



Synthèse de sondes luminescentes utilisant un bras réactif auto-immolable : application à la détection de peptidases

Jean-Alexandre Richard

► To cite this version:

Jean-Alexandre Richard. Synthèse de sondes luminescentes utilisant un bras réactif auto-immolable : application à la détection de peptidases. Chimie organique. INSA de Rouen, 2008. Français. NNT : 2008ISAM0011 . tel-03351439

HAL Id: tel-03351439

<https://theses.hal.science/tel-03351439>

Submitted on 22 Sep 2021

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

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



THESE DE DOCTORAT



Présentée par

Jean-Alexandre RICHARD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES DE L'INSA DE ROUEN

Spécialité Chimie Organique

**Synthèse de sondes luminescentes utilisant
un bras réactif auto-immolable :
Applications à la détection de peptidases**

Soutenue le 20 octobre 2008 devant le jury composé de :

Pr. Nicolas Winssinger

Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Dr. Raymond Ziessel

Directeur de Recherche CNRS, ECPM, Strasbourg

Dr. Benoît Dubertret

Chargé de Recherche CNRS, ESPCI, Paris

Pr. Laurent Bischoff

Professeur, Université de Rouen

Pr. Pierre-Yves Renard

Professeur, Université de Rouen

Dr. Anthony Romieu

Maître de conférences, Université de Rouen

Dr. Pauline Noack-Fraissignes

Chef de projet, QUIDD



THESE DE DOCTORAT



Présentée par

Jean-Alexandre RICHARD

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES DE L'INSA DE ROUEN

Spécialité Chimie Organique

**Synthèse de sondes luminescentes utilisant
un bras réactif auto-immolable :
Applications à la détection de peptidases**

Soutenue le 20 octobre 2008 devant le jury composé de :

Pr. Nicolas Winssinger

Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Dr. Raymond Ziessel

Directeur de Recherche CNRS, ECPM, Strasbourg

Dr. Benoît Dubertret

Chargé de Recherche CNRS, ESPCI, Paris

Pr. Laurent Bischoff

Professeur, Université de Rouen

Pr. Pierre-Yves Renard

Professeur, Université de Rouen

Dr. Anthony Romieu

Maître de conférences, Université de Rouen

Dr. Pauline Noack-Fraissignes

Chef de projet, QUIDD

Remerciements

Cette thèse a été effectuée au sein de l'IRCOF (UMR CNRS 6014 COBRA) dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe de chimie bio-organique du Professeur Pierre-Yves Renard et la société QUIDD. Je tiens à remercier le soutien de la région Haute-Normandie et de QUIDD qui ont permis l'accomplissement de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse le professeur Pierre-Yves Renard pour m'avoir accueilli, conseillé et guidé pendant ces trois années.

Je désire exprimer ma profonde gratitude à mon co-directeur de thèse le docteur Anthony Romieu pour son dynamisme, sa disponibilité, sa réactivité et sa constante bonne humeur qui ont rendu ces moments passés à Rouen extrêmement agréables et formateurs.

Je remercie les membres du jury, Monsieur Nicolas Winssinger, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, Monsieur Raymond Ziessel, Directeur de Recherches au CNRS à l'ECPM de Strasbourg, Monsieur Benoît Dubertret, Chargé de Recherches au CNRS à l'ESPCI de Paris et Monsieur Laurent Bischoff, Professeur à l'Université de Rouen, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de d'évaluer ce travail.

Je remercie Annick Le Boisselier et Elisabeth Roger pour l'aide précieuse qu'elles ont apportée dans la caractérisation des produits.

Je remercie tous mes collègues : Nico, parti vers d'autres horizons, Silvia et Mélanie pour votre humanité et pour toutes nos passionnantes discussions ; Marine, Christine et les étudiants de l'INSA de Rouen pour les bons moments passés ensemble ; les jeunes chercheurs (Alicia, Yves, Virgile) avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et à qui je souhaite plein de réussite pour la suite de leurs travaux ; les doctorants/chercheurs de l'IRCOF et les Quiddous qui ont permis de rendre ces années de thèse inoubliables.

Enfin, je remercie Gaëlle qui a toujours été présente et qui a grandement contribué à la réalisation de cette thèse.

**« Il n'est pas de vent favorable pour celui qui
ne sait pas où il va. »**

Sénèque

**« Celui qui trouve sans chercher est celui qui
a longtemps cherché sans trouver. »**

Gaston Bachelard

**« Qu'importe l'issue du chemin quand seul le
chemin compte. »**

David Lebreton

Abréviations

Abréviations

A	Accepteur
Ac	Acétyle
ACBP	Acyl-Coenzyme Binding Protein
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIF	Facteur d'induction de l'apoptose
Ala (A)	Alanine
AM	Modulation d'amplitude
AMC	7-amino-4-méthylcoumarine
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
APTS	Acide <i>para</i> -toluène sulfonique
aq.	Aqueux
Ar	Aromatique
Arg (R)	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
Asp (D)	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
Bad	Bcl-2-Associated Death promoter
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2–Associated X protein
BB	Tampon borate
BBQ	BlackBerry [®] Quencher
BET	Back Electron Transfer
BHQ	Black Hole Quencher
Bid	BH3 Interacting domain Death agonist
Bn	Benzyle
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène
BOP	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BPO	Benzophénoxazine

Abréviations

br	Large (pour broad)
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
bsrm	Basé sur la récupération du réactif de départ
CAD	Caspase activated DNase
cat.	Catalytique
Cy	Cyanine
CCD	Charged-Coupled Device
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCP	Peptide de pénétration cellulaire
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
α -CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CIEEL	Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CRET	Chemiluminescence Resonance Energy Transfer
CT	Computed Tomography
CTAB	Bromure de cétyltriméthylammonium
Cys (C)	Cystéine
D	Donneur
d	Doublet
DABCYL	4-((4-(diméthylamino)phényl)azo)benzoïque
DABSYL	4-diméthylaminoazobenzene-4"-sulfonyl
dansyl	5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl
DAO	7-hydroxy-9H-(9,9-diméthylacridin-2-one)
dd	Doublet de doublet
DDAO	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one)
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCF	2',7'-dichlorofluorescéine
DCU	Dicyclohexylurée
DEL	Diode ElectroLuminescente
DIEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DIPA	N,N-Diisopropylamine
DISC	Death Signaling Inducing Complex
DMF	N,N-Diméthylformamide

Abréviations

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOT	Diffuse Optical Tomography
DPA	Di-2-picolylamine
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	DL-Dithiothreitol
E	Efficacité
EDANS	Acide 5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EEDQ	<i>N</i> -éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Em.	Emission
Et	Ethyle
EtOH	Ethanol
éq. (eq.)	Equivalent
ESI	Ionisation par électrospray
Ex.	Excitation
FDG	¹⁸ F-fluorodésoxyglucose
FDOPA	¹⁸ F-6-fluoro-3,4 dihydroxyphénylalanine
FDPM	Frequency Domain Photon Migration
FM	Modulation de fréquence
Fmoc	9 <i>H</i> -fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
FMN	Flavine mononucléotide
FMT	Fluorescence Molecular Tomography
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence à la résonance
FRI	Epi-illumination (Fluorescence Reflectance Imaging)
GEA	Groupe électroattracteur
GFP	Green Fluorescent Protein
Glu (E)	Acide glutamique
Gly (G)	Glycine
HATU	Hexafluorophosphate de 2-(7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium
HEPES	Acide 4-(2-Hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole

Abréviations

HOMO	Orbitale la plus haute occupée
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTS	8-hydroxy-1,3,6-pyrènetrisulfonate de trisodium
HRP	Horseradish peroxidase (peroxydase de raifort)
HTP	Protéine HaloTag
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
IBX	Acide 2-iodoxybenzoïque
ICAD	Inhibiteur de CAD
ICG	Indocyanine green
ICT	Transfert de charge interne
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
J.-C	Jésus-Christ
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse
LDA	Lithium diisopropylamide
Luc8	Luciférase <i>Renilla</i>
LUMO	Orbitale la plus basse vacante
Lys (K)	Lysine
M	Molaire ou mol. L ⁻¹
m	Multiplet
MAC	Mitochondrial Apoptosis-induced Channel
MALDI-TOF	Désorption-ionisation laser assistée par matrice - Temps de vol
MAO	Monoamine oxydase
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MHz	Mégahertz
MMP	Métalloprotéase matricielle
mol	Mole
MOM	Méthoxyméthyle
MU	Méthylumbelliférone
MS	Spectroscopie de masse
N	Normalité
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
n.d.	Non déterminé

Abréviations

NHC	Carbène N-Hétérocyclique
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMP	<i>N</i> -Méthyl-2-pyrrolidone
Nu	Nucléophile
P	Groupe protecteur
PABA	Alcool <i>p</i> -aminobenzylique
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymérase
PB	Tampon phosphate
PBS	Tampon phosphate (Phosphate Buffered Saline)
PGA	Penicillin G acylase (ou Penicillin amidase)
PCC	Pyridinium chlorochromate
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
PMB	<i>para</i> -méthoxybenzyle
ppm	Partie par million
Pro (P)	Proline
PSA	Prostate Specific Antigen
PT	Permeability Transition pore
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
q	Quadruplet
QD	Quantum Dot
QOS TM	Quidd Optical System
quant.	Quantitatif
Quidd	Quantitative Imaging in Drug Development
R ₀	Rayon de Förster
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography
RX	Rayons X
S, s	Singulet
Ser (S)	Sérine
SNAr	Substitution nucléophile aromatique
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T, t	Triplet

Abréviations

TAS-F	Tris(diméthylamino)sulfonium de difluorotriméthylsilicate
TBAF	Fluorure de tétrabutylammonium
TBAI	Iodure de tétrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TDM	Tomodensitométrie
TDPM	Time Domain Photon Migration
TEA	Triéthylamine
TEAB	Bicarbonate de triéthylammonium
TEMP	Tomographie d'émission monophotonique
TeP	Transfert d'électron Photoinduit
TEP	Tomographie par émission de positrons
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TCP	Transfert de charge photoinduit
TLC	Thin Layer Chromatography
TMAF	Fluorure de tétraméthylammonium
TMSE	TriMéthylSilylEthyle
TMS	Triméthylsilyle
TMSI	Iodure de triméthylsilyle
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPP	Tétraphénylporphyrine
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Death Domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSTU	Tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-O-(<i>N</i> -succinimidyl)uronium
UV	Ultraviolet
Val (V)	Valine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Z (Cbz)	Benzyloxycarbonyle

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction – Lumière et imagerie *in vivo*

I	LA LUMINESCENCE	2
1	Lumière et luminescence.....	2
1. 1	La lumière.....	2
1. 2	La luminescence	4
2	La spectroscopie de fluorescence	5
2. 1	Les paramètres de la fluorescence	6
2. 1. 1	Le diagramme de Perrin-Jablonski	6
2. 1. 2	Les temps de vie de la fluorescence	8
2. 1. 3	Le déplacement de Stokes.....	10
2. 1. 4	Le rendement quantique	10
2. 1. 5	Le coefficient d'absorption atomique ϵ	11
2. 1. 6	La brillance.....	11
2. 2	Les paramètres qui influencent la fluorescence	11
2. 2. 1	Les différents processus de désexcitation	11
2. 2. 2	Les effets environnementaux	12
2. 2. 3	Le photoblanchiment.....	13
2. 3	Les fluorophores.....	14
2. 3. 1	La fluorescence des produits naturels	15
2. 3. 2	Les fluorophores polyaromatiques	16
2. 3. 3	Les coumarines.....	17
2. 3. 4	Les dérivés du noyau xanthène	19
2. 3. 5	Les oxazines	23
2. 3. 6	Les BODIPYs	25
2. 3. 7	Les cyanines	28
3	La fluorescence comme outil analytique : les sondes fluorescentes activables.....	32

3. 1	Le Transfert d'électron Photoinduit	34
3. 2	Le FRET	36
3. 3	Le Transfert de Charge Photoinduit.....	40
3. 4	Le Transfert de Proton Photoinduit.....	41
3. 5	La pro-fluorescence	41
3. 6	Exemples de sondes fluorescentes activables.....	42
3. 6. 1	Les sondes à pH	43
3. 6. 2	Les sondes à cations et anions.....	46
3. 6. 3	La détection d'enzymes.....	52
II	L'IMAGERIE MOLECULAIRE	57
1	Introduction	57
2	Les différents types d'imagerie moléculaire	58
3	L'imagerie optique	63
3. 1	Introduction.....	63
3. 2	La pénétration de la lumière dans les tissus	63
3. 3	Les agents de contraste	66
3. 3. 1.	Les méthodes directes	66
3. 3. 2.	Les méthodes indirectes	67
3. 4	L'instrumentation.....	68
3. 4. 1	L'imagerie planaire	68
3. 4. 2	La tomographie de fluorescence	71
3. 5	Conclusion - Perspectives	73

Chapitre 2 : Synthèse de sondes pro-fluorescentes pour la détection de peptidases

I LA DETECTION DE PEPTIDASES	76
II LES BRAS REACTIFS AUTO-IMMOLABLES	81
1 Définition et applications en thérapie.....	81
2 Extension aux sondes pro-fluorescentes	84
III CHOIX DES CIBLES	88
1 Une peptidase modèle : la Pénicilline G Acylase (PGA)	88
2 Une enzyme d'intérêt : la caspase-3.....	90
2. 1 L'apoptose	90
2. 2 Le processus apoptotique	91
2. 2. 1 La voie extrinsèque	92
2. 2. 2 La voie intrinsèque	93
2. 2. 3 Le rôle des caspases	95
2. 3 La détection de la caspase-3	97
2. 3. 1 Les sondes auto-quenchées	97
2. 3. 2 Les sondes FRET	98
2. 3. 3 Les sondes pro-fluorescentes	101
2. 3. 4 Autres sondes	104
IV UTILISATION D'UN BRAS REACTIF DERIVE DE L'ACIDE HOMOVANILLIQUE	105
1 Principe	105
2 Synthèse de sondes pour la détection de la PGA	106
3 Synthèse de sondes pour la détection de la caspase-3	108
3. 1 Synthèse du térapeptide DEVD.....	110
3. 1. 1 Stratégie.....	110
3. 1. 2 Synthèse du dipeptide Ac-DE-OH	111

3. 1. 3 Synthèse du dipeptide H ⁺ -VD-Bn	113
3. 1. 4 Synthèse du tétrapeptide Ac-DEVD-OH	114
3. 2 Synthèse et introduction du linker de H. Waldmann	114
V UTILISATION D'UN BRAS REACTIF DERIVE DE L'ALCOOL <i>p</i>-AMINO BENZYLIQUE	119
1 Introduction	119
2 Utilisation du PABA pour la détection de la PGA	120
2. 1 Introduction de la 7-hydroxycoumarine	120
2. 1. 1 Synthèse	120
2. 1. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la PGA	121
2. 2 Extension aux fluorophores émettant dans le rouge	125
2. 2. 1 Synthèse	125
2. 2. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la PGA	126
3 Utilisation du PABA pour la détection de la caspase-3.....	130
3. 1 Introduction de la 7-hydroxycoumarine	130
3. 1. 1 Synthèse	130
3. 1. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la caspase-3	135
3. 1. 3 Détermination des paramètres de cinétique	136
3. 2 Introduction de DAO	137
3. 2. 1 Synthèse	137
3. 2. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la caspase-3	137
3. 3 Conclusion	143
VI DEVELOPPEMENT DE PRO-FLUOROPHORES HYDROSOLUBLES EMETTANT DANS LE PROCHE IR.....	144
1 Stratégie.....	144
2 Synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine	147
2. 1 Synthèse des aldéhydes précurseurs.....	147
2. 2 Synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine	149

3 Caractéristiques spectrales des hybrides hémicyanine-coumarine	152
4 Application à la détection de la PGA.....	155
VII CONCLUSION-PERSPECTIVES	158

Chapitre 3 : Synthèse de sondes chémiluminescentes pour la détection de peptidases

I LA CHEMILUMINESCENCE	162
1 La bioluminescence	162
1.1 Origines et mécanismes de la bioluminescence	162
1.2 Applications de la bioluminescence	165
2 La Chémiluminescence	168
3 Les sondes chémiluminescentes.....	175
II SYNTHÈSE ET EVALUATION D'UNE SONDE CHEMILUMINESCENTE POUR LA DETECTION DE LA CASPASE-3.....	177
1 Résultats préliminaires	177
2 Synthèse de la sonde chémiluminescente	179
3 Clivage par la caspase-3.....	181
4 Conclusion.....	185
III AUGMENTATION DE L'EMISSION DES DIOXETANES ET EXTENSION DE L'EMISSION VERS LE ROUGE.....	186
1 Remarques préliminaires	186
2 Première stratégie : Transfert d'énergie à travers l'espace	189
2.1 Principe	189
2.2 Synthèse	191
3 Deuxième stratégie : Transfert d'énergie à travers les liaisons	197
3.1 Introduction.....	197

3. 2 Synthèse d'un cœur chémiluminescent dérivé du naphthalène	200
3. 2. 1 Synthèse	200
3. 2. 2 Conclusion	210
3. 3 Synthèse d'un cœur chémiluminescent dérivé phénylique.....	210
IV CONCLUSION	214

Chapitre 4 : Experimental section

I GENERAL PROCEDURES.....	219
II SYNTHESIS OF PRO-FLUORESCENT PROBES.....	223
III SYNTHESIS OF CHEMILUMINESCENT PROBES.....	251
IV ENZYMATIC KINETICS.....	278
1 Fluorogenic probes	278
2 Chemiluminescent probes.....	280

Chapitre 5 : Conclusions - Perspectives

I CONCLUSIONS.....	283
II PERSPECTIVES	288

La société QUIDD (QUantitative Imaging in Drug Development – www.quidd.com) a été créée en octobre 2003. Elle emploie actuellement une vingtaine de personnes : des chefs de projet, ingénieurs en informatique et optique, et des chercheurs en chimie et biologie.

QUIDD a établi des collaborations avec différents laboratoires universitaires régionaux, notamment avec l'UMR6014, COBRA à l'IRCOF (Institut de Recherche en Chimie Organique Fine, Rouen), les unités INSERM U413 (Université de Rouen) et U644 (CHU de Rouen), ainsi qu'avec de nombreux laboratoires à l'échelle nationale et internationale.

QUIDD est une société qui développe des technologies dans le domaine de l'imagerie pré-clinique *in vivo* du petit animal. Son ambition est d'améliorer le processus de découverte de nouveaux médicaments avec pour objectif final leur évaluation chez l'homme. L'activité de l'entreprise se répartit sur trois départements :

- Un département chimie chargé de développer des sondes intelligentes spécifiques de phénomènes biologiques ciblés.
- Un département biologie chargé de développer des modèles biologiques permettant la validation et l'optimisation des sondes dans un organisme vivant.
- Un département physique chargé de la conception, de l'installation et de la gestion de plateformes d'imagerie optique, c'est-à-dire le développement d'un imageur optique QOSTM (Quidd Optical System) et de logiciels de modélisation.

Dans ce contexte, le département chimie de QUIDD collabore avec l'équipe du Pr. Pierre-Yves Renard et du Dr. Anthony Romieu dans le but de concevoir et synthétiser des sondes intelligentes capables de détecter des événements biologiques *in vivo*. Cette thèse, effectuée avec le soutien de la région Haute-Normandie sous la forme d'une bourse régionale industrielle (BRI), s'inscrit dans le cadre cette collaboration.

Chapitre 1

Introduction

Lumière et imagerie *in vivo*

Introduction

Lumière et imagerie *in vivo*

I LA LUMINESCENCE

1 Lumière et luminescence

1.1 La lumière

La lumière est essentielle à la vie telle que nous la connaissons sur Terre puisqu'elle fournit aux végétaux l'énergie pour effectuer la photosynthèse. A travers la photosynthèse, la lumière permet de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique *via* la synthèse des sucres. La photosynthèse permet également de fournir le dioxygène dont nous avons besoin et de consommer le gaz carbonique que nous émettons. La fascination pour la lumière remonte à plus de 2000 ans déjà où les philosophes grecs Pythagore, Empédocle, Démocrite ou Aristote spéculaient sur sa nature, sa vitesse (« inexprimable » d'après les écrits de Démocrite) ou la manière dont elle se propage. Les travaux d'Euclide (~ 325 avant J.-C. - ~ 265 avant J.-C.), Snellius (1581-1626) puis Descartes (1596-1650) et Fermat (1601-1665) en optique géométrique ont ensuite apporté de conséquentes avancées concernant les mécanismes de propagation de la lumière mais sa nature même restait encore à découvrir.

Le 17^{ème} siècle a permis les premières investigations concernant la nature de la lumière et ont jeté les prémices qui ont abouti aux théories telles que nous les connaissons aujourd'hui. Huyghens (1629-1695) compare la lumière au son et pour la première fois émet l'hypothèse que la lumière est un phénomène vibratoire qui se propage par ondes. Parallèlement, Newton (1642-1727) est le premier à supposer que la lumière pouvait être représentée comme des corpuscules. Malgré les insuffisances de sa théorie, la notoriété de Newton est telle que la

majorité des physiciens du 18^{ème} siècle y adhère et ignore la théorie ondulatoire. Ce n'est que grâce aux travaux de Young (1743-1829) et surtout de Fresnel (1788-1827) que la théorie ondulatoire refait surface et s'impose à la communauté scientifique. Mais un évènement majeur dans l'histoire de la lumière découle des théories de Maxwell (1831-1879) sur l'électromagnétisme et de sa démonstration expérimentale effectuée par Hertz (1857-1894). En effet, l'élaboration des lois de l'électromagnétisme permet de considérer la lumière comme n'étant qu'un cas particulier des ondes électromagnétiques pouvant être vues par l'œil humain. En effet, la rétine contient des récepteurs qui sont sensibles aux longueurs d'onde comprises entre 400 et 700 nm. Au-delà de ces longueurs d'onde correspondent les rayons infrarouges ($700 \text{ nm} < \lambda < 1 \text{ mm}$), les micro-ondes ($1 \text{ mm} < \lambda < 10 \text{ cm}$), les ondes radio ($\lambda > 10 \text{ cm}$) tandis que les longueurs d'onde inférieures correspondent aux rayonnements ultraviolets ($10 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$), rayons X ($5 \text{ pm} < \lambda < 1 \text{ nm}$) et rayons γ ($\lambda < 5 \text{ pm}$) (Figure 1-1).

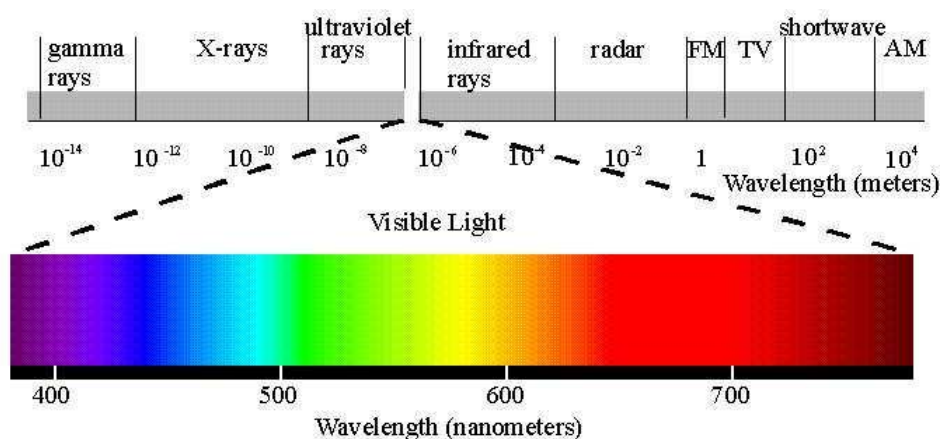


Figure 1-1. Le spectre électromagnétique.

L'universalité de la théorie ondulatoire ainsi admise à la fin du 19^{ème} siècle, Max Planck (1858-1947) apporte un retour à la théorie corpusculaire avec sa théorie des *quanta*. Il montre que l'énergie lumineuse ne s'échange pas avec la matière de façon continue mais seulement par des *paquets* d'énergie appelés *quanta* d'énergie $E = h\nu$ (ν fréquence du rayonnement ; h constante de Planck, $h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$), plus tard appelés photons.

Ainsi, l'état de la science à ce jour permet de définir la lumière comme une onde électromagnétique transportant des photons dont l'énergie est proportionnelle à la fréquence de l'onde ($E = h\nu$). Les récentes avancées de la physique visent à unifier cette dualité onde-particule et marquent une nouvelle étape dans cette passionnante histoire de la lumière.

1. 2 La luminescence

Le soleil et le feu sont des sources de lumière qui ont permis aux hommes de s'éclairer et de se chauffer. L'origine de cette lumière est thermique car elle est émise par des corps chauffés à haute température : ce phénomène est appelé incandescence et on parle de lumière *chaude*. La lumière peut aussi résulter d'autres phénomènes qui ne sont pas d'origine thermique : il s'agit de la luminescence, appelée aussi lumière *froide*. Ainsi, la luminescence peut être définie comme l'émission d'une lumière dans le domaine ultraviolet, visible ou infrarouge grâce à une espèce excitée qui revient à l'état fondamental en émettant de la lumière (Figure 1-2).

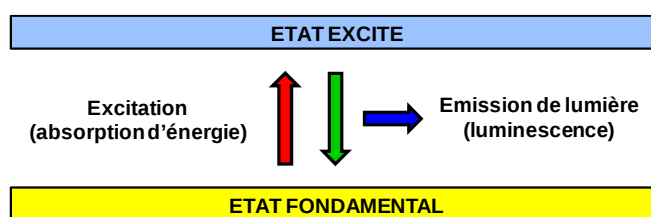


Figure 1-2. Principe de la luminescence.

Les espèces luminescentes peuvent être classées selon leur nature :¹

- Composés organiques : composés aromatiques (naphtalène, anthracène, phenanthrène, pyrène, pérylène, ...), fluorescéine, rhodamine, coumarine, oxazines, polyènes, acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine), etc. (*vide infra*)
- Composés inorganiques : ion uranyle (UO_2^+), surfaces dopées avec divers éléments métalliques (Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, ...), nanocristaux (ou Quantum Dots (QD's) à base de ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, ...), etc.²
- Composés organométalliques : complexes de ruthénium ($[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ par exemple), complexes de lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), etc.³
- Biomolécules (protéines, oligonucléotides, ...).

¹ Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 2001.

² Pour des revues récentes sur l'utilisation de nanoparticules et QD dans le domaine de l'imagerie, voir Green, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4129-4131. Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, 4, 435-446. Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. *Science* **2005**, 307, 538-544. Maysinger, D. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2335-2342. Zhou, M.; Ghosh, I. *Biopolymers* **2007**, 88, 325-339. Pour une intéressante comparaison entre QD et fluorophores organiques, Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. *Nat. Methods* **2008**, 5, 763-775.

³ Bunzli, J. C. G.; Piguet, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 1048-1077. Hemmila, I.; Laitala, V. *J. Fluoresc.* **2005**, 15, 529-542. de Bettencourt-Dias, A. *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 1460-1480. Roda, A.; Guardigli, M.; Ziessel, R.; Mirasoli, M.; Michelini, E.; Musiani, M. *Microchem. J.* **2007**, 85, 5-12. Charbonniere, L. J.; Hildebrandt, N. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 3241-3251.

Il existe de nombreux types de luminescence qui se distinguent par le mode d'excitation de l'espèce émettrice (Tableau 1-1).

Modes d'excitation	Types de luminescence
Lumière	Photoluminescence (Fluorescence-Phosphorescence)
Réaction chimique	Chémiluminescence
Réaction biochimique	Bioluminescence
Rayonnements ionisants	Radioluminescence
Electrons accélérés	Cathodoluminescence
Champ électrique	Electroluminescence
Elévation de température	Thermoluminescence
Ultrasons	Sonoluminescence
Frottement, rupture, déformation	Triboluminescence

Tableau 1-1. Les différents types de luminescence (Source réf. 1).

Parmi les différents modes d'excitation, l'électroluminescence trouve des applications dans la vie quotidienne dans les télévisions et dans l'affichage électronique avec les Diodes ElectroLuminescentes (DEL). Les modes les plus intéressants pour notre étude sont d'une part la chémiluminescence et la bioluminescence, c'est à dire lorsque l'état excité est atteint grâce à une réaction chimique ou biochimique. Lorsque d'autre part l'état excité est atteint par l'absorption d'un photon, il s'agit de photoluminescence qui est elle même divisée en fluorescence et phosphorescence en fonction de la nature de l'état excité.

2 La spectroscopie de fluorescence

La fluorescence a connu un énorme développement ces vingt dernières années avec des applications dans la détection de nombreux analytes (métaux, ADN, enzymes, sucres, etc.), dans l'établissement de la structure ou dans la mesure de la distance entre des biomolécules, dans le séquençage de l'ADN, l'analyse génétique, etc. Outre sa grande sensibilité, l'intérêt majeur de la fluorescence réside dans sa facilité de mise en œuvre et son moindre coût comparativement aux méthodes d'imagerie par résonance magnétique nucléaire ou radiochimiques.

La fluorescence et la phosphorescence sont des cas particuliers de luminescence.⁴ Le mode d'excitation est l'absorption d'un photon qui amène une espèce à un état électronique excité qui revient à l'état fondamental en émettant de la lumière. La fluorescence résulte d'un état excité ayant le même état de spin qu'à l'état fondamental tandis qu'un changement de spin de l'état excité conduit à la phosphorescence. Ce phénomène est coûteux en énergie, mais permet d'avoir des temps d'émission nettement plus longs.

Dans un premier temps, les différents paramètres (déplacement de Stokes, τ , Φ_F , ϵ , B) propres à chaque fluorophore vont être présentés dans la mesure où ils permettent d'évaluer la qualité de l'émission de fluorescence. Dans un second temps seront exposés les différents éléments environnementaux qui peuvent influencer sur la fluorescence et qui permettent d'expliquer et rationaliser la qualité de l'émission. Enfin, les différentes familles de fluorophores et leurs applications dans la détection de diverses espèces seront détaillées.

2.1 Les paramètres de la fluorescence^{1,4}

2.1.1 Le diagramme de Perrin-Jablonski

Le diagramme de Perrin-Jablonski permet de visualiser les différents processus mis en jeu lors du phénomène de fluorescence (Figure 1-3).

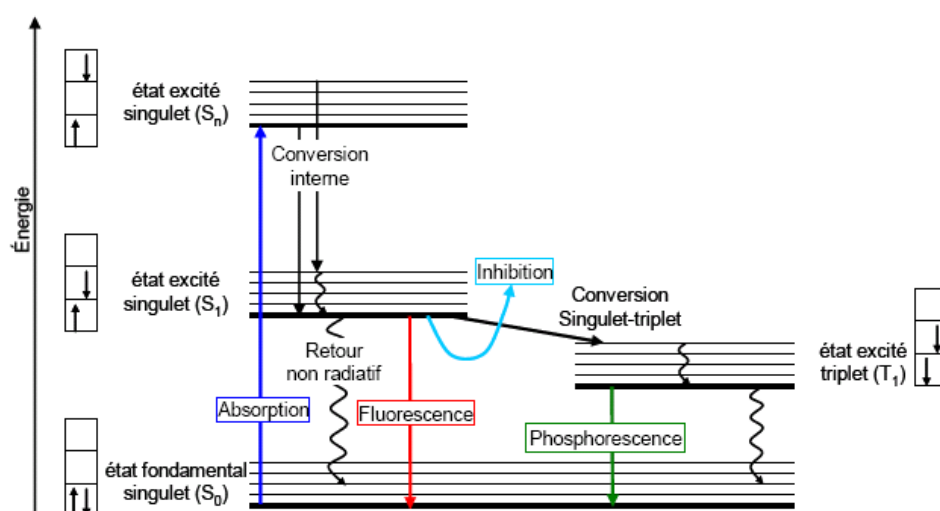


Figure 1-3. Diagramme de Perrin-Jablonski.

L'absorption d'un photon permet l'obtention d'un état excité singulet (S_n) qui est suivie d'une rapide conversion interne. La conversion interne est une transition non radiative entre deux

⁴ Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Kluwer Academic / Plenum: New-York, 1999.

états électroniques de même multiplicité de spin. En solution, celle-ci est suivie d'une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique final (S_1). Le temps de conversion interne étant plus rapide ($\sim 10^{-12}$ s) que le temps de vie à l'état excité ($\sim 10^{-8}$ s, *vide infra*), c'est à partir de cet état excité commun que l'espèce subit un processus de désexcitation qui peut se faire sous la forme de :

- **Retour non radiatif** : le même processus de conversion interne peut être observé entre S_1 et S_0 . Celui-ci est peu favorisé à cause de la grande différence d'énergie entre S_1 et S_0 comparativement au passage de S_n à S_1 .
- **La fluorescence** : l'émission de photons accompagnant le passage de S_1 à S_0 est appelée fluorescence. En raison de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle à l'état excité, l'émission s'effectue à des énergies plus basses, ce qui a pour conséquence l'observation de la fluorescence à des longueurs d'ondes plus grandes. L'émission de fluorescence se produisant à partir de l'unique état excité S_1 , la longueur d'onde émission observée ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation.
- **Conversion singulet (S_1) - triplet (T_1)** (ou passage/croisement intersystème) : le croisement intersystème est un processus non radiatif entre deux systèmes vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicité différente. Le passage entre des états de multiplicité différente est en principe interdit mais le couplage spin-orbite entre le moment magnétique orbital et le moment magnétique de spin peut être suffisamment important pour le rendre possible. En particulier, la présence d'atomes d'halogène augmente le couplage spin-orbite et favorise le passage intersystème selon un phénomène appelé effet d'atome lourd (ou « heavy atom effect »).
- **Désexcitation à partir de T_1** : en solution et à température ambiante, la désexcitation non radiative est favorisée car le passage de T_1 à S_0 est en théorie interdit. Ainsi, sa vitesse est très faible et le processus non radiatif s'effectue *via* des collisions de l'espèce excitée avec les molécules de solvant. En revanche, à basse température et/ou dans un milieu rigide, les collisions sont inhibées et l'émission de lumière peut être observée : c'est la phosphorescence. Il est intéressant de noter que puisque le niveau énergétique de T_1 est inférieur à celui de S_1 , le spectre de phosphorescence se situe à des longueurs d'ondes plus élevées.

- **Inhibition de fluorescence** (aussi appelée « quenching ») : l'inhibition de fluorescence peut être due à des collisions de l'espèce excitée avec d'autres molécules ou atomes de l'environnement telles que le dioxygène, les amines, les halogènes (en favorisant le croisement intersystème), les molécules électro-déficientes, le solvant ou un autre fluorophore. Par exemple, la concentration du fluorophore peut s'avérer cruciale dans la mesure où une concentration trop forte peut conduire à une auto-inhibition de la fluorescence. Cette inhibition est liée soit à l'augmentation du nombre de collisions entre les molécules (« quenching dynamique ») soit à cause de la formation de complexes, d'agrégats ou de polymères non fluorescents (« quenching statique »).⁵ Il a en général lieu entre deux mêmes fluorophores mais peut aussi s'effectuer entre deux fluorophores différents.
- **Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)** : une dernière possibilité consiste à transférer l'énergie à un accepteur qui dissipe l'énergie de manière non radiative ou émet à sa propre longueur d'onde. Ce phénomène, lié à des transferts dipôle-dipôle a lieu à courte distance et a de nombreuses applications ; il sera présenté et discuté ultérieurement.

2. 1. 2 Les temps de vie de la fluorescence

A tous ces processus sont associés des temps caractéristiques (Tableau 1-2) :

Temps caractéristiques
Absorption-Emission : 10^{-15} s
Relaxation vibrationnelle : 10^{-12} - 10^{-10} s
Durée de vie de l'état excité S_1 : 10^{-10} - 10^{-7} s
Croisement intersystème : 10^{-10} - 10^{-8} s
Conversion interne : 10^{-11} - 10^{-9} s
Durée de vie de l'état excité T_1 : 10^{-6} - 1 s

Tableau 1-2. Temps caractéristiques des processus de fluorescence.

Les processus d'absorption et d'émission sont plus rapides que la phosphorescence qui est un processus beaucoup plus lent car la transition T_1-S_0 est théoriquement interdite. La conversion

⁵ Johansson, M. K.; Cook, R. M. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3466-3471.

interne est plus rapide que la durée de vie de l'état excité, ce qui explique pourquoi l'émission se fait à partir d'un unique état excité S_1 (règle de Kasha).

Un des paramètres les plus importants de la fluorescence est la durée de vie de l'état excité τ qui correspond au temps moyen où l'espèce reste à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental (10^{-8} s en moyenne). τ s'exprime comme étant l'inverse de la somme des vitesses de désexcitation radiatives et non radiatives (Figure 1-4).

$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$	τ : Durée de vie à l'état excité k_r : Constante de vitesse pour la désexcitation radiative k_{nr} : Constante de vitesse pour la désexcitation non radiative
---------------------------------	--

Figure 1-4. Durée de vie de l'état excité.

τ est le temps requis pour que la concentration en molécules fluorescentes décroisse d'un facteur $1/e$ par rapport à sa valeur initiale. Il permet de définir la fenêtre de temps où il est possible d'observer l'émission de lumière. En effet, lors du phénomène de fluorescence, il est possible de distinguer trois temps : les périodes de « vie privée » ($t < \tau/100$) et de « mort » de l'espèce ($t > 10 \tau$) sont des périodes où il n'est pas possible d'avoir d'informations précises sur la fluorescence. La « vie publique » de la molécule est la période intermédiaire entre celles-ci et permet l'observation de l'émission de fluorescence (Figure 1-5).

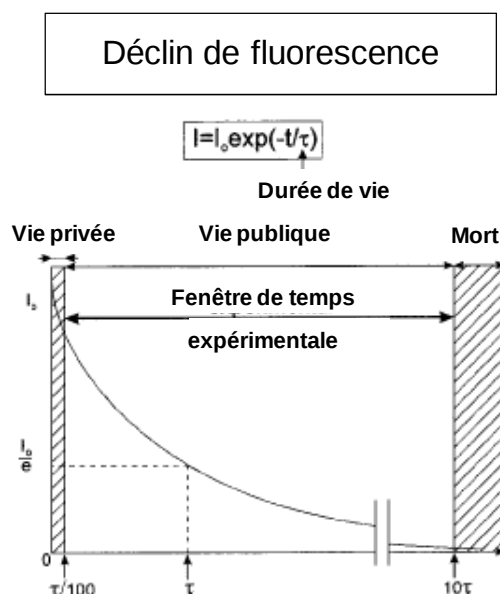


Figure 1-5. Déclin de l'intensité de fluorescence (Source réf. 1).

2. 1. 3 Le déplacement de Stokes

La perte d'énergie entre l'état excité S_n et S_1 est responsable d'une émission à une plus grande longueur d'onde que la longueur d'onde d'excitation. La différence entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission est appelée le déplacement de Stokes (Figure 1-6).

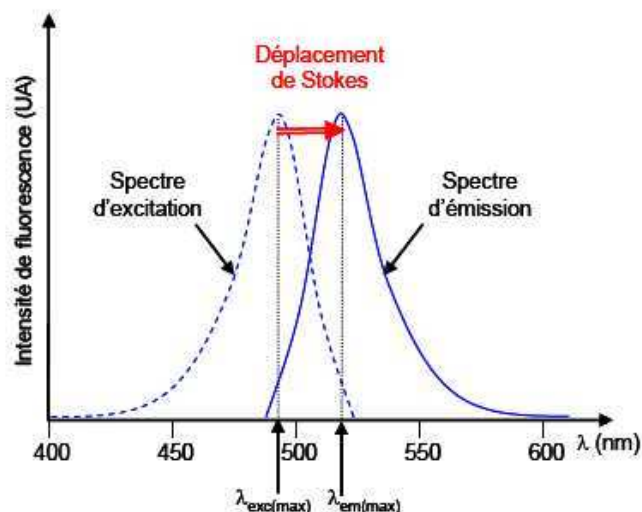


Figure 1-6. Le déplacement de Stokes.

Le déplacement de Stokes est d'une grande importance dans la perspective de mise au point de sondes fluorescentes. En effet, un faible déplacement Stokes peut être responsable d'auto-quenching, notamment dans le cas où un grand nombre de fluorophores sont incorporés sur la biomolécules, ou de superpositions de spectres d'émission et d'excitation. Ceci est lié à la difficulté pour filtrer efficacement la lumière incidente diffusée (à la longueur d'onde d'excitation du système) et le signal d'émission, à moins d'utiliser un laser monochromatique, mais ce qui limite alors les longueurs d'onde accessibles. Ainsi, utiliser des fluorophores ayant un déplacement Stokes important (> 50 nm) permet d'améliorer la détection grâce à un meilleur rapport signal/bruit et ainsi minimise les erreurs de mesures.

2. 1. 4 Le rendement quantique

Le rendement quantique Φ_F est la fraction de molécules excitées qui retourne à l'état fondamental S_0 avec une émission de photons. C'est un paramètre très important qui permet d'évaluer l'efficacité d'émission d'un fluorophore. Il correspond au rapport entre la quantité de photons émise par l'espèce excitée sur la quantité de photons absorbée ($\Phi_F \leq 1$, figure 1-7).

$$\Phi_F = \frac{\text{Quantité de photons émis}}{\text{Quantité de photons absorbés}}$$

Figure 1-7. Définition du rendement quantique.

2. 1. 5 Le coefficient d'absorption atomique ϵ

Le coefficient d'absorption atomique traduit l'efficacité avec laquelle l'espèce excitée absorbe la lumière. Il est relié à l'absorption et à la concentration de l'espèce par la loi de Beer-Lambert (Figure 1-8):

$A = \epsilon \cdot l \cdot C$	A : Absorbance à la longueur d'onde λ ϵ : Coefficient d'extinction molaire $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ l : longueur du trajet optique (longueur de la cuve utilisée en cm) C : Concentration de la solution ($mol \cdot L^{-1}$)
--------------------------------	--

Figure 1-8. Loi de Beer-Lambert.

D'une manière générale, plus une espèce est capable d'absorber la lumière, plus elle a de chances d'en restituer un maximum. Associé au rendement quantique, ce coefficient d'extinction molaire permet d'obtenir une quantification de la quantité de lumière attendue d'un fluorophore *via* la brillance.

2. 1. 6 La brillance

Afin de disposer d'un unique paramètre qui puisse donner une idée de l'efficacité d'un fluorophore, le terme de brillance $B = \Phi_F \times \epsilon$ qui est le produit entre le rendement quantique Φ_F et le coefficient d'extinction molaire ϵ a été introduit. Ce paramètre reflète à la fois la capacité d'absorption du fluorophore et sa capacité à restituer de la lumière. C'est le terme le plus à même de permettre de comparer efficacement les fluorophores entre eux.

2. 2 Les paramètres qui influencent la fluorescence

2. 2. 1 Les différents processus de désexcitation

De nombreux processus de relaxation du fluorophore peuvent avoir lieu et sont résumés sur la figure 1-9 :

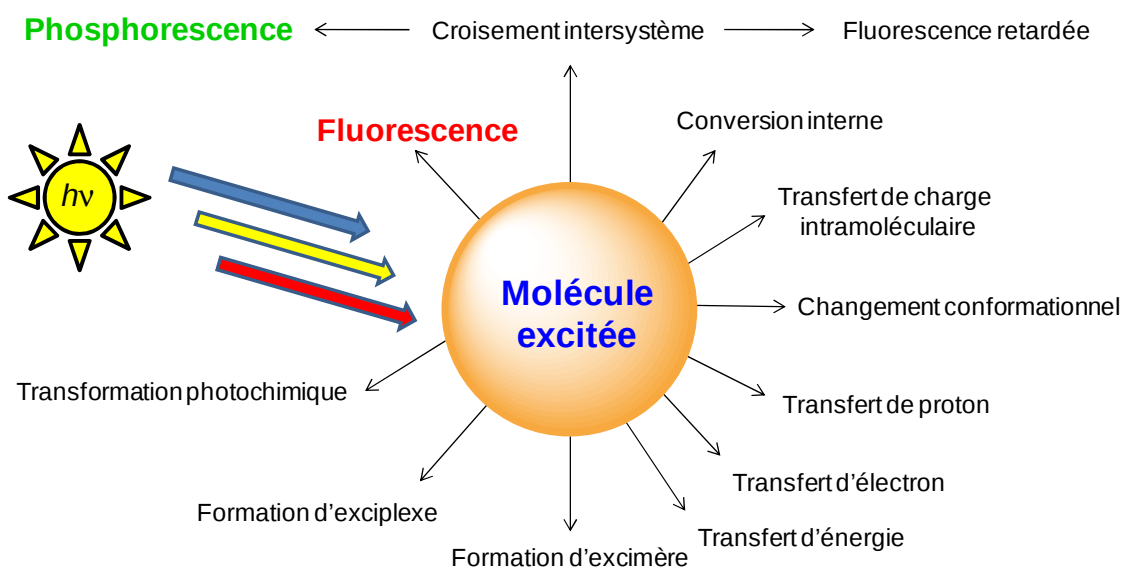


Figure 1-9. Les processus de désexcitation du fluorophore (Source réf. 1).

Parmi les différentes possibilités, les voies qui mènent à l'émission de fluorescence ou de phosphorescence sont en concurrence avec de nombreux autres processus comme des transferts de proton, d'électron ou d'énergie, la formation d'excimère (pour « excited dimer », c'est-à-dire la formation d'un dimère à l'état excité entre deux molécules identiques) ou d'exciplexe (il s'agit de la même chose que l'excimère mais entre deux molécules différentes), etc. Toutes ces voies concurrencent la fluorescence et sont donc à prendre en compte pour expliquer l'efficacité d'émission d'un fluorophore.

2. 2. 2 Les effets environnementaux

Tous les phénomènes de relaxation présentés ci-dessus sont en général liés à l'environnement direct de la molécule fluorescente à l'état excité, ce qui explique l'utilisation de ces espèces chimiques simples comme senseurs de phénomènes complexes (Figure 1-10).

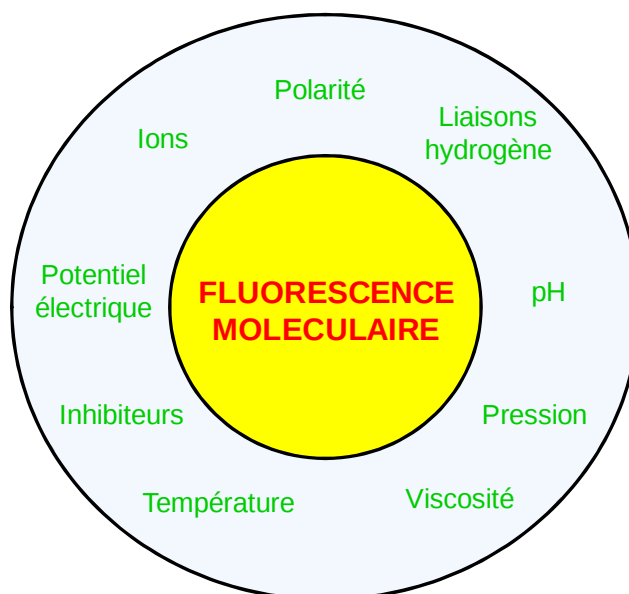


Figure 1-10. Effets de l'environnement sur la fluorescence moléculaire (Source réf. 1).

La viscosité, la température, la pression peuvent modifier les interactions de la molécule à l'état excité avec le solvant et favorisent plus ou moins la relaxation non radiative.

Le succès de la spectroscopie de fluorescence vient de sa haute sensibilité dans la détection des variations de l'environnement proche du fluorophore. Ainsi, la modification de différents paramètres tels que la présence d'ions dans le milieu ou un changement de pH peut être détecté par fluorescence, c'est le principe des sondes fluorescentes. Le revers de la médaille est que plusieurs phénomènes différents pouvant influencer sur la fluorescence, il peut être parfois délicat d'attribuer avec certitude une modification du signal à un phénomène unique et précis.

2. 2. 3 Le photoblanchiment

Le photoblanchiment (ou « photobleaching ») est un paramètre supplémentaire qu'il faut prendre en compte lors d'études de fluorescence. Le photoblanchiment consiste en l'extinction de l'émission d'un fluorophore à la suite d'une illumination continue et prolongée. En effet, à l'état excité, le fluorophore peut réagir avec des molécules de son environnement (e.g., l'oxygène, l'eau, etc) de façon irréversible en créant des liaisons covalentes, voire se décomposer spontanément s'il est photosensible. La qualité d'un fluorophore dépend donc de sa capacité à résister le plus longtemps possible au photoblanchiment.

2.3 Les fluorophores

Parmi les différentes espèces fluorescentes existantes, nous nous limiterons aux fluorophores organiques qui sont à la fois les plus utilisés et ceux qui nous ont intéressés au cours de notre étude.⁶ En particulier, nous n'aborderons donc volontairement pas ici l'ensemble des protéines fluorescentes comme la GFP (Green Fluorescent Protein).⁷ Un intéressant panorama sur l'état de l'art concernant la chimie des fluorophores organiques, tirée d'une revue récente publiée par L. D. Lavis et R. T. Raines est reproduite sur la figure 1-11.⁸ Cette compilation permet d'observer qu'il est possible de classer les fluorophores par famille, chacune d'entre elles couvrant une partie du spectre électromagnétique.

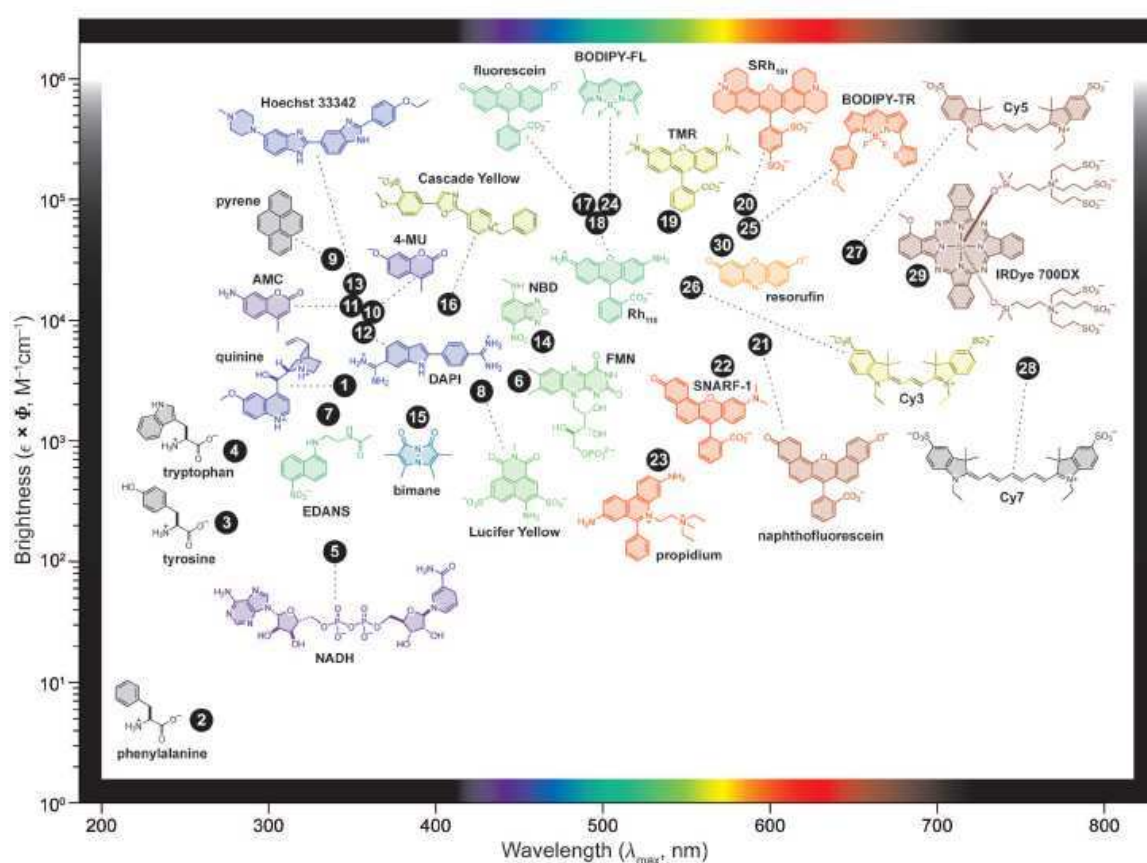


Figure 1-11. Les familles de fluorophores organiques : la brillance ($B = \epsilon \times \Phi_F$) est représentée en fonction du $\lambda_{\max}$. Les couleurs des fluorophores correspondent à la longueur d'onde à laquelle ils émettent (Source réf. 8).

⁶ Pour une revue incluant également le marquage de biomolécules à l'aide de matériaux inorganiques, voir Wang, F.; Tan, W. B.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wang, M. *Nanotechnology* **2006**, 17, R1-R13.

⁷ Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544. Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Nat. Methods* **2005**, 2, 905-909. Zacharias, D. A.; Tsien, R. Y. *Methods Biochem. Anal.* **2006**, 47, 83-120.

⁸ Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 142-155.

2. 3. 1 La fluorescence des produits naturels

Certains produits naturels courants sont intrinsèquement fluorescents. Parmi ceux-ci, la quinine est très importante historiquement,⁹ non seulement pour ses propriétés anti-malariques mais aussi puisqu'elle est le premier fluorophore organique à avoir été identifié (Figure 1-12).



Figure 1-12. Mise en évidence de la fluorescence de la quinine dans une boisson gazeuse (Source de l'image : « Quinine » sur Wikipédia France).

Certains acides aminés possédant des cycles aromatiques comme la phénylalanine et la tyrosine sont également (faiblement) fluorescents. En revanche, le tryptophane a des caractéristiques de fluorescence plus importantes qui ont été mises à profit dans des applications utilisant des phénomènes d'extinction de fluorescence (par FRET, quenching dynamique ou statique) ou de Transfert d'électron Photoinduit (TeP, *vide infra*). D'autres fluorophores naturels comme le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), la flavine mononucléotide (FMN) ou les porphyrines présentent également des caractéristiques de fluorescence (Figure 1-13).

⁹ Teodoro S. Kaufman, E. A. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 854-885.

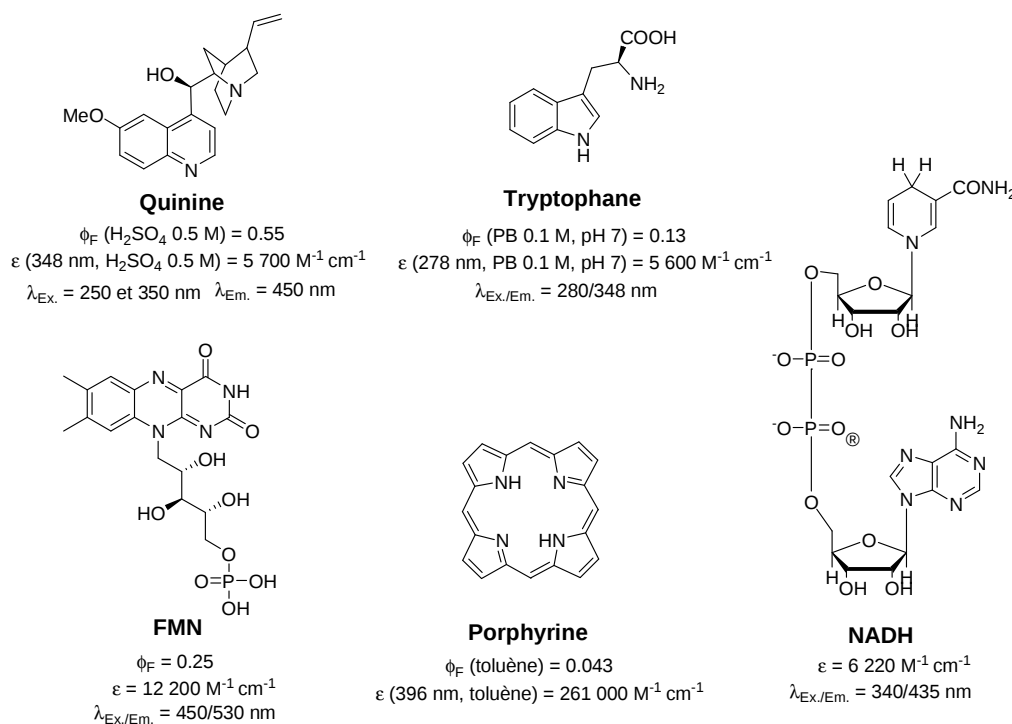


Figure 1-13. Structure de quelques fluorophores naturels.

La fluorescence naturelle des biomolécules, que ce soient sous forme de monomères ou de polymères, n'est pas sans conséquences sur les applications biologiques puisqu'elles peuvent être responsables d'un bruit de fond qui peut gêner l'observation du phénomène biologique ciblé. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire de travailler à des longueurs d'onde où les biomolécules et les tissus n'absorbent pas (en l'occurrence, à des longueurs d'onde dans le proche IR, voir section II).

2. 3. 2 Les fluorophores polyaromatiques

Les composés organiques fluorescents les plus simples sont des espèces polyaromatiques. D'une façon générale, une extension de la conjugaison du système d'électron π permet de déplacer les spectres d'absorption et d'émission vers de plus grandes longueurs d'ondes. Par exemple, les composés aromatiques naphthalène, anthracène, naphthacène et pentacène émettent respectivement dans l'ultraviolet, le bleu, le vert et le rouge. Une autre classe de composés polyaromatiques simples est celle des pyrènes. Par exemple, un dérivé hydrosoluble du pyrène, le 8-hydroxy-1,3,6-pyrènetrisulfonate de trisodium (HPTS ou pyranine et vendu par InvitrogenTM sous la forme d'un dérivé hydrazide bioconjugué et sous le nom Cascade

Blue[®]) est utilisé comme sonde à pH.¹⁰ L'intérêt des pyrènes est qu'ils possèdent un long temps de vie à l'état excité ($\tau > 100$ ns), ce qui permet à un pyrène excité de former un excimère avec un pyrène à l'état fondamental et l'excimère obtenu subit un effet bathochrome (i.e., déplacement vers le rouge) de sa longueur d'onde d'émission ($\lambda_{Em.} = 490$ nm). D'autres fluorophores aromatiques ont de nombreuses applications comme les dérivés du naphthalène tels que le 5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl (dansyl) ou l'acide 5-((2-aminoéthyl)amino)naphthalène-1-sulfonique (EDANS) qui sont largement utilisés dans des sondes FRET (Figure 1-14, *vide infra*).

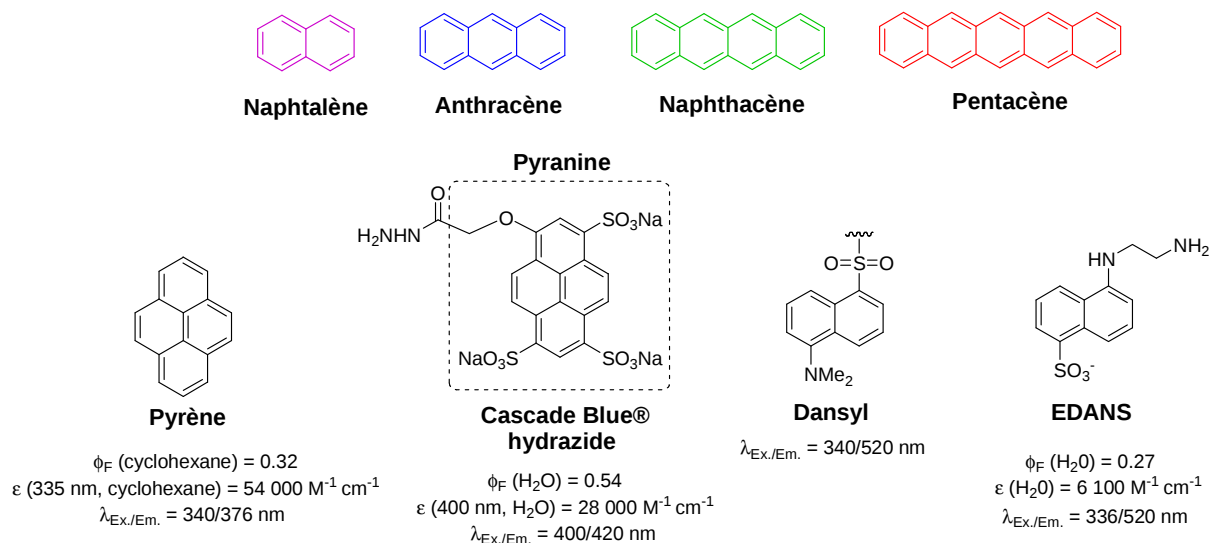


Figure 1-14. Structure de quelques fluorophores polyaromatiques.

Les composés organiques fluorescents les plus utilisés sont des composés polycycliques et/ou hétéroaromatiques. Quelques familles représentatives vont être passées en revue dans la suite de ce chapitre d'introduction.

2. 3. 3 Les coumarines

Les coumarines constituent une importante classe de composés naturels, qui peuvent être à la fois des composés biologiquement actifs et des fluorophores. Tandis que la coumarine elle-même a de très faibles caractéristiques de fluorescence, la substitution par un groupement donneur en positions 3, 4, 6 et 7 exaltent sa fluorescence avec des émissions dans le bleu ou le vert. Par exemple, la fluorescence de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (appelée aussi 4-

¹⁰ Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A., *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, 10th ed., Eugene, OR., 2005.

méthylumbellifère, 4-MU) présente une émission de fluorescence bien plus importante que la 4-méthylcoumarine, et cette fluorescence augmente avec la proportion de phénol présente sous forme de phénolate ($pK_a = 7.8$).¹¹ La 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) présente des caractéristiques semblables à 4-MU lorsque le pH est supérieur à 5.¹⁰ Le dérivé *N,N*-diéthylé de l'AMC présente quant à lui, des propriétés de fluorescence encore supérieures (Figure 1-15).

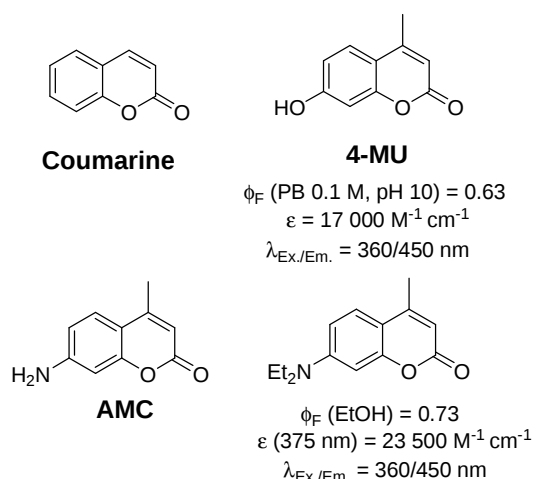


Figure 1-15. Effet de la substitution par des hétéroatomes sur la fluorescence de la coumarine.

Ces variations de l'émission de fluorescence en fonction du pH et de la substitution par des hétéroatomes ont été mises à profit dans de nombreuses sondes telles que des sondes à pH (Figure 1-16) ou des sondes sensibles aux protéases, estérases, etc.

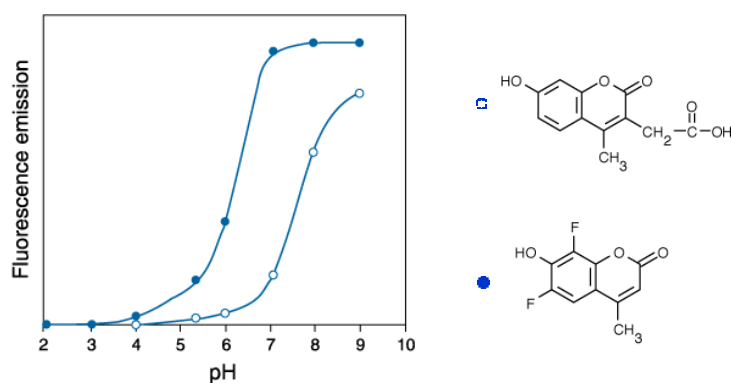


Figure 1-16. Modification de l'intensité de fluorescence de deux coumarines en fonction du pH (Source réf. 10).

Cependant, si les coumarines sont des fluorophores intéressants car elles possèdent un déplacement de Stokes important, à ce jour, peu de coumarines ont pu montrer des longueurs

¹¹ Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 3107-3110.

d'ondes d'émission déplacées dans le rouge, et donc trouver des utilisations en imagerie *in vivo* (*vide infra*).

2. 3. 4 Les dérivés du noyau xanthène

Historiquement, le représentant le plus connu des fluorophores à noyau xanthène est la fluorescéine. Elle a été synthétisée pour la première fois par Von Baeyer en 1871 et il s'agit d'un colorant qui est toujours utilisé, principalement pour son innocuité. C'est par exemple le colorant utilisé pour tracer les écoulements aqueux, que ce soit dans la recherche de fuites ou de résurgences. Bien qu'elle ait été également largement utilisée dans des applications de marquage de biomolécules, la fluorescéine possède de nombreux inconvénients comme une faible résistance au photoblanchiment, une tendance à l'auto-quenching lorsqu'un grand nombre de fluorescéines sont fixées sur une même biomolécule et une forte dépendance au pH. En effet, cette molécule se trouve en fait sous la forme d'un équilibre entre quatre formes ouvertes **I-IV** plus ou moins fluorescentes et deux fermées **II'** et **III'** non fluorescentes. En particulier, à pH physiologique, une grande proportion de fluorescéine se trouve sous la forme **III**, en équilibre avec une forme fermée non fluorescente **III'**, et seulement une faible quantité se trouve sous la forme dianion **IV** qui est la forme la plus fluorescente (Schéma 1-1).¹²

¹² Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469-6475.

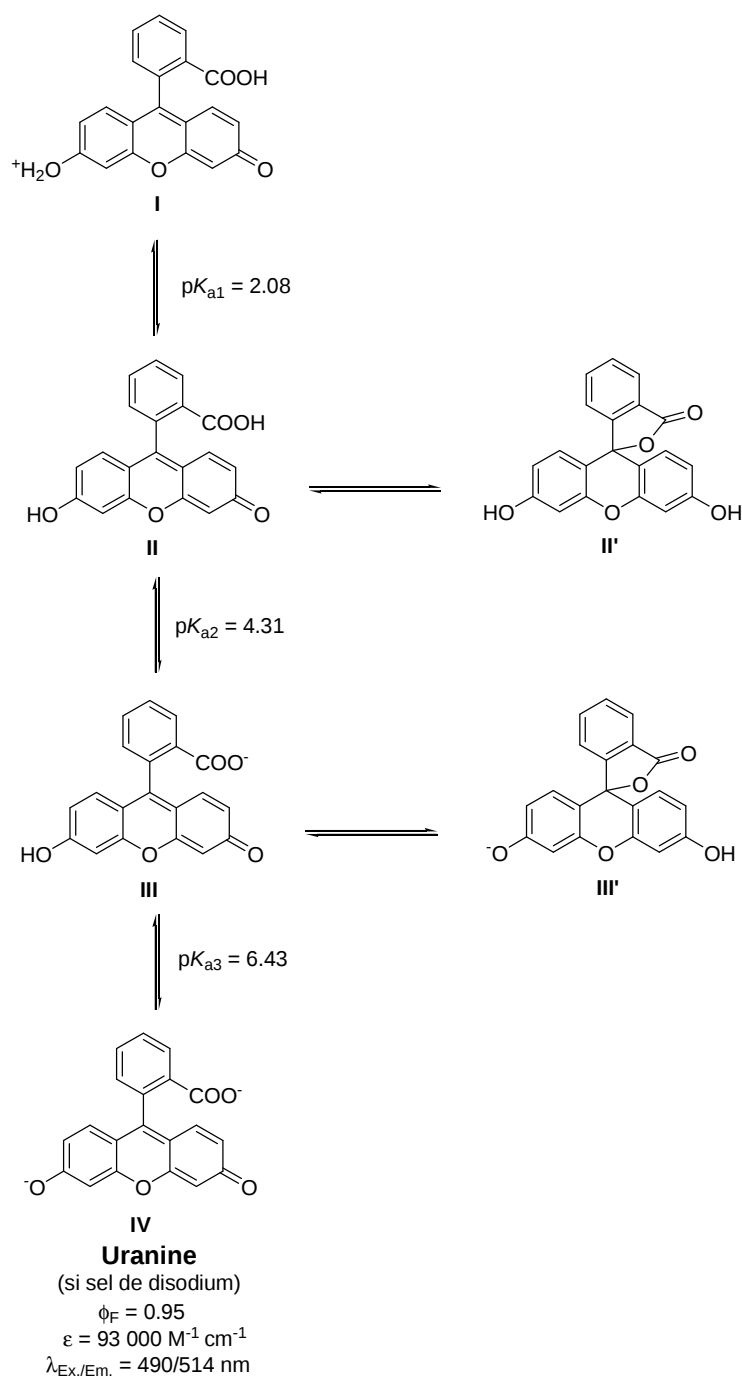


Schéma 1-1. Equilibre entre les différentes formes ouvertes et fermées de la fluorescéine en fonction du pH.

Pour résoudre ces problèmes de dépendance de l'efficacité de fluorescence en fonction du pH, quelques groupes ont essayé de modifier la structure de la fluorescéine. En particulier, l'introduction de deux atomes de chlore permet d'obtenir la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) qui diminue la sensibilité vis-à-vis du pH (en tout cas aux pH physiologiques), en faisant

passer le pK_{a3} de 6.43 pour le phénol de la fluorescéine à 4.29 pour la DCF.¹³ De même, la synthèse de l'Oregon Green a permis de réduire le pK_{a3} à 4.8, d'améliorer le rendement quantique ainsi que la résistance au photoblanchiment.¹⁴ En revanche, l'introduction d'atomes de brome ou d'iode a pour conséquence un déplacement de l'émission vers le rouge mais avec une brillance inférieure à cause de l'«heavy atom effect» qui favorise le croisement intersystème.¹⁵ Malgré ces améliorations, il semble que le caractère dichargé de la fluorescéine soit un frein à sa pénétration dans les cellules, c'est pourquoi des analogues remplaçant la fonction acide carboxylique par un groupement méthyle (Pennsylvania¹⁶ et Tokyo Green¹⁷) ou plus récemment par un groupement hydroxyméthyle (Pittsburgh Green¹⁸) ont permis de concilier bons rendements quantiques, résistance au photoblanchiment, non sensibilité aux variations de pH et meilleure pénétration cellulaire (Figure 1-17).

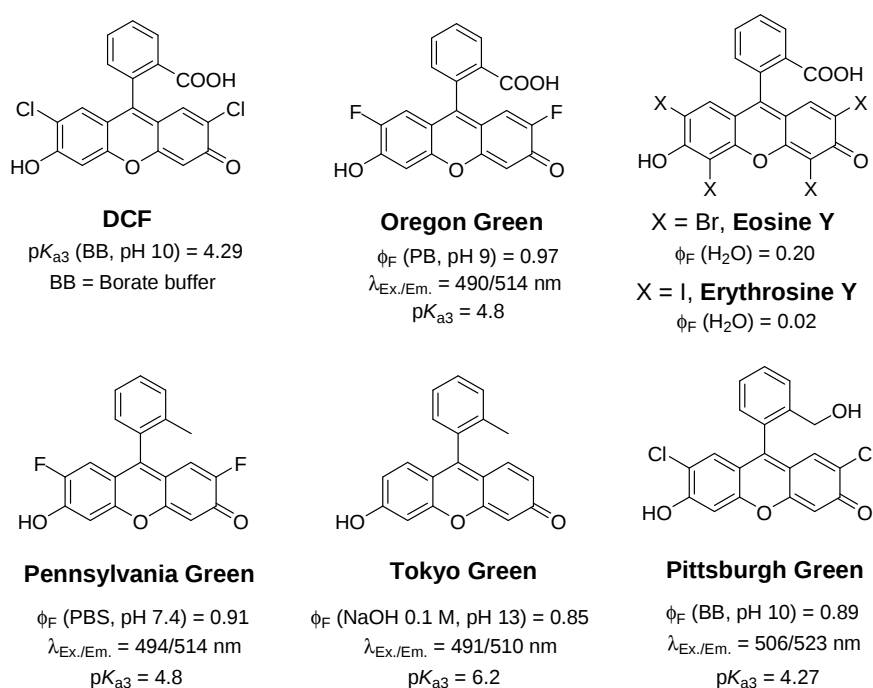


Figure 1-17. Analogues de la fluorescéine avec des propriétés de fluorescence améliorées.

¹³ McHedlovpetrossyan, N. O.; Rubtsov, M. I.; Lukatskaya, L. L. *Dyes Pigm.* **1992**, *18*, 179-198.

¹⁴ Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469-6475.

¹⁵ Fleming, G. R.; Knight, A. W. E.; Morris, J. M.; Morrison, R. J. S.; Robinson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4306-4311.

¹⁶ Mottram, L. F.; Boonyarattanakalin, S.; Kovel, R. E.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 581-584. Mottram, L. F.; Maddox, E.; Schwab, M.; Beaufils, F.; Peterson, B. R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3741-3744.

¹⁷ Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888-4894.

¹⁸ Koide, K.; Song, F. L.; de Groh, E. D.; Garner, A. L.; Mitchell, V. D.; Davidson, L. A.; Hukriede, N. A. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 214-218.

La deuxième solution trouvée pour pallier les limitations de la fluorescéine a donné naissance à une autre classe de fluorophores dérivés du noyau xanthène : la famille des rhodamines. Ce sont les dérivés aminés de la fluorescéine et elles ont pour avantages de présenter une meilleure photostabilité que la fluorescéine et une insensibilité naturelle aux variations de pH. Certains exemples courants comme les rhodamines B, 110 et 6G sont représentés sur la figure 1-18.

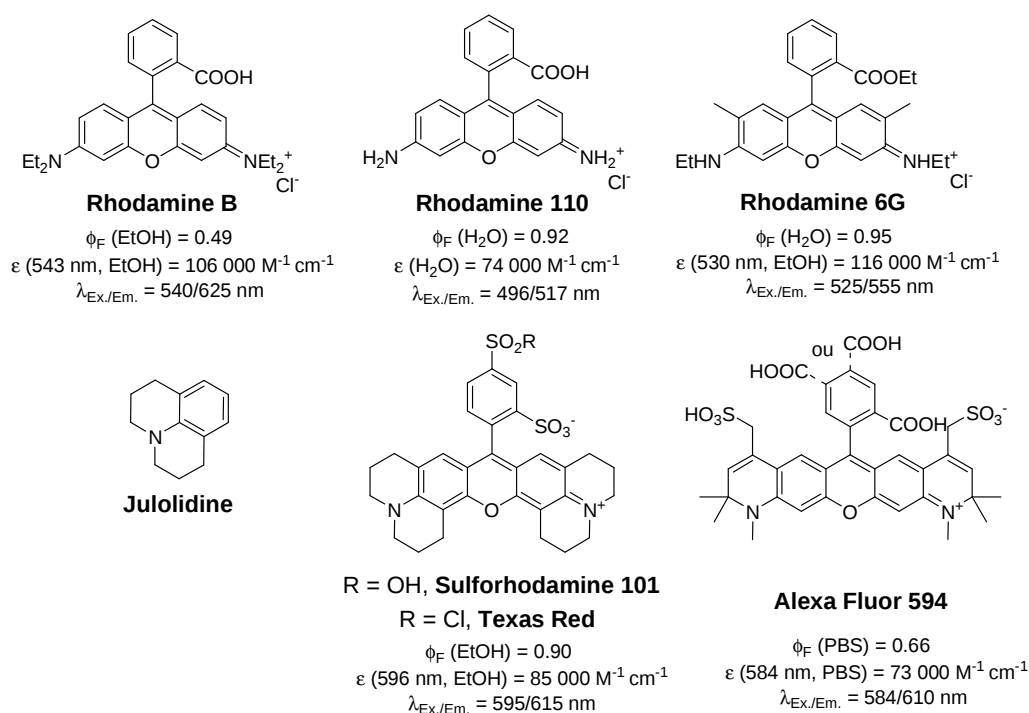


Figure 1-18. Rhodamines et analogues hydrosolubles.

L'avantage supplémentaire présenté par cette famille des rhodamines est qu'il est possible de modifier relativement aisément leurs caractéristiques spectrales et notamment de déplacer la longueur d'onde d'émission vers le rouge. Cela s'accompagne parfois d'une baisse du rendement quantique (pour la rhodamine B par exemple), ce qui est attribué à une perte d'énergie à l'état excité à cause de la rotation autour de la liaison C-N. Cet effet indésirable peut être évité en rigidifiant la structure, ce qui a permis d'obtenir par exemple la sulforhodamine 101 (ou Texas Red[®] sous sa forme activée chlorure d'acide sulfonique, la rigidification a lieu grâce à un noyau julolidine)¹⁹ ou l'Alexa Fluor[®] 594, un analogue hydrosoluble de la rhodamine et commercialisé par Invitrogen.²⁰

¹⁹ Titus, J. A.; Haugland, R.; Sharrow, S. O.; Segal, D. M. *J. Immunol. Methods* **1982**, 50, 193-204.

²⁰ Mao, F.; Leung, W.-Y.; Haugland, R. P. (Molecular Probes, Inc., USA). WO 9915517, 1999.

L'ajout de motifs acide sulfonique sur la structure aromatique directement, ou *via* des bras de liaison permet aussi de moduler l'hydrosolubilité des rhodamines, mais cela rend les synthèses nettement plus complexes.

La modification du noyau xanthène a permis d'accéder à d'autres analogues de rhodamines. Ainsi, l'oxygène du noyau xanthène peut être remplacé par un atome d'azote ou de soufre. De plus, il s'avère que le carboxyphényle des rhodamines est peu impliqué dans la délocalisation des électrons π puisque pour des raisons stériques, son orientation est perpendiculaire au tricycle. Il est donc possible soit de remplacer ce cycle par un hydrogène ou un hétéroatome (e.g., S, N, O), soit d'enlever tout substituant sur le cycle aromatique afin que la réduction de l'encombrement stérique favorise la conjugaison avec le tricycle. On obtient ainsi la famille des pyronines/rosamines ayant des propriétés spectrales voisines des rhodamines correspondantes (Figure 1-19).²¹

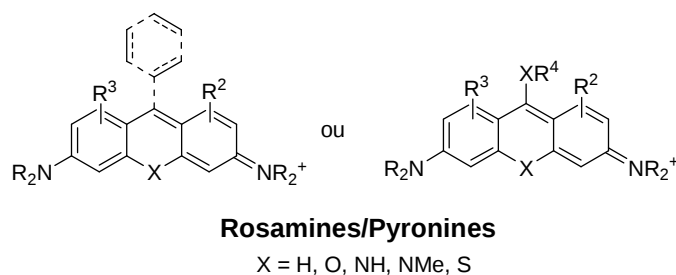


Figure 1-19. Famille des pyronines/rosamines comme analogues de rhodamines.

2. 3. 5 Les oxazines

Certaines oxazines (plus particulièrement des benzophénoxazines, BPO) comme le Nile Red et son analogue Nile Blue ont suscité récemment l'intérêt des biochimistes en raison de leur lointaine émission dans le rouge. Cependant, leur faible solubilité en milieu polaire explique que leurs utilisations majeures soient des applications en tant que colorants ou pour la détection de milieu apolaires comme des lipides. Dans la même famille, des fluorophores comme la résorufine ou le crésyl violet possèdent, en plus de leur émission dans le proche IR, l'intérêt d'avoir des propriétés de fluorescence modifiées lorsque leur fonction phénol ou aniline sont substituées (il en est de même pour les coumarines, amino-coumarines et les fluorescéines mais à l'heure actuelle aucun représentant de ces familles n'émet aussi loin dans le rouge). Ainsi, ces pro-fluorophores ont été utilisés dans des sondes fluorogéniques pour la

²¹ Pour un exemple récent, voir Wu, L. X.; Burgess, K. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1779-1782.

détection d'anticorps, d'estérases ou de peptidases mais leur faible solubilité dans l'eau et leur réactivité particulière ont freiné une utilisation plus large (Figure 1-20).

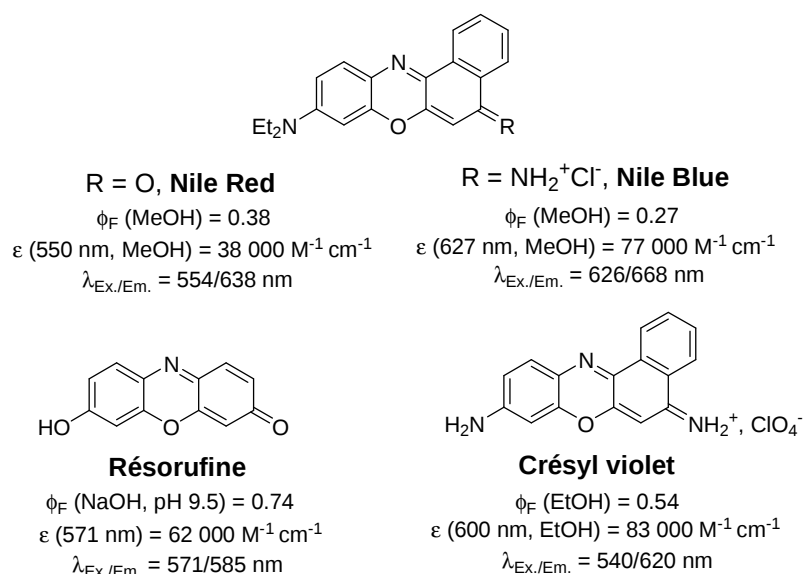


Figure 1-20. Oxazines et benzophénoxazines hydrophobes.

La chimie des benzophénoxazines est connue depuis plus de 100 ans²² et n'a connu un récent regain d'intérêt que depuis que certaines équipes comme les groupes des Pr. R. Weissleder²³ et K. Burgess²⁴ ont remis au goût du jour ces fluorophores avec des efforts dirigés vers leur solubilisation dans l'eau. En effet, avec l'avènement de l'imagerie *in vivo* qui requiert des fluorophores émettant dans le rouge ou le proche IR, des benzophénoxazines hydrosolubles ont été synthétisées et ont montré des caractéristiques de fluorescence prometteuses. Elles ont ainsi pu être utilisées pour la détection de peptidase²⁵ et de la β -galactosidase (Figure 1-21).²⁶

²² Pour une revue récente, voir Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, 62, 11021-11037.

²³ Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Tetrahedron* **2006**, 62, 578-585.

²⁴ Jose, J.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7835-7839.

²⁵ Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2599-2602.

²⁶ Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *ChemBioChem* **2007**, 8, 560-566.

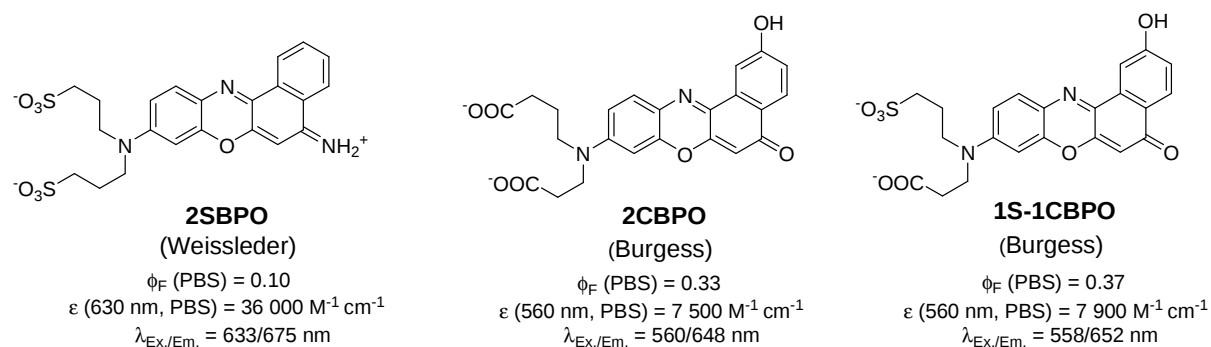


Figure 1-21. Benzophénoxazines hydrosolubles.

Cependant, ces oxazines sont sensibles à l'oxydation, pour donner les N-oxydes correspondants (la résazurine dans le cas de la résorufine), et à certains thiols, ce qui modifie leur émission de lumière et limite leur utilisation (voir Chapitre 2).

2. 3. 6 Les BODIPYs

La classe des 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène (BODIPY) est une famille de fluorophores en pleine essor comme en témoignent les deux revues très récentes des groupes de R. Ziessel et K. Burgess qui lui sont consacrées.²⁷ L'intérêt pour les BODIPYs réside tout d'abord dans leur grande diversité d'utilisation puisque ceux-ci peuvent avoir des applications aussi bien en tant que marqueurs fluorescents qu'en tant que matériel organique pouvant par exemple transformer l'énergie solaire en énergie chimique (« Dyes-sensitized solar cells »). De plus, les BODIPYs semblent à eux seuls résoudre presque tous les problèmes inhérents aux fluorophores organiques : en effet, leur émission est insensible à la polarité, au pH et au photoblanchiment ; ils sont stables en milieu physiologiques, ont d'excellent rendements quantiques, de forts coefficients d'absorption molaire et il est aisé de modifier leur structure pour moduler leur longueur d'onde d'émission.

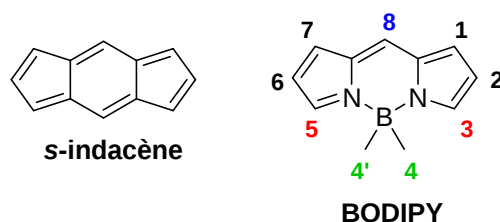


Figure 1-22. Les BODIPYs, dérivés du noyau s-indacene.

²⁷ Loudet, A.; Burgess, K. *Chem.Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932 et références citées. Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184-1201 et références citées.

Le développement important des BODIPYs ces dernières années a permis de dégager certaines tendances qui peuvent expliquer leurs propriétés. Ainsi, les BODIPYs sont en fait des dérivés du noyau s-indacène dont un atome de carbone a été substitué par un atome de bore. Cela a son importance puisque c'est ce noyau pseudo-indacène qui confère au BODIPY la rigidité qui lui confère ses bonnes caractéristiques de fluorescence. Les substitutions sur les différentes positions des BODIPYs ont également chacune une caractéristique particulière (Figure 1-22) :

- La position 8, aussi appelée *meso*, est souvent substituée par un groupement aromatique. Cela ne change pas les caractéristiques de fluorescence mais fournit un point d'accrochage pour introduire des fonctions sensibles au pH, des cryptants chélateurs de métaux, une fonctionnalisation pour des applications de bioconjugaison ou plus récemment pour introduire des groupements hydrosolubilisants (Figure 1-23 a-c).

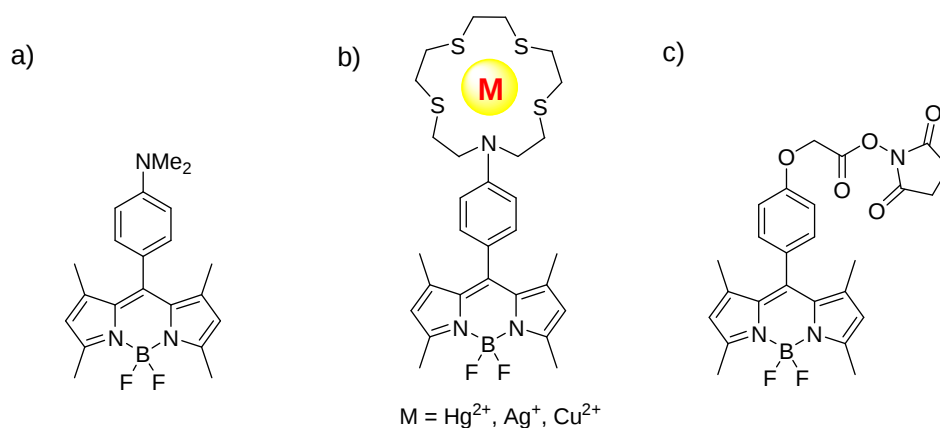


Figure 1-23. Le cycle aromatique en position *meso* utilisé comme plate-forme pour : a) une sonde à pH ; b) la détection de métaux ; c) la conjugaison de biomolécules.

- Les positions 1 et 7 ont des rôles similaires dans la mesure où leur substitution permet une rigidification de la structure. Cet effet est d'autant plus prononcé si la position *meso* est substituée car les groupements en position 1 et 7 empêchent la rotation du cycle aromatique à l'état excité et limitent ainsi une désexcitation non radiative du fluorophore (Figure 1-24).

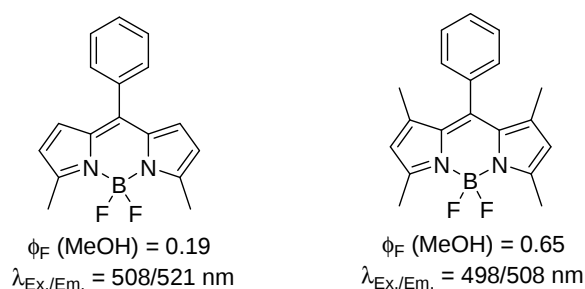
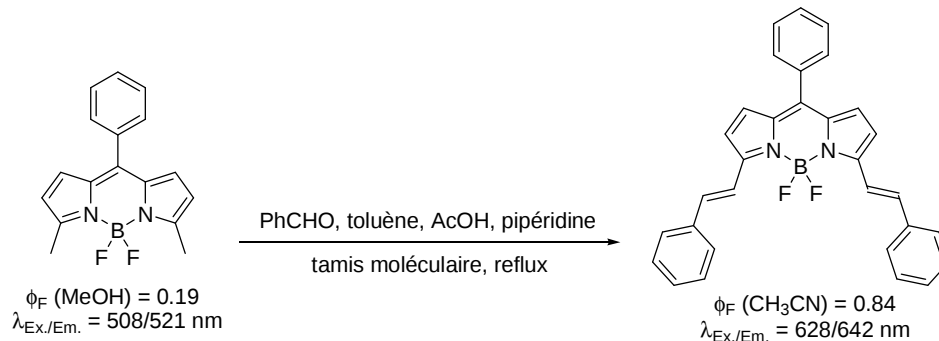


Figure 1-24. Effet de la substitution en position 1 et 7 sur le rendement quantique.

- Les positions 3/5 et 2/6 permettent, quant à elles, l'extension de la conjugaison du fluorophore et déplacent ainsi son émission vers le rouge. Ceci est possible grâce à la réactivité particulière de ces positions : les atomes d'hydrogène d'un groupement méthyle en position 3 et 5 sont assez acides pour engager le BODIPY correspondant dans une condensation de Knoevenagel avec un aldéhyde, fournissant ainsi une extension du système π du fluorophore et une modification de ses caractéristiques spectrales (Schéma 1-2 a). De même, les positions 2 et 6 se sont avérées réactives dans des réactions d'insertion C-H pallado-catalysées, comme par exemple dans une réaction de Heck (Schéma 1-2 b).

a)



b)

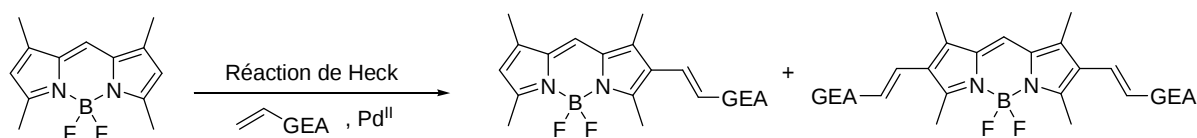


Schéma 1-2. Extension de la conjugaison du fluorophore par : a) une condensation de Knoevenagel ; b) une réaction de Heck *via* une insertion C-H pallado-catalysée (GEA = groupe électroattracteur).

- Les positions 4 et 4' sont le plus souvent substituées par deux atomes de fluor et permettent une excellente rigidification de la structure. Cependant, d'autres substituants ont déjà été introduits comme des groupements alkyles qui font cependant

chuter significativement l'émission de lumière. Le remplacement des atomes de fluor par des groupements aromatiques (naphtalènes, pyrènes, anthracènes, terpyridines, etc.) et alkynylaromatiques présentent des propriétés intéressantes, notamment pour la synthèse de nouveaux matériaux organiques et ont ouvert la voie pour de nombreuses applications en optique.

Malgré leurs nombreux avantages, l'utilisation des BODIPYs dans des applications biologiques est encore problématique en raison de leur faible solubilité dans l'eau. Cependant, des récents travaux ont abouti à des structures hydrosolubles et les efforts effectués actuellement dans ce domaine devraient permettre d'étendre leur utilisation dans les milieux physiologiques.²⁸

2. 3. 7 Les cyanines

Les cyanines constituent une famille de fluorophores très populaire en imagerie optique grâce à leurs caractéristiques de fluorescence en milieu physiologique pour l'instant inégalées. Leur structure de base consiste en un système donneur-accepteur (« push-pull ») entre un atome d'azote neutre et un atome d'azote chargé, les deux étant séparés par un enchaînement de doubles liaisons (Figure 1-25).²⁹

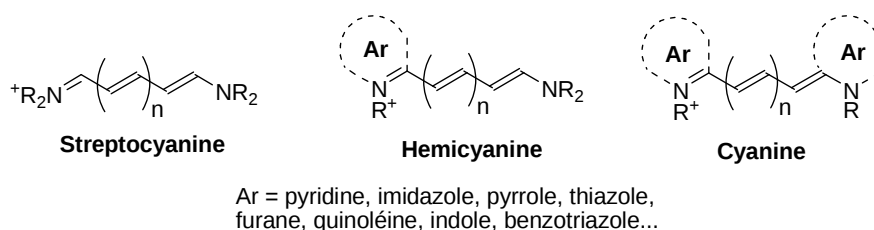


Figure 1-25. Structures de base des cyanines.

Les cyanines les plus intéressantes possèdent deux groupements aromatiques, en particulier des indoles, qui permettent d'étendre la délocalisation des électrons et améliorer l'émission de fluorescence. De plus, ces cyanines possèdent un coefficient d'extinction molaire pour l'instant inégalé ($\sim 200\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), émettent à des longueurs d'onde lointaines (de 570 à plus de 800 nm selon les structures) et leur rendement quantique est honorable en milieu

²⁸ Thivierge, C.; Bandichhor, R.; Burgess, K. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2135-2138. Li, L. L.; Han, J. Y.; Nguyen, B.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1963-1970. Romieu, A.; Ziessel, R. *et al.* Manuscrit en préparation.

²⁹ Pour une excellente revue sur la chimie, stabilité et relation entre structure et fluorescence des cyanines, voir Ballou, B.; Ernst, L. A.; Waggoner, A. S. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 795-805.

aqueux (~ 20% pour les meilleures d'entre elles), ce qui fait d'elles d'excellentes candidates pour des utilisations en imagerie *in vivo*. Le nombre de carbones de la chaîne polyénique donne le nom à la cyanine : Cy 3 pour 3 carbones, Cy 5 pour 5 carbones et Cy 7 pour 7 carbones. L'allongement de la chaîne carbonée s'accompagne d'un décalage d'environ 100 nm dans l'absorption et l'émission entre chacune de ces structures (Figure 1-26).

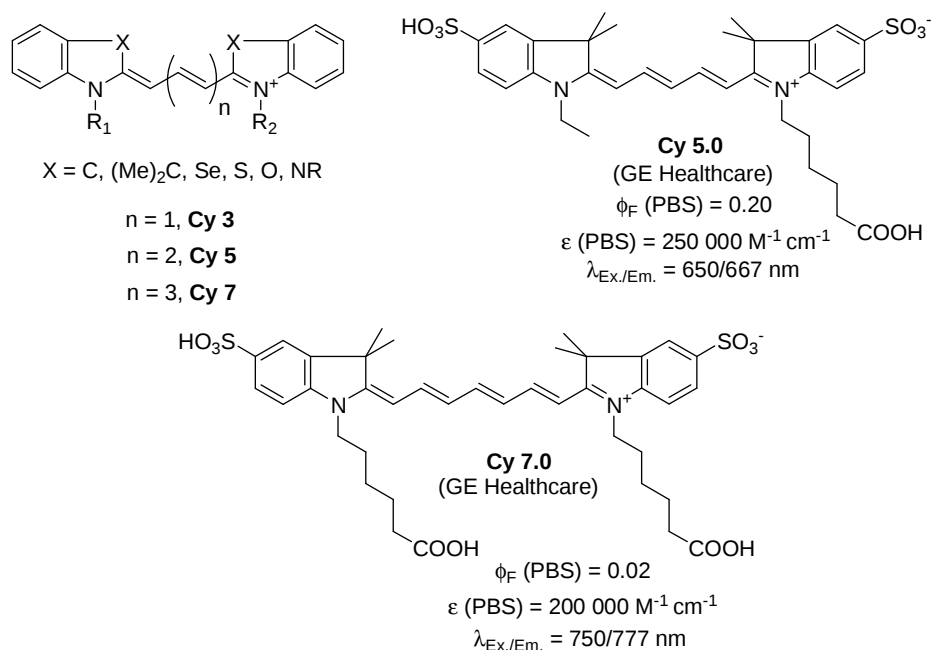


Figure 1-26. Structure générale des cyanines et exemples des cyanines Cy 5.0 et Cy 7.0 commercialisées par GE Healthcare.

Une des cyanines les plus utilisées est Cy 5.0 qui présente un fort coefficient d'extinction molaire et un rendement quantique correct en milieu aqueux, ce qui lui confère une brillance de $50\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ qui est comparable aux rhodamines mais à des longueurs d'onde plus élevées. Une double liaison supplémentaire donne accès à Cy 7.0 qui émet encore plus loin à 777 nm mais de manière moins intense et avec l'inconvénient d'être plus sensible à l'oxydation et au photo-blanchiment.³⁰

L'ajout d'un cycle aromatique supplémentaire sur le noyau indolique permet à la fois de déplacer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission vers le proche IR (d'environ 20 à 30 nm si l'indole est remplacé par un benzoindole par exemple) et d'introduire des motifs

³⁰ Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, 4, 105-111.

hydrosolubilisants comme des groupements sulfonate. Ainsi, Cy 5.5 émet à 694 nm dans l'eau avec un Φ_F et un ϵ similaires à Cy 5.0 (Figure 1-27).³¹

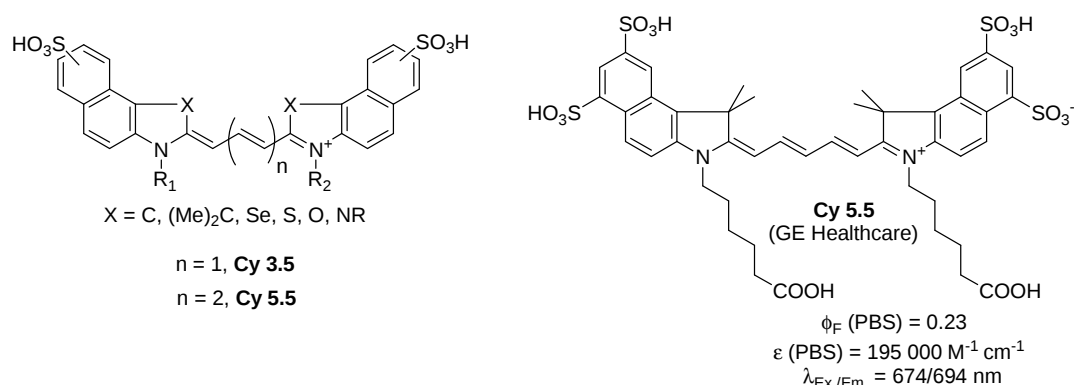


Figure 1-27. Exemples de Cy 3 et Cy 5 ayant des propriétés de fluorescence améliorées et commercialisés par GE Healthcare.

La fragilité de Cy 7.0 est un frein à son utilisation mais sa stabilité peut être améliorée grâce à l'introduction d'un cycle à 5 ou 6 chaînons au sein de la chaîne polyéthylénique. Ainsi, les groupes de C. H. Tung³² et A. Moore³³ (travaux effectués dans ces deux groupes par le Dr. W. Pham) ont rapportés des dérivés de Cy 7.0 possédant un cycle à six chaînons stabilisant la chaîne polyéthylénique et possédant un atome de chlore pour des dérivatisations ultérieures.³⁴ Les groupes de X. Peng,³⁵ A. Masotti,³⁶ W. Pham³⁷ et nous même³⁸ ont rapporté des analogues de Cy 7.0 stabilisés, hydrosolubles et certains possédant une fonction bioconjugable (Figure 1-28).

³¹ Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 356-362. Lin, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 605-610.

³² Pham, W.; Lai, W. F.; Weissleder, R.; Tung, C. H. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 1048-1051.

³³ Pham, W.; Medarova, Z.; Moore, A. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 735-740.

³⁴ Pour quelques exemples significatifs, voir Zhang, Z.; Achilefu, S. *Org. Lett.* **2004**, 6, 2067-2070. Hilderbrand, S. A.; Kelly, K. A.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1275-1281. Lee, H.; Mason, J. C.; Achilefu, S. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7862-7865. Li, C.; Greenwood, T. R.; Bhujwalla, Z. M.; Glunde, K. *Org. Lett.* **2006**, 8, 3623-3626. Lee, H.; Mason, J. C.; Achilefu, S. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 723-725.

³⁵ Song, F.; Peng, X.; Lu, E.; Zhang, R.; Chen, X.; Song, B. *J. Photochem. Photobiol., A* **2004**, 168, 53-57. Peng, X.; Song, F.; Lu, E.; Wang, Y.; Zhou, W.; Fan, J.; Gao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4170-4171.

³⁶ Masotti, A.; Vicennati, P.; Boschi, F.; Calderan, L.; Sbarbati, A.; Ortaggi, G. *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 983-987.

³⁷ Pham, W.; Cassell, L.; Gillman, A.; Koktysh, D.; Gore, J. C. *Chem. Commun.* **2008**, 1895-1897.

³⁸ Bouteiller, C.; Clavé, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1303-1317.

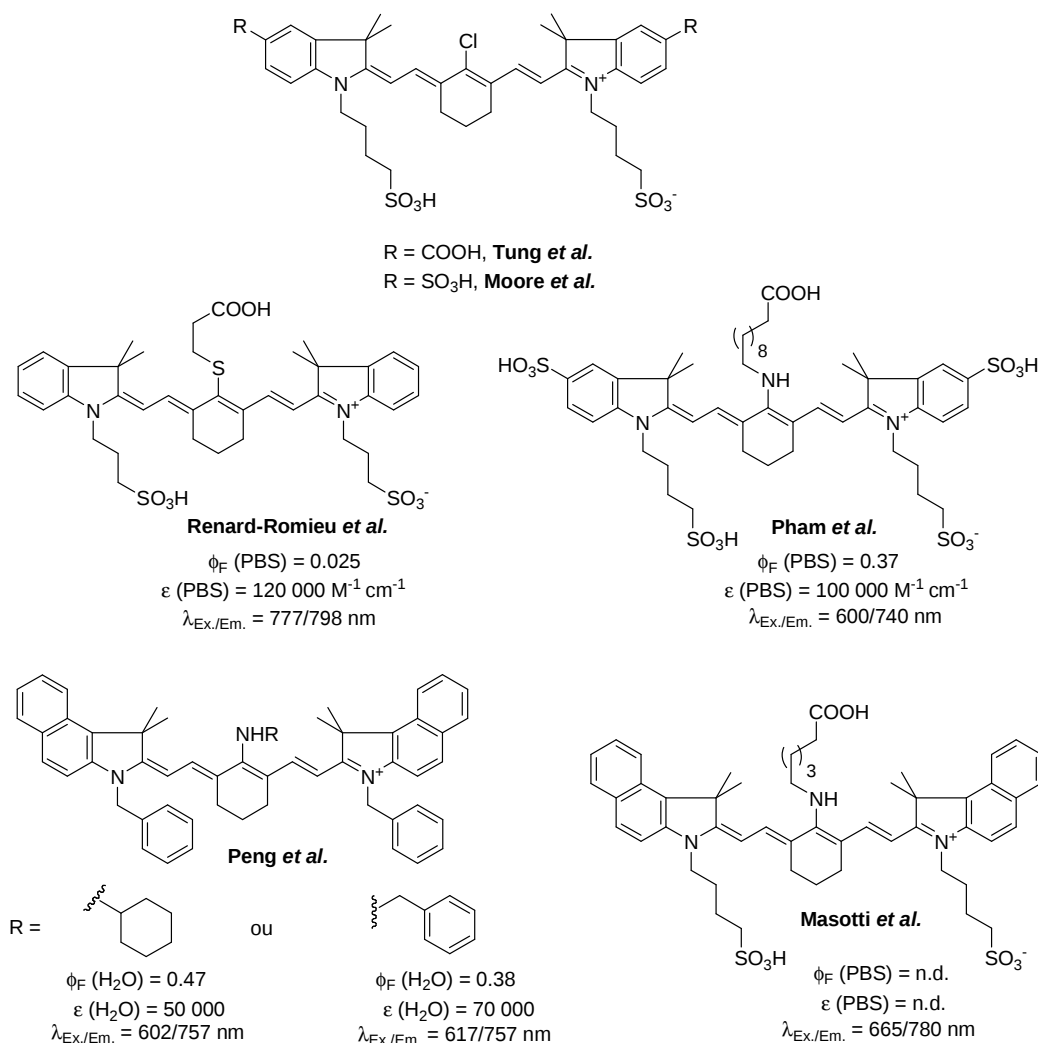


Figure 1-28. Analogues de Cy 7.0 stabilisés par un cycle à six chaînons.

Il est également intéressant de noter deux classes de cyanines ayant des émissions au-delà de 800 nm et avec des coefficients d'extinction molaire compris entre 100 000 et 300 000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. D'une part les squaraines,³⁹ dont les derniers développements par le groupe de B. D. Smith ont permis de limiter fortement leur auto-agrégation grâce à leur inclusion dans un rotaxane. Les squaraines se présentent donc comme une excellente alternative aux cyanines classiques.⁴⁰ D'autre part, les croconaines⁴¹ qui constituent une dernière classe de cyanines et

³⁹ Oswald, B.; Patsenker, L.; Duschl, J.; Szmazinski, H.; Wolfbeis, O. S.; Terpetschnig, E. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 925-931. Tatarets, A. L.; Fedyunyayeva, I. A.; Dyubko, T. S.; Povrozin, Y. A.; Doroshenko, A. O.; Terpetschnig, E. A.; Patsenker, L. D. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 214-223.

⁴⁰ Arunkumar, E.; Forbes, C. C.; Noll, B. C.; Smith, B. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3288-3289. Arunkumar, E.; Fu, N.; Smith, B. D. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4684-4690. Johnson, J. R.; Fu, N.; Arunkumar, E.; Leevy, W. M.; Gammon, S. T.; Piwnica-Worms, D.; Smith, B. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5528-5531.

⁴¹ Langhals, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4286-4288. Song, X.; Foley, J. W. *Dyes Pigm.* **2008**, *78*, 60-64. Avirah, R. R.; Jyothish, K.; Ramaiah, D. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 274-279 et références citées.

ont démontré des caractéristiques d'émission de fluorescence prometteuses même si les rendements quantiques sont encore à améliorer (Figure 1-29).

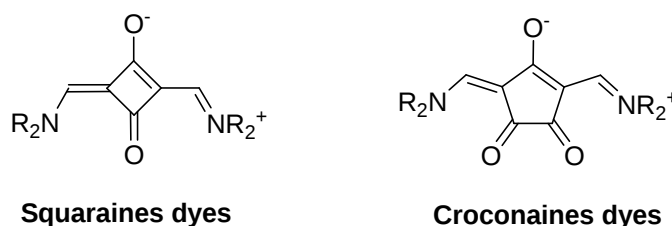


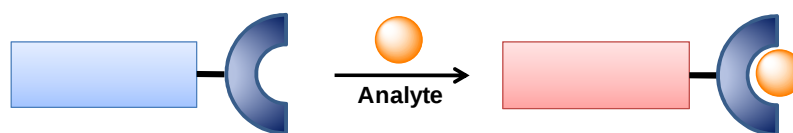
Figure 1-29. Structure générale des squaraines et croconaines dyes.

3 La fluorescence comme outil analytique : les sondes fluorescentes activables

La première utilisation possible des fluorophores est un marquage simple d'une cible donnée qui permet de détecter ou de suivre celle-ci. Les utilisations de telles sondes sont multiples (comme les tests immunofluorescents) mais sont limitées car il n'y a pas de variation de fluorescence à proprement parler. Les sondes fluorescentes les plus intéressantes sont les sondes fluorescentes qui présentent une variation de leur longueur d'onde d'émission et/ou d'intensité de fluorescence suite à l'interaction (covalente ou non) avec un analyte ciblé. Afin d'obtenir un maximum de sensibilité, la sonde fluorescente idéale n'émet pas de lumière en l'absence de l'espèce à détecter et devient fluorescente en présence de celle-ci (sondes « Off » → « On » ou « smart probe », *vide infra*).

Plusieurs classifications des sondes fluorescentes activables peuvent être effectuées. En cohérence avec notre étude, nous avons choisi de distinguer deux types de sondes fluorescentes.

Tout d'abord, la classe de sondes fluorescentes activables la plus répandue repose sur une variation de la fluorescence suite à la détection de l'analyte *via* une liaison non covalente (Figure 1-30).



Variation de l'émission de fluorescence

Figure 1-30. Première classe de sondes fluorescentes activables : détection d'analytes *via* des liaisons non covalentes.

La deuxième classe de sondes fluorescentes activables suppose non seulement la liaison à l'analyte mais il est également nécessaire que celui-ci réagisse avec la sonde. En effet, deux possibilités peuvent se présenter : soit la détection de l'analyte induit la formation de liaisons covalentes qui permet l'allumage de la sonde (Figure 1-31 a) ; soit la détection de l'analyte est visualisée grâce à la rupture d'une liaison. Dans ce dernier cas, la sonde est généralement constituée de deux ou trois entités : d'une part le substrat qui est la partie reconnue par l'espèce à détecter ; d'autre part, le ou les fluorophores qui en absence de l'analyte peuvent fluorescer ou être quenchés ; éventuellement un bras espaceur ou linker qui permet de relier les deux entités et dont la coupure permet leur séparation et la variation de l'émission de fluorescence (Figure 1-31 b).⁴²

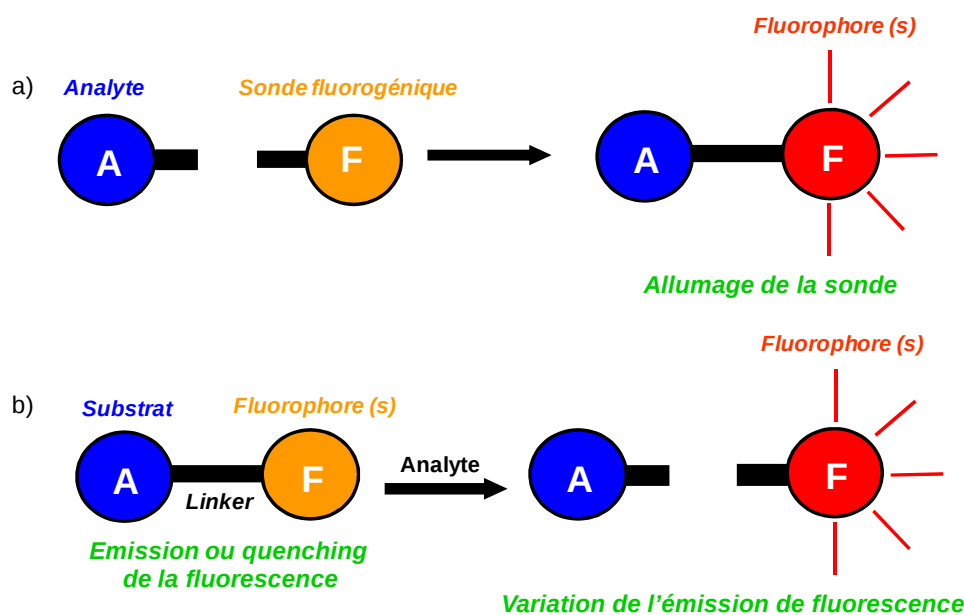


Figure 1-31. Deuxième classe de sondes fluorescentes : détection d'analytes *via* a) la formation ou b) la rupture de liaisons covalentes.

⁴² Pour une excellente revue, voir Chen, X.; Sun, M.; Ma, H. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 477-489.

Ces deux types de sonde permettent de rassembler la grande majorité des sondes fluorescentes et les principaux mécanismes intervenant dans le fonctionnement de celles-ci vont être présentés.

3. 1 Le Transfert d'électron Photoinduit

Le Transfert d'électron Photoinduit (TeP) est un phénomène très important qui est à la base de nombreuses sondes fluorescentes capables de détecter une grande variété d'espèces. C'est également le phénomène qui est mis en jeu lors de la photosynthèse.⁴³

Le mécanisme mis en jeu dans les sondes TeP est le suivant (sachant qu'il peut également être utilisé dans le sens inverse, nous n'illustrerons que le cas le plus simple) : à la suite de l'excitation photonique, en l'absence de l'analyte cible, l'émission de fluorescence est inhibée car un groupement donneur de la sonde (en général, porteur d'un doublet électronique non liant) transfère un électron au fluorophore et empêche le retour radiatif de l'espèce excitée à l'état fondamental. En revanche, lorsqu'une espèce (souvent un proton ou un cation métallique) interagit avec le donneur, les électrons du doublet non liant sont impliqués dans la complexation de l'espèce et le transfert d'électron est défavorisé voire annulé. Par conséquent, l'émission de fluorescence est restaurée (Figure 1-32 a). Dans de nombreux cas, le groupement donneur est le doublet libre d'un atome d'azote qui se trouve à proximité du fluorophore. Celui-ci transfère un électron et inhibe la fluorescence mais en présence de l'analyte cible, le doublet de l'azote n'est plus disponible, ce qui permet la restauration de la fluorescence (Figure 1-32 b dans le cas où l'analyte est un proton).⁴⁴

Les électrons de doublets non liants ne sont pas les seuls à pouvoir intervenir dans ce type de phénomène, qui est en fait beaucoup plus général, et qui, pour être expliqué correctement doit en fait être interprété en termes de niveaux d'énergie des orbitales moléculaires. Lors de l'excitation, un électron appartenant à l'orbitale la plus haute occupée (HOMO) passe dans l'orbitale la plus basse vacante (LUMO). Si la HOMO du donneur (le doublet de l'atome d'azote ou un groupement aromatique donneur) se situe à un niveau d'énergie supérieur à la

⁴³ Suppan, P. *Top. Curr. Chem.* **1992**, 163, 95-130.

⁴⁴ Bissell, R. A.; de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Lynch, P. L. M.; Maguire, G. E. M.; McCoy, C. P.; Sandanayake, K. R. A. S. *Top. Curr. Chem.* **1993**, 168, 223-64. de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1515-1566.

HOMO du fluorophore, alors un transfert d'électron est possible. Ce transfert d'électron modifie le retour à l'état fondamental, puisque soit il se fait de façon non radiative, soit il se fait avec une énergie plus faible (et donc à une longueur d'onde d'émission plus élevée). En revanche, en présence d'un proton ou d'un cation, le potentiel redox du donneur est augmenté, de sorte que sa HOMO devient plus basse que la HOMO du fluorophore. Dans ce cas, le transfert d'électron du donneur n'est plus possible, le retour de l'électron de la LUMO vers la HOMO peut s'effectuer de façon radiative et l'émission de lumière est restaurée (Figure 1-32 c). Ce phénomène peut être intra- ou intermoléculaire au sein de complexes supramoléculaires mais les espèces impliquées doivent être très proches dans l'espace.

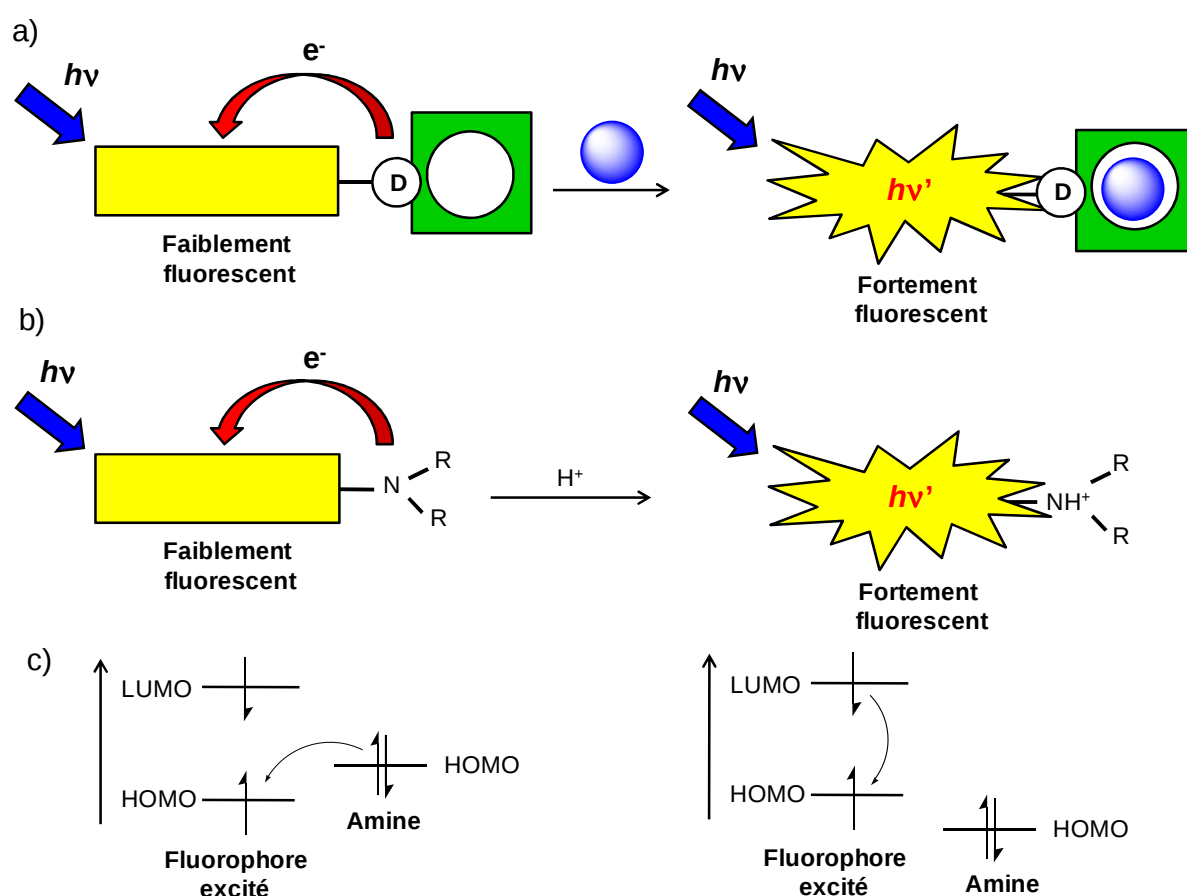


Figure 1-32. Principe du TeP : a) appliqué à la détection de diverses espèces; b) appliqué à la détection de protons avec une amine comme groupement donneur d'électron ; c) en termes d'énergie des orbitales frontières.

3.2 Le FRET

Le FRET (pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un processus non radiatif dans lequel une entité à l'état excité, appelée donneur D, transfère son énergie à un accepteur A séparé de D par une distance r . Ainsi, l'énergie lumineuse $h\nu_1$ absorbée par A est soit restituée sous la forme d'émission de lumière $h\nu_2$, soit dissipée de façon non radiative (quenching) (Figure 1-33).⁴⁵

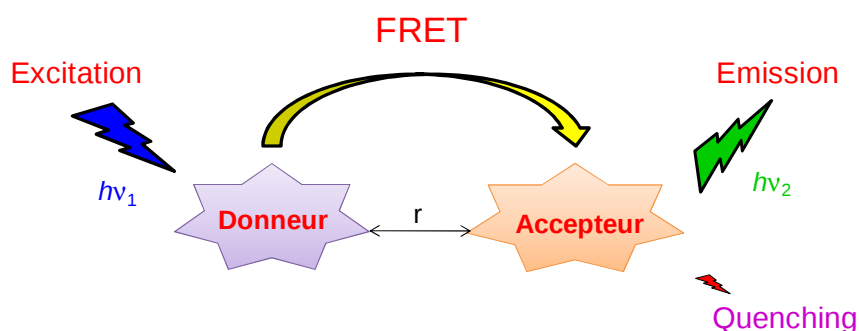


Figure 1-33. Schéma de principe du FRET.

Plusieurs paramètres doivent être réunis pour que le transfert d'énergie se produise de façon efficace. Tout d'abord, le transfert d'énergie de D vers A doit se faire de telle manière que celle-ci puisse être absorbée par A, il doit donc y avoir recouvrement partiel des spectres d'émission de D et d'absorption de A, ce qui, comme le TeP, doit être interprété de façon orbitaire (Figure 1-34).

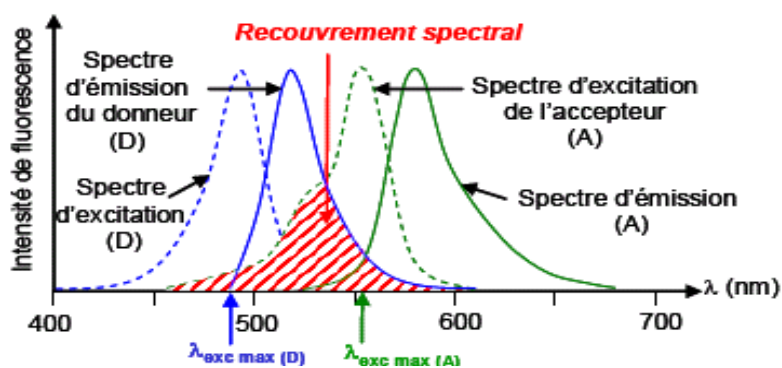


Figure 1-34. Le recouvrement des spectres du donneur D et de l'accepteur A.

Un deuxième paramètre important est la distance r séparant A et D. En effet, en pratique, le transfert d'énergie s'effectue efficacement lorsque ceux-ci sont espacés d'une distance

⁴⁵ Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4562-4588.

comprise entre 10 et 100 Å. Une étude complète du phénomène a permis de montrer que l'efficacité E , qui permet d'évaluer l'efficacité du FRET, peut s'exprimer en fonction de r et de « R_0 ». R_0 est une distance appelée rayon de Förster et correspond à la distance D-A pour laquelle 50% de l'énergie est transférée à A. R_0 dépend des fluorophores utilisés, du milieu et est généralement compris entre 2 et 10 Å pour la plupart des fluorophores utilisés.⁴⁶ Au-delà de cette distance, l'efficacité décroît fortement comme le montre le facteur 6 qui entre en jeu dans la formule de E (Figure 1-35).

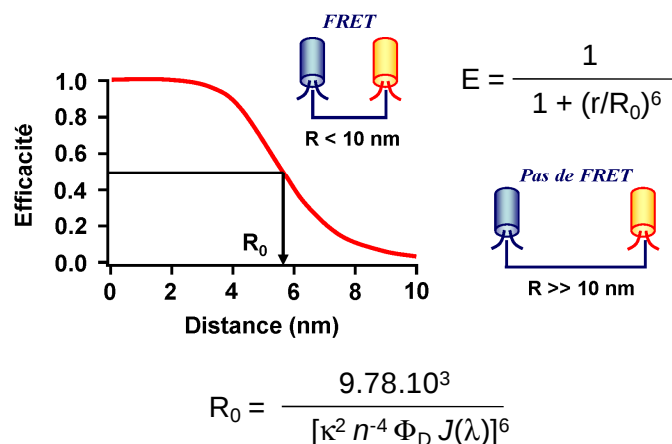


Figure 1-35. Efficacité E du FRET en fonction des distances r et R_0 .

Le calcul de R_0 s'effectue à partir de différents paramètres qui ont une influence sur l'efficacité de FRET. Ainsi κ^2 met en évidence l'importance de l'orientation des dipôles des fluorophores. Il peut prendre des valeurs comprises de 0 (fluorophores perpendiculaires) à 4 (le donneur et l'accepteur sont parallèles avec leurs dipôles de transition parallèles) mais une valeur de 2/3 est généralement observée dans la plupart des environnements biologiques ; n correspond à l'indice de réfraction du milieu qui est 1.4 pour les biomolécules en milieu aqueux ; enfin, des paramètres comme le rendement quantique Φ_D du donneur et le recouvrement spectral représenté par l'intégrale de recouvrement $J(\lambda)$ interviennent dans l'expression de R_0 et donc dans l'efficacité E du FRET.⁴

⁴⁶ Kikuchi, K.; Takakusa, H.; Nagano, T. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 407-415.

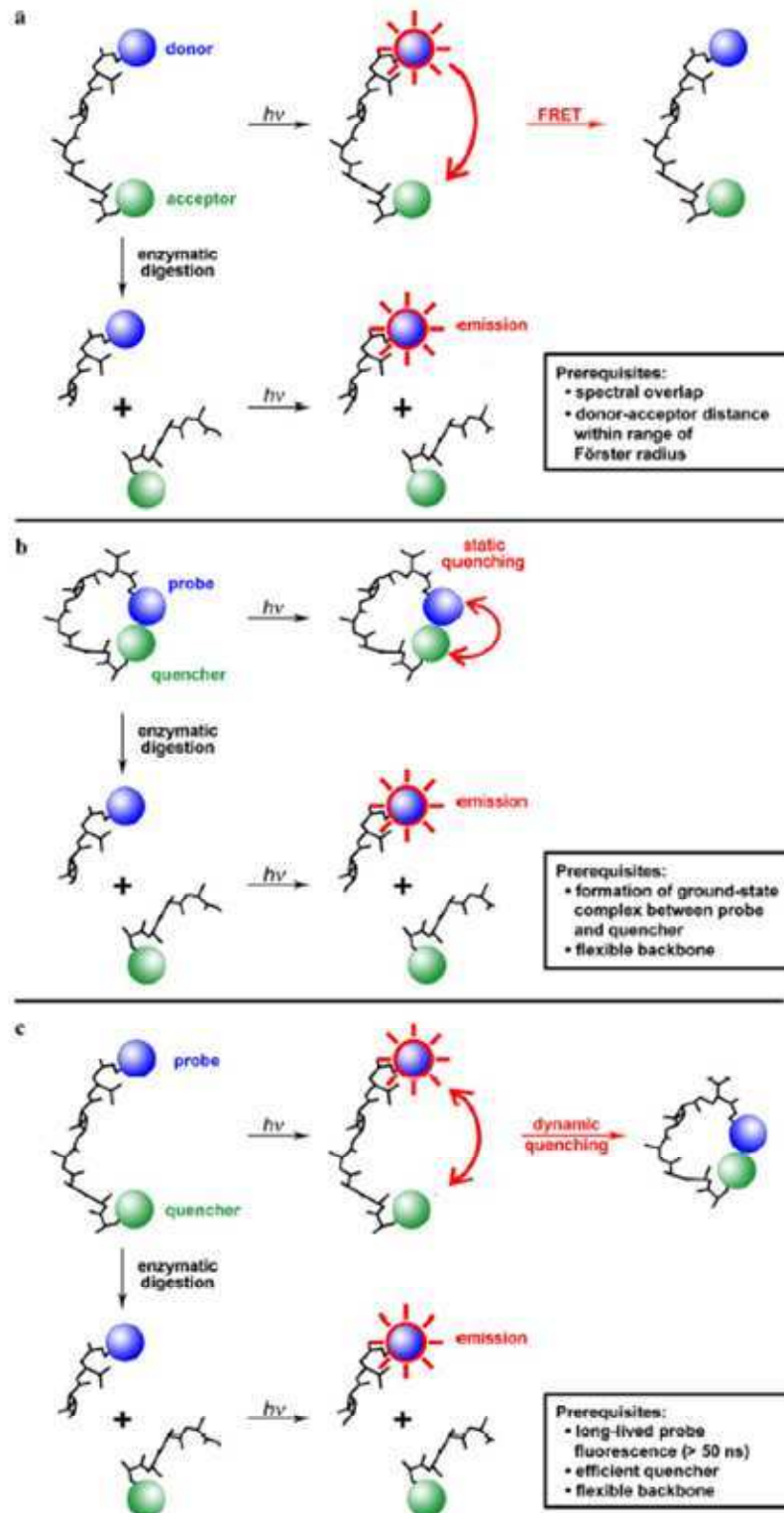


Figure 1-36. Trois approches de sondes FRET : a) FRET entre deux fluorophores différents ou entre un couple fluorophore/quencher ; b) quenching statique entre deux fluorophores ; c) quenching dynamique entre un fluorophore et un quencher à longs temps de vie.

Les sondes fluorescentes utilisant le principe de FRET reposent majoritairement sur trois types d'approches :⁴⁷ 1) soit deux fluorophores ou un couple fluorophore/quencher ayant un bon recouvrement spectral et une proximité dans l'espace sont utilisés. Il s'agit du FRET « classique » tel que décrit ci-dessus (Figure 1-36 a) ; 2) soit deux fluorophores (identiques ou non) sont introduits sur le substrat à détecter. Dans ce cas, il est nécessaire qu'un repliement efficace de la chaîne peptidique s'effectue afin de rapprocher les deux fluorophores pour que leur émission de lumière soit éteinte par quenching statique (Figure 1-36 b) ;⁵ 3) soit l'excitation d'un fluorophore induit un quenching dynamique par collision avec un quencher à proximité.⁵ Dans ce cas également, un bon repliement de la chaîne peptidique est nécessaire et il faut de plus que les temps de vie de fluorescence des deux partenaires soient assez longs ($\tau > 50$ ns). L'avantage de cette approche est de pouvoir travailler en temps résolu (Figure 1-36 c).

Les couples D/A peuvent ainsi prendre la forme soit de deux fluorophores ou d'un couple fluorophore/quencher. Les couples de fluorophores les plus utilisés sont les couples coumarine/fluorescéine, fluorescéine/rhodamine et Cy 3.0/Cy 5.0, ou les couples de protéines fluorescentes modifiées par ingénierie génétique à partir de la GFP. L'utilisation d'un quencher comme accepteur permet d'obtenir des sondes « Off » qui deviennent « On » suite à la détection de l'évènement biologique ciblé. Le quencher permet ainsi de diminuer le bruit de fond lorsque D a un faible déplacement de Stokes (pour les cyanines par exemples). Les quenchers les plus utilisés sont le DABCYL/DABSYL,¹⁰ BlackBerry® Quencher (BBQ),⁴⁸ les familles ATTO,⁴⁹ QXLTM,⁵⁰ QSY^{®51} et Black Hole Quenchers® (BHQ[®])⁵² qui couvrent une gamme spectrale de l'orange au proche IR (Figure 1-37).

⁴⁷ Hennig, A.; Florea, M.; Roth, D.; Enderle, T.; Nau, W. M. *Anal. Biochem.* **2007**, 360, 255-265.

⁴⁸ <http://www.berryassoc.com/blackberry.asp>

⁴⁹ <http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/Quencher.html>

⁵⁰ <http://www.anaspec.com/products/productcategory.asp?id=339>

⁵¹ Haugland, R. P.; Singer, V. L.; Yue, S. T. (Molecular Probes, Inc., USA). WO 2000064988, 2000.

⁵² <http://www.biosearchtech.com/products/display.asp?catID=176>

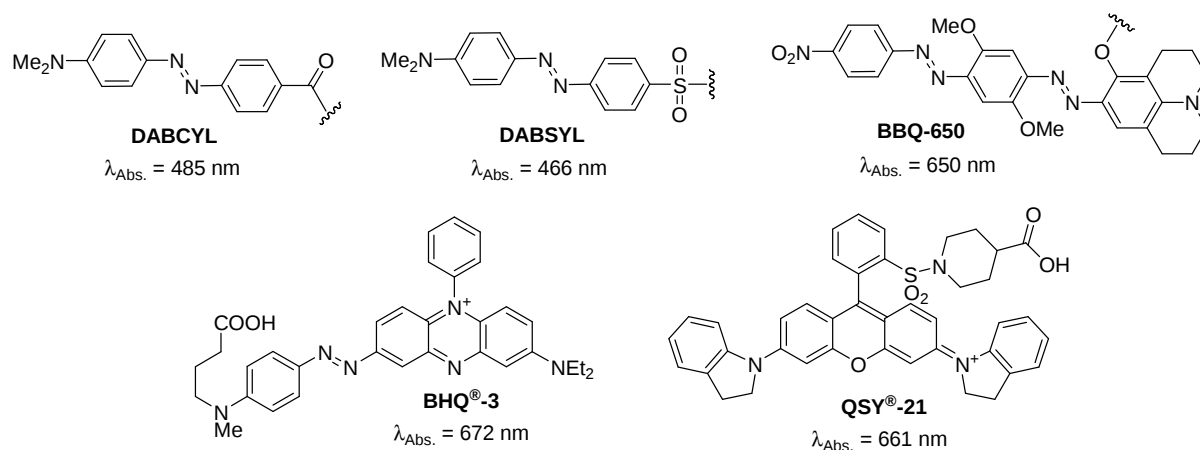


Figure 1-37. Les principaux quenchers utilisés comme partenaires de FRET.

3.3 Le Transfert de Charge Photoinduit

Un élément à prendre en compte lors de l'évaluation de la qualité d'un fluorophore est sa capacité à subir un transfert de charge photoinduit (TCP ou PCT en anglais). En effet, dans le cas où un fluorophore possède un groupement donneur (souvent un groupement aminé) conjugué à un accepteur, l'excitation du fluorophore s'accompagne d'une variation de son moment dipolaire. Dans un milieu suffisamment fluide, les molécules de solvant se réorganisent et, par interaction avec le solvant, un état de transfert de charge intramoléculaire relaxé dont l'énergie est minimum est atteint. Plus la polarité du solvant est grande, plus le niveau d'énergie de l'état excité est bas et plus le déplacement bathochrome est important.

Ce phénomène peut être mis à profit pour la conception de sondes fluorescentes à cation. En effet, un cation peut interagir avec le donneur ou l'accepteur et modifier l'émission de lumière du fluorophore. Dans le cas où un cation interagit avec l'électroaccepteur, le caractère accepteur de celui-ci est augmenté et le transfert de charge est renforcé. Il en résulte des spectres d'absorption et d'émission déplacés vers les grandes longueurs d'onde, une augmentation du coefficient d'extinction molaire et une modification du rendement quantique.

Parallèlement, si le cation interagit avec un groupement électrodonneur (cas fréquent si le donneur est une amine ou un ligand azoté), son caractère donneur est diminué et le transfert de charge est réduit. Il en résulte un effet hypsochrome des spectres d'absorption et d'émission et une baisse du coefficient d'extinction molaire. Cependant, si ce phénomène est souvent observé en spectrométrie d'absorption UV-visible, en pratique, le spectre de

fluorescence est très peu déplacé car l'excitation induit une photorupture de l'interaction entre le donneur et le cation, l'espèce émettrice est donc majoritairement le fluorophore libre.

Ces modifications de l'émission de la fluorescence en fonction de la présence de cations permettent la mise au point de sonde ratiométriques pour lesquelles l'enregistrement simultané de la fluorescence à deux longueurs d'onde et le calcul de leur ratio permet une meilleure précision que le suivi à une seule longueur d'onde.⁵³

3.4 Le Transfert de Proton Photoinduit

Les propriétés acides et basiques d'une molécule qui absorbe la lumière ne sont pas les mêmes à l'état fondamental et à l'état excité. La redistribution de la densité électronique lors de l'excitation est l'une des causes possibles. Un cas intéressant est celui où l'acide (ou la base) est plus fort à l'état excité qu'à l'état fondamental puisque dans ce cas l'excitation peut déclencher un transfert de proton, c'est ce que l'on appelle le transfert de proton photoinduit. Ainsi, les pKa de fonctions phénols et acides carboxyliques peuvent être diminués significativement (des variations de 3 à 8 unités de pKa peuvent être observées) tandis que le pKa d'une amine peut être bien plus élevé que celui de l'état fondamental.¹ Ces caractéristiques intéressantes peuvent être utilisées pour la mise au point de sondes à pH (*vide infra*).

3.5 La pro-fluorescence

La pro-fluorescence désigne la capacité de certaines espèces chimiques à émettre de la lumière suite à une réaction chimique mettant en jeu un analyte ciblé. En effet, certains fluorophores ont la particularité d'émettre différemment en fonction du degré de substitution de leurs fonctions chimiques. Lorsque les atomes d'oxygène ou d'azote de fluorophores tels que les fluorescéines, rhodamines, coumarines, oxazines ou acridinones sont substitués par des groupements le plus souvent électroattracteurs, ceux-ci voient leurs caractéristiques de fluorescence modifiées. Cela se caractérise par une diminution partielle ou totale de l'émission de fluorescence accompagnée le plus souvent d'un décalage vers le bleu par rapport à l'émission originale (Schéma 1-3).

⁵³ Pour un exemple de sonde ratiométrique pour la détection d'ions Zn^{2+} , voir Maruyama, S.; Kikuchi, K.; Hirano, T.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10650-10651.

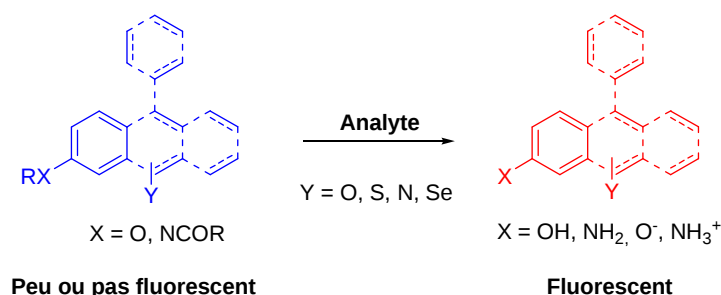


Schéma 1-3. Principe des pro-fluorophores.

Ce phénomène est notamment utilisé dans de nombreuses sondes pour détecter les espèces réactives de l'oxygène et/ou de l'azote (e.g., H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, NO , *vide infra*). Le principe consiste en l'introduction d'une fonction réactive sur le squelette du fluorophore qui inhibe sa fluorescence. En présence de ces espèces réactives, la fonction inhibitrice est transformée et le fluorophore formé émet de nouveau de la lumière.

L'avantage de la pro-fluorescence est de pouvoir obtenir des sondes dont la fluorescence est éteinte en n'utilisant qu'un seul fluorophore. Ceci constitue un avantage par rapport aux sondes FRET qui nécessitent un fluorophore donneur et un quencheur dont le coût constitue un frein pour le développement des sondes FRET à grande échelle. L'inconvénient de cette approche est la difficulté pour disposer d'une gamme de pro-fluorophores pouvant présenter à la fois des caractéristiques de pro-fluorescence, une émission efficace et à des longueurs d'ondes adaptées pour les applications envisagées.⁵⁴

Les sondes pro-fluorescentes ont ainsi été très largement développées dans des dosages d'immunosorption liée à l'enzyme (ELISA pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), le criblage haut débit d'inhibiteurs d'enzymes, la détection d'ADN et d'ARN, l'évaluation de la viabilité cellulaire ou pour la détection d'analytes variés dont quelques exemples vont être exposés dans la suite de ce chapitre.¹⁰

3. 6 Exemples de sondes fluorescentes activables

La sensibilité de la fluorescence, sa nature non destructrice, sa rapidité et facilité de mise en œuvre à moindre coût en font un outil puissant pour le développement de sondes pouvant détecter aussi bien des variations de pH, des antigènes, des anions (en particulier F^- et CN^-),

⁵⁴ Johnsson, N.; Johnsson, K. *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 31-38.

des ions métalliques, des oligonuléotides, des espèces réactives de l'oxygène/azote (H_2O_2 ,⁵⁵ $\text{O}_2^{\bullet-}$,⁵⁶ ONOO^- ,⁵⁷ NO ,⁵⁸ $^1\text{O}_2$,⁵⁹),⁶⁰ des thiols,⁶¹ des dérivés organophosphorés toxiques⁶² ou des enzymes. Les différents mécanismes et concepts mis en évidence dans les précédents paragraphes vont ainsi être illustrés à travers la description d'exemples de sondes fluorescentes. Un accent particulier sera porté sur les sondes émettant à des longueurs d'onde au-delà de 600 nm qui peuvent ouvrir des possibilités pour effectuer de l'imagerie *in vivo* (voir section II).

3. 6. 1 Les sondes à pH

La variation du pH dans l'organisme est un paramètre important de la vie cellulaire. La possibilité de pouvoir cartographier la dynamique du pH intracellulaire est un bon moyen pour mieux comprendre le fonctionnement de l'organisme et détecter ses dysfonctionnements. En effet, la production d'espèces acides dans l'organisme peut être à l'origine de nombreuses maladies. Des sondes sensibles aux variations du pH de la cellule ont donc été imaginées dans cette optique.¹⁰

⁵⁵ Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392-15393. Maeda, H.; Futkuyasu, Y.; Yoshida, S.; Fukuda, M.; Saeki, K.; Matsuno, H.; Yamauchi, Y.; Yoshida, K.; Hirata, K.; Miyamoto, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2389-2391. Miller, E. W.; Albers, A. E.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16652-16659. Xu, K.; Tang, B.; Huang, H.; Yang, G.; Chen, Z.; Li, P.; An, L. *Chem. Commun.* **2005**, 5974-5976. Dickinson, B. C.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9638-9639.

⁵⁶ Maeda, H.; Yamamoto, K.; Nomura, Y.; Kohno, I.; Hafsi, L.; Ueda, N.; Yoshida, S.; Fukuda, M.; Fukuyasu, Y.; Yamauchi, Y.; Itoh, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 68-69. Maeda, H.; Yamamoto, K.; Kohno, I.; Hafsi, L.; Itoh, N.; Nakagawa, S.; Kanagawa, N.; Suzuki, K.; Uno, T. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1946-1954. Xu, K.; Liu, X.; Tang, B. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 453-458.

⁵⁷ Ueno, T.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10640-10641. Yang, D.; Wang, H. L.; Sun, Z. N.; Chung, N. W.; Shen, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6004-6005.

⁵⁸ Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3357-3367. Sasaki, E.; Kojima, H.; Nishimatsu, H.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Hirata, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3684-3685. Lim, M. H.; Lippard, S. J. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 41-51. Zheng, H.; Shang, G.-Q.; Yang, S.-Y.; Gao, X.; Xu, J.-G. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2357-2360.

⁵⁹ Tanaka, K.; Miura, T.; Umezawa, N.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2530-2536.

⁶⁰ Setsukinai, K.-i.; Urano, Y.; Kakinuma, K.; Majima, H. J.; Nagano, T. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3170-3175. Koide, Y.; Urano, Y.; Kenmoku, S.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10324-10325. Miller, E. W.; Chang, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 620-625.

⁶¹ Maeda, H.; Matsuno, H.; Ushida, M.; Katayama, K.; Saeki, K.; Itoh, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2922-2925. Ahn, Y. H.; Lee, J. S.; Chang, Y. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4510-4511. Matsumoto, T.; Urano, Y.; Shoda, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3375-3377. Tang, B.; Xing, Y.; Li, P.; Zhang, N.; Yu, F.; Yang, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11666-11667. Zhang, M.; Yu, M.; Li, F.; Zhu, M.; Li, M.; Gao, Y.; Li, L.; Liu, Z.; Zhang, J.; Zhang, D.; Yi, T.; Huang, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10322-10323. Bouffard, J.; Kim, Y.; Swager, T. M.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 37-40. Fujimoto, K.; Yoshimura, Y.; Ihara, M.; Matsuda, K.; Takeuchi, Y.; Aoki, T.; Ide, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1106-1109. Pires, M. M.; Chmielewski, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 837-840.

⁶² Burnworth, M.; Rowan, S. J.; Weder, C. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7828-7836. Royo, S.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F.; Costero, A. M.; Parra, M.; Gil, S. *Chem. Commun.* **2007**, 4839-4847.

Le pH dans le cytosol est compris entre 6.8 et 7.4 et celui dans les lysosomes et endosomes entre 4.5 et 6.0. Il existe donc un grand intérêt pour des fluorophores dont la fluorescence puisse être modifiée autour d'un pH neutre mais également à des pH inférieurs.

Depuis les premiers exemples de suivi cellulaire du pH à l'aide de la fluorescéine (la formation d'espèces fermées non fluorescentes en fonction du pH ont déjà été exposées précédemment),⁶³ de nombreux systèmes ont été développés, notamment récemment avec des fluorophores émettant dans le proche IR. Les sondes à pH peuvent être classées selon deux types : soit elles émettent différemment après la déprotonation d'un acide carboxylique ou d'une fonction phénol, soit la fluorescence est modifiée après la protonation d'un atome d'azote.

Le premier type de sondes à pH utilise la meilleure émission d'un phénolate par rapport à un phénol pour détecter la variation de concentration de protons dans le milieu. Par exemple, la 4-MU et la pyranine subissent un transfert de proton à l'état excité : le proton du phénol (pK_a voisin de 7.0 à l'état fondamental) est plus acide à l'état excité, il en résulte que le phénolate est formé plus facilement et l'émission de lumière est accrue.

Les BODIPYs sont normalement réputés pour être insensibles aux variations de pH. Cependant, en présence de certaines fonctionnalités introduites sur le groupement phényle de la position *méso*, il a été observé des variations de l'émission en fonction du pH et des sondes à pH ont ainsi pu être développées. Mais contrairement à la 4-MU et la pyranine, ce sont les formes phénol qui émettent le plus (Figure 1-38).²⁷

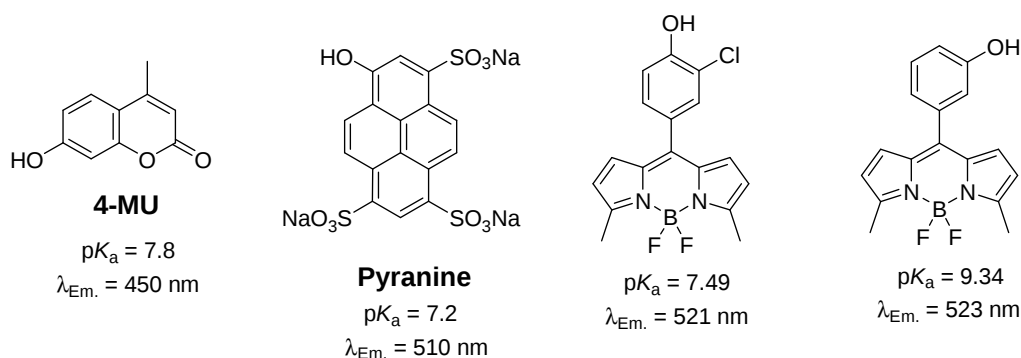


Figure 1-38. Exemples de sondes à pH : l'émission de la fluorescence dépend de la formation de la forme phénol ou phénolate.

⁶³ Thomas, J. A.; Buchsbaum, R. N.; Zimniak, A.; Racker, E. *Biochemistry* **1979**, *18*, 2210-2218.

Le deuxième type de sondes à pH est le plus intéressant car il permet d'obtenir des sondes ayant des pK_a compris entre 5.0 et 7.0 qui se rapprochent des conditions des milieux physiologiques.

Il existe d'innombrables exemples de ce type de sondes mais les meilleurs d'entre eux mettent en jeu les norcyanines qui présentent l'avantage d'émettre dans le proche IR. Les cyanines ont habituellement un atome d'azote neutre (le donneur) et un autre chargé (l'accepteur) et les électrons circulent à travers les doubles liaisons selon un système « push-pull ». Avec les norcyanines, l'atome d'azote de l'accepteur n'est pas substitué et est donc non chargé, ce qui conduit à une moins bonne circulation des électrons et une émission de lumière assez faible. En revanche, en présence de protons, l'atome d'azote est protoné et l'ammonium formé induit une meilleure circulation des électrons, ce qui restaure la fluorescence de la cyanine (Figure 1-39).

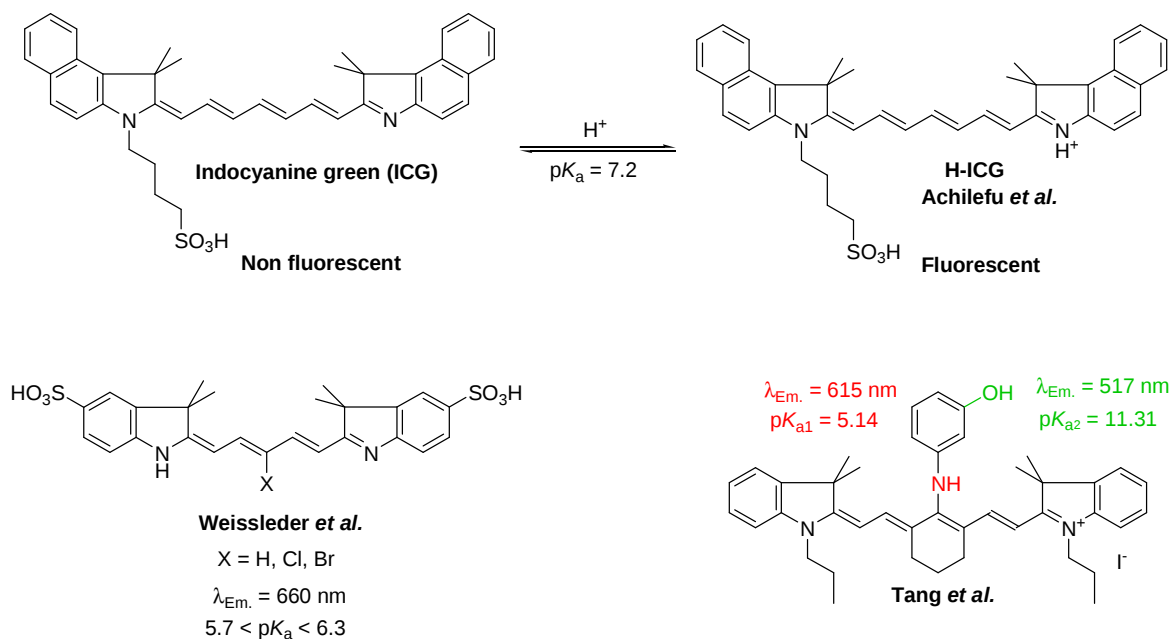


Figure 1-39. Exemples de sondes à pH à base de cyanines et norcyanines.

Ainsi, de nombreux exemples de norcyanines ont été développés⁶⁴ notamment par les groupes de S. Achilefu,⁶⁵ R. Weissleder⁶⁶ et B. Tang.⁶⁷ Les sondes obtenues émettent au-delà de 600

⁶⁴ Miltsov, S.; Encinas, C.; Alonso, J. N. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 9253-9254. Briggs, M. S.; Burns, D. D.; Cooper, M. E.; Gregory, S. J. *Chem. Commun.* **2000**, 2323-2324. Cooper, M. E.; Gregory, S.; Adie, E.; Kalinka, S. J. *Fluoresc.* **2002**, 12, 425-429. Ei-Shishtawy, R. M.; Almeida, P. *Tetrahedron* **2006**, 62, 7793-7798. Puyol, M.; Encinas, C.; Rivera, L.; Mijtssov, S.; Alonso, J. *Dyes Pigm.* **2007**, 73, 383-389.

⁶⁵ Zhang, Z. R.; Achilefu, S. *Chem. Commun.* **2005**, 5887-5889.

⁶⁶ Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. *Chem. Commun.* **2007**, 2747-2749.

⁶⁷ Tang, B.; Liu, X.; Xu, K. H.; Huang, H.; Yang, G. W.; An, L. G. *Chem. Commun.* **2007**, 3726-3728.

nm et les pK_a varient autour de 7.0 ou de 5.0, ce qui permet d'envisager de suivre l'évolution du pH *in vivo*.

L'exemple de sonde développé par B. Tang est particulier, car il permet de concilier les deux concepts de sonde à pH : en effet, en milieu acide, la protonation de l'atome d'azote ($pK_{a1} = 5.14$) de la norcyanine permet une émission à 615 nm tandis qu'en milieu basique ($pK_{a2} = 11.31$) la déprotonation du phénol permet une émission différente à 517 nm.

Enfin, l'émission de certains BODIPYs peut également être modifiée suite à la protonation d'un atome d'azote selon un mécanisme reposant sur le TeP (Figure 1-40).⁶⁸

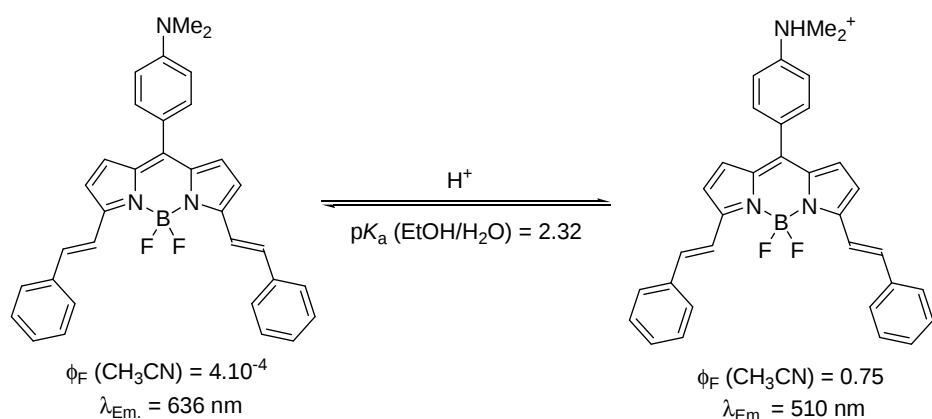


Figure 1-40. Sonde à pH dérivée d'un BODIPY et basée sur le TeP.

3. 6. 2 Les sondes à cations et anions

La détection de cations,⁶⁹ organiques ou inorganiques, est d'un grand intérêt dans la mesure où ceux-ci sont omniprésents dans la nature : le sodium, le potassium, le fer, le magnésium, le calcium, les ammoniums sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme la régulation de l'activité cellulaire, l'influx nerveux, la contraction des muscles, etc. ; certains cations comme le zinc (II) sont fortement impliqués dans les complexes métalloenzyme ; il est également souvent important en médecine de pouvoir suivre le niveau des cations dans l'organisme comme le potassium dans le cas de la pression artérielle, l'aluminium pour les traitements de la maladie d'Alzheimer ou le lithium lors de traitements contre la dépression ; enfin, une détection très sensible de métaux toxiques comme le cadmium (II), le mercure (II) ou le plomb (II) est d'un grand intérêt environnemental.

⁶⁸ Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. *New J. Chem.* **2001**, 25, 289-292.

⁶⁹ Pour une revue récente sur la détection de métaux basée sur l'ouverture du motif spirolactame de rhodamines, voir Kim, H. N.; Lee, M. H.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1465-1472.

La structure de la sonde fluorescence idéale est représentée sur la figure 1-41 :

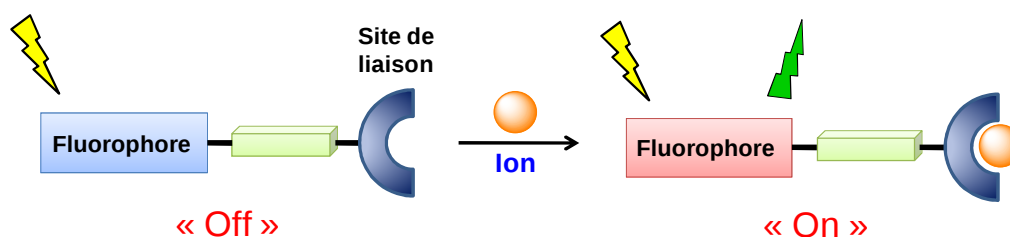


Figure 1-41. Principe des sondes fluorescentes « Off » - « On » pour la détection d'ions.

L'idéal est de posséder des sondes qui reposent sur le principe de l'interrupteur : elles n'émettent pas de lumière en l'absence de l'ion à détecter (état « Off ») mais émettent de la lumière une fois liées sélectivement à l'ion ciblé (état « On »). Les mécanismes qui permettent l'extinction de la lumière en l'absence d'analyte sont de type TeP, TCP, transfert d'énergie ou la formation/disparition d'exciplexe/excimère.⁷⁰

Un des moyens efficaces pour avoir une détection spécifique d'un cation est d'utiliser un ligand spécifique comme récepteur. Par exemple, les éthers couronnes et autres cryptands développés notamment par J.-M. Lehn⁷¹ sont d'excellents complexants des métaux alcalin et de transition. Le greffage de l'éther couronne 15-[C]-5 sur un dérivé de fluorescéine de type Tokyo Green a ainsi permis de détecter sélectivement le cation Na^+ . En l'absence de Na^+ , un transfert d'électron du cycle aromatique vers le noyau xanthène empêche la fluorescence⁷² mais en présence de Na^+ , le TeP est inhibé et la fluorescence est restaurée (Figure 1-42 a).⁷³

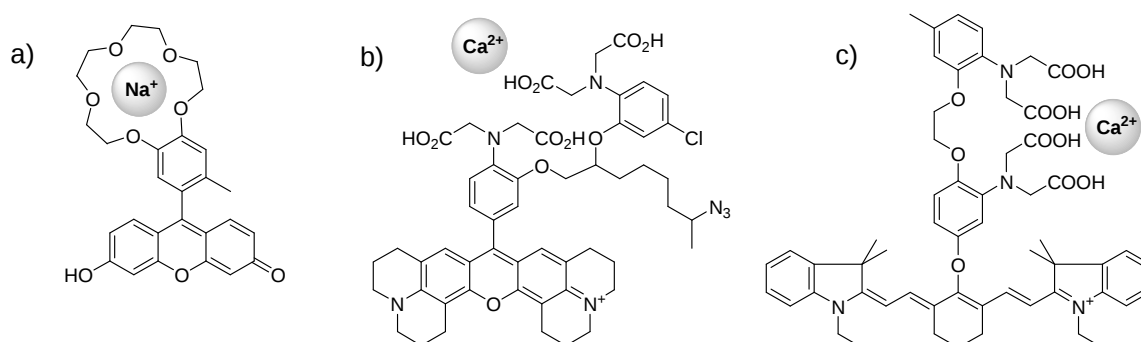


Figure 1-42. Sondes TeP pour la détection des ions : a) Na^+ par complexation de l'ion par un éther couronne ; b-c) Ca^{2+} par chélation avec des ligands possédant plusieurs groupements acide carboxylique.

⁷⁰ Pour des revues complètes de sondes fluorescentes pour la détection d'ions, voir : Valeur, B.; Leray, I. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 3-40. Callan, J. F.; de Silva, A. P.; Magri, D. C. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8551-8588.

⁷¹ Lehn, J.-M., *Supramolecular chemistry*, Wiley-VCH: Weinheim: 1995.

⁷² Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4888-4894.

⁷³ Kenmoku, S.; Urano, Y.; Kanda, K.; Kojima, H.; Kikuchi, K.; Nagano, T. *Tetrahedron* **2004**, 60, 11067-11073.

Outre les éthers-couronnes, il est possible d'utiliser d'autres fonctions chélatantes comme des acides carboxyliques. Ceux-ci sont capables de se lier à des cations durs comme les ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} . Par exemple, la synthèse d'un dérivé de la rhodamine possédant quatre fonctions acides carboxyliques a permis d'obtenir une chélation efficace de l'ion Ca^{2+} . En présence de celui-ci, la sonde émet à 600 nm avec une excellente brillance de $42\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Figure 1-42 b).⁷⁴

Une espèce chélatrice du même type a aussi été utilisée avec un dérivé de Cy 7.0 stabilisé et a permis la détection de Ca^{2+} à 782 nm grâce à une augmentation du rendement quantique de 5% pour le fluorophore libre à 12% pour le complexe. Le mécanisme décrit est un TeP, ce qui a permis aux auteurs de valider le fait que ce type de mécanisme est également possible dans le proche IR (Figure 1-42 c).⁷⁵

La sélectivité pour un cation peut être obtenue de différentes façons, soit en modulant le nombre, le positionnement et la nature des fonctions complexantes, ce qui est le cas le plus classique, soit en variant les substituants présents sur le fluorophore, comme illustré sur la figure 1-43 tirée du catalogue Molecular Probes.¹⁰

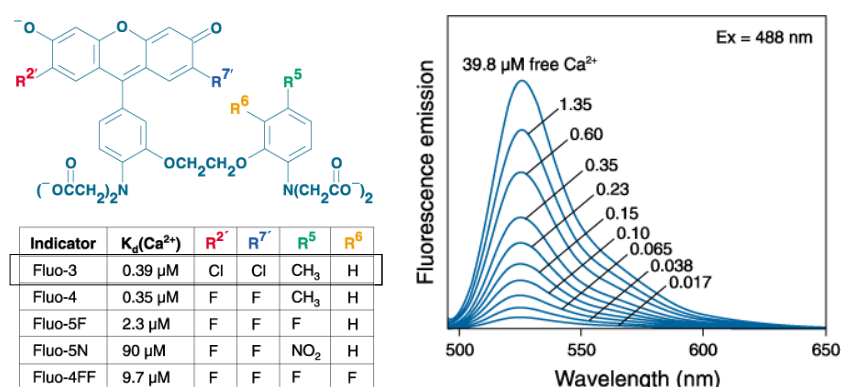


Figure 1-43. Variation de la substitution de sondes fluorescentes reposant sur un mécanisme de TeP et appliquées à la détection de Ca^{2+} .

Le zinc est le deuxième métal de transition le plus abondant dans le corps humain et intervient dans de nombreux processus biologiques. C'est pourquoi de nombreuses sondes fluorescentes ont été développées.⁷⁶ Les plus efficaces sont construites à partir d'un ligand du type di-2-picolylamine (DPA), qui est un excellent chélatant de l'ion Zn^{2+} . Dans ce contexte, le groupe

⁷⁴ Gaillard, S.; Yakovlev, A.; Luccardini, C.; Oheim, M.; Feltz, A.; Mallet, J.-M. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2629-2632.

⁷⁵ Ozmen, B.; Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 9185-9188.

⁷⁶ Carol, P.; Sreejith, S.; Ajayaghosh, A. *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 338-348.

de T. Nagano a été le premier à publier une sonde pour la détection de Zn^{2+} qui émette dans le proche IR.⁷⁷ En présence de l'ion Zn^{2+} , la sonde subit un effet bathochrome de 44 nm de sa longueur d'onde d'absorption, ce qui permet de l'utiliser comme sonde ratiométrique (Figure 1-44 a).

Une amélioration de ce type de sonde a été reportée peu après par le groupe de B. Tang avec la publication d'une sonde TeP émettant à 800 nm (avec 194 nm de déplacement de Stokes) et montrant une augmentation de la fluorescence après l'ajout de Zn^{2+} (Figure 1-44 b).⁷⁸

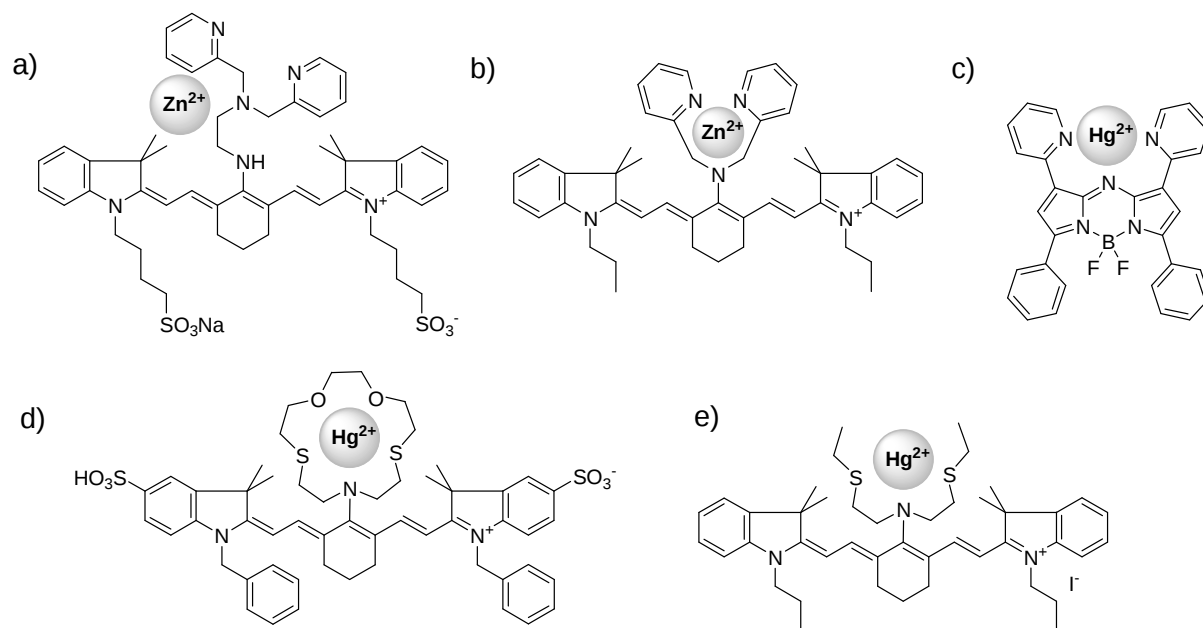


Figure 1-44. Sondes fluorescentes pour la détection des ions Zn^{2+} et Hg^{2+} .

Le mercure est un des métaux les plus toxiques connus. La détection de ses différentes formes et notamment l'ion Hg^{2+} est donc d'un grand intérêt environnemental. De nombreuses sondes ont déjà été synthétisées mais peu d'entre elles émettent à des longueurs d'ondes lointaines.⁷⁹ Parmi elles, un dérivé aza-BODIPY portant deux groupements pyridine capables de chélater le métal a été reporté. Le rendement quantique est le même entre le fluorophore libre et l'espèce complexée mais l'émission de fluorescence passe de 682 à 719 nm dans l'acétonitrile (Figure 1-44 c).⁸⁰

⁷⁷ Kiyose, K.; Kojima, H.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6548-6549.

⁷⁸ Tang, B.; Huang, H.; Xu, K. H.; Tong, L. L.; Yang, G. W.; Liu, X.; An, L. G. *Chem. Commun.* **2006**, 3609-3611.

⁷⁹ Nolan, E. M.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3443-3480.

⁸⁰ Coskun, A.; Yilmaz, M. D.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 607-609.

L'introduction d'un éther couronne sur un Cy 7.0 stabilisé a aussi permis l'obtention d'une sonde colorimétrique avec un maximum d'absorption qui passe de 695 nm ($\epsilon = 86\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) à 817 nm ($\epsilon = 190\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) et un changement de couleur qui vire du bleu à l'incolore. Cependant, la fluorescence diminue en présence d'ions Hg^{2+} et la sonde ne peut être utilisée en fluorimétrie que selon un mode « On » - « Off » (Figure 1-44 d).⁸¹

Cet inconvénient peut être évité avec la sonde TeP développée par le groupe de B. Tang où une augmentation de fluorescence est observée suite à la chélation de Hg^{2+} . La sonde émet à 763 nm avec un rendement quantique qui passe de 2 à 12% en présence d'ions Hg^{2+} (Figure 1-44 e).⁸²

La détection d'anions a également été initiée grâce à l'essor de la chimie supramoléculaire développée par C. J. Pedersen et J.-M. Lehn dans les années 60 mais ce n'est que depuis ces vingt dernières années que celle-ci a été développée de façon plus intensive.⁸³ La détection des anions par fluorimétrie est d'un grand intérêt puisque de nombreuses biomolécules, polluants (phosphates, nitrates, etc.) ou halogénures sont des anions ou possèdent des motifs anioniques.⁸⁴ Cependant, leur détection reste un défi à cause de leur sensibilité au pH et de leur plus grande taille (par rapport à leur cation isoélectronique). De plus, très peu d'exemples de sondes émettant à des longueurs d'ondes élevées ont pour l'instant été reportés.

Par exemple, E. U. Akkaya a développé des sondes à base de BODIPYs pour la détection d'ions phosphates et cyanure. En présence d'ions Zn^{2+} , le BODIPY n'émet pas de lumière à cause d'un mécanisme de TeP oxydatif. En présence d'ions phosphate, une émission de fluorescence est observée à 518 nm et augmente d'un facteur 25 (Schéma 1-4 a).⁸⁵

⁸¹ Zhu, M.; Yuan, M.; Liu, X.; Xu, J.; Lv, J.; Huang, C.; Liu, H.; Li, Y.; Wang, S.; Zhu, D. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1481-1484.

⁸² Tang, B.; Cui, L. J.; Xu, K. H.; Tong, L. L.; Yang, G. W.; An, L. G. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1159-1164.

⁸³ Pour des revues récentes sur la détection d'anions, voir : Beer, P. D.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486-516. Gale, P. A.; Garcia-Garrido, S. E.; Garric, J. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 151-190.

⁸⁴ Snowden, T. S.; Anslyn, E. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 740-746. Martinez-Manez, R.; Sancenon, F. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419-4476.

⁸⁵ Coskun, A.; Baytekin, B. T.; Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5649-5651.

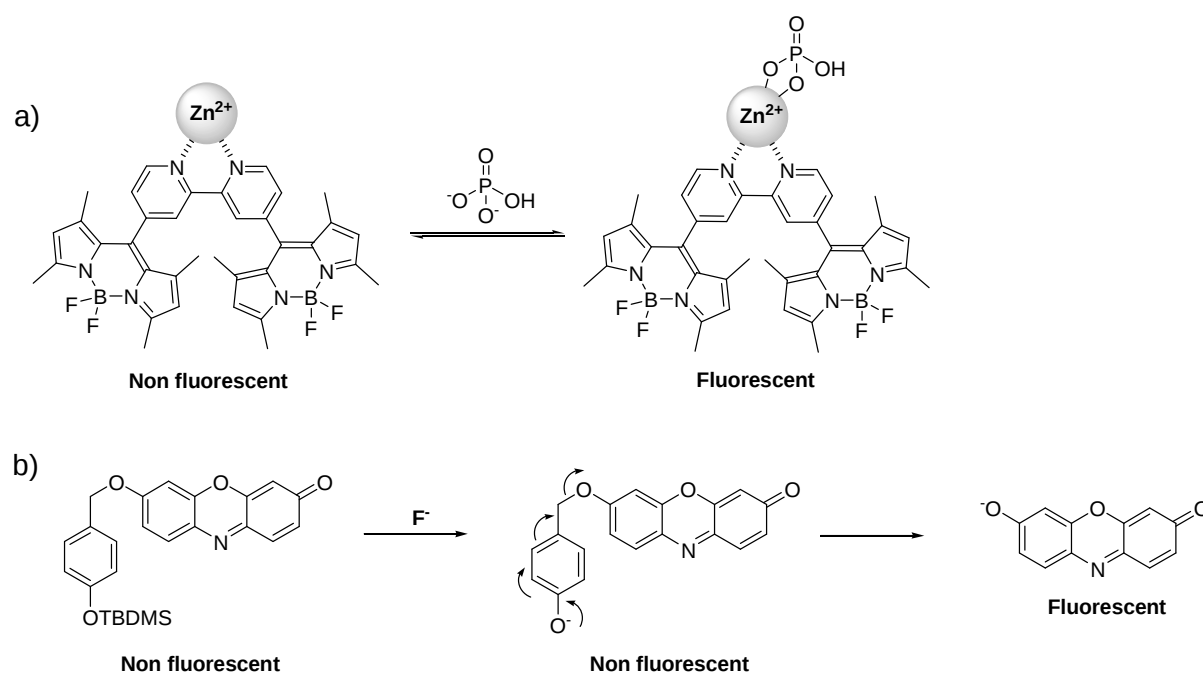


Schéma 1-4. Détection d'anions : a) HPO_4^{2-} via un complexe BODIPY- Zn^{2+} ; b) F^- grâce à un bras réactif auto-immolable et la résorufine.

Un exemple intéressant pour notre étude est l'utilisation d'un bras réactif auto-immolable pour la détection de l'ion fluorure⁸⁶ en milieu aqueux.⁸⁷ Elle est fondée sur un principe classique pour la détection des ions fluorure,⁸⁸ c'est-à-dire l'utilisation de l'affinité des ions fluorures pour le silicium qui permet d'avoir une déprotection sélective d'un phénol protégé par un groupement silylé. Dans ce cas, la déprotection du phénol est suivie de la fragmentation du bras réactif et conduit à la libération de la résorufine. Toutefois, ce dispositif est limité dans la mesure où il ne fonctionne que dans un mélange d'eau et d'acétonitrile (Schéma 1-4 b).

⁸⁶ Pour des exemples de détection d'ions fluorure à l'aide de porphyrine et fluorescéine, voir : Kubo, Y.; Yamamoto, M.; Ikeda, M.; Takeuchi, M.; Shinkai, S.; Yamaguchi, S.; Tamao, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2036-2040. Swamy, K. M. K.; Lee, Y. J.; Lee, H. N.; Chun, J.; Kim, Y.; Kim, S. J.; Yoon, J. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 8626-8628.

⁸⁷ Kim, S. Y.; Hong, J.-I. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3109-3112.

⁸⁸ Sagot, M. A.; Heutte, F.; Renard, P.-Y.; Dolle, F.; Pradelles, P.; Ezan, E. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4286-4291.

3. 6. 3 La détection d'enzymes

La détection d'enzymes est un enjeu extrêmement important dans le contexte de criblage à haut débit⁸⁹ visant à la découverte de nouveaux médicaments, dans le but d'obtenir de nouvelles protéines non naturelles avec des propriétés inédites,⁹⁰ ou pour la mise en évidence de dysfonctionnements *in vivo*. Dans ce contexte, la mise au point de sondes fluorogéniques activables est d'un grand intérêt. En effet, la modification d'un substrat enzymatique par un marqueur fluorescent est à ce jour la méthode la plus sensible (puisque l'information est multipliée par le taux de roulement de l'enzyme) et sélective (si la modification du substrat par le fluorophore n'est pas préjudiciable à sa reconnaissance par l'enzyme) pour la détection d'une activité enzymatique, ce qui explique les développements récents qui ont été effectués dans ce domaine.⁴²

Dans le but de mettre au point de telles sondes, trois stratégies principales ont été envisagées et permettent la détection d'enzymes diverses.⁹¹

La première méthode est la plus directe et utilise des pro-fluorophores reliés directement au substrat reconnu par l'enzyme cible. Cette stratégie a ainsi permis de détecter des substrats aussi variés que des estérases,⁹² phosphatases,⁹³ β -galactosidase⁹⁴ ou autres substrats osidiques,⁹⁵ cytochrome P450,⁹⁶ MAO (pour « monoamine oxydases »)⁹⁷ ou le coenzyme Q.⁹⁸ Certains de ces dispositifs sont représentés sur le schéma 1-5.

⁸⁹ Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 314-322. Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363-370.

⁹⁰ Liu, D. R.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 36-54. Jaeger, K.-E.; Reetz, M. T. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 68-73. Reetz, M., T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284-310. Taylor, S. V.; Kast, P.; Hilvert, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3310-3335. Gauchet, C.; Taran, F.; Renard, P.-Y.; Crémignon, C.; Grassi, J.; Pradelles, P.; Mioskowski, C. *J. Immunol. Methods* **2002**, *269*, 133-145. Reetz, M. T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6595-6602. Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5716-5722. Valetti, F.; Gilardi, G. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 490-511. Wang, L.; Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34-66.

⁹¹ La détection des peptidases et de certaines enzymes détectées *via* une stratégie utilisant un bras réactif auto-immolable seront discutées dans le chapitre 2.

⁹² La plupart des sondes visant à la détection d'estérases sont toutefois peu ou pas sélectives.

⁹³ Sarpara, G. H.; Hu, S. J.; Palmer, D. A.; French, M. T.; Evans, M.; Miller, J. N. *Anal. Chem.* **1999**, *36*, 19-20.

⁹⁴ Tung, C.-H.; Zeng, Q.; Shah, K.; Kim, D.-E.; Schellingerhout, D.; Weissleder, R. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1579-1583. Kamiya, M.; Kobayashi, H.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Bernardo, M.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3918-3929.

⁹⁵ Coleman, D. J.; Studler, M. J.; Naleway, J. J. *Anal. Biochem.* **2007**, *371*, 146-153.

⁹⁶ Celik, A.; Roberts, G. A.; White, J. H.; Chapman, S. K.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. *Chem. Commun.* **2006**, 4492-4494. Yatzeck, M. M.; Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Chandran, S. S.; Ronald T. Raines, R. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, sous presse.

⁹⁷ Chen, G.; Yee, D. J.; Gubernator, N. G.; Sames, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4544-4545. Albers, A. E.; Rawls, K. A.; Chang, C. J. *Chem. Commun.* **2007**, 4647-4649.

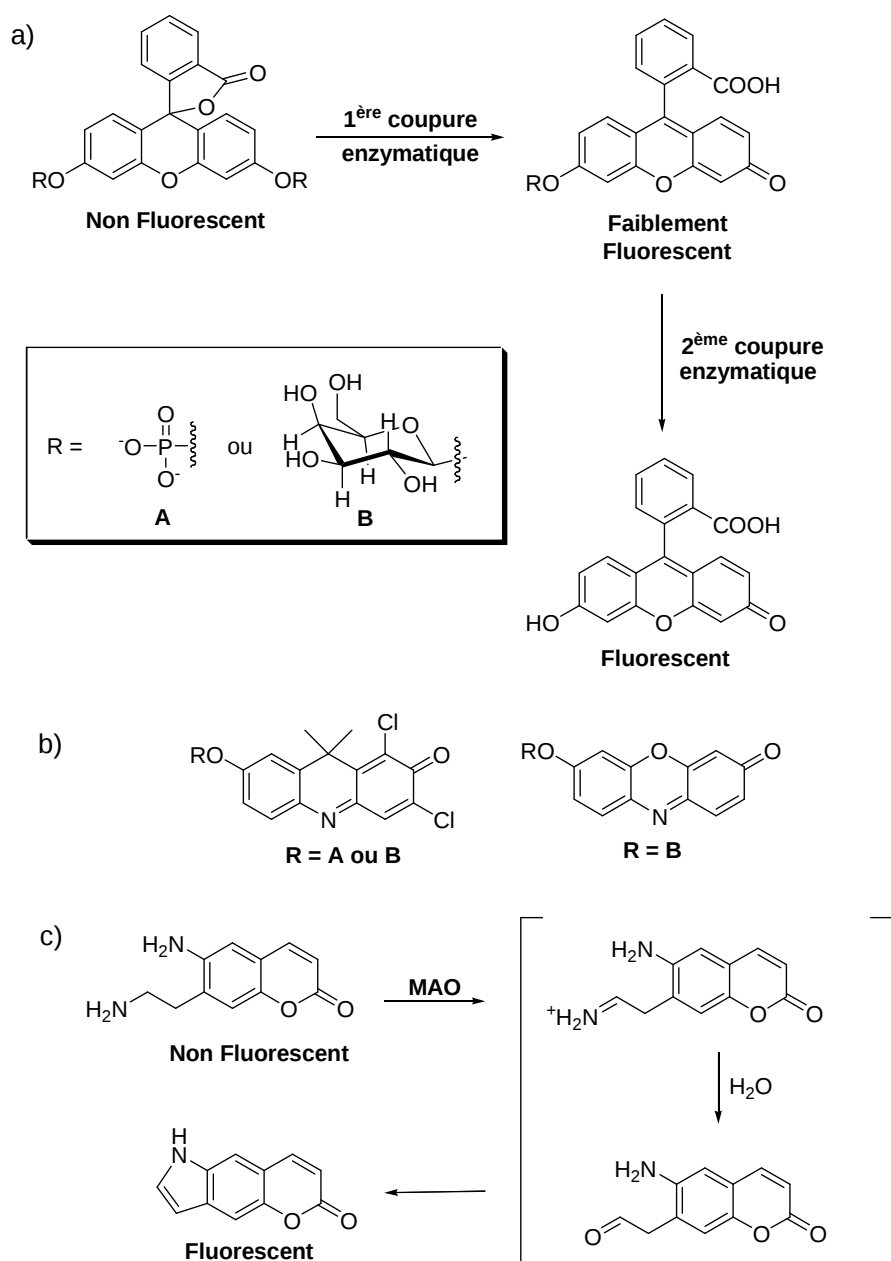


Schéma 1-5. Première stratégie pour la détection d'enzymes : le pro-fluorophore est relié directement au substrat. a) Utilisation de la fluorescéine pour la détection de phosphatases et de β -galactosidase ; b) Extension de la détection à de plus grandes longueurs d'ondes ; c) Sonde pro-fluorescente pour la détection de MAO.

Cependant, peu d'exemples ont été décrits avec des fluorophores émettant à des longueurs d'onde dans le proche IR. De plus, les seuls dispositifs décrits utilisent la résorufine, DDAO ou la naphthofluorescéine qui présentent de sérieuses limitations (voir chapitre 2).

⁹⁸ Tremblay, M. S.; Sames, D. *Org. Lett.* **2005**, 7, 2417-2420. Pour un autre exemple de sonde redox visant les 3α -hydroxystéroïde déshydrogénases, voir Yee, D. J.; Balsanek, V.; Sames, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2282-2283.

La principale limitation de cette stratégie est qu'il faut conserver une reconnaissance par l'enzyme du pseudo-substrat fluorogénique, ce qui est souvent problématique étant donné leur encombrement stérique et le caractère aromatique et lipophile des fluorophores.

Une seconde stratégie, plus limitée, mais souvent plus efficace consiste à utiliser les substrats et produits naturels de l'enzyme, voire un des cofacteurs (métallique en particulier), et d'avoir un pro-fluorophore dont les propriétés de fluorescence sont modifiées par l'un de ces intervenants. Un exemple significatif est représenté sur le schéma 1-6 : le clivage du substrat par l'enzyme cible libère une espèce chélatante qui casse le complexe [Cu.Calcéine] initialement non fluorescent. La calcéine est ainsi libérée et son émission de fluorescence est restaurée.

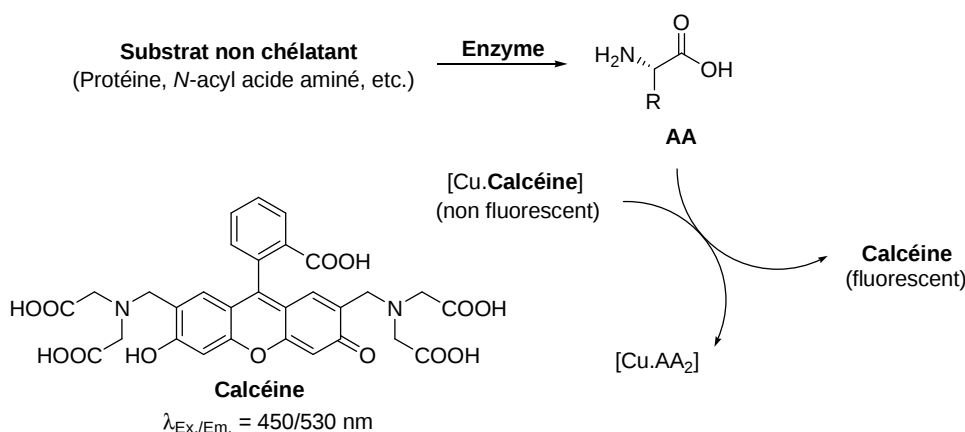


Schéma 1-6. Deuxième stratégie pour la détection d'enzymes : la fluorescence est modifiée indirectement par la libération d'une espèce réagissant avec l'espèce pro-fluorescente.

La troisième stratégie fait intervenir le mécanisme de FRET, plus rarement de quenching statique ou dynamique,⁵ et a donné lieu à des dispositifs ingénieux. Par exemple, le groupe de T. Nagano a décrit des sondes ratiométriques pour la détection de l'activité de phosphodiésterases.⁴⁶

Sa première génération de sonde repose sur la séparation classique de deux partenaires suite au clivage enzymatique par l'enzyme (Figure 1-45 a). Un élément clef dans cette stratégie est le choix du linker séparant les deux fluorophores afin d'éviter un quenching par agrégation des deux fluorophores en milieu aqueux. Cependant, après le clivage enzymatique, l'émission de lumière s'effectue à de plus petites longueurs d'onde (450 nm) que l'émission initiale (515 nm), ce qui empêche l'utilisation de cette sonde en milieu biologique à cause de la présence

d'un bruit de fond important à ces longueurs d'onde UV-visible. Un dispositif permettant d'observer le phénomène inverse serait donc préférable.⁹⁹

Ainsi, une deuxième génération de sonde a été mise au point pour la détection de PTP (Protein Tyrosine Phosphatase). Dans ce cas, les fonctions phénol de l'accepteur (fluorescéine) sont protégées par des groupements phosphate. La fluorescéine est sous sa forme fermée qui absorbe dans l'UV et ne peut pas effectuer de FRET avec le donneur. L'émission initiale est donc celle de la coumarine à 450 nm. Cependant, en présence de PTP, les groupements phosphate sont hydrolysés, la fluorescéine retrouve sa forme ouverte fluorescente, un FRET peut donc s'effectuer avec la coumarine et une émission à 515 nm est observée (Figure 1-45 b).

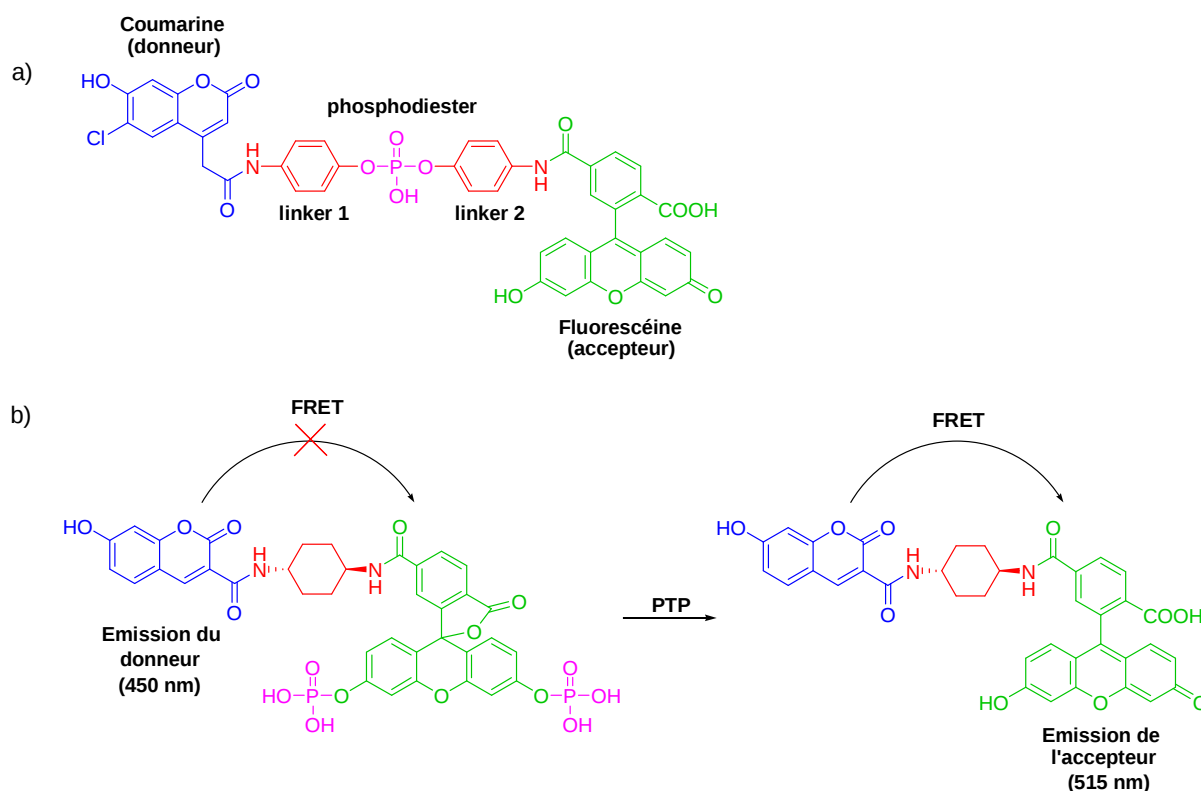


Figure 1-45. Troisième stratégie pour la détection d'enzymes : les sondes FRET. Sondes ratiométriques mise au point par le groupe de Nagano pour : a) la détection de phosphodiesterases ; b) la détection de PTP.

D'autres sondes FRET ont également été mises au point pour la détection de β -lactamases.¹⁰⁰

Le groupe de R. Y. Tsien a décrit une sonde utilisant une coumarine comme donneur et une fluorescéine comme accepteur dont la rupture du motif β -lactame permet un éloignement

⁹⁹ Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1653-1657.

¹⁰⁰ Campbell, R. E. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 208-211.

spatial qui diminue le FRET (Figure 1-46 a).¹⁰¹ De la même manière, le groupe de J. Rao a utilisé un dispositif analogue à la différence qu'il s'agit d'une sonde quenchée avec Cy 5.0 comme donneur, QSY[®]-21 comme quencher et que la sonde peut être utilisée en imagerie *in vivo* (Figure 1-46 b).¹⁰²

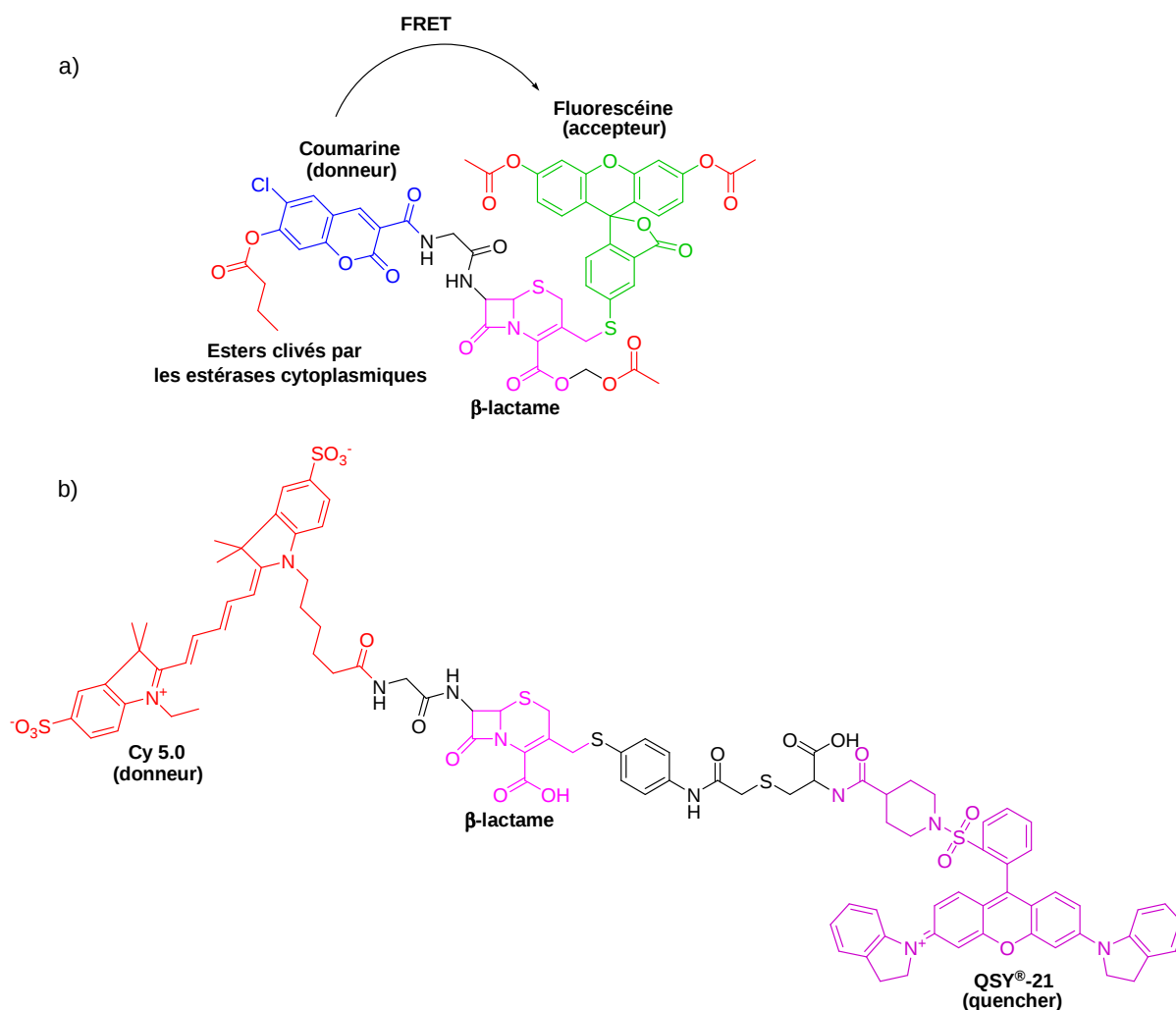


Figure 1-46. Sondes FRET pour la détection de β -lactamases *via* : a) un couple de fluorophores coumarine/fluorescéine ; b) un couple fluorophore/quencher Cy 5.0/QSY[®]-21 utilisable en imagerie *in vivo*.

¹⁰¹ Zlokarnik, G.; Negulescu, P. A.; Knapp, T. E.; Mere, L.; Burres, N.; Feng, L.; Whitney, M.; Roemer, K.; Tsien, R. Y. *Science* **1998**, 279, 84-88.

¹⁰² Xing, B.; Khanamiryan, A.; Rao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4158-4159.

II L'IMAGERIE MOLECULAIRE

1 Introduction

Le décryptage du génome humain étant achevé, un des défis qui en découle est de comprendre les fonctions des gènes, des protéines et des interactions protéines-protéines afin de déterminer leur rôle respectif dans le développement des maladies. Pour cela, l'imagerie moléculaire, qui se définit comme étant la mesure ou la visualisation des processus biologiques dans les organismes vivants à l'échelle cellulaire et moléculaire, constitue un domaine très attractif.¹⁰³

En effet, l'objectif de l'imagerie moléculaire est de mettre au point des sondes/biomarqueurs permettant d'observer l'activité de la cellule dans le but de : 1) détecter des anomalies moléculaires ou physiologiques à un stade encore guérissable d'une maladie ; 2) mettre au point et/ou ajuster un traitement en temps réel ; 3) rationaliser le développement de nouveaux médicaments grâce à une meilleure connaissance de la maladie.

Le développement d'une nouvelle thérapie (pour le cancer par exemple) est chère, longue et nécessite de nombreux tests *in vivo* (chez l'animal puis chez l'homme). Il est estimé que dix à douze ans sont nécessaires pour mettre au point un médicament, pour un coût souvent supérieur à 600 millions d'euros (900 millions de dollars US). A cela s'ajoute le fait que certains traitements ne sont efficaces que pour une certaine fraction de la population, avec une forte différence interindividuelle de la réponse aux médicaments.¹⁰⁴ L'imagerie moléculaire, qui constitue donc un enjeu fort à la fois économique et de santé publique, se propose d'améliorer le coût du développement du médicament grâce à la mise au point d'outils pouvant être utilisés à tous les stades du développement du médicament.

Pour cela, la visualisation des processus biologiques nécessite le développement non seulement d'agents de contraste mais aussi de technologies performantes d'imagerie afin de les visualiser. Les dispositifs d'imagerie actuels peuvent être classés selon l'énergie utilisée pour obtenir l'information (rayons X, photons, ultrasons), la résolution spatiale atteinte (macroscopique, mésoscopique ou microscopique) ou le type d'informations qui est obtenu (anatomique, physiologique, cellulaire ou moléculaire).

¹⁰³ Weissleder, R.; Mahmood, U. *Radiology* **2001**, 219, 316-333.

¹⁰⁴ Weissleder, R. *Science* **2006**, 312, 1168-1171.

Ainsi, dans un premier temps, le principe des principales méthodes d'imagerie moléculaire, ainsi que leurs avantages et limitations vont être brièvement présentées afin de dresser un panorama des techniques actuelles et des orientations à prendre pour les améliorer. Dans un second temps, une section sera consacrée plus spécialement à l'imagerie optique qui connaît un intérêt croissant depuis ces quinze dernières années et qui a constitué le cadre de notre étude.

2 Les différents types d'imagerie moléculaire

Découverts en 1895 par W. Röntgen, les rayons X sont historiquement à l'origine de toutes les techniques d'imagerie actuelles. Cette découverte a permis le développement de la radiographie médicale qui a constitué une avancée extraordinaire pour la visualisation des structures internes du corps humain. Les rayons X sont un rayonnement ionisant analogue aux rayons γ à la différence que ceux-ci sont produits par transitions électroniques (alors qu'il s'agit de transitions nucléaires pour les rayons γ). Ils sont très énergétiques et pénètrent très bien la matière molle (la peau, la graisse, les muscles qui sont peu opaques aux rayons X) et sont bien absorbés par la matière dure plus opaque (essentiellement les os). Les différences entre les constituants du corps permettent de créer un contraste et une image qu'il est possible d'améliorer en injectant un agent de contraste (BaSO_4 , CO_2 ou l'iode qui a la propriété de fortement absorber les rayons X et donc de rendre très visibles les tissus environnants).

Cependant, l'utilisation des rayons X en imagerie moléculaire n'a pu prendre son essor que dans les années 70 avec l'avènement des ordinateurs, qui ont permis d'aller au-delà du simple cliché photographique. En effet, la TDM (tomodensitométrie, aussi appelée scanner-CT ou tomographie axiale calculée par ordinateur dérivant du terme anglais Computed Tomography) permet l'obtention d'une image grâce à une reconstruction 3D des tissus à partir du balayage sous rayons X du patient. Toutefois, les limitations de ce type d'imagerie résident dans son caractère invasif, tant à cause de l'exposition prolongée à des rayonnements ionisants que dans l'utilisation d'agents de contrastes potentiellement nocifs.

L'échographie est une méthode d'imagerie employant les ultrasons qui dérive des développements des sonars pendant la première guerre mondiale. Le principe est de produire une onde à hautes fréquences (2-18 MHz) et d'enregistrer son écho. Celui-ci dépend des obstacles rencontrés, donc connaissant la vitesse du son et la force de l'écho enregistré, un

traitement mathématique permet de transformer les signaux en une image 2D ou 3D. L'avantage de cette technique est de pouvoir effectuer de l'imagerie en temps réel, ce qui permet par exemple de visualiser le flux sanguin ou la structure et les mouvements des organes. C'est une technique sans danger, facile à mettre en œuvre et peu chère par rapport à certaines autres techniques d'imagerie (TEP, IRM). Bien que son application principale soit dans le domaine de l'obstétrique, l'échographie est complémentaire d'autres méthodes d'imagerie car elle permet de visualiser les tissus mous qui sont par exemple invisibles sous rayons X.

Des avancées récentes en oncologie permettent également la détection de tumeurs et, d'une façon plus originale, l'utilisation des ultrasons a pu être appliquée à la délivrance des médicaments (« drug-delivery ») afin de faire en sorte que le médicament anti-cancéreux soit libéré plus spécifiquement au niveau des cellules malades.

Cependant, ses limitations résident dans le fait que la présence d'air ou de gaz ne laisse pas passer l'onde, ce qui rend l'échographie incompatible avec l'imagerie de certains organes comme l'estomac ou le pancréas. De plus, son pouvoir de pénétration est limité et ne permet pas d'atteindre de grandes profondeurs dans le corps, ce qui constitue une limitation pour le diagnostic de personnes en surpoids.

La TDM et l'échographie permettent de fournir des images du corps humain, de suivre l'évolution de processus macroscopiques et constituent donc d'excellentes techniques d'imagerie structurelle fournissant des informations anatomiques. Il n'est cependant pas possible d'obtenir des informations au niveau cellulaire ou moléculaire. En revanche, les méthodes suivantes, la TEP/TEMP, l'IRM et l'imagerie optique, font partie des techniques d'imagerie fonctionnelles qui peuvent permettre la visualisation du métabolisme de la cellule et constituent de grandes avancées afin d'atteindre les objectifs de l'imagerie moléculaire.

L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est une technique de diagnostic non invasive capable d'imager des événements à des niveaux à la fois anatomiques, cellulaires et subcellulaires. Elle constitue une application en médecine des avancées effectuées en RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pendant la deuxième moitié du 20^{ème} siècle et est devenue un puissant outil d'imagerie. Le principe est le même que celui de la RMN : l'application d'un champ magnétique permet l'alignement des spins des noyaux d'hydrogène (cas le plus courant car l'eau, très abondante dans le corps humain, permet de fournir de nombreuses

d'informations) dans le même sens (avec un léger excès pour ce niveau d'énergie le plus bas, c'est la répartition de Boltzmann) ou dans le sens opposé au champ magnétique. Après l'application d'une impulsion à une fréquence radio, les noyaux absorbent l'énergie nécessaire pour passer à l'état d'énergie supérieur, c'est la résonance. Après arrêt de l'impulsion, les noyaux retournent à l'état initial, c'est la relaxation qui permet l'émission et l'enregistrement d'une onde électromagnétique. Une reconstruction mathématique permet la formation d'une image qui correspond à la densité en protons de la zone imagée.

L'IRM permet donc de remplir un rôle très efficace d'imagerie structurale en imageant des régions du corps comme des tissus et ainsi de détecter des anomalies responsables de maladies. Cependant, un domaine actuellement en grand développement en IRM et qui apporte de nouvelles potentialités à cette technologie est la possibilité d'effectuer de l'imagerie fonctionnelle en détectant des informations au niveau cellulaire et subcellulaire. Dans ce but, les recherches actuelles visent à la mise au point d'agents de contraste (à base de lanthanides dont le Gadolinium,¹⁰⁵ via la relaxation particulière des molécules d'eau présentes dans leur sphère de coordination, ou de nanoparticules¹⁰⁶) permettant de détecter par IRM des cellules,¹⁰⁷ des ions, des activités enzymatiques¹⁰⁸ ou des variations de pH qui fournissent des indications sur l'activité de la cellule.¹⁰⁹

Un des avantages principaux de cette technique réside dans le fait qu'elle soit non ionisante, ce qui constitue une avancée par rapport à d'autres types d'imagerie (rayons X, médecine nucléaire, etc.). La possibilité de la coupler à d'autres types d'imagerie comme la TDM, la TEP ou plus récemment à l'imagerie optique est également une grande avancée qui va permettre de pouvoir renforcer les informations fournies par chacune de ces techniques.

La TEP (pour Tomographie par Emission de Positrons) est une méthode qui découle des travaux effectués en tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou SPECT pour Single Photon Emission Computed Tomography). C'est la technique d'imagerie moléculaire qui est

¹⁰⁵ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2293-2352.

¹⁰⁶ Morawski, A. M.; Lanza, G. A.; Wickline, S. A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 89-92. McCarthy, J. R.; Weissleder, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 60, 1241-51.

¹⁰⁷ Aime, S.; Carrera, C.; Castelli, D. D.; Crich, S. G.; Terreno, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1813-1815.

¹⁰⁸ Duimstra, J. A.; Femia, F. J.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12847-12855. Chauvin, T.; Durand, P.; Bernier, M.; Meudal, H.; Doan, B. T.; Noury, F.; Badet, B.; Beloeil, J.-C.; Toth, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4370-4372. Hanaoka, K.; Kikuchi, K.; Terai, T.; Komatsu, T.; Nagano, T. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 987-995.

¹⁰⁹ Meade, T. J.; Taylor, A. K.; Bull, S. R. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, 13, 597-602. Sosnovik, D. E.; Weissleder, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, 18, 4-10 et références citées.

actuellement reconnue comme étant la plus sensible avec une limite de détection de biomolécules pouvant aller jusqu'à l'échelle du picomolaire. Il s'agit d'une méthode de scintigraphie qui consiste en l'administration d'isotopes radioactifs afin de produire une image grâce aux rayonnements γ émis indirectement par ceux-ci. L'avantage de la TEP est d'utiliser des radio-isotopes émetteurs de positrons, qui sont soit des constituants des biomolécules (^{11}C , ^{13}N , ^{14}O , ^{15}O), soit isostère de certaines fonctions (comme le ^{18}F considéré en chimie médicinale comme isostère des atomes d'hydrogène¹¹⁰ et des fonctions OH),¹¹¹ ou des noyaux métalliques comme le ^{41}Cu , qui peut être accroché sur une biomolécule *via* un chélate adapté.

Le principe de la TEP est d'intégrer un tel radionucléide instable émettant des positrons à une biomolécule ou un médicament. Le radionucléide se désintègre et émet un positron dont l'annihilation avec un électron dans le milieu produit deux photons γ de 511 keV qui partent dans des directions opposées et sont détectés par la caméra TEP. Un traitement informatique permet ensuite de localiser l'émission des photons et de reconstruire une image.¹¹²

La TEP a ainsi été couramment utilisée dans l'imagerie de processus biologiques comme le suivi du métabolisme du glucose grâce au FDG (^{18}F -fluorodésoxyglucose), le suivi du métabolisme cérébral de la dopamine avec la FDOPA (^{18}F -6-fluoro-3,4 dihydroxyphénylalanine) ou l'évaluation de l'activité neuronale grâce à de l'oxygène 15 injecté dans le sang.¹¹³

Le principe de la TEMP est apparenté à la TEP à la différence que le radionucléide utilisé n'est plus un émetteur β^+ , mais un émetteur γ . Celui-ci émet directement un seul photon (au lieu de deux pour la TEP), ce qui réduit la précision spatiale mais l'émission de positrons n'étant pas nécessaire, la TEMP peut être utilisée avec des traceurs dont la désintégration est plus lente et qui peuvent donc être transportés et stockés plus facilement.

Cependant, en dépit de ses nombreux avantages, la TEP et la TEMP sont limitées par le fait qu'elles constituent des méthodes invasives (injection d'un radionucléide) qui nécessitent la proximité d'un cyclotron près du centre d'examen/recherche en raison de la courte demi-vie

¹¹⁰ Pour quelques revues récentes sur le rôle du fluor en chimie médicinale, voir Shah, P.; Westwell, A. D. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 527-540. Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330. Hagmann, W. K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369.

¹¹¹ Cai, L. S.; Lu, S. Y.; Pike, V. W. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2853-2873.

¹¹² Ametamey, S. M.; Honer, M.; Schubiger, P. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501-1516.

¹¹³ Phelps, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9226-9233.

de la plupart des traceurs utilisés (leur période va de quelques minutes à quelques heures). La TEP nécessite donc des infrastructures assez lourdes (un cyclotron et un robot de synthèse protégé sous enceinte blindée à proximité de l'imageur) et une sécurité stricte à mettre en œuvre, ce qui rend ces méthodes assez onéreuses et sont un frein à un développement plus général.

Un résumé des méthodes d'imagerie actuelles avec leurs points forts, limitations et coût de mise en œuvre est présenté dans le tableau 1-3.¹¹⁴ Les techniques présentées dans cette section sont en concurrence avec un mode d'imagerie émergent qui est en train de révolutionner l'imagerie moléculaire : l'imagerie optique.

Technique	Resolution*	Depth	Time †	Quantitative‡	Multi-channel	Imaging agents	Target	Cost*§	Main small-animal use	Clinical use
MRI	10–100 µm	No limit	Minutes to hours	Yes	No	Paramagnetic chelates, magnetic particles	Anatomical, physiological, molecular	\$\$\$	Versatile imaging modality with high soft-tissue contrast	Yes
CT	50 µm	No limit	Minutes	Yes	No	Iodinated molecules	Anatomical, physiological	\$\$	Imaging lungs and bone	Yes
Ultrasound	50 µm	cm	Seconds to minutes	Yes	No	Microbubbles	Anatomical, physiological	\$\$	Vascular and interventional imaging	Yes
PET	1–2 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	No	¹⁸ F-, ⁶⁴ Cu- or ¹¹ C-labelled compounds	Physiological, molecular	\$\$\$	Versatile imaging modality with many tracers	Yes
SPECT	1–2 mm	No limit	Minutes to hours	Yes	No	^{99m} Tc- or ¹¹¹ In-labelled compounds	Physiological, molecular	\$\$	Imaging labelled antibodies, proteins and peptides	Yes
Fluorescence reflectance imaging	2–3 mm	<1 cm	Seconds to minutes	No	Yes	Fluorochromes	Physiological, molecular	\$	Rapid screening of molecular events in surface-based disease	Yes
FMT	1 mm	<10 cm	Minutes to hours	Yes	Yes	Near-infrared fluorochromes	Physiological, molecular	\$\$	Quantitative imaging of fluorochrome reporters	In development
Bioluminescence imaging	Several mm	cm	Minutes	No	Yes	Luciferins	Molecular	\$\$	Gene expression, cell and bacterium tracking	No
Intravital microscopy¶	1 µm	<400–800 µm	Seconds to hours	No	Yes	Fluorochromes	Anatomical, physiological, molecular	\$\$\$	All of the above at higher resolutions but limited depths and coverage	In development#

*For high-resolution, small-animal imaging systems. (Clinical imaging systems differ) †Time for image acquisition. ‡Quantitative here means inherently quantitative. All approaches allow relative quantification. §Cost is based on purchase price of imaging systems in the United States: \$, <US\$100,000; \$\$, US\$100,000–300,000; \$\$\$, >US\$300,000. ||Interventional means used for interventional procedures such as biopsies or injection of cells under ultrasound guidance. ¶Laser-scanning confocal or multiphoton microscopy. #For microendoscopy and skin imaging. (Table adapted, with permission, from ref. 85.)

Tableau 1-3. Résumé des techniques d'imagerie moléculaire actuelles.

¹¹⁴ Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, 452, 580–589.

3 L'imagerie optique

3.1 Introduction

Tout d'abord, il convient de rappeler que comme pour tous les types d'imagerie, l'enjeu principal de l'imagerie optique est d'obtenir un contraste entre l'objet à observer (caillot, tumeur, etc) et le milieu environnant. Toutes les stratégies mises en œuvre et qui vont être présentées visent à améliorer ce contraste. Dans le cas de l'imagerie optique, l'objet d'étude est la lumière et plus particulièrement les photons. Parmi les différentes possibilités d'imagerie optique, il est possible de distinguer la fluorescence, la chimiluminescence et la bioluminescence qui dépendent de la manière dont l'état excité est atteint. Actuellement, la fluorescence est la méthode qui a retenu le plus d'attention dans la communauté scientifique. L'intérêt de la fluorescence par rapport aux méthodes existantes réside dans son caractère non invasif, une bonne résolution spatiale et temporelle, une grande sensibilité, une extrême simplicité de mise en œuvre, une instrumentation peu onéreuse et peu encombrante qui permet d'envisager une généralisation aisée de cette technologie dans le milieu médical. De plus, l'existence de nombreuses sondes capables de fournir des informations (parfois multiples en travaillant à plusieurs longueurs d'onde) au niveau cellulaire est un atout qui contraste fortement avec la difficulté (parfois même l'impossibilité) avec laquelle ce type de données peut être obtenue avec les autres méthodes d'imagerie exposées ci-dessus.¹¹⁵

3.2 La pénétration de la lumière dans les tissus

La problématique principale de l'imagerie optique est de faire en sorte que la lumière parvienne à pénétrer suffisamment le tissu pour exciter le fluorophore et que la lumière émise arrive à effectuer le trajet inverse pour être détectée. A la différence d'autres méthodes d'imagerie, les photons en imagerie optique sont fortement perturbés par le milieu qu'ils traversent et leur propagation à travers les tissus est assez aléatoire. En effet, les indices de réfraction peuvent varier selon les tissus et la plupart des milieux traversés sont anisotropes, c'est-à-dire que l'effet de la lumière n'est pas le même en fonction de la direction de l'espace. A ces éléments s'ajoutent la dispersion des photons (selon les lois de Rayleigh ou de Mie en

¹¹⁵ Pour une revue récente très générale sur les « fluorescent reporters » et les différentes méthodes d'imagerie optique, voir Ntziachristos, V. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, 8, 1-33.

fonction du milieu) et l'absorption de la lumière par les tissus qui atténuent le signal que l'on désire observer. Ces paramètres montrent que l'imagerie optique doit surmonter des difficultés importantes afin de parvenir à tirer profit de tous les avantages qu'elle apporte au domaine de l'imagerie moléculaire (Figure 1-47).

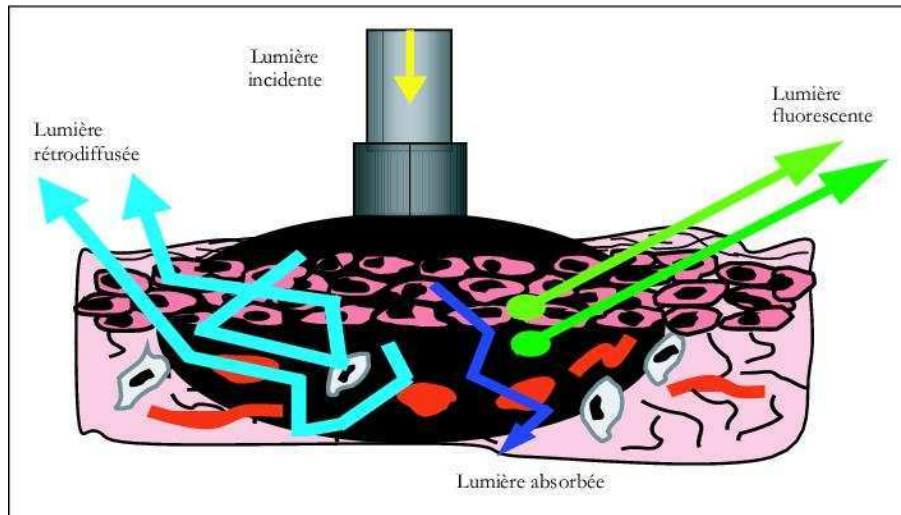


Figure 1-47. Les différentes possibilités offertes à la lumière incidence lors de la traversée d'un tissu.

Afin de surmonter ces obstacles, il est maintenant couramment admis que l'imagerie *in vivo* doit être effectuée à des longueurs d'ondes comprises dans le proche IR ou l'IR.¹¹⁶ En effet, les espèces les plus absorbantes dans l'organisme sont l'hémoglobine (le principal absorbeur de lumière visible qui absorbe 39-64% de la lumière dans un tissu typique constitué de 8% de sang et 29% de lipides), les lipides, l'eau et leur absorbance est minimum dans la région 650-900 nm du spectre électromagnétique (Figure 1-48 a-b).

¹¹⁶ Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nature Med.* **2003**, 9, 123-128.

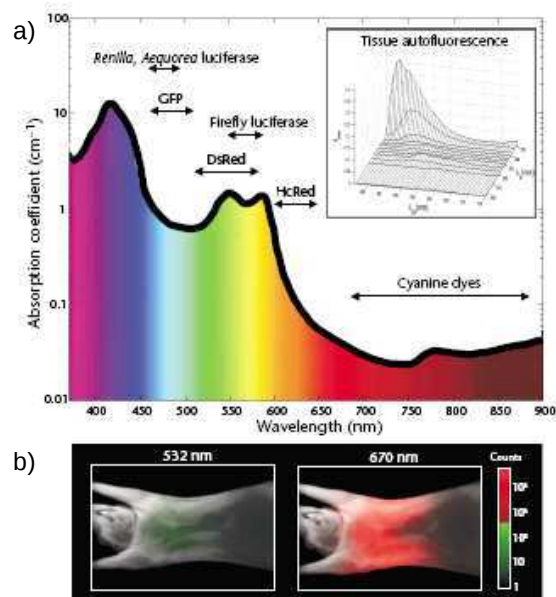


Figure 1-48. a) Coefficient d'absorption des tissus en fonction de la longueur d'onde ; b) Dans les mêmes conditions, le signal détecté dans le proche IR est quatre fois supérieur à une excitation effectuée dans le vert (Source réf. 116).

De plus, à ces longueurs d'onde, l'autofluorescence des tissus est fortement diminuée, ce qui permet une amélioration du rapport signal sur bruit. Une illustration de ce phénomène est représentée sur la figure 1-49 b-d où l'autofluorescence des tissus est significative dans le bleu/vert puis diminue dans le vert/rouge jusqu'à être éliminée dans le proche IR.¹¹⁷

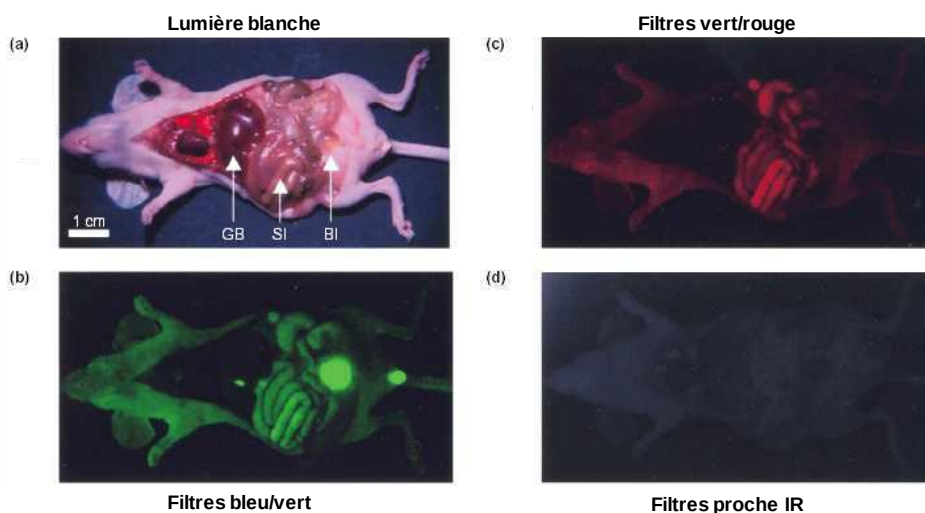


Figure 1-49. Autofluorescence des tissus en utilisant différents filtres d'excitation/émission : a) Viscères de souris juste après le sacrifice (GB = vésicule biliaire, SI = petit intestin, BI = vessie) ; b) Filtres bleu/vert (460-500 nm/505-560 nm) ; c) Filtres vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm) ; d) Filtres proche IR (725-775 nm/790-830 nm).

¹¹⁷ Frangioni, J. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626-34.

Ainsi, plus la longueur d'onde est élevée, meilleure est la pénétration dans les tissus et plus la quantité de photons atteignant sa cible est grande. Cependant, l'imagerie à des longueurs d'onde élevées est à nouveau limitée par l'absorption de l'eau à partir de 1300 nm qui conduit à un échauffement des tissus. Ainsi, des études récentes dans le domaine de l'imagerie *in vivo* ont montré que la fenêtre spectrale idéale se situait entre 950 et 1100 nm.²⁹ Ces longueurs d'onde constituent le meilleur compromis entre une diminution de l'absorption/autofluorescence des tissus et une absence d'absorption de l'eau. Toutefois, il n'existe actuellement qu'extrêmement peu de fluorophores émettant à ces longueurs d'onde. En effet, l'imagerie optique nécessite des agents de contraste ou sondes fluorescentes (également appelés « fluorescence reporter » dans la littérature) pour visualiser les processus biologiques. Les différents types de sondes activables (ou sondes intelligentes) seront développées au chapitre 2 dans le contexte de la détection de protéases. Il est cependant instructif de dresser un bref aperçu des technologies existantes.

3.3 Les agents de contraste

Les sondes fluorescentes ont pour objectif l'identification et la quantification *in vivo* d'un processus biologique. Pour cela, des fluorophores sont utilisés et doivent répondre à un cahier des charges très exigeant. Ils doivent en effet posséder une brillance¹¹⁸ aussi élevée que possible, émettre dans le proche IR, être stables (photo)chimiquement, tout en possédant une toxicité minimale pour les cellules. Les stratégies pour visualiser l'activité cellulaire sont de deux types : directe ou indirecte.¹¹⁹

3.3.1 Les méthodes directes

Parmi les méthodes directes se distinguent les sondes actives et les sondes activables.

Les sondes actives sont constituées d'un fluorophore libre ou introduit sur un ligand (anticorps monoclonal, peptide modifié ou petite molécule) dont le rôle est d'atteindre une cible spécifique (un récepteur ou un organe par exemple). Elles sont toujours fluorescentes, ce qui peut être la cause d'un bruit de fond important dû à une proportion de sonde circulante

¹¹⁸ Une brillance supérieure à 30 000 est actuellement estimée nécessaire pour effectuer de l'imagerie *in vivo*, Wolfbeis, O. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2980-2982.

¹¹⁹ Rao, J.; Dragulescu-Andrasi, A.; Yao, H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 17-25. Kovar, J. L.; Simpson, M. A.; Schutz-Geschwender, A.; Olive, D. M. *Anal. Biochem.* **2007**, *367*, 1-12.

n'ayant pas atteint sa cible et n'ayant pas eu le temps d'être éliminée, mais elles s'accumulent sur l'organe/le récepteur ciblé.

A l'inverse, les sondes activables (ou sondes intelligentes, « smart probes »), possèdent un fluorophore dont la fluorescence est le plus souvent quenchée et la détection de la cible (e.g., un ion, une enzyme, etc) permet la restauration de la fluorescence. Elles permettent ainsi de réduire fortement le bruit de fond et d'augmenter la sensibilité de la détection.

La bioluminescence (voir chapitre 3) est également une possibilité puisque l'absence d'excitation permet de s'affranchir de l'autofluorescence des tissus. Mais les dispositifs actuels nécessitent des injections de luciférine importantes (120 mg/kg), l'émission s'effectue à des faibles longueurs d'onde et il est indispensable de co-injecter la luciférase correspondante, qui doit avoir une bio-distribution compatible avec l'événement à imager.

3. 3. 2 Les méthodes indirectes

Les méthodes indirectes sont appropriées pour l'étude de l'expression et la régulation des gènes. Elles reposent sur l'introduction d'un gène reporteur codant pour une protéine fluorescente (GFP ou un dérivé) ou bioluminescente (luciférase) dans un gène d'une protéine d'intérêt. La transcription de ce gène a pour conséquence l'expression d'une protéine chimère ayant la même fonction que la protéine originale et étant de plus marquée par une protéine fluorescente (ou bioluminescente) dont il est possible de détecter l'émission de lumière. Toutefois, les protéines fluorescentes sont handicapées par leur grande taille, leurs propriétés physicochimiques particulières (les GFPs sont très hydrophobes ; les luciférases ne s'expriment pas en dehors des cellules), une toxicité potentielle et malgré les efforts effectués pour développer des protéines émettant à de grandes longueurs d'onde, les avancées actuelles se limitent à une émission dans le rouge.

De plus, l'extension à l'homme paraît difficile, ce qui explique pourquoi les méthodes directes utilisant des sondes exogènes possèdent un avenir plus prometteur dans le but de transposer ces technologies à des applications cliniques.

3.4 L'instrumentation

Historiquement, la microscopie de fluorescence est une méthode d'imagerie pionnière qui a connu des récents développements grâce aux microscopies confocales, bi- et multiphotons. Cependant, dans le but d'effectuer de l'imagerie à une échelle macroscopique (des animaux), ces technologies ne sont pas applicables car elles sont limitées à des profondeurs de quelques μm , ce qui restreint leur utilisation à l'imagerie superficielle des tissus. Un des grands défis de l'imagerie optique est donc de pouvoir effectuer des études à de plus grandes profondeurs.

L'émergence de l'imagerie optique telle que nous la connaissons depuis ces dernières années n'a ainsi pu s'opérer que grâce au développement spectaculaire de l'instrumentation pour l'émission et la détection des photons. Parmi les méthodes développées, les deux principales techniques sont l'imagerie planaire et la tomographie.¹²⁰

3.4.1 L'imagerie planaire

Il s'agit de la méthode la plus simple, la plus courante et la plus facile à mettre en œuvre. Le principe est d'éclairer un tissu avec une source constante de lumière et de collecter la lumière émise avec une caméra CCD (pour Charged-Coupled Device). Pour cela, des progrès importants ont été effectués dans les sources de lumière avec le développement de lasers qui sont plus sûrs que les sources de lumière blanche munies de filtres. Ils sont également plus performants puisque leur précision est de $\pm 3 \text{ nm}$ au lieu de $\pm 10 \text{ nm}$, ce qui est très important dans le proche IR en raison du faible déplacement de Stokes de la plupart des fluorophores (les cyanines par exemple). En général, la précision des caméras CCD est telle que le facteur limitant n'est pas le bruit de fond mais l'autofluorescence des tissus.

Dans l'imagerie planaire, deux types de dispositif sont possibles en fonction de la position de l'illumination et de la détection des photons. En effet, si l'illumination et la détection sont effectués du même côté de l'animal, on parle d'épi-illumination (aussi appelée FRI pour Fluorescence Reflectance Imaging, figure 1-50 a et c). Dans le cas où illumination et détection sont de part et d'autre de l'animal, il s'agit de transillumination (Figure 1-50 b).

¹²⁰ Pour une excellente comparaison de ces deux techniques, voir Ntziachristos, V.; Bremer, C.; Weissleder, R. *Eur. Radiol.* **2003**, *13*, 195-208.

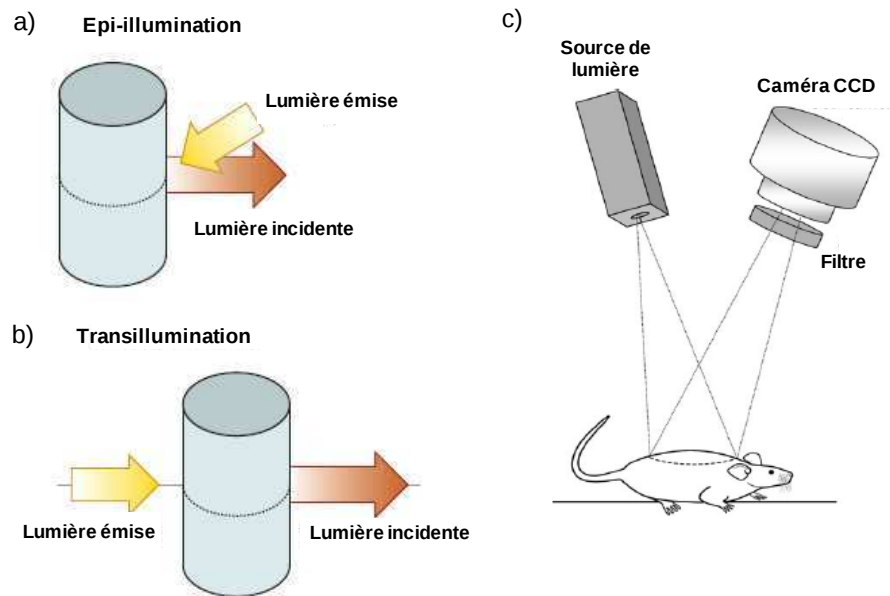


Figure 1-50. L'imagerie planaire par : a) Epi-illumination ou FRI ; b) Transillumination ; c) Dispositif de FRI avec la source de lumière et la caméra CDD du même côté que l'animal.

Généralement, pour obtenir une image par FRI, deux images sont enregistrées, une avec filtre et une sans filtre qui sert de calibration. L'image finale obtenue et possédant une bonne résolution résulte de la superposition des deux images (Figure 1-51 a-c).

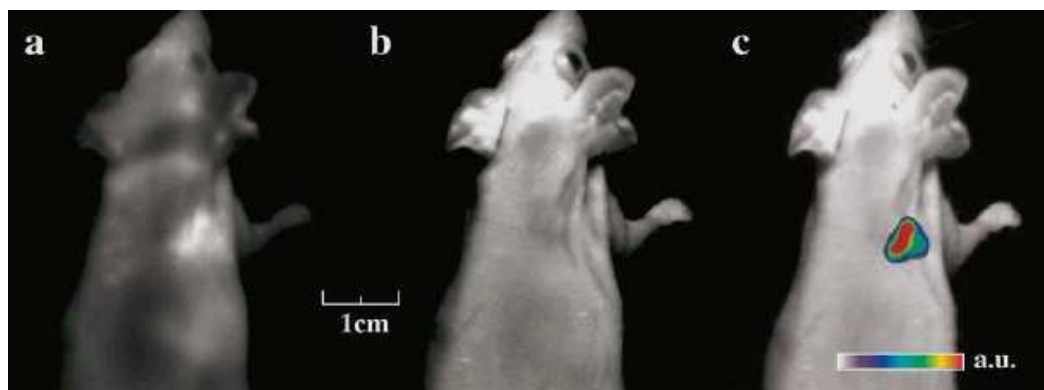


Figure 1-51. Dans l'enregistrement typique d'une image par FRI, l'image obtenue (C) résulte de la superposition d'une image avec filtre (A) et sans filtre (B).

Il existe actuellement de nombreuses applications de la FRI car elle est simple, peu coûteuse, avec un appareillage qui ne prend pas de place. Un des défis actuels réside dans la possibilité d'effectuer de la multispectralité, c'est-à-dire la détection de signaux à plusieurs longueurs d'onde grâce à l'utilisation de filtres appropriés, ce qui permet de multiplier les cibles visées et/ou de mieux corriger le signal détecté.

Toutefois, la pénétration de la lumière dans le tissu est le principal inconvénient de la FRI, car cette pénétration n'est pas homogène et le signal émis est atténué de façon exponentielle. Le maximum de lumière est donc obtenu près de la source d'excitation. Il n'est ainsi pas possible de relier la quantité de lumière détectée à la concentration de fluorophore : la FRI n'est pas quantitative. Une illustration de ce phénomène est présentée sur la figure 1-52 : un même signal de fluorescence peut résulter d'une concentration locale en fluorophore et d'une profondeur de tissu très différentes. De la même manière, pour une même concentration locale de fluorophore, une région plus vascularisée sera plus riche en hémoglobine, subira plus d'absorption et émettra donc une intensité de fluorescence inférieure à un milieu moins bien irrigué.



Figure 1-52. La FRI est non quantitative : un même signal de fluorescence peut signifier une concentration de fluorophore et une profondeur de lésion très différentes.

La transillumination est une alternative à la FRI qui possède la même décroissance exponentielle du signal en fonction de la profondeur du tissu mais permet tout de même une meilleure localisation de l'émission, une amélioration du contraste et de la quantification. Elle est cependant moins étudiée et ne connaît d'applications que dans les imageries dentaire, cardiaque et du petit animal.

Afin d'améliorer le contraste, il est désormais possible de mettre en place des méthodes dépendant du temps qui prennent en compte les cinétiques de relaxation de fluorescence. Afin de résoudre les problèmes d'atténuation du signal, une méthode comme la TDPM (pour Time Domain Photon Migration) utilise une source d'illumination dont l'intensité varie avec le temps. L'illumination se fait sous la forme d'un pulse d'excitations qui s'élargit et s'atténue avec la pénétration dans les tissus. La région d'excitation maximale n'est pas stationnaire donc l'émission réémise de la surface peut avoir pour origine des profondeurs de tissu variées. La TDPM pouvant être difficile à mettre en œuvre, il est possible d'effectuer de la FDPM (Frequency Domain Photon Migration), reliée à la TDPM par une transformée de Fourier. La

FDPM consiste en une source d'excitation de lumière modulée à une fréquence qui permet d'avoir des maxima d'excitation à diverses profondeurs de tissu.¹²¹

Les dernières avancées de l'imagerie planaire permettent donc de résoudre partiellement les problèmes de contraste et de pénétration des photons, ce qui explique pourquoi elle constitue toujours la méthode la plus utilisée. Toutefois, afin de parvenir à de plus grandes profondeurs de l'ordre de plusieurs dizaines de cm, des approches tomographiques sont en développement et vont peu à peu remplacer l'imagerie planaire.

3. 4. 2 La tomographie de fluorescence

La tomographie de fluorescence consiste en une reconstruction en 3D de la distribution interne de fluorophores dans les tissus à partir de mesures d'émission de fluorescence enregistrées tout autour de l'animal. Elle a été développée depuis une quinzaine d'années à mesure que les modèles mathématiques de diffusion de la lumière dans les tissus, les sources d'émission et de détection de lumière ont été développés.

Parmi les différentes tomographies, la DOT (Diffuse Optical Tomography) permet l'illumination et de multiples mesures tout autour de l'animal imagé. Les images combinées prennent en compte la dispersion de la lumière engendrée par les tissus, ce qui permet de faire de l'imagerie quantitative de l'absorption, de la diffusion ainsi que le suivi de la concentration et le temps de vie simulés dans des fantômes (i.e., polymère mimant les propriétés optiques des tissus humains dans le proche IR).

De la même manière, la FMT (Fluorescence Molecular Tomography) permet des études *in vivo* en produisant des reconstructions 3D quantitatives. Elle ne requiert aucune mesure avant l'administration de l'agent de contraste, ce qui est un atout pour les sondes nécessitant un temps non négligeable pour atteindre leur cible.

Expérimentalement, la FMT ne nécessite qu'une simple source de lumière constante, ce qui contraste avec la DOT qui requiert généralement des sources de photons plus élaborées comme des sources à intensité modulée ou des courtes impulsions de photons.

Un dispositif classique de FMT comprend une source de lumière laser, parfois à plusieurs longueurs d'onde pour effectuer de la multispectralité. La lumière incidente est divisée par un interrupteur (switch) qui permet le passage de celle-ci dans des fibres optiques reliées tout autour de l'animal selon un dispositif appelé « optical bore ». Les systèmes initiaux

¹²¹ Seivick-Muraca, E. M.; Houston, J. P.; Gurfinkel, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 642-650.

nécessitaient l'immersion de l'animal dans un liquide (« matching fluid ») ayant les mêmes propriétés optiques que le tissu étudié, ce qui permet de simplifier la reconstruction de l'image. Les systèmes actuels permettent de s'en affranchir et d'effectuer l'expérience avec l'animal exposé à l'air libre. Les photons sont ensuite collectés, filtrés et détectés à l'aide d'une caméra CCD. Une reconstruction mathématique permet finalement d'obtenir une image en 3D. Pour les appareils les plus récents, la qualité de l'image a pu être fortement améliorée grâce à l'utilisation d'illuminateurs mobiles et de multiples caméras (Figure 1-53).

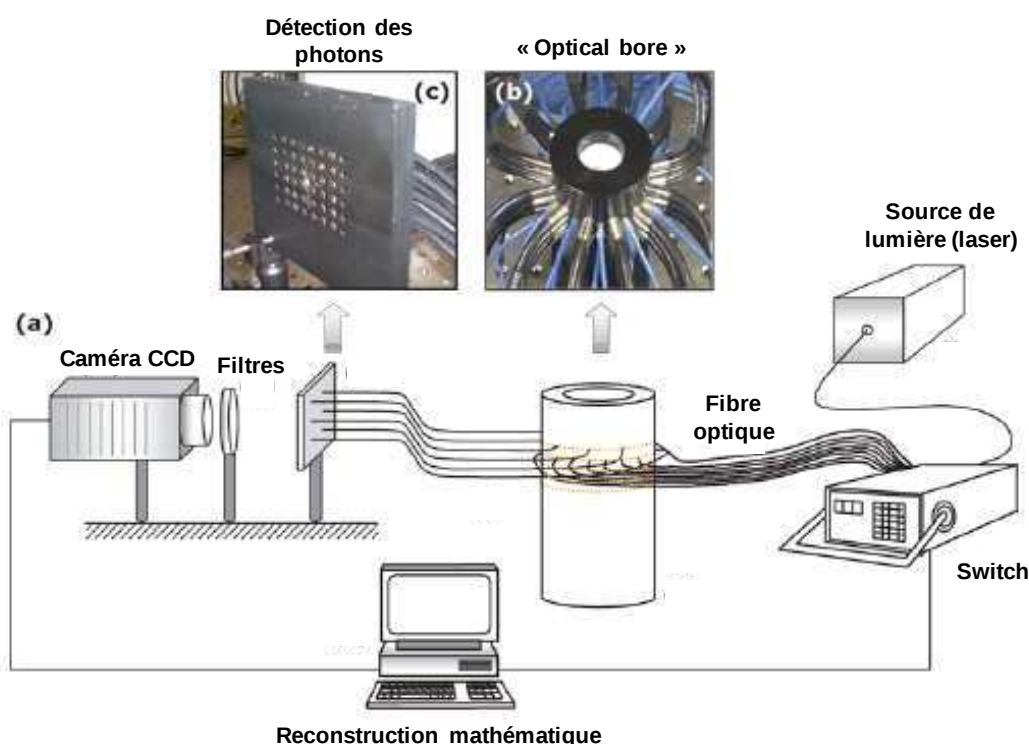


Figure 1-53. Dispositif expérimental de la FMT : a) Schéma de principe ; b) « Optical bore » permettant de relier les fibres optiques à divers endroits de l'animal ; c) Dispositif pour la détection des photons.

Des études ont montré une bonne relation entre intensité du signal de fluorescence et la concentration du fluorophore. L'émission de fluorescence n'est pas dépendante des propriétés optiques et de la profondeur du tissu, ce qui permet des études quantitatives.

Comme pour l'imagerie planaire, plusieurs types d'illumination sont possibles : l'excitation peut être soit continue, soit en modulation de fréquence (entre 100 MHz et 1 GHz) ou consister en des pulses rapides de photons (100 fs -100 ps). Parallèlement, des systèmes de détection parviennent à résoudre les problèmes d'atténuation de la lumière, à mesurer cette atténuation à différentes fréquences et à offrir une détection très rapide de la cinétique des

photons (de l'ordre de la ps). Généralement, les techniques dépendant du temps ou de la fréquence offrent de meilleures différenciations de la dispersion et de l'absorption. Mais pour des études de biodistribution, l'illumination constante est actuellement meilleure car elle offre un meilleur rapport signal/bruit, tout en étant plus simple, robuste et économique.

Dans ce contexte, la société Quidd développe et commercialise un appareil d'imagerie optique baptisé QOSTM (Quidd Optical System). Il s'agit d'un imageur totalement automatisé possédant une caméra mobile qui effectue de multiples mesures tout autour de l'animal. Les avantages de cet appareil sont : 1) la possibilité d'effectuer des mesures au plus près de l'animal, ce qui permet d'atteindre des niveaux de précision inégalés et d'assurer un bon niveau de reproductibilité ; 2) une amélioration de la qualité de l'image grâce à un algorithme tomographique qui se base sur un modèle de propagation de la lumière plus proche de la réalité que les algorithmes utilisés par les imageurs sur le marché ; 3) sa polyvalence puisqu'il est possible d'effectuer des études de fluorescence, bioluminescence et chémiluminescence ; 4) son évolutivité en raison de la possibilité d'ajouter diverses fonctionnalités (multimodalités, changement de filtres ou de caméra, etc.) au fur et à mesure des besoins des études effectuées.

3. 5 Conclusion - Perspectives

L'imagerie optique est une des méthodes d'imagerie les plus anciennes mais son extension à l'imagerie moléculaire n'en est qu'à son début. Sa simplicité, son caractère non invasif, la possibilité d'imager plusieurs cibles simultanément et la fiabilité/stabilité des sondes fluorescentes permettent de promettre un bel avenir à cette technologie. Un bref récapitulatif des différentes techniques d'imagerie optique *in vivo* est représenté dans le tableau 1-4.¹¹⁶

Technique	Contrast ^a	Depth	Commonly used wavelength	Clinical potential
Microscopic resolution				
Epi	A, FI	20 μm	Visible	Experimental
Confocal	FI	500 μm	Visible	Experimental
Two-photon	FI	800 μm	Visible	Yes
Mesoscopic resolution				
Optical projection tomography	A, FI	15 mm ^c	Visible	No
Optical coherence tomography	S	2 mm	Visible, NIR	Yes
Laser speckle imaging	S	1 mm	Visible, NIR	Yes
Macroscopic resolution, intrinsic contrast				
Hyperspectral imaging	A, S, FI	<5 mm	Visible	Yes
Endoscopy	A, S, FI	<5 mm	Visible	Yes
Polarization imaging	A, S	<1.5 cm	Visible, NIR	Yes
Fluorescence reflectance imaging (FRI)	A, FI	<7 mm	NIR	Yes
Diffuse optical tomography (DOT)	A, FI	<20 cm	NIR	Yes
Macroscopic resolution, molecular contrast				
Fluorescence resonance imaging (FRI)	A, FI	<7 mm	NIR	Yes
Fluorescence molecular tomography (FMT)	FI	<20 cm	NIR	Yes
Bioluminescence imaging (BI)	E	<3 cm	500–600 nm	No

Tableau 1-4. Récapitulatif des systèmes d'imagerie optique *in vivo* (A = absorption, E = émission, S = dispersion, FI = fluorescence).

Alors qu'il est possible d'obtenir des profondeurs de l'ordre du μm en microscopie de fluorescence, que l'imagerie planaire permet une pénétration de plusieurs mm dans les tissus, la tomographie apparaît la méthode la plus prometteuse avec des profondeurs pouvant atteindre plusieurs dizaines de cm.

Envisager des applications cliniques nécessite toutefois des profondeurs de tissu encore plus importantes : en effet, il a été évalué que la perte d'un ordre de grandeur dans l'intensité du signal est observé tous les 1.5-2.5 cm pour des milieux comme les seins ou les poumons et tous les 1 cm pour les muscles et le cerveau.

De plus, contrairement à d'autres systèmes d'imagerie plus mûrs, les algorithmes de reconstruction tomographiques pour l'imagerie optique sont encore soumis à débat dans la communauté scientifique. Un affinement puis une généralisation de ceux-ci devraient donc permettre un gain en performance des appareils actuels et permettre l'utilisation du scanner de fluorescence en routine dans les laboratoires d'imagerie médicale.

Les méthodes d'imagerie médicale actuelles parviennent à atteindre des profondeurs plus importantes que l'imagerie optique. Elles souffrent toutefois d'un coût important et fournissent peu d'informations au niveau cellulaire. Parallèlement, l'imagerie optique apporte de nombreuses informations fonctionnelles, un équipement miniature, peu onéreux et sensible (de l'ordre du pico/femtomole) mais il faut améliorer la pénétration des photons dans les tissus. Ainsi, pendant le temps nécessaire à ce que la FMT parvienne à surmonter les difficultés actuelles de pénétration, la combinaison des différentes méthodes d'imagerie (l'IRM, la TDM et la TEP) permet de pallier les lacunes de chacune d'entre elles, d'où l'émergence actuelle d'appareils multimodaux et de sondes multimodales.

Chapitre 2

Synthèse de sondes pro-fluorescentes pour
la détection de peptidases

Synthèse de sondes pro-fluorescentes pour la détection de peptidases

I LA DETECTION DE PEPTIDASES

Les protéases constituent une importante classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons amides des peptides et protéines, permettant leur activation ou inactivation. De manière générale, les peptidases clivent de petits peptides et les protéases coupent des peptides plus longs et des protéines.¹²²

Les peptidases peuvent être classées en fonction de la position où a lieu la coupure enzymatique de la chaîne peptidique. Elles se répartissent en :

- Exopeptidases si la coupure s'effectue au niveau du dernier acide aminé : les aminopeptidases si la coupure a lieu à l'extrémité N-terminale et carboxypeptidases dans le cas d'une coupure en C-terminal ;
- Endopeptidase si la coupure a lieu à l'intérieur d'une chaîne peptidique.

En fonction de la nature de l'acide aminé responsable de la coupure de la liaison amide, il est possible de distinguer plusieurs familles de protéases : ainsi les protéases à sérine, thréonine et cystéine possèdent des fonctions alcool ou thiol qui jouent le rôle de nucléophile pour attaquer le motif carbonyle de la liaison peptidique ; les protéases acides possèdent un acide aspartique ou glutamique dans leur site actif qui active une molécule d'eau et permet la coupure de la

¹²² Kenny, A. J. *Proteolytic Enzymes: Tools and Targets*, Springer: Heidelberg, **1999**.

fonction amide ; de la même manière, les MMPs (pour Matrix MetalloProteinases) activent une molécule d'eau grâce à la présence d'un cation métallique (souvent du zinc (II)).¹²³

Les peptidases et protéases sont très abondantes dans l'organisme et les gènes codant pour leur synthèse représentent 1 à 5% de la totalité du génome. Celles-ci jouent un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques et par conséquent se retrouvent fortement impliquées dans les dysfonctionnements de l'organisme. C'est pourquoi il est actuellement évalué qu'environ 14% des protéases sont des cibles potentielles pour le développement de médicaments.¹²⁴ Ainsi, étant donné l'importance des protéases pour le bon fonctionnement de l'organisme, l'utilisation de l'imagerie optique dans le but de les détecter et/ou évaluer leur activité apparaît d'une grande importance pour diagnostiquer les maladies de façon précoce, accélérer le développement de médicaments et suivre l'efficacité des traitements.

De nombreuses techniques ont été développées pour effectuer le marquage de protéines¹²⁵ et ont plus particulièrement permis la mise au point de sondes fluorescentes pour la détection de peptidases.

Par exemple, l'utilisation de la fluorescamine ou de l'o-phthaldialdéhyde permet la formation d'un adduit fluorescent suite à une réaction avec l'amine libérée par le clivage enzymatique de la liaison peptidique. Cependant, toutes les amines primaires sont potentiellement détectables, en particulier celles des chaînes latérales des résidus lysine non impliqués dans des liens peptidiques, et ainsi le réactif pro-fluorescent n'est pas spécifique d'une protéase particulière. D'autres stratégies ont donc été envisagées pour détecter les peptidases avec plus de spécificité. Un gain en spécificité peut être obtenu avec l'utilisation d'anticorps marqués par un fluorophore ou en marquant la protéine cible à l'aide de substrats suicides fluorescents qui se lient de façon covalente à la protéase.¹²⁶ L'ingénierie génétique est également une excellente alternative car elle permet de fusionner le gène de la protéase cible au gène d'une GFP¹²⁷ ou de la luciférase. La protéine de fusion obtenue peut ainsi être suivie dans

¹²³ Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 305-341.

¹²⁴ Southan, C. *Drug Discov. Today* **2001**, 6, 681-688.

¹²⁵ Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, 1996.

¹²⁶ Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A., *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, 10th ed., Eugene, OR., 2005.

¹²⁷ Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544. Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Nat. Methods* **2005**, 2, 905-909. Zacharias, D. A.; Tsien, R. Y. *Methods Biochem. Anal.* **2006**, 47, 83-120.

l'organisme par détection de fluorescence ou bioluminescence¹²⁸ même si la protéine ajoutée peut influencer sur la distribution et/ou activité de la protéase d'origine.

Toutefois, l'inconvénient de ce type de sondes est qu'elles sont fluorescentes quelles que soient les conditions. Seule une augmentation locale de la fluorescence est détectée, ce qui est intéressant pour localiser une protéine mais constitue un inconvénient majeur si l'objectif est de visualiser un processus biologique complexe ou d'atteindre une cible précise (un récepteur, une cellule cancéreuse, etc.). En effet, dans ce dernier cas, il y a émission de fluorescence même pour les sondes n'ayant pas atteint leur cible, ce qui engendre un bruit de fond important qui perturbe voire fausse l'information recherchée. Ainsi, la mise au point de sondes plus sophistiquées dont les propriétés de fluorescence sont profondément modifiées (le plus souvent une exaltation du signal de fluorescence est recherchée) suite à une réaction avec l'enzyme ciblée est donc nécessaire. En effet, avec ce type de sondes, il est possible de mettre en évidence l'activité de l'enzyme et non la présence de la protéine elle-même,¹²⁹ ce qui supprime le bruit de fond et de surcroît démultiplie l'information pour le taux de roulement de l'enzyme. Ceci permet donc de détecter un événement biologique complexe, c'est ce que l'on appelle des sondes intelligentes ou « smart probes ».

Cette approche a quelques avantages par rapport aux autres sondes fluorescentes : 1) une seule enzyme peut activer une grande quantité de sonde à la différence des substrats suicides fluorescents qui se lient de façon irréversible à une seule protéase cible ; 2) la plupart des sondes activables sont fondées sur un mécanisme de quenching-déquenching, le bruit de fond est donc fortement diminué grâce à la faible émission de fluorescence à l'état initial ; 3) pour les protéases, une même stratégie peut être étendue à plusieurs cibles en faisant varier la nature des séquences peptidiques.

Les différentes possibilités développées à ce jour notamment par le groupe du Pr. R. Weissleder sont représentées sur la figure 2-1 et seront détaillées ultérieurement avec les sondes fluorescentes capables de détecter une enzyme d'intérêt pour notre étude, la caspase-3 :¹³⁰

¹²⁸ Pour plus de détails sur la bioluminescence, voir le chapitre 3

¹²⁹ Ce type de sondes intelligentes visant à la localisation de protéines *via* des interactions non covalentes ne sera pas discuté ici. Pour une entrée dans cette thématique, voir Honda, K.; Nakata, E.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2006**, 4024-4026. Soh, N.; Seto, D.; Nakano, K.; Imato, T. *Mol. Biosyst.* **2006**, 2, 128-130. Nonaka, H.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15777-15779. Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. *Chem. Commun.* **2008**, 1217-1219.

¹³⁰ Tung, C. H. *Biopolymers* **2004**, 76, 391-403 et références citées.

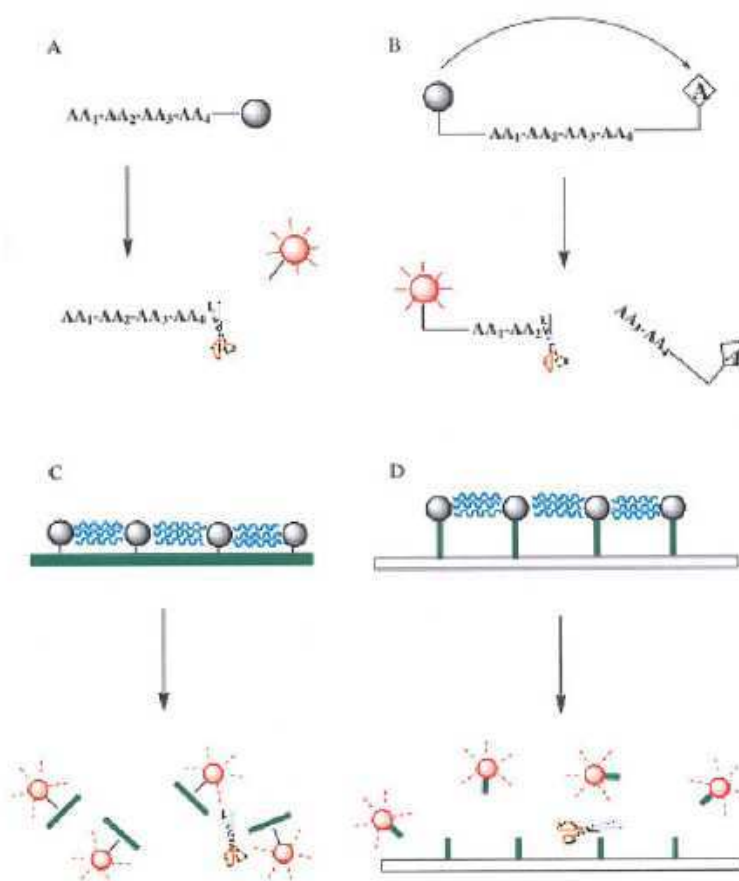


Figure 2-1. Sondes activables pour la détection de protéases : A. Sonde pro-fluorescente ; B. Sonde FRET ou auto-quenchée avec deux partenaires reliés entre eux par la séquence peptidique cible ; C. Partenaires greffés sur un polymère substrat clivable ; D. Fluorophores auto-quenchés reliés à un polymère par la séquence peptidique spécifique de l'enzyme cible.

La méthode la plus simple consiste en la mise au point de sondes pro-fluorescentes en greffant la fonction aniline d'un pro-fluorophore directement sur l'extrémité C-terminale de la séquence peptidique reconnue par l'enzyme cible. Cette approche permet d'obtenir des sondes très sensibles, sélectives et elle est très efficace pour la détection de diverses carboxypeptidases. Cependant, cette méthode se prête mieux à la détection d'exopeptidases et possédant de surcroît une bonne tolérance de substrat (Figure 2-1 A).

Une deuxième stratégie consiste à utiliser soit une paire de fluorophores qui s'auto-quenchent, soit un couple de FRET fluorophore/quencher et de les relier par la séquence peptidique substrat de l'enzyme. Ainsi, le clivage par l'enzyme sépare les deux partenaires et permet de restaurer l'émission de fluorescence. Cette approche est très efficace pour tout type de cible et notamment pour la détection d'endopeptidases qui reconnaissent le peptide aux extrémités N- et C-terminales et clivent à l'intérieur de la séquence peptidique. Cela nécessite toutefois une

proximité spatiale entre les deux partenaires de FRET qui dépend de la longueur et du repliement de la chaîne peptidique (Figure 2-1 B).¹³¹

Une autre possibilité consiste en un multi-marquage sur un polymère clivable par l'enzyme. Une forte densité de fluorophores entraîne un auto-quenching de la sonde et sa plus grande taille permet d'augmenter le temps de vie dans l'organisme (Figure 2-1 C). De la même manière, les fluorophores peuvent être attachés à une séquence peptidique spécifique de la peptidase cible, elle-même reliée à un polymère de type PEG, afin d'obtenir plus de spécificité pour une enzyme (Figure 2-1 D).¹³²

Ces différentes approches ont ainsi été employées pour la détection de diverses peptidases¹³³ parmi lesquelles la MMP-7,¹³⁴ la MMP-2,¹³⁵ la cathepsine D,¹³⁶ la thrombine¹³⁷ ou des protéases lysosomales de cellules cancéreuses.¹³⁸

Enfin, la récente explosion de procédures robustes pour la synthèse de nanoparticules a été mise à profit pour les utiliser en tant que plate-forme pour le greffage de fluorophores en lieu et place des polymères de la figure 2-1. Les sondes ainsi obtenues possèdent des paramètres de cinétique améliorés par rapport aux petites molécules fluorescentes et si la particule est elle-même un agent de contraste (une nanoparticule de fer par exemple, détectable par IRM),¹³⁹ cela permet d'obtenir des sondes bimodales qui connaissent actuellement un grand développement.

Parmi les différentes stratégies disponibles et en parallèle avec les travaux de Quidd fondés sur une stratégie FRET utilisant des couples fluorophore/quencher non originaux (*vide infra*), nous avons choisi de mettre au point de nouvelles sondes pro-fluorescentes originales et brevetables pour la détection de carboxypeptidases (Stratégie A sur la figure 2-1). En effet, un des objectifs de Quidd est de développer des sondes intelligentes pour détecter la caspase-3,

¹³¹ Pour deux exemples de détection de la protéase du VIH, voir Cummings, R. T.; McGovern, H. M.; Zheng, S.; Park, Y. W.; Hermes, J. D. *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 79-93. Peng, X. Z.; Draney, D. R.; Volcheck, W. M. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2006**, 6097, 60970E/169970E/12.

¹³² Law, B.; Curino, A.; Bugge, T. H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Chem. Biol.* **2004**, 11, 99-106.

¹³³ Funovics, M.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 956-963.

¹³⁴ Pham, W.; Choi, Y.; Weissleder, R.; Tung, C. H. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 1403-1407.

¹³⁵ Bremer, C.; Bredow, S.; Mahmood, U.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Radiology* **2001**, 221, 523-529.

¹³⁶ Tung, C. H.; Bredow, S.; Mahmood, U.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 892-896. Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. *Cancer Res* **2000**, 60, 4953-4958.

¹³⁷ Tung, C.-H.; Gerszten, R. E.; Jaffer, F. A.; Weissleder, R. *ChemBioChem* **2002**, 3, 207-211.

¹³⁸ Weissleder, R.; Tung, C. H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A. *Nature Biotechnol.* **1999**, 17, 375-378.

¹³⁹ Josephson, L.; Kircher, M. F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 554-560. Kircher, M. F.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 242-248.

une carboxypeptidase clé impliquée dans le processus final de l'apoptose. La pro-fluorescence apparaît donc comme une méthode simple et puissante pour détecter cette enzyme. Cependant, de nombreuses sondes pro-fluorescentes pour la détection de peptidases ont déjà été rapportées dans la littérature (publications et brevets) et certaines sont déjà disponibles commercialement. Leur stratégie consiste en l'introduction d'un pro-fluorophore aminé (i.e., dérivés de la 7-aminocoumarine, de la rhodamine 110 ou du crésyl violet) directement du côté C-terminal de la liaison peptidique coupée par l'enzyme. Afin de se démarquer de cette approche, et ayant pour objectif d'utiliser une stratégie qui sera également mise en œuvre dans nos sondes chémiluminescentes (voir le chapitre 3), nous avons donc décidé d'étendre le concept des sondes pro-fluorescentes à l'utilisation d'un pro-fluorophore à phénol. Celui-ci ne pouvant pas être directement relié au peptide, nous avons envisagé l'incorporation d'un bras réactif auto-immolable entre le peptide et le pro-fluorophore, permettant de transférer l'information « coupure de la liaison peptidique » en l'information « libération du fluorophore à phénol ».

II LES BRAS REACTIFS AUTO-IMMOLABLES

1 Définition et applications en thérapie

Les développements de la synthèse organique sur phase solide¹⁴⁰ ont permis la mise au point de nombreux linkers¹⁴¹ permettant aussi bien la synthèse de larges bibliothèques de molécules par synthèse combinatoire et/ou parallèle que la synthèse de molécules naturelles complexes.¹⁴² Parmi ceux-ci, des linkers dits « traceless linkers »¹⁴³ ou « self-immolative linkers » (par la suite appelés bras réactifs auto-immolables) ont notamment été développés. Ceux-ci permettent la libération du composé sans traces de son précédent accrochage à la phase solide contrairement aux linkers classiques qui conservent sur le composé libéré la fonction qui a permis leur greffage à la phase solide (acide carboxylique, carboxamide, etc.). Toutefois, ces bras réactifs auto-immolables ont été dérivés de leurs utilisations initiales et ont trouvé de

¹⁴⁰ Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158.

¹⁴¹ James, I. W. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4855-4946. Wills, A. J.; Balasubramanian, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 346-352.

¹⁴² Hall, D. G.; Manku, S.; Wang, F. *J. Comb. Chem* **2001**, *3*, 125-150. Nicolaou, K. C.; Pfefferkorn, J. A. *Biopolymers* **2001**, *60*, 171-193.

¹⁴³ Bräse, S.; Dahmen, S. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1899-1905. Comely, A. C.; Gibson, S. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1012-1032. Gil, C.; Bräse, S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 230-237.

nombreuses applications dans la conception de pro-drogues visant à améliorer la solubilisation, la stabilité, l'activité et/ou la spécificité d'un principe actif.¹⁴⁴ Ainsi, de nombreuses pro-drogues ont été développées ces dernières années pour l'amélioration des thérapies anticancéreuses.¹⁴⁵ Dans ce contexte, un bras réactif auto-immolable sert à relier le médicament (« Drug ») à un déclencheur (« Trigger »), qui après clivage se décompose spontanément pour libérer le principe actif. Le déclencheur est très majoritairement un substrat d'enzyme spécifique dont l'activité est suivie d'une réaction en cascade (ou réaction domino)¹⁴⁶ qui permet la libération spontanée du médicament (Schéma 2-1).



Schéma 2-1. Principe du bras réactif auto-immolable appliqué aux pro-drogues.

Ainsi, la chimie des pro-drogues a permis le développement de nombreux bras réactifs auto-immolables qu'il est possible de classer en deux catégories selon le mécanisme conduisant à la libération du médicament :

- Élimination : la première catégorie repose sur un mécanisme d'élimination et permet de libérer le principe actif après un clivage et une élimination de type 1,4 ; 1,6 ou 1,8 (Schéma 2-2).
- Cyclisation : La deuxième catégorie de bras réactif auto-immolables utilise un hétéroatome (N ou O) libéré après clivage pour former un cycle à cinq ou six chaînons qui permet la libération du médicament (Schéma 2-3).¹⁴⁷

¹⁴⁴ Papot, S.; Tranoy, I.; Tillequin, F.; Florent, J.-C.; Gesson, J.-P. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2002**, 2, 155-185.
Tranoy-Opalinski, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J.-P.; Papot, S. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, 8, 618-37.

¹⁴⁵ Pour une excellente revue sur les stratégies de pro-drogues appliquées aux traitements anticancéreux, et notamment via l'utilisation de bras réactifs auto-immolables, voir Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A. *ChemMedChem* **2008**, 3, 20-53.

¹⁴⁶ Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Kurt, F. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 332-339.

¹⁴⁷ Gomes, P.; Vale, N.; Moreira, R. *Molecules* **2007**, 12, 2484-2506.

Elimination

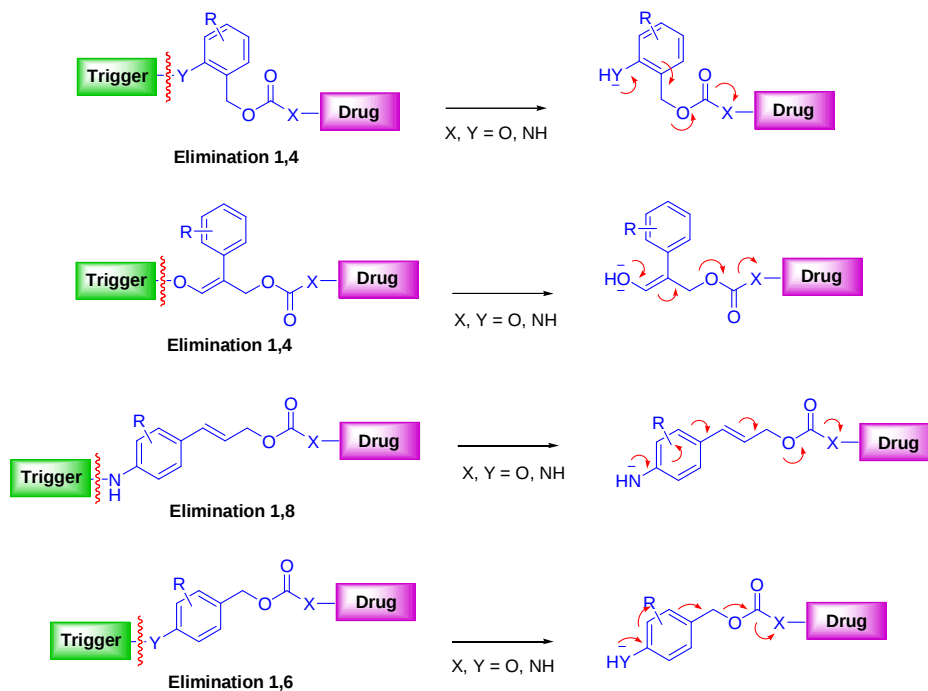


Schéma 2-2. Principaux bras réactifs auto-immolables basés sur un mécanisme d'élimination.

Cyclisation

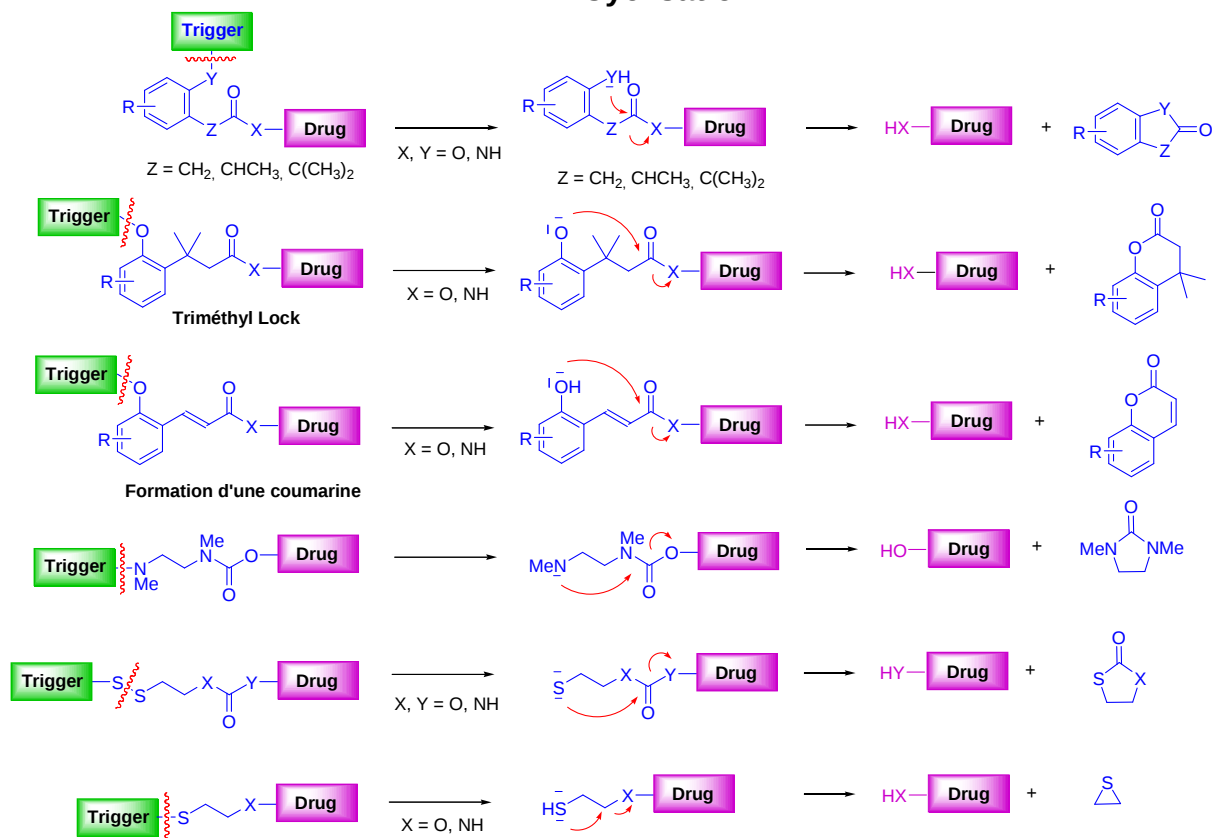


Schéma 2-3. Principaux bras réactifs auto-immolables basés sur un mécanisme de cyclisation.

2 Extension aux sondes pro-fluorescentes

L'utilisation des bras réactifs auto-immolables dans les stratégies de pro-drogues et les récentes avancées dans la conception de linkers pour la synthèse en phase solide sont une source d'inspiration pour d'autres domaines de la chimie. Ainsi, depuis quelques années, l'utilisation des bras réactifs auto-immolables a été étendue à la synthèse de sondes pro-fluorescentes, qui après clivage enzymatique, permettent la libération d'un fluorophore. Un des avantages de l'incorporation d'un bras réactif entre le substrat et le fluorophore est de pouvoir éloigner le site de reconnaissance (et de coupure enzymatique) du fluorophore, ce qui dans certains cas permet d'améliorer de façon significative la cinétique de clivage enzymatique du fait d'une réduction de l'encombrement stérique. En effet, la plupart des fluorophores utilisées dans ces sondes sont des structures polycycliques souvent volumineuses et hautement hydrophobes. Mais l'intérêt majeur de leur utilisation est de pouvoir accroître la liberté de choix du fluorophore libéré qui peut être soit un fluorophore aminé (cas le plus fréquent), mais aussi un fluorophore à phénol ou à thiophénol et ce quelque soit l'origine de la coupure enzymatique (par une estérase, peptidase, galactosidase, etc.). Ainsi, cela confère à la fois une certaine liberté dans le choix des cibles à détecter et élargit la nature du pro-fluorophore potentiellement utilisable. De plus, les sondes pro-fluorescentes ont pour inconvénient de relier un substrat à un fluorophore qui est très fréquemment un excellent groupe partant, ce qui a tendance à rendre celles-ci relativement instables en particulier dans les milieux aqueux.¹⁴⁸ Or, l'introduction d'un bras réactif auto-immolable permet de moduler plus efficacement le greffage du fluorophore et d'améliorer la stabilité de la sonde par réduction de l'hydrolyse non spécifique.

Cependant, à ce jour, peu d'exemples de sondes pro-fluorescentes utilisant un bras réactif auto-immolable ont été décrits dans la littérature et encore moins avec des fluorophores émettant dans le proche IR. Parmi ceux-ci, on peut citer le travail du groupe de R. T. Raines qui utilise le Triméthyl Lock pour la détection du cytochrome P450¹⁴⁹ ou d'estérases¹⁵⁰ avec

¹⁴⁸ Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Trends Biotechnol.* **2004**, 22, 363-370. Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 314-322.

¹⁴⁹ Yatzeck, M. M.; Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Chandran, S. S.; Ronald T. Raines, R. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, sous presse.

¹⁵⁰ Chandran, S. S.; Dickson, K. A.; Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1652-1653. Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 252-260.

notamment un exemple utilisant le crésyl violet comme fluorophore émettant dans le rouge (Schéma 2-4).¹⁵¹

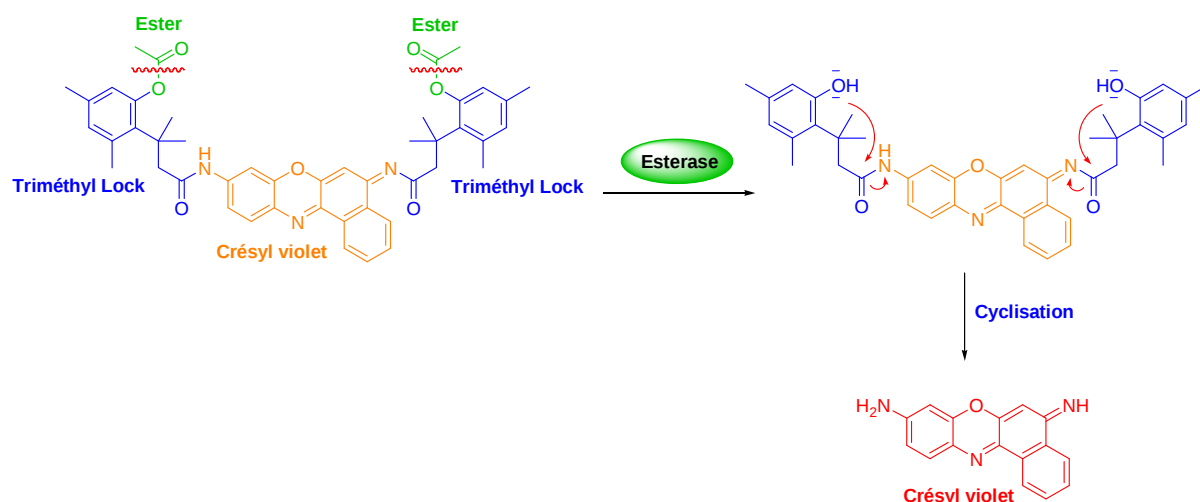


Schéma 2-4. Triméthyl Lock comme bras réactif auto-immolable pour la détection d'estérases.

L'équipe du Pr. R. Weissleder a récemment rapporté une sonde pro-fluorescente pour la détection de la β -galactosidase. Celle-ci utilise un dérivé de l'alcool *p*-aminobenzylrique (PABA) comme bras réactif auto-immolable et un fluorophore de type benzophénoxazine (BPO) hydrosoluble qui émet dans le proche IR une fois libéré dans le milieu. Il est intéressant de noter que les auteurs avaient essayé de relier directement le fluorophore au bras réactif sous la forme d'une fonction carbamate mais il en résultait une sonde qui était toujours fortement fluorescente. L'introduction d'un résidu glycine entre les deux partenaires a cependant permis d'obtenir la sonde pro-fluorescente désirée (Schéma 2-5).¹⁵²

Une stratégie analogue pour une sonde FRET a également été décrite par le groupe de T. Nagano. La rupture de la liaison glycosidique a pour conséquence une fragmentation du bras réactif qui sépare les deux partenaires de FRET et permet ainsi un suivi ratiométrique du clivage enzymatique.¹⁵³

¹⁵¹ Lavis, L. D.; Chao, T.-Y.; Raines, R. T. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1151-1154.

¹⁵² Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *ChemBioChem* **2007**, 8, 560-566.

¹⁵³ Komatsu, T.; Kikuchi, K.; Takakusa, H.; Hanaoka, K.; Ueno, T.; Kamiya, M.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15946-15947.

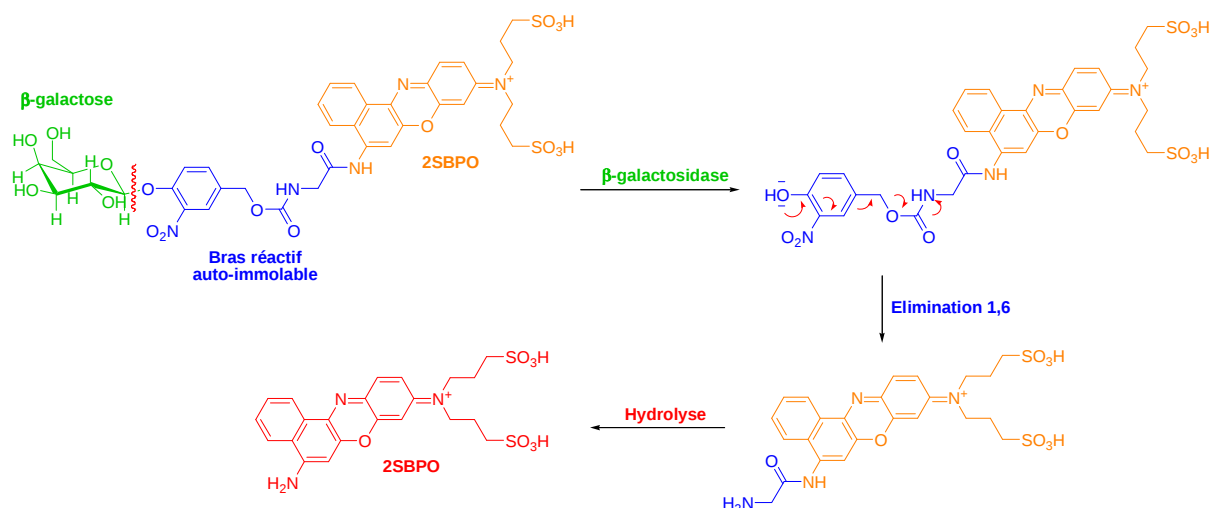


Schéma 2-5. Combinaison du PABA et d'une glycine pour l'obtention d'une sonde pro-fluorescente détectant la β-galactosidase.

Le groupe de R. Y. Rao a rapporté des sondes pro-fluorescentes pour la détection de β-lactamases (voir la ref. 102 du chapitre 1 pour une sonde FRET). La coupure du β-lactame génère une amine secondaire qui libère un fluorophore à phénol (la résorufine) après une élimination 1,6. De façon intéressante, la présence d'une double liaison entre la céphalosporine et le fluorophore a été montrée comme indispensable pour obtenir une sonde totalement stable en milieu aqueux (Schéma 2-6).¹⁵⁴

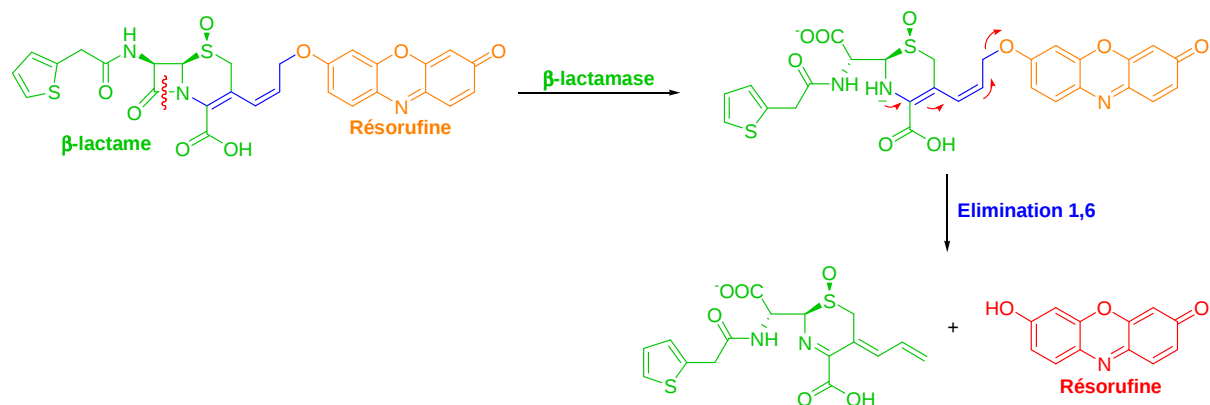


Schéma 2-6. Sonde pro-fluorescente pour la détection de β-lactamase.

Avant le début de notre étude et malgré le fort intérêt de nombreux groupes pour la détection de peptidases, un seul exemple de pro-fluorophore sensible aux protéases et utilisant un bras réactif avait été rapporté par G. B. Jones *et al.*¹⁵⁵ Les différentes sondes utilisaient le linker

¹⁵⁴ Gao, W.; Xing, B.; Tsien, R. Y.; Rao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11146-11147.

¹⁵⁵ Jones, G. B.; Crasto, C. F.; Mathews, J. E.; Xie, L.; Mitchell, M. O.; El-Shafey, A.; D'Amico, A. V.; Bubley, G. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 418-425.

PABA et avaient comme cible la PSA (Prostate Specific Antigen), une protéase à sérine utile pour imager le cancer de la prostate. Cependant, les fluorophores libérés n'émettaient pas au-delà du vert (Schéma 2-7).

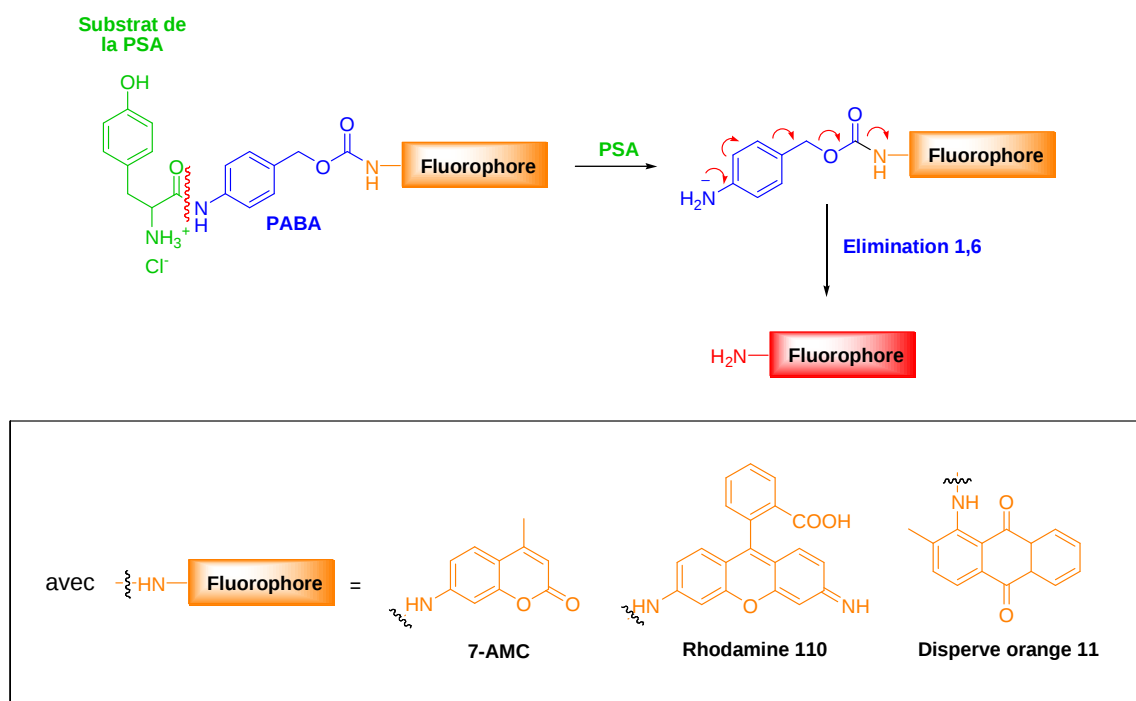


Schéma 2-7. Bras réactif auto-immolable PABA pour la détection de la PSA.

D'autres exemples ont suivi depuis avec notamment le groupe de D. Shabat qui illustre l'utilité et l'efficacité de ses polymères et dendrimères auto-immolables¹⁵⁶ avec la synthèse de pro-drogues¹⁵⁷ ou de sondes pro-fluorescentes pouvant reconnaître la pénicilline amidase (ou pénicilline G acylase, PGA).¹⁵⁸

Cependant, la plupart des exemples cités ci-dessus libèrent un pro-fluorophore aminé qui ne répond pas aux critères exigés par l'imagerie *in vivo* : émission dans le proche IR et solubilité dans l'eau. De plus, l'extension à des pro-fluorophores phénoliques n'a encore jamais été explorée. Dans ce contexte, nous avons récemment revisité la chimie développée par S. L. Flitsch et N. J. Turner concernant un linker enzymo-labile utilisé pour le greffage d'alcools

¹⁵⁶ Shabat, D.; Amir, R. J.; Gopin, A.; Pessah, N.; Shamis, M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2626-2634. Shabat, D. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, *44*, 1569-1578.

¹⁵⁷ Gopin, A.; Rader, C.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1853-1858. Amir, R. J.; Popkov, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. E.; Shabat, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4378-4381. Gopin, A.; Ebner, S.; Attali, B.; Shabat, D. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1432-1440.

¹⁵⁸ Danieli, E.; Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7318-7324. Shamis, M.; Shabat, D. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4523-4528. Sagi, A.; Weinstein, R.; Karton, N.; Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5434-5435. Erez, R.; Shabat, D. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2669-2672.

sur phase solide.¹⁵⁹ Inspirés par ce linker, nous avons rapporté la synthèse d'un nouveau bras réactif auto-immolable basé sur un motif *N*-acylhémithioaminal, qui après hydrolyse enzymatique permet de libérer un fluorophore à phénol (Schéma 2-8).¹⁶⁰

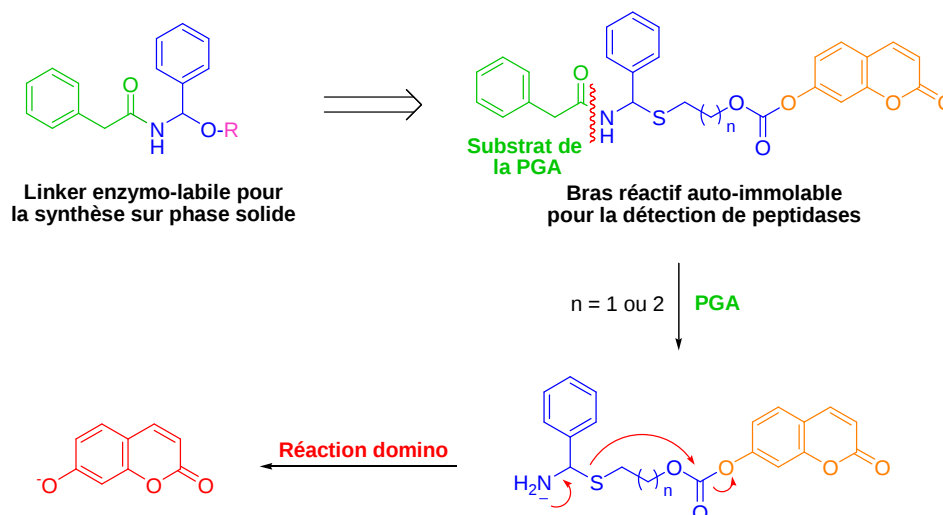


Schéma 2-8. Nouveau bras réactif auto-immolable pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes à phénol.

Ainsi, l'objectif de notre étude est de mettre au point une méthode générale pour la détection de peptidases grâce à des sondes pro-fluorescentes utilisant un bras réactif auto-immolable et un pro-fluorophore phénolique émettant dans le proche IR. De plus, notre groupe est impliqué dans le développement de sondes chémioluminescentes utilisant un motif 1,2-dioxétane dont l'émission de lumière est déclenchée par la libération d'un phénol. Ainsi, les enseignements obtenus lors du présent travail sur les sondes pro-fluorescentes serviront de base pour la synthèse de sondes chémioluminescentes visant la détection de peptidases (voir chapitre 3).

III CHOIX DES CIBLES

1 Une peptidase modèle : la Pénicilline G Acylase (PGA)

Afin de valider l'efficacité de nos sondes et notamment de résoudre les problèmes de stabilité que nous pourrions rencontrer, nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec une enzyme modèle, la PGA. La PGA est une peptidase facilement disponible, et également

¹⁵⁹ Bohm, G.; Dowden, J.; Rice, D. C.; Burgess, I.; Pilard, J.-F.; Guilbert, B.; Haxton, A.; Hunter, R. C.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3819-3822.

¹⁶⁰ Meyer, Y.; Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 1517-1520.

commercialisée sous une forme immobilisée (sur support solide) dont la stabilité est compatible avec l'utilisation de solvants organiques dans des proportions raisonnables (i.e., acétone ou méthanol à hauteur de 10-20%). Elle est utilisée industriellement dans l'hémisynthèse de pénicillines et plus récemment comme réactif de déprotection en synthèse organique en particulier dans les domaines de la synthèse en phase solide,¹⁶¹ de la chimie des biopolymères et des dendrimères.¹⁵⁸ La PGA reconnaît et clive divers substrats dont le mieux reconnu est le simple motif phénylacétamide.¹⁶² Ainsi, la synthèse de sondes pour la détection de cette enzyme constitue un moyen simple d'obtenir une première preuve de principe de notre stratégie.

Depuis la méthode colorimétrique développée par Zhang pour la détection de la PGA et basée sur la libération de l'acide 2-nitro-5-aminobenzoïque,¹⁶³ plusieurs méthodes fluorimétriques ont été publiées. La méthode la plus simple consiste en la synthèse de 7-phénylacétyl-4-alkylcoumarinylamides capables de libérer un dérivé 7-amino-4-alkylcoumarine (Schéma 2-9 a).¹⁶⁴ Plus récemment, nous avons rapporté la synthèse d'une sonde basée sur un noyau pyrazino-benz-[e]indole dont le clivage par la PGA suivi d'une cyclisation instantanée permet de former un tétracycle fortement fluorescent (Schéma 2-9 b).¹⁶⁵ Enfin, au cours de nos travaux, le groupe de J.-L. Reymond a décrit à notre connaissance le premier exemple d'utilisation d'un bras réactif auto-immolable pour la détection d'une peptidase (ici la PGA) et libérant un fluorophore à phénol. La sonde repose sur une libération ingénieuse d'une cétone énoisable qui après énoilisation subit une élimination 1,4 et libère la 7-hydroxycoumarine (Schéma 2-9 c).¹⁶⁶

¹⁶¹ Reents, R.; Jeyaraj, D. A.; Waldmann, H. *Drug Discov. Today* **2002**, 7, 71-76.

¹⁶² Ninkovic, M.; Riester, D.; Wirsching, F.; Dietrich, R.; Schwienhorst, A. *Anal. Biochem.* **2001**, 292, 228-233.

¹⁶³ Zhang, Q. J.; Zhang, L. F.; Han, H. I.; Zhang, Y. Y. *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 413-416.

¹⁶⁴ Scheper, T.; Weiss, M.; Schuegerl, K. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 182, 203-206. Ninkovic, M.; Riester, D.; Wirsching, F.; Dietrich, R.; Schwienhorst, A. *Anal. Biochem.* **2001**, 292, 228-233.

¹⁶⁵ Clavé, G.; Bernardin, A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 6229-6233.

¹⁶⁶ Sicart, R.; Collin, M.-P.; Reymond, J.-L. *Biotechnol. J.* **2007**, 2, 221-231.

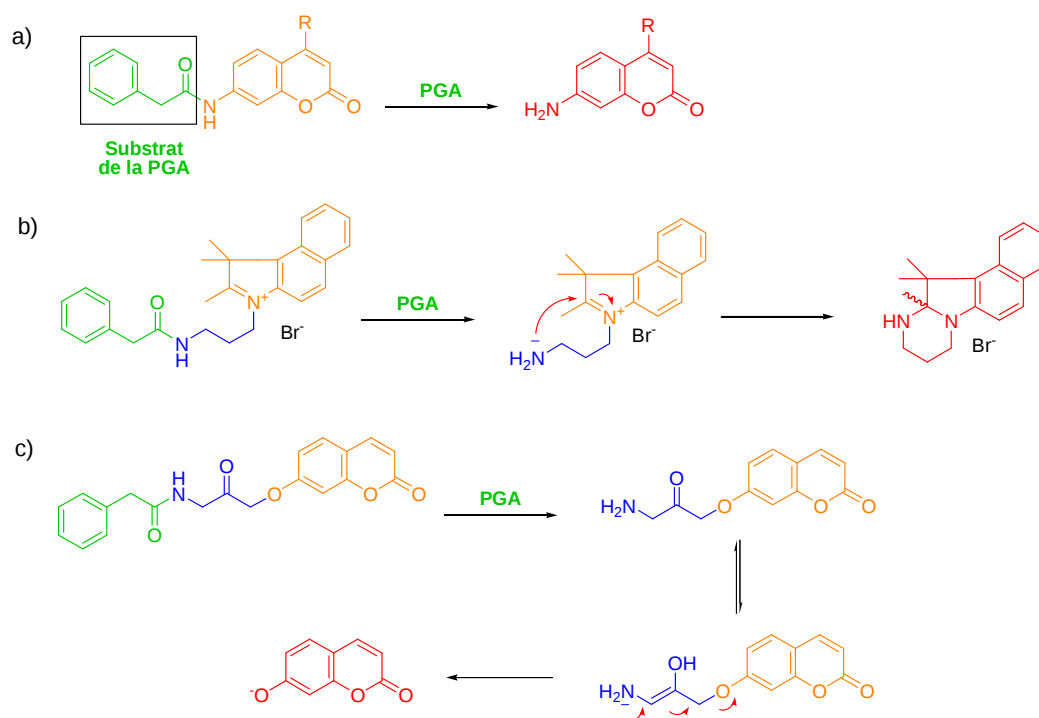


Schéma 2-9. Sondes pro-fluorescentes pour la détection de la PGA.

2 Une enzyme d'intérêt : la caspase-3

Une fois notre preuve de principe obtenue avec la PGA, notre objectif est d'étendre la stratégie vers une enzyme d'intérêt biologique. Notre choix s'est tourné vers la caspase-3 qui est une enzyme clé du processus apoptotique.

2.1 L'apoptose

Les organismes pluricellulaires disposent de deux principaux mécanismes de mort cellulaire. On distingue tout d'abord la nécrose (du grec *nekros*, signifiant mort), qui est une mort cellulaire brutale et incontrôlée intervenant essentiellement après une blessure, une infection ou dans diverses pathologies et déficits métaboliques. Elle débute par un gonflement de la cellule, une digestion de la chromatine puis par la dégradation de la membrane plasmique et des différents organites cellulaires. S'ensuit l'hydrolyse de l'ADN, la destruction des organites cellulaires et la lyse de la cellule. Un aspect important de la nécrose est que la libération du contenu cellulaire dans les tissus environnants induit une réponse inflammatoire de l'organisme.

A l'inverse, l'apoptose (du grec : *apo* - au loin et *ptosis* - chute) qui est l'autre processus de mort cellulaire n'engendre pas d'inflammation. L'apoptose est la mort cellulaire programmée, c'est un processus organisé par l'organisme qui est nécessaire à l'homéostasie car il permet de réguler l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Ainsi, l'apoptose est indispensable pour permettre d'éliminer certaines cellules inutiles (chez l'embryon, l'apoptose permet la formation des organes, des tissus, des doigts et des orteils), malades (i.e., les cellules cancéreuses), infectées par un virus ou qui présentent des dommages irréparables de l'ADN. Par exemple, le pelage de la peau dû à une exposition prolongée au soleil est une conséquence de la mise en apoptose massive de cellules défectueuses. L'apoptose intervient également dans l'immunité : après la maturation des lymphocytes T dans le thymus, ceux-ci sont testés avant d'être libérés dans la circulation sanguine et les lymphocytes T défectueux (ceux qui reconnaissent le soi) sont éliminés par apoptose.

L'apoptose a connu un intérêt croissant ces dernières années car des dysfonctionnements du processus apoptotique sont impliqués dans de nombreuses maladies. L'apoptose se situe en effet à un carrefour très important : un déficit d'apoptose peut conduire à une prolifération cellulaire incontrôlée et donner naissance à des tumeurs cancéreuses. A l'inverse, un excès d'apoptose peut être à l'origine de maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer) ou être la conséquence de dysfonctionnements comme l'ischémie qui peut déboucher sur un infarctus de l'organe concerné. Pour ces différentes raisons, l'apoptose est devenu un intense sujet d'étude et il est donc d'un grand intérêt de pouvoir imager les différents acteurs impliqués dans ce processus.

2. 2 Le processus apoptotique

Il existe deux types de mécanismes apoptotiques, l'un implique l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) qui est libéré grâce à l'ouverture de pores dans la mitochondrie (voir la section 2. 2. 2) et est dit « caspases indépendant ». L'autre mécanisme, celui qui va nous intéresser, fait intervenir une importante classe de protéases : les caspases.¹⁶⁷ Les caspases sont présentes dans l'organisme sous la forme de pro-enzymes qui ont besoin d'être clivées pour être activées. Leur étymologie en dit long sur leurs caractéristiques : le « c » se réfère au fait que ce sont des protéases à cystéine et « aspase » indique que celles-ci clivent systématiquement

¹⁶⁷ Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1387*, 17-31. Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477*, 299-306. Chowdhury, I.; Tharakan, B.; Bhat, G. K. *Comp. Biochem. Physiol. B* **2008**, *151*, 10-27.

après un résidu acide aspartique. Plus précisément, la famille des caspases est composée de quatorze enzymes connues à ce jour (ou ramenées à onze en comptant les homologies et en tenant compte que la caspase-13 n'existe pas chez l'homme) qui clivent toutes après une séquence térapeptidique C-terminale se terminant par un acide aspartique. Elles sont très spécifiques, ce qui est remarquable si l'on considère que seulement trois acides aminés permettent de différencier les différentes caspases. Les quatorze enzymes connues à ce jour sont classées selon leur fonction en caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) ou effectrices (3, 6, 7). Les autres agissent dans le processus d'inflammation (activatrices de cytokines pour les caspases 1, 4 et 5) et/ou ont un rôle encore mal connu (caspase-14).¹⁶⁸

L'ensemble des mécanismes régissant et contrôlant l'apoptose ne sont pas encore complètement déterminés et sont encore soumis à débat. Cependant, il est possible de mettre en évidence certains processus. Dans un souci de simplification, le processus apoptotique sera détaillé en deux voies, une voie intrinsèque et une voie extrinsèque, en gardant à l'esprit que celles-ci sont simultanées et interagissent entre elles.¹⁶⁹

2. 2. 1 La voie extrinsèque

La figure 2-2 a) représente les différentes voies intrinsèques et extrinsèques qui mènent à la mort cellulaire programmée. Parmi celles-ci, la voie extrinsèque correspond à la voie faisant intervenir des récepteurs membranaires appelés récepteurs de mort. En effet, ceux-ci peuvent se lier à des ligands exprimés à la surface de lymphocytes T cytotoxiques ou à différents ligands solubles comme la cytokine TNF- α (pour Tumor Necrosis Factor), le ligand Fas (FasL ou CD95L) ou le TRAIL (pour TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) :

- TNF- α : selon le mécanisme actuellement admis, la liaison du TNF- α à son récepteur TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) entraîne la synthèse de céramides par l'enzyme sphingomyélinase acide. Ceux-ci permettent le rassemblement de nombreux récepteurs de mort, ce qui est important pour permettre une amplification de la réponse apoptotique. Ainsi, un changement conformationnel d'une partie du récepteur (notée « Death Domain » sur la figure 2-2 b) permet la liaison des différentes protéines TRADD (TNFR Associated Death

¹⁶⁸ Denault, J.-B.; Salvesen, G. S. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4489-4499.

¹⁶⁹ Guimaraes, C. A.; Linden, R. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 1638-1650. Meier, P.; Vousden, K. H. *Mol. Cell* **2007**, 28, 746-754. Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9, 231-241.

Domain), FADD et pro-caspase-8 pour former un complexe protéique appelé DISC (Death Signaling Inducing Complex) qui permet l'activation de la caspase-8. Celle-ci active elle-même la caspase-3 qui joue un rôle décisif que nous détaillerons ultérieurement.

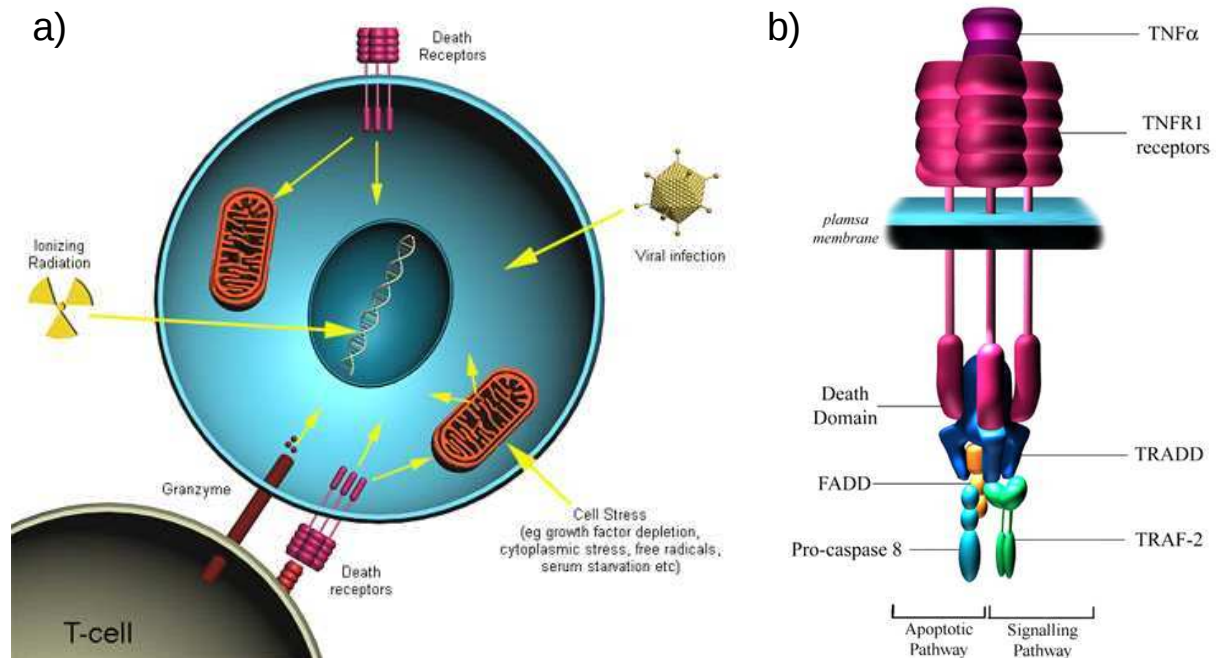


Figure 2-2. a) Les différentes voies qui mènent à l'apoptose ; b) Complexe DISC formé par la voie extrinsèque de l'apoptose.

- Le ligand Fas (FasL ou CD95L) : le ligand Fas se lie au récepteur Fas (FasR) et suit un mécanisme similaire à celui du TNF- α mais est plus simple puisque le FADD peut être recruté directement sans la présence de TRADD. De plus, le ligand Fas est connu pour activer spécifiquement l'apoptose et ne joue aucun rôle dans d'autres aspects de la communication cellulaire.
- TRAIL : il se lie aux récepteurs DR4 et DR5 et agit selon un mécanisme simplifié similaire à celui du ligand Fas.

2. 2. 2 La voie intrinsèque

La grande majorité de la voie intrinsèque passe par l'intervention d'un organe clé, la mitochondrie. En effet, la mitochondrie contient de nombreuses protéines pro- et anti-apoptotiques dont l'équilibre fait pencher la cellule vers l'inhibition ou la mise en apoptose. Parmi ces protéines, on note les anti-apoptotiques comme les IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) qui suppriment l'activité des caspases ou la famille des Bcl-2 qui contient à la fois

des enzymes pro- ou anti-apoptotiques. Le cytochrome C, l'AIF, le Smac/DIABLO et les protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2–Associated X protein), Bid (BH3 Interacting domain Death agonist), Bad (Bcl-2-Associated Death promoter), Bak (Bcl-2 homologous Antagonist/Killer) sont toutes des enzymes localisées dans la mitochondrie. Certaines jouent un rôle dans la formation de pores (ou PT pour Permeability Transition pore) dans la membrane de la mitochondrie tandis que d'autres en sont libérées afin de permettre le déclenchement de la cascade apoptotique (Figure 2-3 a).

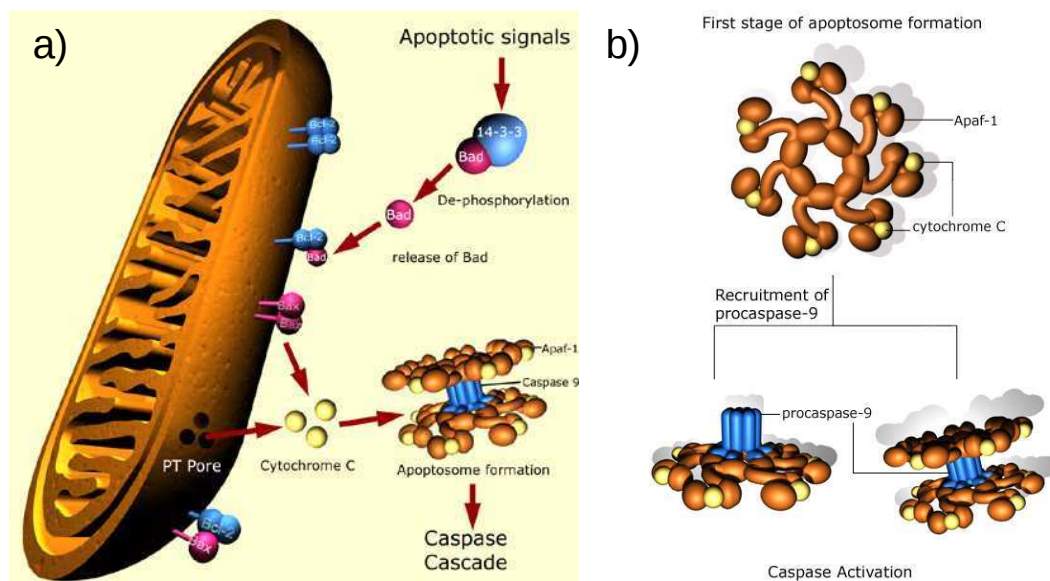


Figure 2-3. a) Mécanisme conduisant à la formation de l'apoptosome activateur de la caspase-9 ; b) Vue détaillée de l'apoptosome.

En effet, à la suite d'un stimulus pouvant prendre diverses formes (dommages de l'ADN, stress cellulaire dû à une infection virale, à des radicaux libres, à l'exposition à des produits chimiques ou des radiations), les protéines cytosoliques anti-apoptotiques se relocalisent à la surface de la mitochondrie pour former des dimères Bcl-2/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-XL ou Bcl-XL/Bcl-XL. La séparation du complexe 14-3-3/Bad et la déphosphorylation de Bad permet l'inactivation de ces protéines anti-apoptotiques, ce qui simultanément avec la translocation de Bax et Bak à la surface de la mitochondrie laisse le champ libre pour la formation de pores appelés MAC (pour Mitochondrial Apoptosis induced Channel, figure 2-3 a).

La formation de pores permet ainsi la libération dans le cytosol d'espèces comme le cytochrome C et la pro-caspase-9. Ceux-ci peuvent alors former avec l'Apaf-1 et une molécule d'ATP un complexe appelé apoptosome qui permet l'activation de la caspase-9 (Figure 2-3 b).

Un autre mécanisme conduit à l'activation des caspases effectrices et fait intervenir la granzyme B, une protéase à sérine induite par les lymphocytes T. Elle permet soit l'activation directe des caspases-3, 7, 8, 10, soit le clivage de l'enzyme Bid, ce qui active Bax et conduit au mécanisme précédent faisant intervenir Bax et Bak.

Les différents acteurs précédemment cités sont régulés par un facteur de transcription appelé protéine 53 (ou p53). Dans les cellules normales, la p53 est inactive et son niveau est bas mais des dommages de l'ADN provoqués par des facteurs extérieurs (rayonnements UV et IR, produits chimiques, etc.), le stress oxydatif ou un défaut de facteurs de croissance peuvent l'activer. Ainsi, elle joue un rôle de régulateur qui se traduit soit par sa capacité à activer les enzymes réparatrices de l'ADN, soit par sa capacité à initier directement l'apoptose dans le cas où les dommages de l'ADN sont irréparables.

2. 2. 3 Le rôle des caspases

Les voies extrinsèques et intrinsèques précédemment décrites permettent l'activation des caspases initiatrices parmi lesquelles les caspases-8 et 9. Celles-ci sont libérées dans le cytosol et peuvent cliver les pro-caspases-3 et 7, générant ainsi les caspases-3 et 7 clés de la phase effectrice de l'apoptose. La caspase-3 en particulier joue plusieurs rôles décisifs qui conduisent à la mort cellulaire. Tout d'abord, elle clive les filaments d'actine, protéine structurale du cytosquelette, ce qui désorganise la structure de la cellule. Elle agit également dans le noyau cellulaire et participe à la destruction du matériel génétique : tout d'abord, l'enzyme PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymérase) qui est une importante enzyme de réparation de l'ADN est inactivée par un clivage par la caspase-3. Parallèlement, la caspase-6 clive les lamines, protéines fibreuses qui ont un rôle de maintien structural du noyau. Enfin, l'enzyme ICAD (Inhibitor of CAD), forme inactive de la CAD (Caspase activated DNase), est clivée par la caspase-3 et libère la CAD qui fragmente l'ADN chromosomal en unités nucléosomiques (Figure 2-4).¹⁷⁰

¹⁷⁰ Les figures 2-2, 2-3 et 2-4 et les mécanismes présentés sont issues du « Reproductive and Cardiovascular diseases Research Group », Division of Basic Medical Sciences, St Georges, University of London et plus spécialement de la page du Dr. Phil Dash : <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/%7Edash/apoptosis/index.htm>.

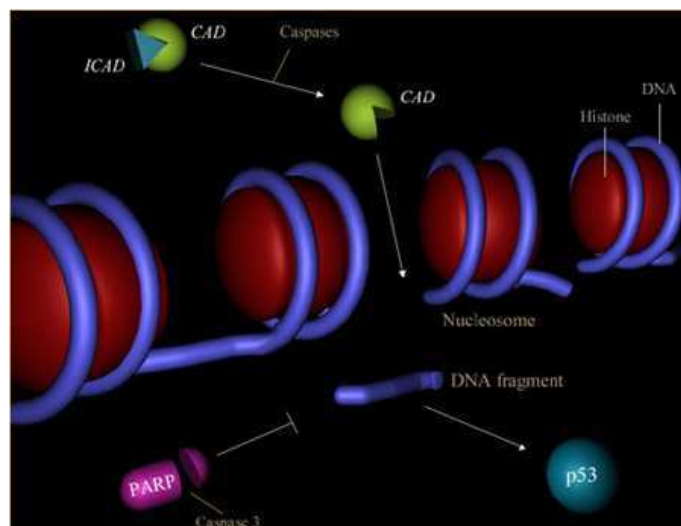


Figure 2-4. Action de la caspase-3 pour la destruction du matériel génétique.

Ces différents mécanismes qui mènent à la mort cellulaire programmée se matérialisent par l'exposition de phosphatidylsérine à la surface de la membrane cellulaire, l'arrêt de la réplication, la fragmentation du noyau et du cytosquelette et entraînent la formation de corps apoptotiques phagocytés par les cellules environnantes. Tout ceci contribue à faire de l'apoptose un moyen d'élimination organisé et « propre » d'élimination des cellules nuisibles pour l'organisme. Un résumé de tous ces mécanismes est représenté sur la figure 2-5.¹⁷¹

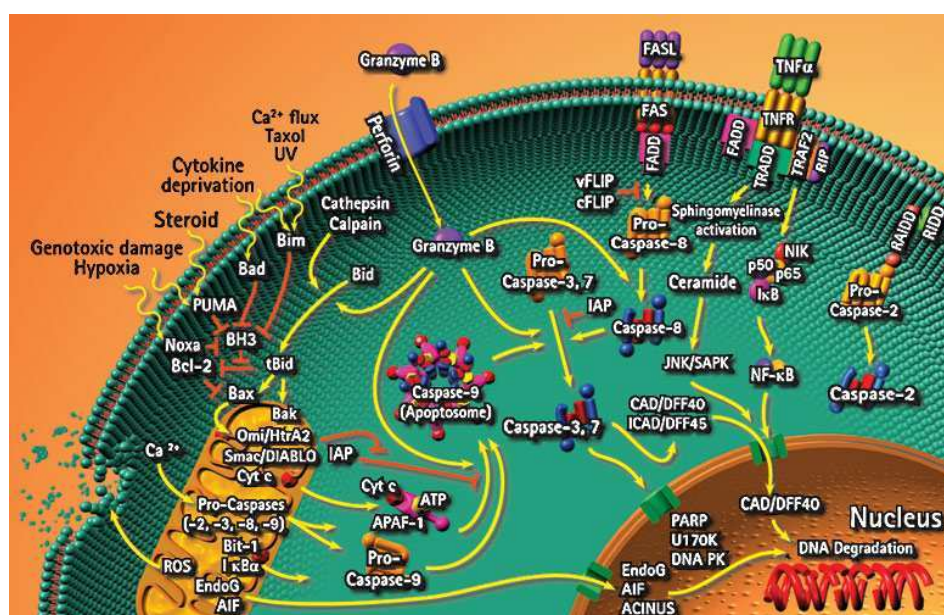


Figure 2-5. Schéma général des différents mécanismes impliqués dans l'apoptose.

¹⁷¹ Reproduction d'un poster disponible sur le site internet de Merck et disponible à l'adresse suivante : <http://www.merckbiosciences.co.uk/html/CBC/posters.htm>.

2.3 La détection de la caspase-3

La description des mécanismes de l'apoptose a clairement mis en évidence l'importance de la caspase-3 comme étant un acteur clé du processus apoptotique. Etant donné l'importance de cette enzyme dans le processus, il n'est pas surprenant que les chercheurs en aient fait une cible de choix pour imager différents dysfonctionnements biologiques. En effet, l'intervention de la caspase-3 indique que le processus apoptotique a atteint un stade irréversible, elle est donc une cible intéressante permettant d'évaluer la quantité de mise en apoptose dans un milieu. Cette information est très importante par exemple pour comparer l'efficacité d'inhibition ou de mise en apoptose induite par différents médicaments.^{123,172}

Un des intérêts de la caspase-3 est également sa grande spécificité. En effet, celle-ci reconnaît et clive uniquement le motif DEVD sur l'extrémité C-terminal de ce tetrapeptide et ceci avec une grande tolérance quant au substituant situé sur le dernier résidu acide aspartique (acide aminé, linker ou pro-fluorophore). Ainsi, cette enzyme constitue une bonne opportunité pour étendre notre stratégie générale de détection des peptidases. Cependant, plusieurs sondes ont déjà été décrites et se fondent soit sur un mécanisme de pro-fluorescence, de FRET ou d'auto-quenching de fluorophores.

2.3.1 Les sondes auto-quenchées

Une classe importante de sondes activables pour la détection de la caspase-3 sont les sondes commerciales PhiPhiLux[®].¹⁷³ Elles sont constituées de deux fluorophores introduits sur une séquence de 18 acides aminés comportant le motif peptidique DEVD reconnu par la caspase-3. Le principe de la sonde est l'introduction de deux résidus proline qui permettent un repliement de la séquence peptidique, mettant ainsi les deux fluorophores à proximité l'un de l'autre. La proximité de ceux-ci permet un auto-quenching qui éteint la fluorescence initiale de la sonde.¹⁷⁴ Un exemple de séquence utilisée est KDPC_εG-**DEVD**-GIDGC_εPKGY (C_ε = acide ε-aminocaproïque ou acide 6-aminohexanoïque) avec des rhodamines comme fluorophores et pouvant émettre à 530 nm ($\lambda_{\text{Ex.}}$ = 505 nm) ou 580 nm ($\lambda_{\text{Ex.}}$ = 552 nm).

¹⁷² Talanian, R. V.; Brady, K. D.; Cryns, V. L. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3351-3371. Nuttall, M. E.; Lee, D.; McLaughlin, B.; Erhardt, J. A. *Drug Discov. Today* **2001**, 6, 85-91.

¹⁷³ Packard, B. Z.; Toptygin, D. D.; Komoriya, A.; Brand, L., *Methods Enzymol.*, **1997**, 278, 15-23. Sondes commercialisées par OncoImmunin[®] : <http://www.phiphilux.com/phi1.html>.

¹⁷⁴ Komoriya, A.; Packard, B. Z.; Brown, M. J.; Wu, M.-L.; Henkart, P. A. *J. Exp. Med.* **2000**, 191, 1819-1828 et références citées.

Le groupe de R. Weissleder a publié de nombreuses sondes auto-quenchées, soit des molécules de petite taille ou à base de polymères et nanoparticules.¹³⁴⁻¹³⁹

Nous avons également décrit récemment une nouvelle méthode de solubilisation de fluorophores par l'introduction post-synthétique d'un linker polysulfonaté dérivé de la β -alanine. Ainsi, un analogue de la cyanine Cy 5.5 (commercialisée par GE Healthcare) a été synthétisé et utilisé pour la synthèse d'une sonde auto-quenchée pour la détection de la caspase-3.¹⁷⁵

2. 3. 2 Les sondes FRET

Les sondes FRET ont été largement utilisées pour la détection de la caspase-3. Cette section ne prétend pas à l'exhaustivité mais présentera seulement les sondes marquantes ayant été développées ainsi que nos travaux effectués dans ce domaine.

Plusieurs sondes à base de chélates de lanthanines ont été mises au point pour la détection de la caspase-3. L'émission lointaine de l'euprium, son fort déplacement de Stokes et la possibilité de travailler en temps résolu, ont par exemple été mis à profit avec la synthèse de sondes FRET soit quenchées avec un QSY[®]-7¹⁷⁶ ou un DABCYL,¹⁷⁷ soit avec divers fluorophores (tétraméthylrhodamine, Cy 5.0, Alexa Fluor[®] 546) comme accepteurs.¹⁷⁸ En particulier, nous avons développé une sonde FRET possédant une antenne terpyridine permettant de chélater un atome d'euprium et transférant son énergie à un Cy 5.0. L'émission initiale de la sonde à 672 nm est due à la fluorescence de Cy 5.0 après un transfert d'énergie de l'antenne vers le fluorophore. En présence de la caspase-3, les deux partenaires sont séparés et l'émission de l'euprium à 616 nm est restaurée (Schéma 2-10).¹⁷⁹

¹⁷⁵ Romieu, A.; Brossard, D.; Hamon, M.; Outaabout, H.; Portal, C.; Renard, P.-Y. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 279-289.

¹⁷⁶ Karvinen, J.; Laitala, V.; Makinen, M. L.; Mulari, O.; Tamminen, J.; Hermonen, J.; Hurskainen, P.; Hemmila, I. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1429-1436.

¹⁷⁷ Gopalakrishnan, S. M.; Karvinen, J.; Kofron, J. L.; Burns, D. J.; Warrior, U. *J Biomol Screen* **2002**, *7*, 317-323. Karvinen, J.; Hurskainen, P.; Gopalakrishnan, S.; Burns, D.; Warrior, U.; Hemmila, I. *J Biomol Screen* **2002**, *7*, 223-231.

¹⁷⁸ Preaudat, M.; Ouled-Diaf, J.; Alpha-Bazin, B.; Mathis, G.; Mitsugi, T.; Aono, Y.; Takahashi, K.; Takemoto, H. *J Biomol Screen* **2002**, *7*, 267-274.

¹⁷⁹ Poupert, S.; Boudou, C.; Peixoto, P.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4165-4177.

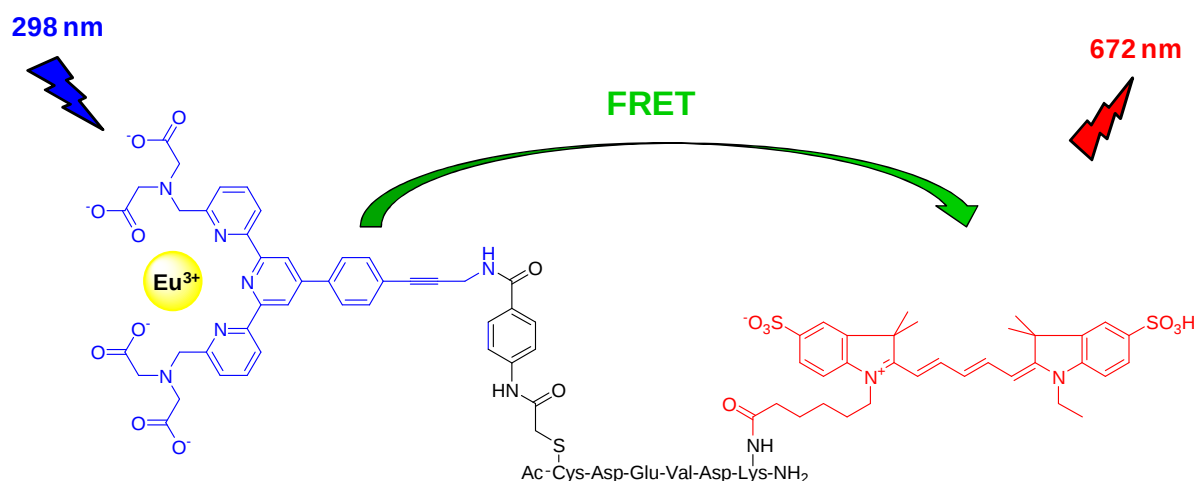


Schéma 2-10. Sonde FRET entre un chélate d'euprimum et Cy 5.0.

D'autres sondes FRET décrites par le groupe de T. Nagano utilisent la séquence **Donneur-GDEVDGVK-Accepteur** et mettent en jeu des couples de fluorophores plus « classiques » comme le lucifer Yellow ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 430/530 \text{ nm}$) ou un dérivé dichloré de la fluorescéine ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 505/525 \text{ nm}$) comme donneurs et des rhodamines ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 550/570 \text{ nm}$ ou $\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 575/595 \text{ nm}$) comme accepteurs.¹⁸⁰ De même, nous avons décrit des sondes FRET pour la détection de la caspase-3 en utilisant des couples Cy 5.5 et Cy 7.0 modifiés¹⁸¹ ainsi qu'un nouveau groupe protecteur pour la synthèse peptidique en phase solide et appliqué à la synthèse d'une sonde utilisant le couple Cy 3.0/Cy5.0.¹⁸²

Cependant, les sondes FRET les plus intéressantes sont les sondes activables quenchées utilisant des fluorophores émettant dans le proche IR. Ainsi, plusieurs sondes ont été décrites indépendamment par les groupes de R. Weissleder et de D. Piwnica-Worms et ont été utilisées en imagerie *in vivo*. Le groupe de R. Weissleder a décrit un nouveau quencher de type azulène et l'a utilisé pour la détection de la caspase-3. En présence de celle-ci, le quencher et le fluorophore sont séparés et la fluorescence de l'Alexa Fluor® 680 est restaurée (Schéma 2-11).¹⁸³

¹⁸⁰ Mizukami, S.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Urano, Y.; Mashima, T.; Tsuruo, T.; Nagano, T. *FEBS Lett.* **1999**, 453, 356-360.

¹⁸¹ Bouteiller, C.; Clavé, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1303-1317.

¹⁸² Lapeyre, M.; Leprince, J.; Massonneau, M.; Oulyadi, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Turcatti, G.; Vaudry, H. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 3655-3671.

¹⁸³ Pham, W.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3659-3662.

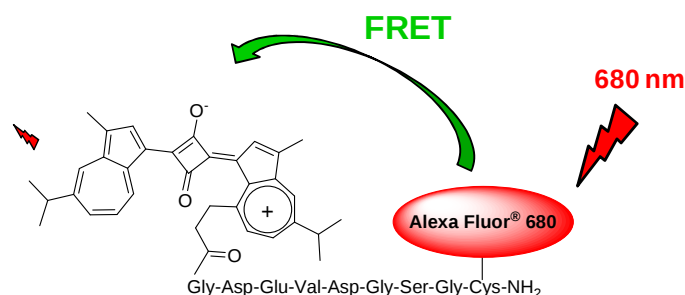


Schéma 2-11. Sonde FRET quenchée entre l'Alexa Fluor® 680 et un quencher de type azulène.

Selon le même concept, le groupe de D. Piwnica-Worms¹⁸⁴ et nous même¹⁸⁵ ont développé des sondes quenchées par le QSY®-21 avec respectivement l'Alexa Fluor® 647 et Cy 5.0 comme fluorophore donneur (Schéma 2-12 a et b, respectivement). Il est intéressant de noter qu'un CPP (Cell Penetrating Peptide)¹⁸⁶ Tat constitué de nombreux acides aminés à chaîne latérale chargées positivement à pH physiologique a été introduit sur la sonde de D. Piwnica-Worms *et al.* afin d'en améliorer la pénétration cellulaire.

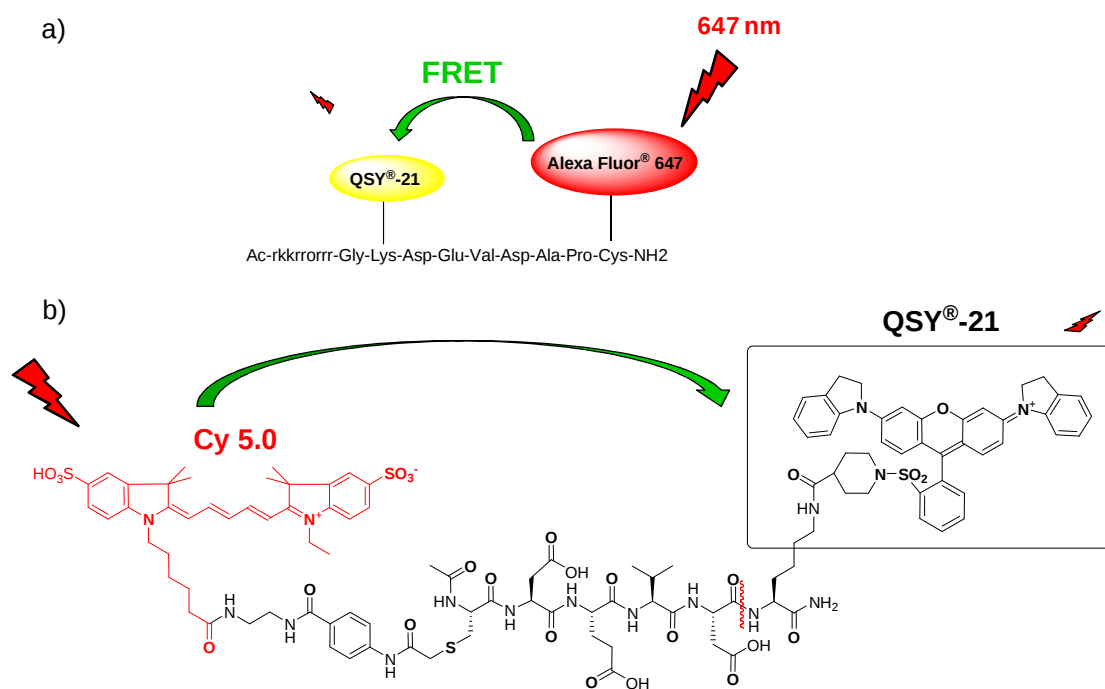


Schéma 2-12. Sondes quenchées utilisant le quencheur QSY®-21.

¹⁸⁴ Bullok, K.; Piwnica-Worms, D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5404-5407. Bullok, K. E.; Maxwell, D.; Kesarwala, A. H.; Gammon, S.; Prior, J. L.; Snow, M.; Stanley, S.; Piwnica-Worms, D. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4055-4065.

¹⁸⁵ Manuscrit en préparation.

¹⁸⁶ Pour quelques revues sur les Cell Penetrating Peptides (CPP), voir Hawiger, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 89-94. Futaki, S.; Goto, S.; Sugiura, Y. *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 260-264. Tung, C. H.; Weissleder, R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 281-294. Futaki, S. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 547-558. Goun, E. A.; Pillow, T. H.; Jones, L. R.; Rothbard, J. B.; Wender, P. A. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1497-1515. Wender, P. A.; Galliher, W. C.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 452-472.

2. 3. 3 Les sondes pro-fluorescentes

La mise au point de sondes pro-fluorescentes constitue la méthode la plus simple pour la détection de la caspase-3 puisque celle-ci est une exopeptidase qui clive en C-terminal. De plus, elle reconnaît une courte séquence peptidique, ce qui simplifie la synthèse et rend possible l'accès à ces sondes sur de grandes échelles de synthèse. Ces différents paramètres expliquent pourquoi la plupart des sondes actuellement commerciales pour la détection de la caspase-3 sont des sondes pro-fluorescentes.

Les premières sondes décrites pour la détection de la caspase-3 utilisent une 7-amino-4-trifluorométhyl-coumarine émettant dans le bleu et ne permettent donc que des études *in vitro* et *in cellulo* (Schéma 2-13 a).¹⁸⁷

La grande majorité des sondes destinées à la détection de la caspase-3 utilisent la rhodamine 110 comme fluorophore et la première sonde décrite par J. Liu *et al.*¹⁸⁸ est actuellement commercialisée sous le nom d'Apo-ONE[®] (Schéma 2-13 b). Cependant, l'inconvénient de cette sonde est sa faible pénétration cellulaire à cause de la présence de six groupements acide carboxylique et la nécessité de cliver deux motifs DEVD pour observer une augmentation de fluorescence, ce qui rend les profils de cinétique non linéaires.

Des modulations de la structure initiale ont ainsi été apportées afin de pouvoir éteindre la fluorescence sans utiliser une deuxième séquence peptidique et afin d'en améliorer la pénétration cellulaire. Plusieurs groupes ont rapporté l'introduction d'un groupement bloqueur sur l'un des deux atomes d'azote de la rhodamine 110 dans le but de permettre à celle-ci d'être non fluorescente avant le clivage enzymatique et de retrouver une partie ou l'intégralité de sa fluorescence initiale après la coupure. Le choix de ce groupement bloqueur a été effectué en fonction de sa capacité à améliorer la pénétration cellulaire de la sonde. Ainsi, S. X. Cai *et al.* ont décrit l'utilisation d'un motif octyloxycarbonyle qui permet d'obtenir les effets escomptés mais la sonde a pour inconvénient de ressortir rapidement de la cellule.¹⁸⁹ Pour remédier à ce problème, le carbamate à longue chaîne alkyle a été remplacé par un groupement pentafluorobenzoyle afin que les fonctions amines libres des protéines intracellulaires ou les thiols biologiques (e.g., glutathion) réagissent avec la sonde par substitution nucléophile aromatique (S_NAr) et favorisent ainsi la rétention de celle-ci dans la

¹⁸⁷ Gurtu, V.; Kain, S. R.; Zhang, G. *Anal. Biochem.* **1997**, *251*, 98-102.

¹⁸⁸ Liu, J.; Bhalgat, M.; Zhang, C.; Diwu, Z.; Hoyland, B.; Klaubert, D. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3231-3236.

¹⁸⁹ Cai, S. X.; Zhang, H. Z.; Guastella, J.; Drewe, J.; Yang, W.; Weber, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 39-42.

cellule.¹⁹⁰ Cependant, le niveau de fluorescence atteint est inférieur à celui obtenu avec la rhodamine 110. L'utilisation d'un autre groupement bloqueur comme une morpholine permet de résoudre ce problème. En effet, la formation de cette urée permet de multiplier les niveaux de fluorescence par un facteur dix et ainsi de retrouver 90% de la fluorescence de la rhodamine 110 (Schéma 2-13 c).¹⁹¹

Une sonde macrocyclique originale a également été reportée par une équipe de la société Marker Gene Technologies, Inc. Leur objectif était d'améliorer la pénétration cellulaire grâce à la formation de liaisons hydrogène entre les groupements acide carboxylique des résidus acide aspartatique et glutamique.¹⁹² Cependant, aucune étude *in cellulo* n'a encore été publiée (Schéma 2-13 d).

Enfin, une seule sonde possédant un fluorophore émettant dans le rouge a été reportée à ce jour, il s'agit de Magic RedTM qui utilise le crésyl violet comme fluorophore. Il est à noter que celle-ci est vendue sous la forme d'une « pro-sonde » puisque la sonde est supposée être obtenue après clivage de ses six esters méthyliques par des estérases intracellulaires. Cependant, cette sonde est très peu soluble dans l'eau et conduit à une précipitation incontrôlable en milieu physiologique, ce qui limite ses applications (Schéma 2-13 e).¹⁹³

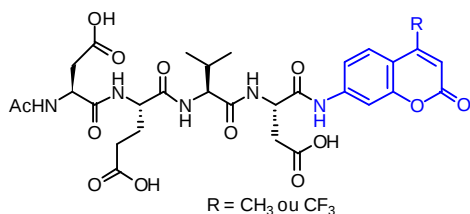
¹⁹⁰ Zhang, H.-Z.; Kasibhatla, S.; Guastella, J.; Tseng, B.; Drewe, J.; Cai, S. X. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 458-463.

¹⁹¹ Wang, Z.-Q.; Liao, J.; Diwu, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2335-2338.

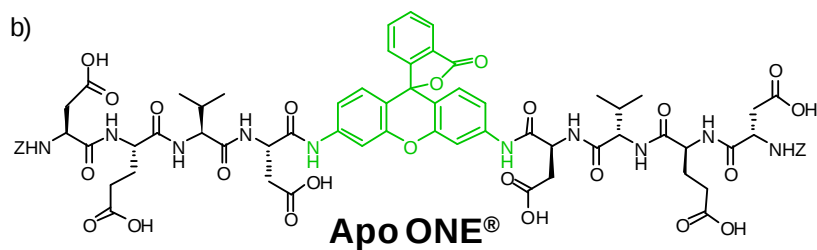
¹⁹² Guzikowski, A. P.; Naleway, J. J.; Shipp, C. T.; Schutte, R. C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4733-4735.

¹⁹³ Lee, B. W.; Johnson, G. L.; Hed, S. A.; Darzynkiewicz, Z.; Talhouk, J. W.; Mehrotra, S. *BioTechniques* **2003**, *35*, 1080-1085.

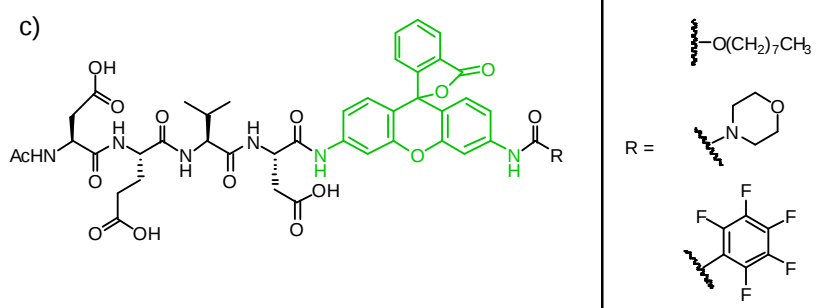
a)



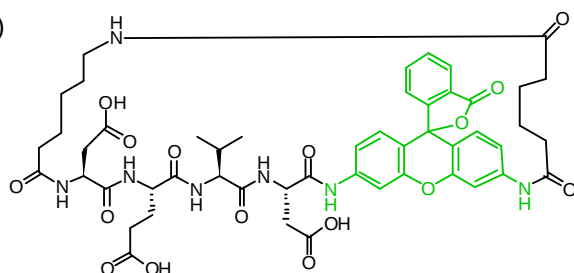
b)



c)



d)



e)

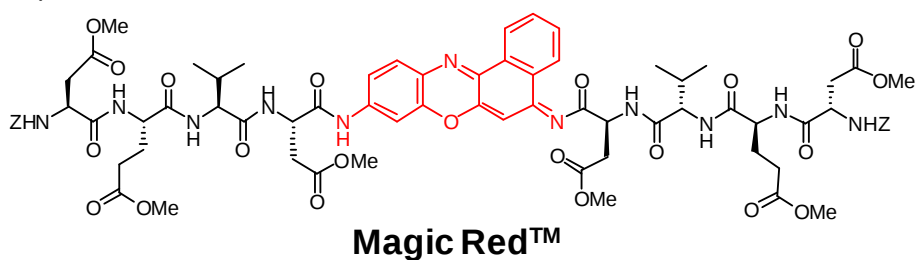


Schéma 2-13. Sondes pro-fluorescentes pour la détection de la caspase-3 utilisant : a) une 7-aminocoumarine ; b) la rhodamine 110 et deux substrats peptidiques ; c) la rhodamine 110, un seul substrat peptidique et un groupement bloqueur ; d) la rhodamine 110 dans un substrat macrocyclique ; e) le crésyl violet émettant dans le rouge et deux substrats peptidiques.

2. 3. 4 Autres sondes

D'autres approches de sondes activables pour la détection de la caspase-3 ont été développées. Par exemple, une détection par IRM est possible avec un chélate de thulium (Tm^{3+})¹⁹⁴ ou grâce à la combinaison d'un chélate de gadolinium¹⁹⁵ et d'un atome de fluor ^{19}F . L'utilisation de GFPs comme marqueurs fluorescents est aussi un bon moyen pour détecter la caspase-3. Par exemple, la GFP a été modifiée pour intégrer une ou plusieurs séquences DEVD dans sa structure. L'émission de lumière se fait selon un mécanisme de FRET entre le donneur W1B ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 434/476 \text{ nm}$) et l'accepteur TOPAZ ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 514/527 \text{ nm}$) de la GFP.¹⁹⁶ De façon analogue, la fusion d'une CFP (Cyan Fluorescent Protein) et d'une YFP (Yellow Fluorescent Protein) reliées par un linker contenant la séquence DEVD permet de détecter efficacement la caspase-3.¹⁹⁷ Enfin, un exemple intéressant a été reporté avec une sonde quenchée utilisant un donneur original puisqu'il s'agit d'une porphyrine chélatrice d'un ion platine (II) phosphorescent pouvant détecter la caspase-3 en temps résolu.¹⁹⁸

Ainsi, les différentes sondes pour détecter la caspase-3 sont principalement fondées sur l'implication de deux partenaires dans un système de type FRET (ou auto-quenching). Quelques exemples de sondes pro-fluorescentes ont également été décrits mais aucune n'a montré de réelles potentialités pour des applications *in vivo* soit en raison d'une émission à des longueurs d'onde trop basses (i.e., dans la gamme UV-visible), soit à cause de problèmes de solubilisation de la sonde en milieu physiologique. De plus, aucun exemple utilisant un bras réactif auto-immolable n'a été décrit à ce jour pour la détection de la caspase-3. Ainsi, nous avons développé une stratégie générale pour la détection de peptidases et nous l'avons appliquée à la détection de la caspase-3. Pour parvenir à cet objectif, plusieurs possibilités de bras réactif auto-immolable ont été envisagées.

¹⁹⁴ Yoo, B.; Pagel, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14032-14033.

¹⁹⁵ Mizukami, S.; Takikawa, R.; Sugihara, F.; Hori, Y.; Tochio, H.; Walchli, M.; Shirakawa, M.; Kikuchi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 794-795.

¹⁹⁶ Tawa, P.; Tam, J.; Cassady, R.; Nicholson, D. W.; Xanthoudakis, S. *Cell Death Differ.* **2001**, *8*, 30-37.

¹⁹⁷ Luo, K. Q.; Yu, V. C.; Pu, Y.; Chang, D. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 1054-1060 et référence 16-19 citées.

¹⁹⁸ O'Riordan, T. C.; Hynes, J.; Yashunski, D.; Ponomarev, G. V.; Papkovsky, D. B. *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 111-119.

IV UTILISATION D'UN BRAS REACTIF DERIVE DE L'ACIDE HOMOVANILLIQUE

1 Principe

Un bras réactif intéressant a été récemment décrit par le groupe de H. Waldmann pour la synthèse sur support solide.¹⁹⁹ Ce linker est basé sur une structure dérivée de l'acide homovanillique et son attractivité vient de la possibilité de séparer la molécule synthétisée du support solide par un clivage enzymatique catalysé par la PGA. En effet, le clivage par l'enzyme libère une amine primaire qui cyclise pour former un cycle à six chaînons, conduisant ainsi au relargage de la molécule cible (Schéma 2-14).

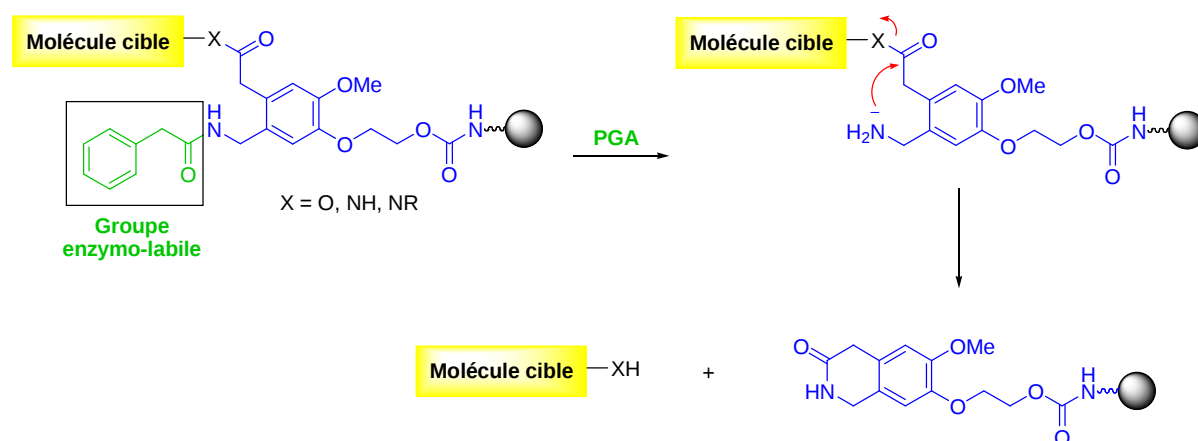


Schéma 2-14. Linker décrit par H. Waldmann *et al.* pour la synthèse sur support solide.

Afin de mettre au point notre méthode de détection de protéases par l'intermédiaire d'un bras réactif auto-immolable, nous avons envisagé dans un premier temps d'utiliser ce linker pour la synthèse de nos sondes pro-fluorescentes. L'objectif était donc d'introduire la séquence peptidique de l'enzyme cible sur le linker et de remplacer la molécule cible par un fluorophore à phénol (Schéma 2-15).

¹⁹⁹ Grether, U.; Waldmann, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1629-1632. Grether, U.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 959-971.

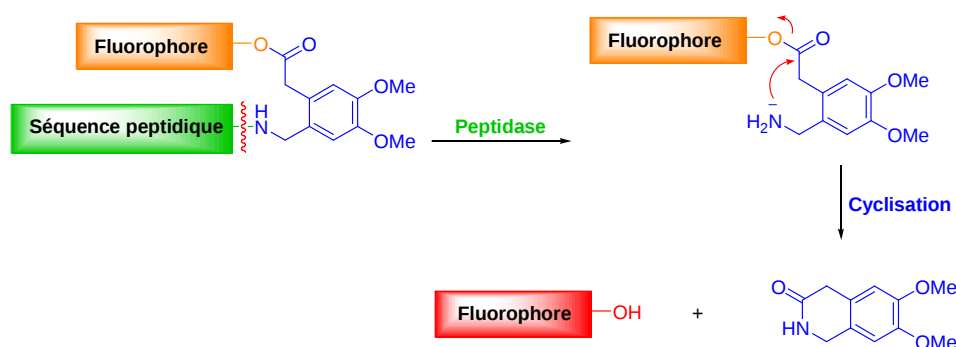


Schéma 2-15. Application du linker décrit par H. Waldmann *et al.* pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes.

Le concept est envisageable pour tout fluorophore à phénol dont les caractéristiques de fluorescence sont modifiées lorsque celui-ci est substitué. Pour cela, les coumarines sont de bons candidats et tout particulièrement les 7-hydroxycoumarines. En effet, les groupes de Nagano²⁰⁰ et Maçanita²⁰¹ ont montré l'influence du solvant et de la substitution des coumarines sur l'intensité de leur émission de fluorescence. Les solvants polaires et la présence de groupements électrodonneurs sur la position 7 de la coumarine (i.e., un hétéroatome N ou O) permettent d'augmenter l'intensité de l'émission de fluorescence. En revanche, la fluorescence est fortement diminuée lorsque l'hétéroatome sur la position 7 porte un ou des groupement(s) électroattracteur(s). Par extension, toute substitution de l'hétéroatome de la position 7 d'une coumarine modifie ses propriétés de fluorescence. Il était donc espéré qu'une 7-hydroxycoumarine substituée émette une faible quantité de lumière, et subisse éventuellement un effet hypsochrome.

2 Synthèse de sondes pour la détection de la PGA

Dans un premier temps, nous avons voulu mettre au point la méthode sur la même enzyme que celle utilisée par le groupe de H. Waldmann, la PGA. Ainsi, des résultats préliminaires²⁰² obtenus au laboratoire ont montré l'efficacité de cette approche avec la synthèse de sondes pro-fluorescentes capables de libérer un simple phénol ainsi que l'acide 2-(7-hydroxycoumarine)-acétique **11** (Schéma 2-16).²⁰³

²⁰⁰ Setsukinai, K.-I.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 2453-2457.

²⁰¹ Demelo, J. S. S.; Becker, R. S.; Macanita, A. L. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 6054-6058.

²⁰² Travail de stage post-doctoral de Ludovic Jean, Quidd, Octobre-Décembre 2004.

²⁰³ Coumarine synthétisée pendant la thèse de Ludivine Louise, Université de Rouen, soutenue le 17 décembre 2007.

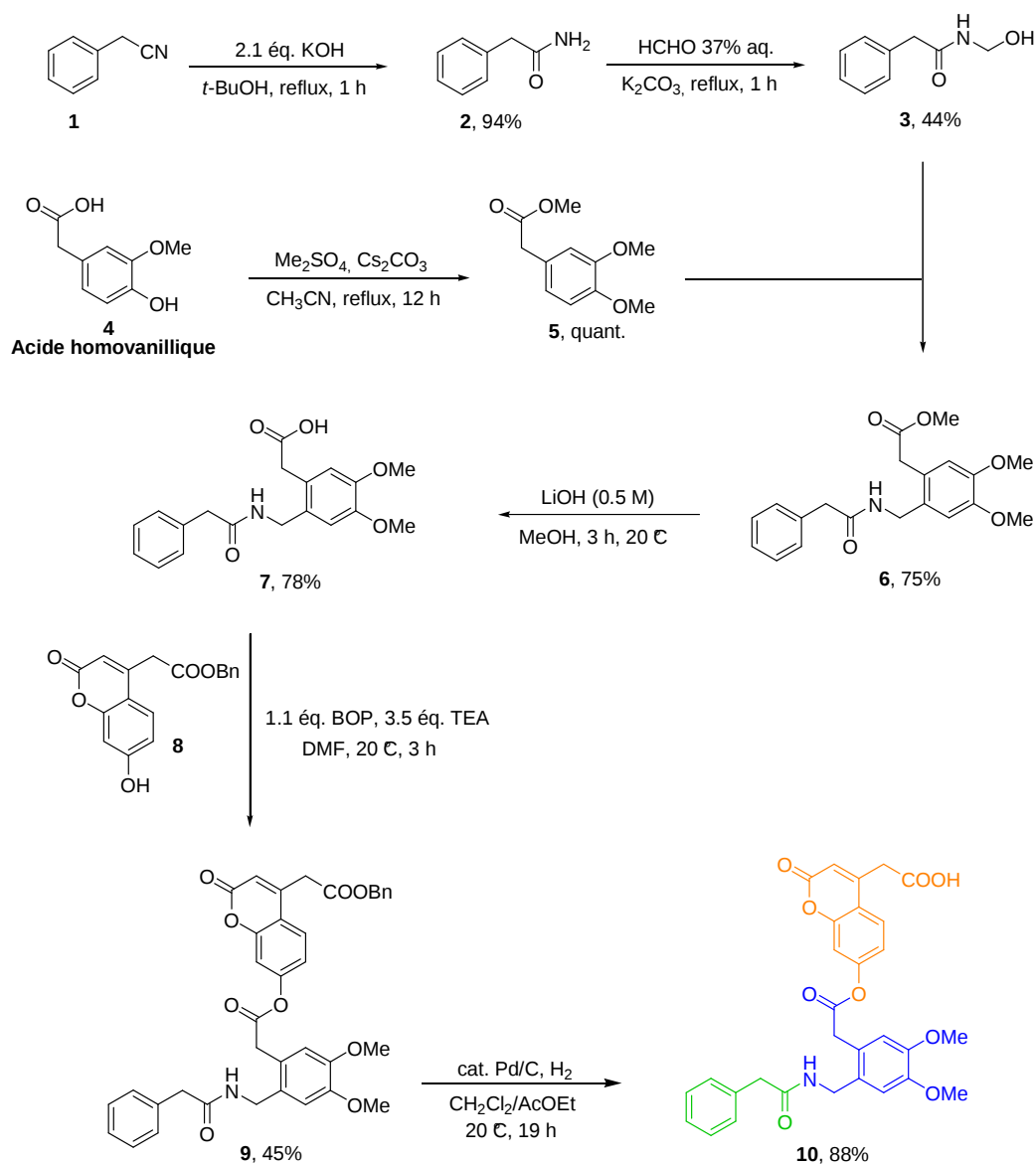


Schéma 2-16. Utilisation du linker de H. Waldmann *et al.* pour la synthèse d'une sonde pro-fluorescente activée par la PGA.

La sonde s'est avérée être efficace puisqu'en présence de la PGA, une augmentation de la fluorescence a pu être observée et le mécanisme de sa décomposition validé par des analyses CLHP (Schéma 2-17).

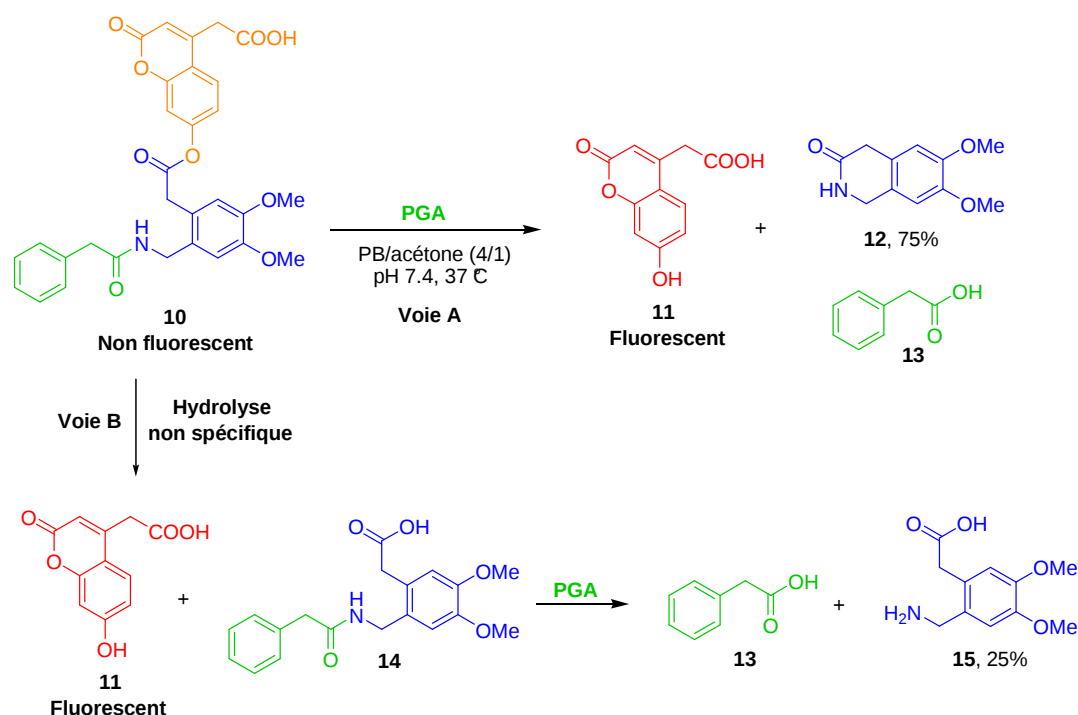


Schéma 2-17. Clivage de la sonde pro-fluorescente **10** par la PGA et mise en évidence de l'hydrolyse non spécifique.

Cependant, des tests de stabilité en tampon PB/acetone (tampon phosphate/acétone, 8:2, v/v) ont montré que la sonde subissait un clivage non spécifique. En effet, deux mécanismes de libération du fluorophore sont envisageables. La voie A libère l'acide **13** et l'hétérocycle **12** après un clivage direct par la PGA. En revanche, la voie B commence par la libération de l'acide **14** par hydrolyse de la liaison ester puis clivage par la PGA pour libérer le linker **15** et l'acide **13**. Une estimation par CLHP a permis de montrer un rapport 75/25 entre les composés **12** et **15**, montrant ainsi que 25% du fluorophore était libéré par hydrolyse non spécifique. En dépit de cette limitation, nous avons tout de même décidé d'étendre cette stratégie à la détection de la caspase-3.

3 Synthèse de sondes pour la détection de la caspase-3

La stratégie pour la synthèse des sondes pro-fluorescentes visant la caspase-3 et utilisant le linker de H. Waldmann *et al.* est représentée sur le schéma rétrosynthétique suivant :

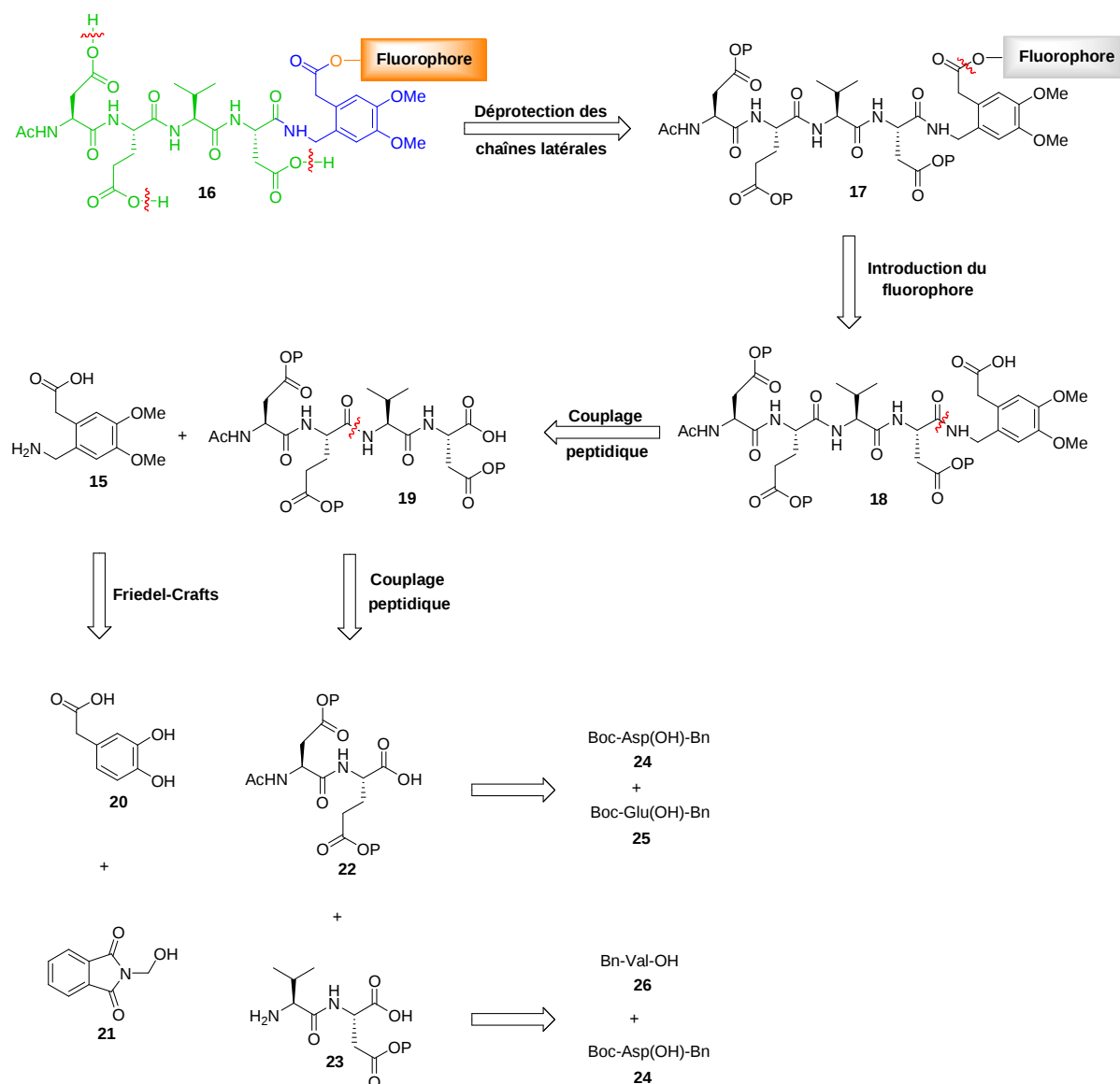


Schéma 2-18. Analyse rétrosynthétique pour la synthèse des sondes pro-fluorescentes utilisant le linker de H. Waldmann *et al.* et visant la détection de la caspase-3.

Les sondes **16** peuvent être obtenues à partir d'un précurseur **17** dont les chaînes latérales des trois acides carboxyliques sont protégées. Afin d'obtenir un maximum de flexibilité dans la synthèse, nous envisageons d'introduire le fluorophore le plus tard possible à partir de **18**. Le bras réactif **15** peut être synthétisé à partir de l'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl)acétique **20** et le *N*-(hydroxyméthyl)phthalimide **21** par une réaction de Friedel-Crafts. Puis, celui-ci pourrait être introduit sur le térapeptide protégé **19**, lui-même préalablement synthétisé à partir des acides aminés commerciaux **24**, **25**, et **26**.

3. 1 Synthèse du tétrapeptide DEVD

3. 1. 1 Stratégie

La synthèse du tétrapeptide DEVD a été effectuée en solution afin de pouvoir envisager une synthèse multigrammes qui serait difficilement envisageable avec une synthèse sur phase solide. De plus, des essais préliminaires sur phase solide utilisant des esters méthyliques comme groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus acides aspartique et glutamique ont conduit à de nombreux produits secondaires.²⁰⁴ En effet, un paramètre important de la synthèse est la présence de deux acides aspartiques dans la séquence peptidique cible. Chacun de ceux-ci peut former des aspartimides par substitution nucléophile de l'ester par l'atome d'azote de l'amide. Cette réaction secondaire est catalysée en milieu acide et basique (notamment par la pipéridine utilisée pour la déprotection du groupement Fmoc protégeant l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique en cours d'élongation) et peut conduire à la formation de produits secondaires α ou β -aspartate, voire à la racémisation de l'acide aminé (Schéma 2-19).²⁰⁵

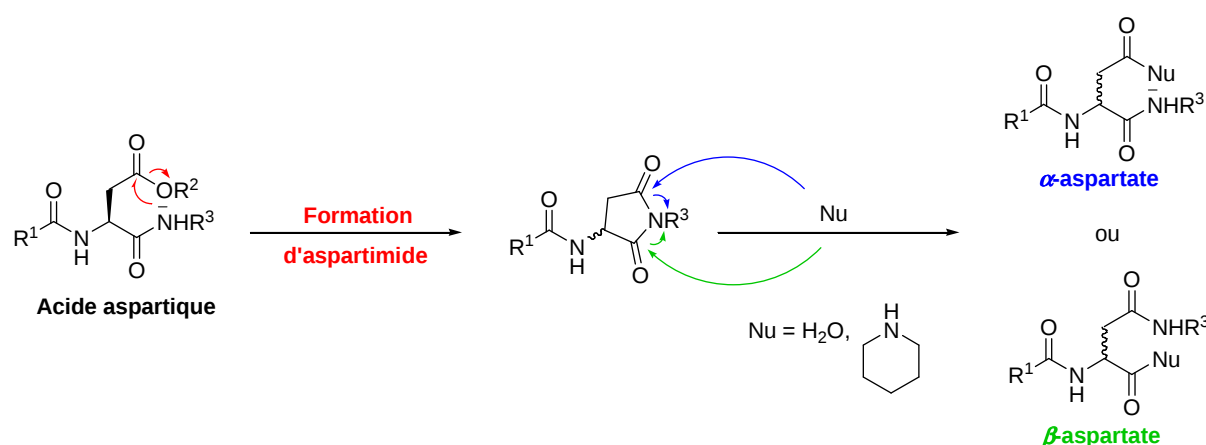


Schéma 2-19. Mécanisme de formation de α ou β -aspartate via la formation d'un aspartimide.

Ainsi, la synthèse en solution est préférable mais pose tout de même le problème délicat du choix du groupement protecteur sur les chaînes latérales des acides aspartique et glutamique. Notre objectif est d'élaborer une stratégie qui puisse servir à la fois pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes et de sondes chémiluminescentes. Ces dernières reposent sur l'utilisation de 1,2-dioxétanes (voir chapitre 3) qui sont instables en milieu acide, ce qui élimine l'utilisation

²⁰⁴ Résultats non publiés issus des travaux du Dr. Jérôme Leprince, INSERM U413, IFRMP23, Université de Rouen et du Dr. Anthony Romieu.

²⁰⁵ Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Staehelin, C.; Vorherr, T. *J. Peptide Sci.* **2003**, 9, 518-526. Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Weiler, P.; Vorherr, T. *J. Peptide Sci.* **2003**, 9, 36-46.

de groupes protecteurs acido-labiles. Parallèlement, le caractère bon groupe partant des pro-fluorophores impose l'utilisation de conditions de déprotection modérément basiques. Un groupement protecteur dont la stabilité est compatible avec les conditions de synthèse peptidique et pouvant être retiré dans des conditions neutres a donc été choisi. Des esters de TriMéthylSilylEthyle (TMSE) ont donc été utilisés car ils présentent les avantages d'être assez robustes pour supporter les conditions successivement acides et basiques de la synthèse multi-étapes et peuvent être retirés dans des conditions douces par une réaction de β -élimination induite par les ions fluorure (Schéma 2-20).²⁰⁶

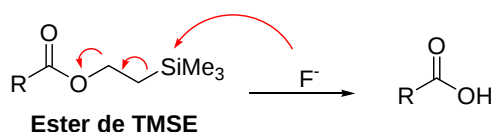


Schéma 2-20. Déprotection des esters de TMSE en présence d'ions fluorure.

Enfin, une stratégie Boc plutôt qu'une stratégie Fmoc a été utilisée afin de minimiser les étapes de purification lors des déprotections des fonctions amines des acides aminés. En effet, suite à la déprotection d'un groupement Fmoc, il est souvent indispensable d'effectuer une purification par chromatographie sur gel de silice afin de séparer l'acide aminé N-déprotégé des dérivés du fulvène, ce qui n'est pas le cas avec le Boc car les sous-produits issus de sa déprotection sont volatils (i.e., CO₂ et isobutène).

Ainsi, la synthèse du térapeptide Ac-DEVD-OH **36** a été envisagée grâce à la synthèse préalable de deux dipeptides Ac-DE-OH **31** et H-VD-Bn **34** qui eux-mêmes pouvaient être obtenus à partir des acides aminés commerciaux Boc-D-Bn **24**, Boc-E-Bn **25** et Boc-V-OH **26** (Schéma 2-18).

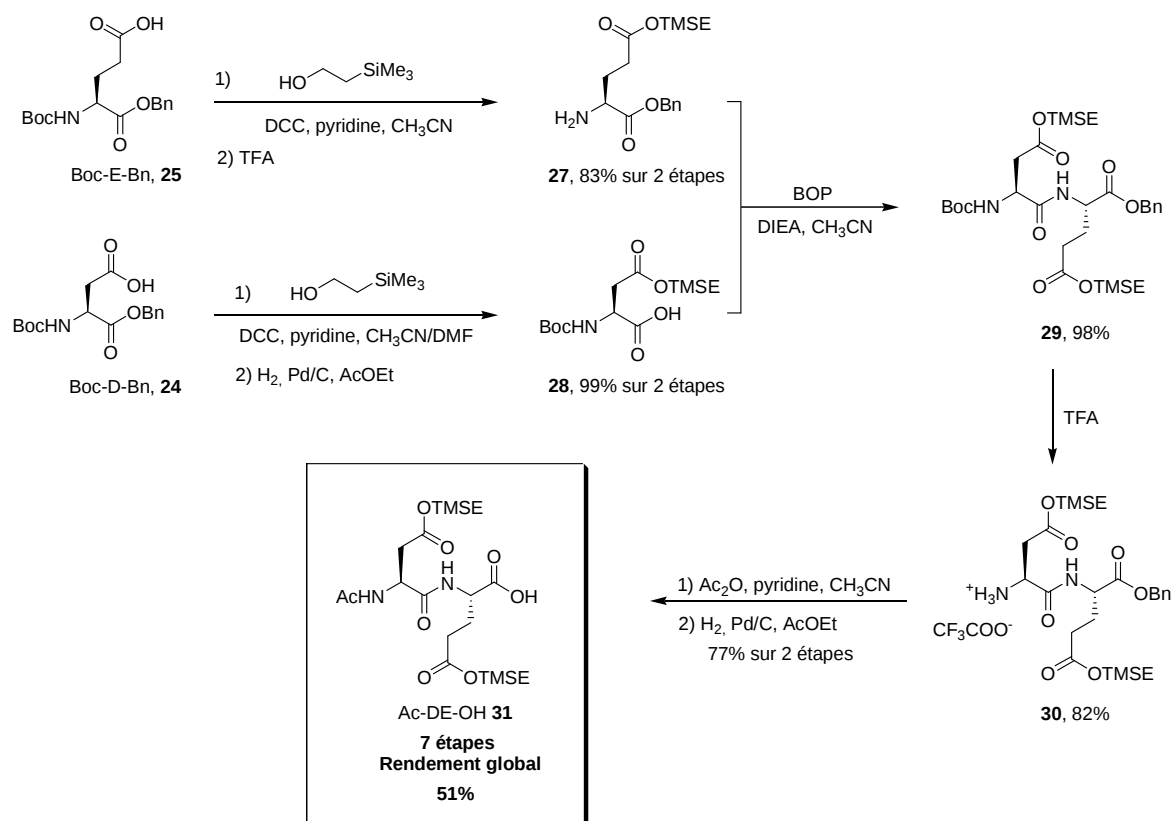
3. 1. 2 Synthèse du dipeptide Ac-DE-OH

La protection des chaînes latérales des acides aminés par des esters de TMSE a tout d'abord été effectuée en utilisant le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme agent de couplage selon une procédure modifiée déjà décrite pour l'acide glutamique.²⁰⁷ Les acides aminés obtenus ont été déprotégés respectivement par traitement au TFA et hydrogénation catalytique

²⁰⁶ Gerlach, H. *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 3039-3044. Sieber, P. *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 2711-2716.

²⁰⁷ Olsen, R. K.; Ramasamy, K.; Emery, T. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3527-3534.

pour fournir **27** et **28** avec 83% et 99% de rendement sur deux étapes. Ceux-ci ont ensuite été couplés en utilisant l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium (BOP) comme agent de couplage,²⁰⁸ permettant l'obtention du premier dipeptide **29** avec un excellent rendement de 98% (Schéma 2-21).



Puis, l'extrémité N-terminale de **29** a été déprotégée par le TFA en prenant soin de conserver l'amine sous sa forme protonée afin d'éviter une réaction secondaire de cyclisation intramoléculaire conduisant à une dicétopipérazine (Schéma 2-22).

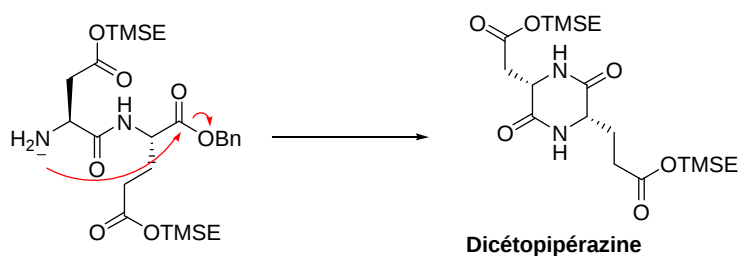


Schéma 2-22. Réaction secondaire de formation de dicétopipérazine si le doublet de l'azote est libre.

²⁰⁸ Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 1219-1222. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Dourtoglou, B.; Evin, G.; Selve, C.; Ziegler, J. C. *Synthesis* **1976**, 751-752.

De plus, la réaction doit être suivie avec précaution car un traitement prolongé en milieu acide conduit à la déprotection prématurée de l'un des esters de TMSE. Ainsi, un rendement maximum de 82% a pu être obtenu mais les différents essais ont plutôt montré une reproductibilité des rendements voisine de 50%. L'ammonium **30** a ensuite été acétylé afin d'éviter tout clivage prématuré des sondes par les exopeptidases présentes dans l'organisme. Enfin, le dipeptide Boc-DE-OH **31** a été obtenu après hydrogénation de l'ester benzylique avec un rendement de 77% sur deux étapes.

3. 1. 3 Synthèse du dipeptide H⁺-VD-Bn

L'acide aminé protégé **24** a également été utilisé pour la synthèse de H⁺-VD-Bn **34**. En effet, après protection de la chaîne latérale par un ester de TMSE et déprotection du groupement Boc en présence de TFA, **32** a pu être obtenu et couplé à la valine commerciale Boc-V-OH **26** dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Le groupement Boc du composé **33** ainsi obtenu a été retiré par traitement au TFA, permettant l'obtention de H⁺-VD-Bn **34** isolé sous sa forme ammonium pour la même raison que celle mentionnée précédemment (Schéma 2-23).

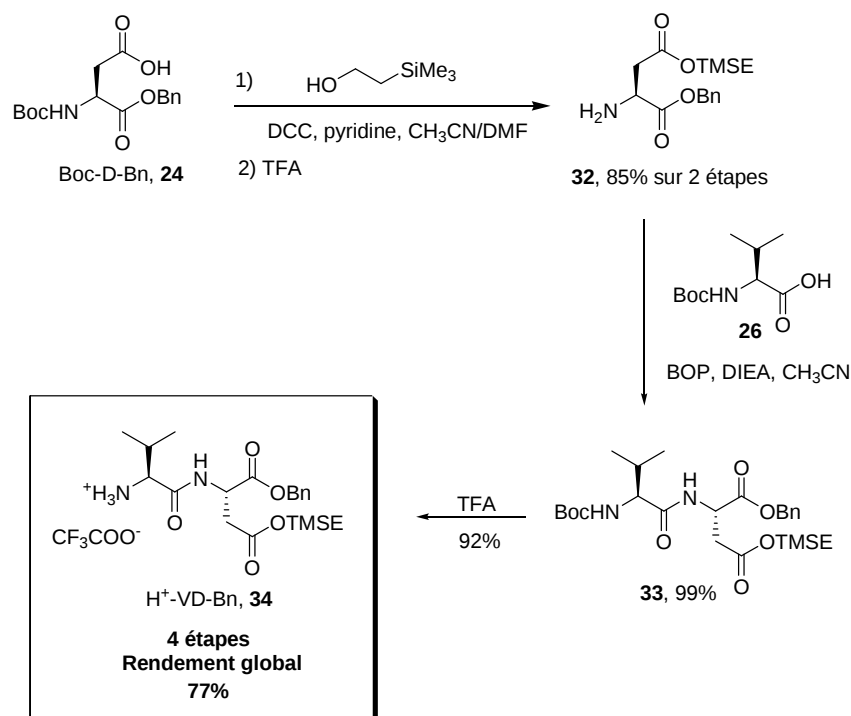


Schéma 2-23. Synthèse du dipeptide H⁺-VD-Bn **34**.

3. 1. 4 Synthèse du térapeptide Ac-DEVD-OH

Une fois la synthèse des dipeptides **31** et **34** effectuée, ceux-ci ont été couplés en présence de BOP et de DIEA, permettant l'obtention du térapeptide benzylé **35** avec un excellent rendement de 96%. Enfin, le térapeptide Ac-DEVD-OH **36** est obtenu par la déprotection quantitative de l'ester benzylique en présence d'hydrogène et de Pd/C (Schéma 2-24).

Ainsi, le térapeptide DEVD substrat de la caspase-3 et protégé sur ses chaînes latérales par des esters de TMSE a été obtenu à l'échelle du multi-gramme (4-5 g) avec un total de 13 étapes et d'excellents rendements puisque le rendement moyen de chaque étape a été évalué à 93%.

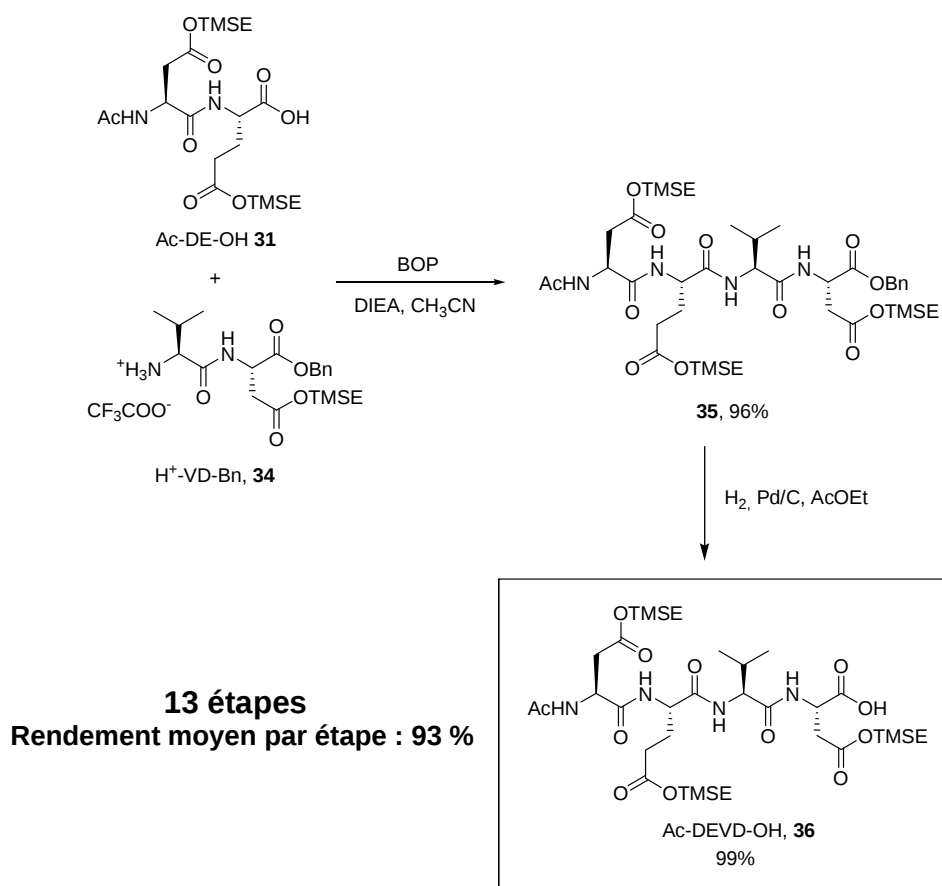


Schéma 2-24. Synthèse du térapeptide Ac-DEVD-OH **36**.

3. 2 Synthèse et introduction du linker de H. Waldmann

La synthèse du linker décrit par H. Waldmann *et al.* selon le schéma 2-16 était bien adaptée pour le substrat de la PGA mais pas pour une extension à des substrats peptidiques du type Ac-DEVD-OH. Ainsi, la synthèse décrite sur le schéma 2-25 a été développée. Les deux

fonctions phénol et la fonction acide carboxylique de l'acide 2-(3,4-dihydroxyphényl)acétique **20** ont été méthylées en une seule étape en utilisant le sulfate de diméthyle. Puis, **37** a été obtenu par une réaction de Friedel-Crafts régiosélective en présence de *N*-(hydroxyméthyl)phthalimide **21** avec un rendement de 75%. Enfin, l'acide aminé **15** est libéré quantitativement par la déprotection du groupement phthalimide en présence d'hydrazine. Cependant, la forte polarité de l'acide aminé **15** présent sous forme zwitterionique nécessite de l'isoler par flash-chromatographie sur une colonne de silice à polarité de phase inversée. De plus, des réactions sur plus grande échelle (1-2 g) ont montré une séparation difficile entre **15** et le produit secondaire **38** issu de la déprotection (i.e., phthalhydrazide) (Schéma 2-25).

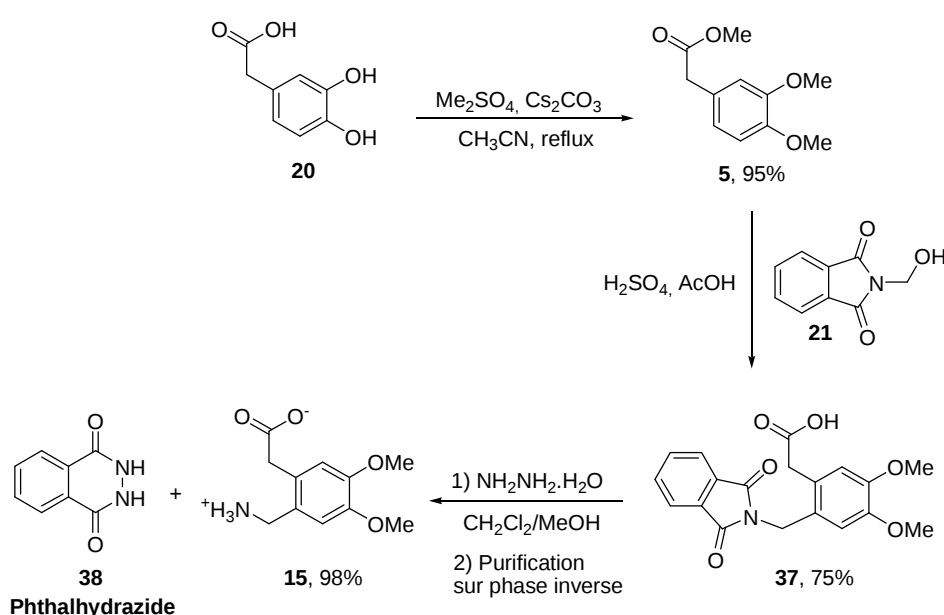


Schéma 2-25. Synthèse du bras réactif **15** à introduire sur le tétrapeptide **36**.

Malgré ces problèmes pratiques de synthèse, le linker **15** a été engagé en présence du tétrapeptide **36** pour former le produit de couplage **39**. Le linker **15** possédant à la fois une fonction amine et acide carboxylique, le peptide **36** a été pré-activé avant d'introduire le linker. Ainsi, le carboxylate de **36** a été formé en présence de DIEA puis a été activé sous la forme de son ester de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) **40** grâce à l'ajout de l'agent de couplage tétrafluoroborate de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium (TSTU).²⁰⁹ L'acide aminé **15** a ensuite été ajouté et le composé **39** a pu être isolé avec un rendement de 25% sous la forme d'un seul isomère (Schéma 2-26 a).

²⁰⁹ Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillissen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930. Bannwarth, W.; Knorr, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1157-1160.

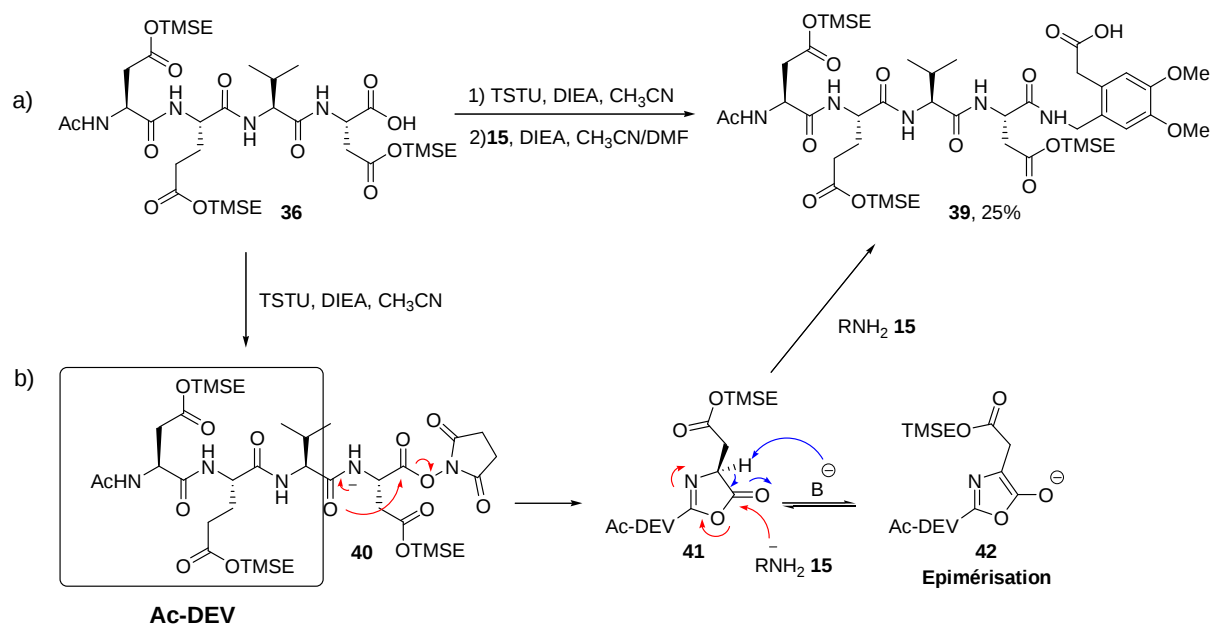


Schéma 2-26. a) Introduction du linker de H. Waldmann *et al.* sur le térapeptide Ac-DEVD-OH **36** ; b) Mécanisme supposé lors de l'obtention de l'épimère de **39**.

Cependant, lorsque la réaction a été reproduite, un mélange de deux produits de structures très proches (selon le spectre ¹H RMN et les temps de rétention de l'analyse par CLHP) a été obtenu. Etant donné l'analogie structurale de ces produits, nous avons supposé que le deuxième produit correspondait à une épimérisation du centre asymétrique de l'acide aspartique du côté C-terminal. L'épimérisation pourrait être due à une réaction secondaire de l'ester de NHS **40**, qui en absence de nucléophile dans le milieu au début de la réaction, conduirait à la formation d'une oxazolinone **41**. Deux réactions sont alors possibles, soit l'ouverture du motif lactone par l'amine primaire **15** qui fournirait le produit **39** désiré, soit l'élimination baso-catalysée du proton en α de la lactone qui conduirait à la formation de l'oxazole **42**. La formation de celui-ci est favorisée pour son caractère aromatique mais engendre la racémisation du centre asymétrique. En présence de l'amine **15** dans le milieu, le produit de couplage **39** serait tout de même obtenu mais avec une épimérisation totale de ce centre (Schéma 2-26 b).²¹⁰

Toutefois, la synthèse a été poursuivie en supposant que l'isomère majoritaire isolé lors de la première réaction était le diastéréoisomère désiré. Ainsi, le 7-hydroxycoumarine-4-acétate de benzyle **8** a été introduit sur le bras réactif de **39** par une réaction d'estérification utilisant le

²¹⁰ Pour le mécanisme proposé et une revue récente sur les agents de couplage peptidiques, voir Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.

BOP comme agent de couplage.²¹¹ Le composé **43** ainsi obtenu avec un rendement de 57% a pu être débenzylé en présence d'hydrogène et de Pd/C et fournir **44** avec un bon rendement. Finalement, des essais de déprotection du composé **44** ont été effectués en présence de différentes sources d'ions fluorure (Schéma 2-27).²¹²

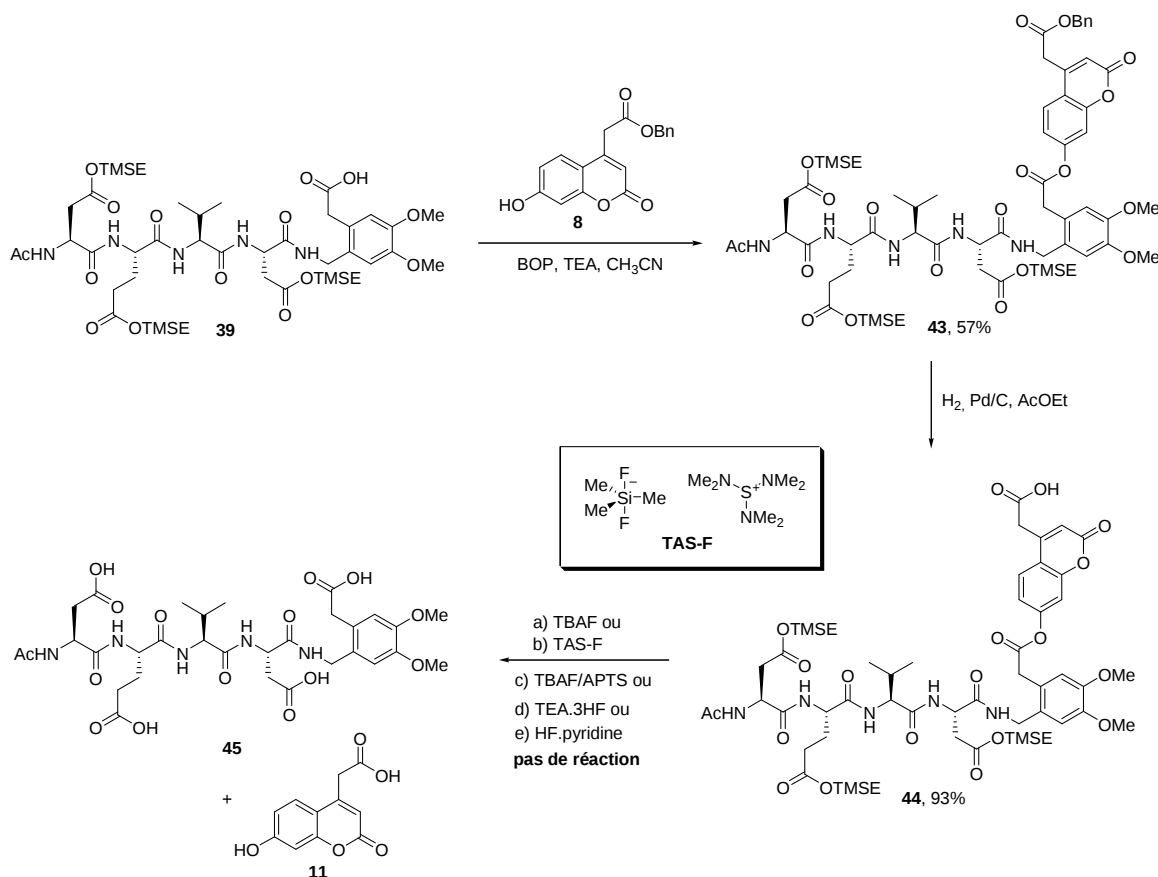


Schéma 2-27. Introduction de l'acide 7-hydroxycoumarine-4-acétique **8** et essais de déprotection des esters de TMSE.

Le précurseur de la sonde a tout d'abord été mis en présence de TBAF en solution dans le THF (1.0 M), ce qui provoque un changement de couleur instantané (de l'incolore au jaune). Une analyse CLHP a montré la libération totale de la coumarine **11**. Supposant que la basicité de la solution de TBAF était la cause de l'hydrolyse de la fonction ester, des essais d'utilisation de sources d'ions fluorure acide ont donc été effectués. Cependant, l'utilisation de TEA.3HF dans un mélange DMSO/AcOH, d'une solution de HF.pyridine ou de TBAF tamponné par de l'APTS²¹³ n'ont pas permis la déprotection des esters et le réactif de départ

²¹¹ Pour une extension de l'utilisation du BOP à la formation d'esters, voir Castro, B.; Evin, G.; Selve, C.; Seyer, R. *Synthesis* **1977**, 413-413.

²¹² Greene, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th ed.; Wiley: New-York, 2006.

²¹³ Ferezou, J.-P.; Julia, M.; Li, Y.; Liu, L. W.; Pancrazi, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 132, 428-52.

44 a été récupéré intact. Les sources acides d'ions fluorure n'étant pas assez réactives, des conditions utilisant le tris(diméthylamino)sulfonium de difluorotriméthylsilicate (TAS-F), déjà utilisé pour la déprotection d'esters de TMSE en présence d'autres esters ou de fonctions sensibles, ont été testées.²¹⁴ Malheureusement, cette source d'ions fluorure a également conduit à la libération du fluorophore **11**.

Parallèlement, et dans le but d'étendre l'utilisation de nos sondes à l'imagerie *in vivo*, l'introduction de la 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one) (DDAO, $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 636/652 nm) **46** a été envisagée. Ce fluorophore avait été précédemment utilisé comme marqueur fluorescent dans une sonde pro-fluorescente destinée à la détection de la β -galactosidase *in vivo*.²¹⁵ Ainsi, DDAO **46** a été synthétisé selon une procédure déjà décrite dans la littérature²¹⁶ et introduit sur le bras réactif dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, fournissant **47** avec un rendement de 33% (Schéma 2-28). Cependant, et pour les mêmes raisons que pour **44**, la déprotection en présence de TBAF ou TAS-F a conduit à la libération de DDAO **46** dans le milieu.

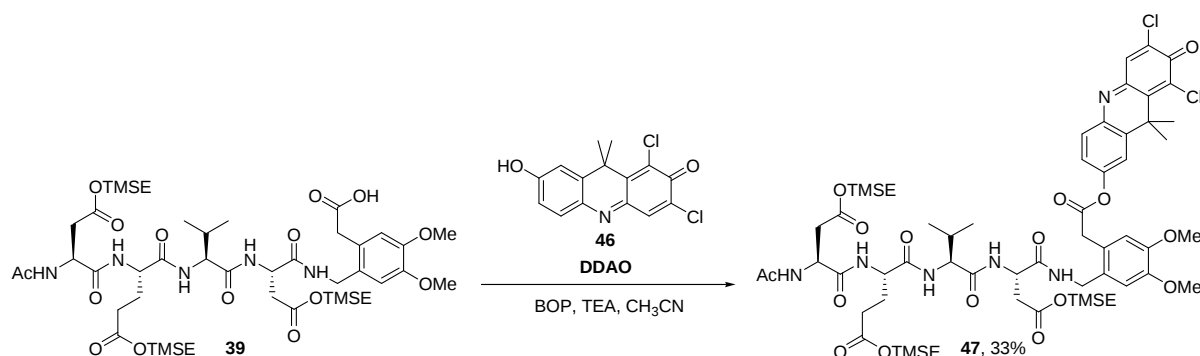


Schéma 2-28. Introduction de DDAO **46** pour une extension à l'imagerie *in vivo*.

Malgré toutes les conditions de déprotection des esters de TMSE que nous avons testées, il n'a pas été possible d'effectuer la déprotection de ces esters sélectivement par rapport à l'autre ester de la molécule. Emettant également des doutes quant à la stabilité de telles sondes en milieu physiologique, il nous a paru pertinent de rechercher un autre moyen pour

²¹⁴ Scheidt, K. A.; Chen, H.; Follows, B. C.; Chemler, S. R.; Coffey, D. S.; Roush, W. R. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6436-6437. Scheidt, K. A.; Bannister, T. D.; Tasaka, A.; Wendt, M. D.; Savall, B. M.; Fegley, G. J.; Roush, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6981-6990. El-Dahshan, A.; Weik, S.; Rademann, J. *Org. Lett.* **2007**, 9, 949-952. Furstner, A.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1906-1907.

²¹⁵ Tung, C.-H.; Zeng, Q.; Shah, K.; Kim, D.-E.; Schellingerhout, D.; Weissleder, R. *Cancer Res.* **2004**, 64, 1579-1583.

²¹⁶ Bruce, J. M.; Knowles, P. *J. Chem. Soc. C* **1966**, 1627-1634. Corey, P. F.; Trimmer, R. W.; Biddlecom, W. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, 103, 1646-1648.

relier la séquence peptidique au fluorophore à phénol. Ainsi, l'utilisation d'un autre bras réactif, le PABA, a été envisagée.

V UTILISATION D'UN BRAS REACTIF DERIVE DE L'ALCOOL *p*-AMINOBENZYLIQUE

1 Introduction

L'utilisation de ce bras réactif a été détaillée précédemment sur le schéma 2-2 avec de nombreuses applications dans des stratégies de type pro-drogue. De façon intéressante, il a aussi été récemment utilisé pour la mise au point de sondes pro-fluorescentes pour la détection de peptidases (Schéma 2-7). De plus, le PABA présente l'avantage d'être disponible commercialement, ce qui résout les problèmes de synthèse à grande échelle que nous avons rencontrés avec le linker de H. Waldmann *et al.*

Dans le but d'obtenir des sondes pro-fluorescentes utilisant des fluorophores à phénol, deux options principales étaient envisageables pour l'introduction directe du fluorophore sur le linker. Le fluorophore pouvait être relié au PABA soit par une fonction carbonate²¹⁷ ou par une fonction éther (Schéma 2-29). Etant donné que les fluorophores que nous avons utilisés se sont avérés être d'excellents groupes partant, nous avons plutôt envisagé l'utilisation de la liaison éther *a priori* plus stable car moins sensible aux agents nucléophile. L'utilisation de la liaison carbonate sera discutée au Chapitre 3 avec la synthèse de sondes chémiluminescentes en utilisant un phénol qui devrait être un moins bon groupe partant.

²¹⁷ Pour deux revues sur les synthèses et applications des carbonates, voir Shaikh, A. A. G.; Sivaram, S. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 951-976. Parrish, J. P.; Salvatore, R. N.; Jung, K. W. *Tetrahedron* **2000**, 56, 8207-8237.

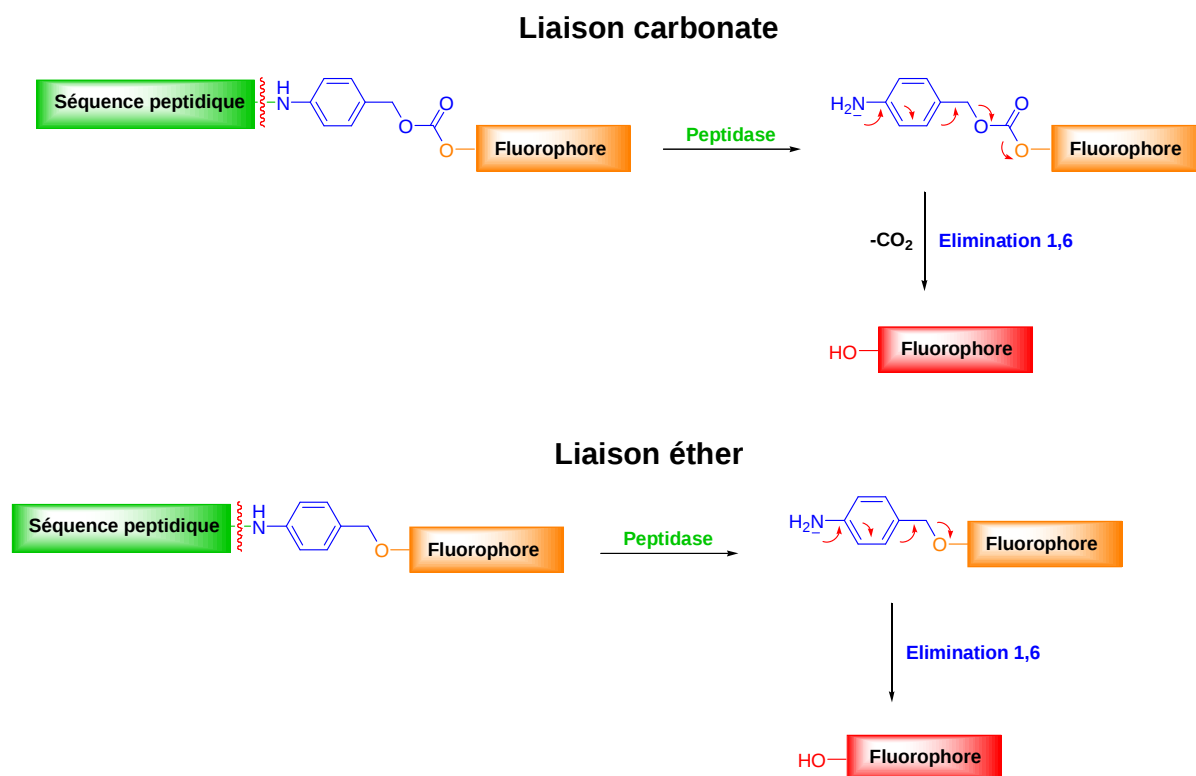


Figure 2-29. Mécanismes envisagés lors de la libération du fluorophore lié au bras réactif PABA via : a) une liaison carbonate ; b) une liaison éther.

Comme précédemment, la stratégie de synthèse a été mise au point en utilisant la PGA comme peptidase modèle et les informations obtenues nous ont servi pour son extension aux sondes caspase-3.

2 Utilisation du PABA pour la détection de la PGA

2.1 Introduction de la 7-hydroxycoumarine

2.1.1 Synthèse

Afin de mettre au point la stratégie, l'introduction de la 7-hydroxycoumarine **52** sur le bras réactif a tout d'abord été envisagée. Les avantages de ce fluorophore sont sa disponibilité commerciale, son important déplacement de Stokes et sa facilité de manipulation comparativement à d'autres fluorophores aromatiques polycycliques hautement hydrophobes. Le PABA **49** a été introduit sur le substrat de la PGA par réaction avec le chlorure de phénylacétyl **48** pour fournir l'alcool **50** avec un rendement de 78%. Celui-ci a été activé sous la forme de son dérivé mésylé **51** qui s'est avéré être d'une stabilité très modérée. Il a donc été mis en réaction rapidement avec la 7-hydroxycoumarine **52** en milieu basique,

permettant d'isoler la première sonde modèle **53** avec un rendement de 28%. Ce rendement modeste peut expliquer par la faible stabilité du dérivé mésylé **51** en milieu basique, ce qui redonne l'alcool **50**, et par la perte d'une partie du produit lors de la purification chromatographique. En effet, il a été nécessaire de purifier la réaction par CLHP semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée car la sonde **53** et la coumarine **52** en excès ont le même R_f en CCM et se sont avérés inséparables lors d'une purification par chromatographie sur gel de silice en phase normale. Le rendement de la réaction n'a pas été optimisé sur ce composé modèle (Schéma 2-30).

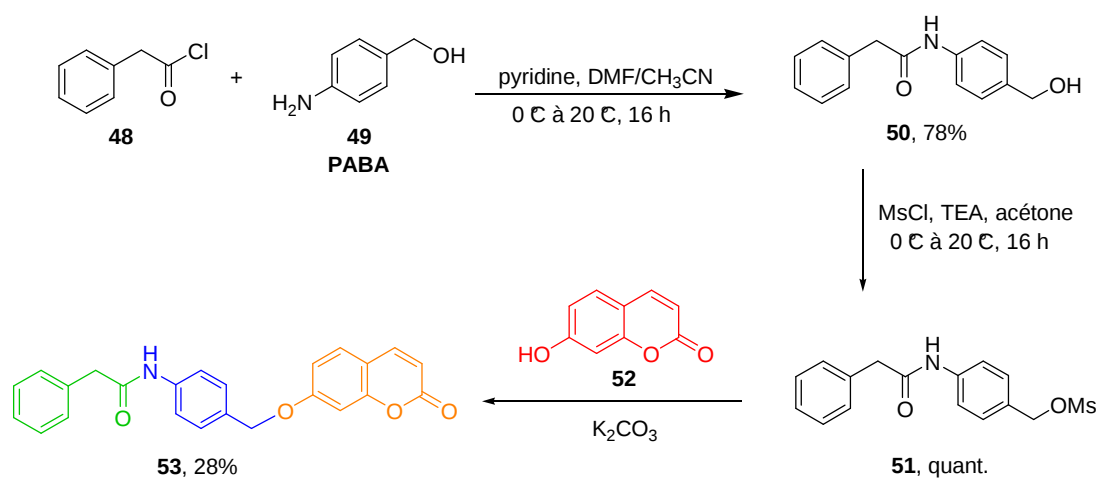


Schéma 2-30. Synthèse de la sonde pro-fluorescente **53**.

2. 1. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la PGA

Une fois la sonde synthétisée, différents paramètres ont été vérifiés afin de valider la pertinence de notre approche. En effet, il fallait : 1) vérifier que la sonde était bien pro-fluorescente, c'est-à-dire qu'il existe une différence significative entre les propriétés de fluorescence de la sonde et celles du fluorophore libre ; 2) que si la sonde émettait de la lumière, son émission subisse un effet hypsochrome (« blue shift ») par rapport au fluorophore libre, ce qui est généralement le cas avec les 7-hydroxycoumarines mais pas avec tous les pro-fluorophores à phénol ; 3) que la sonde soit efficacement clivée par la peptidase ; 4) que la sonde soit soluble et stable en milieu aqueux.

Tout d'abord, la sonde **53** a été dissoute dans un mélange PB/acétone (8:2, v/v) car celle-ci n'est pas totalement soluble dans l'eau. Cela ne présente pas de problème pour la réaction enzymatique dans la mesure où une PGA immobilisée sur support de type Eupergit[®] qui tolère une quantité modérée de solvant organique a été utilisée. Les intensités d'émission de

fluorescence de la sonde **53** et de la 7-hydroxycoumarine **52** à la même concentration ont été comparée (Figure 2-6).

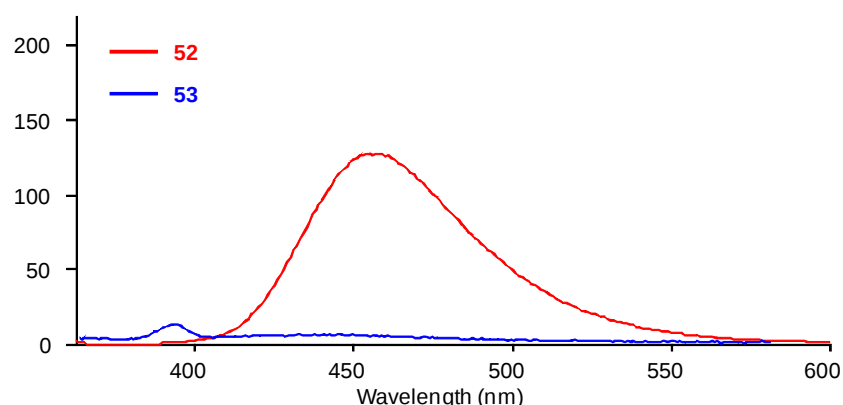


Figure 2-6. Comparaison des intensités d'émission de fluorescence de **52** et **53** (2.6 μ M, $\lambda_{\text{Ex.}}$ = 350 nm) dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 25 °C) et d'acétone.

Comme attendu, une très faible émission de fluorescence a pu être observée pour la sonde **53** et le maximum se situe en deçà de 400 nm (donc avec un effet hypsochrome), démontrant le caractère pro-fluorescent de ce dérivé de 7-hydroxycoumarine. Dans les mêmes conditions, la PGA supportée a été ajoutée et une augmentation significative de la fluorescence a été observée. Lors de l'incubation de la sonde **53** sans enzyme (expérience contrôle), aucune augmentation de fluorescence ne s'est produite. L'ensemble de ces résultats démontre que le pro-fluorophore **53** est un bon substrat de la PGA et prouve que la connexion du fluorophore sur le linker *via* une liaison éther est pertinente pour obtenir des sondes pro-fluorescentes stables en milieu aqueux (Figure 2-7).

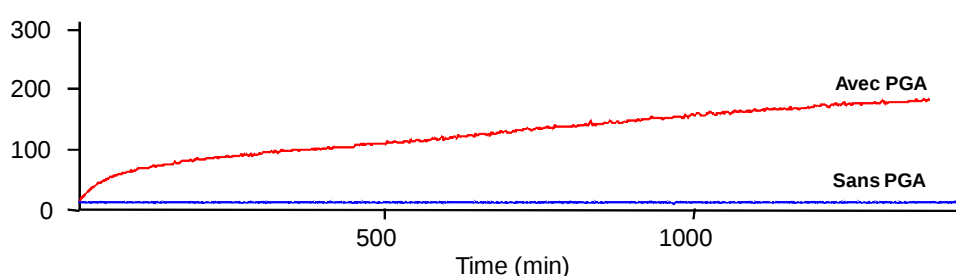


Figure 2-7. Cinétique de clivage de la sonde **53** (2.6 μ M) dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 37 °C) et d'acétone ($\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 360/460 nm) : en présence de PGA supportée (6.4 U, courbe rouge) et sans enzyme (courbe bleue).

Afin de confirmer l'identité de l'espèce libérée dans le milieu et évaluer l'efficacité du clivage enzymatique, une cinétique de clivage a été effectuée sur une échelle plus grande (échelle du millimolaire) et a ainsi pu être suivie par CLHP analytique en enregistrant le spectre en mode

« maxplot », c'est à dire que chaque espèce est détectée à son maximum d'absorption (Figure 2-8).

Au temps initial, l'analyse CLHP du milieu montre le pic de la sonde **53** à $t_R = 29.3$ min. Après 5 h de réaction à 37 °C, la formation d'un deuxième pic à 15.6 min a été observée. Le produit formé a été identifié comme étant la 7-hydroxycoumarine **52** par comparaison avec un échantillon de référence. Cependant, il restait encore de la sonde **53** comme l'attestait le pic à 29.3 min ainsi que des produits secondaires comportant le motif coumarine (présentant une absorption UV à 320 nm) qui peuvent correspondre à des intermédiaires de coupure. Après 24 h la réaction est terminée et seule la 7-hydroxycoumarine **52** est détectée.

Ainsi, à ce stade de notre étude, nous avons validé un moyen d'obtenir des sondes pro-fluorescentes stables grâce à l'introduction d'un fluorophore phénolique sur le linker *via* une liaison éther. Nous avons donc cherché à étendre nos sondes à des fluorophores émettant dans le rouge afin de pouvoir envisager l'utilisation de ces sondes *in vivo*.

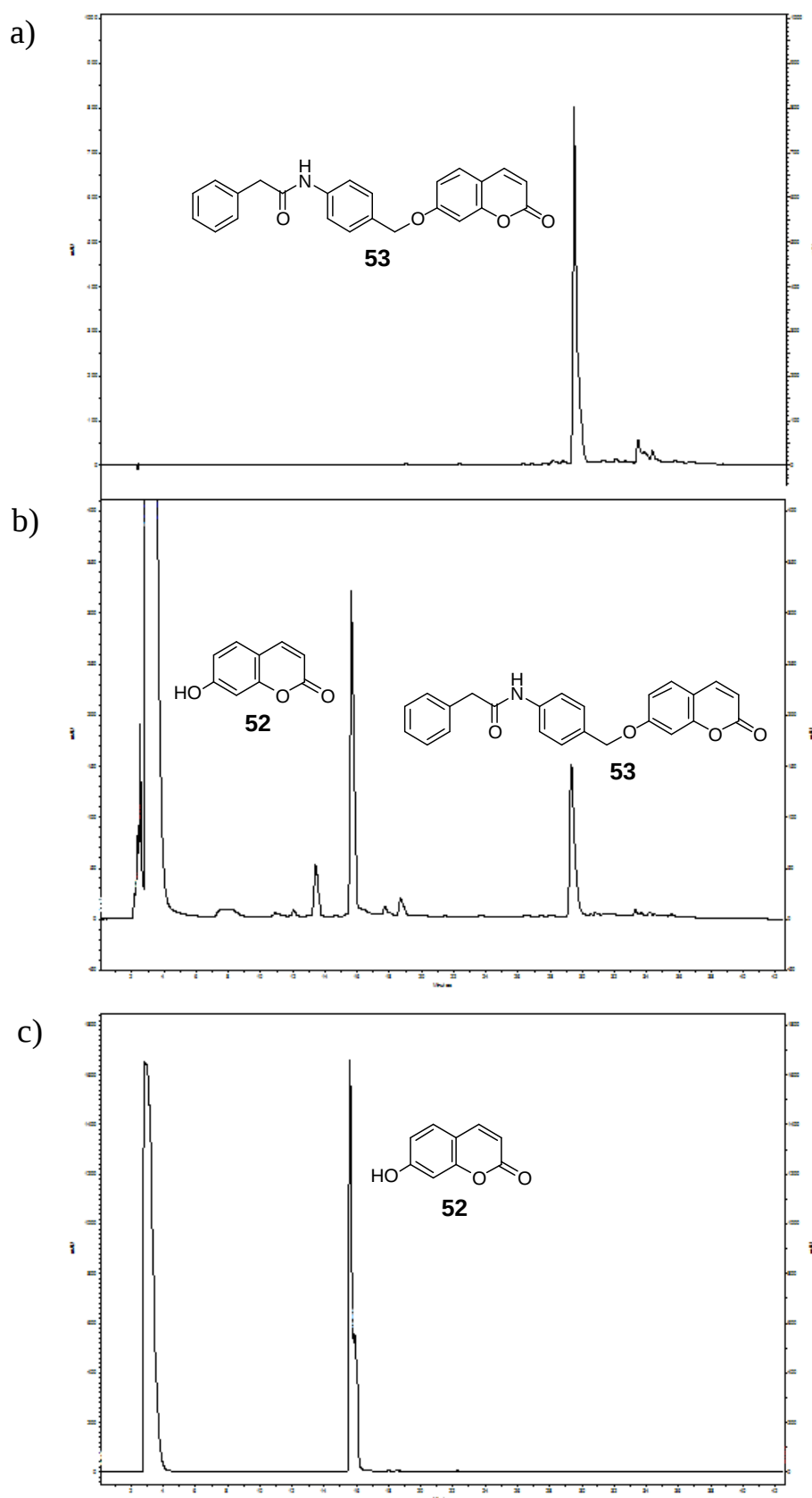


Figure 2-8. Cinétique de clivage (détection « maxplot ») de la sonde **53** (1.65 μ M) dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 37 ° C) et d'acétone en présence de PGA supportée (16.7 U) : a) au temps initial ; b) après 5 h ; c) après 24 h.

2. 2 Extension aux fluorophores émettant dans le rouge

2. 2. 1 Synthèse

Plusieurs fluorophores décrits dans la littérature ont été successivement utilisés pour des raisons qui seront détaillées dans la section 2. 2. 2. Tout d'abord, une BPO possédant une fonction phénol et synthétisée selon une procédure déjà décrite a été introduite sur le bras réactif.²¹⁸ Ce fluorophore était prometteur dans la mesure où des dérivés hydrosolubles ont récemment été synthétisés par le groupe de K. Burgess.²¹⁹ Il fallait toutefois vérifier si la substitution du phénol pouvait changer les caractéristiques spectrales du fluorophore. Parallèlement, l'utilisation de DDAO **46** et de son analogue non halogéné DAO **46'** a été envisagée car la substitution de leur phénol avait déjà montré une bonne capacité à modifier leur fluorescence. Ainsi, la même stratégie de synthèse que celle développée pour la synthèse de **53** a été suivie pour la préparation de sondes portant des fluorophores émettant autour de 650 nm (Schéma 2-31).

Les différentes sondes **54-56** ont été obtenues avec des rendements assez modestes (5-14%) pour les mêmes raisons que celles mentionnées précédemment auxquelles s'ajoute la faible réactivité des fluorophores utilisés. En effet, il semble que la fonction phénol des dérivés benzophénoxazine et acridinone présente une faible nucléophilie du fait d'une délocalisation du doublet électronique de l'atome d'oxygène étendue à deux ou trois cycles aromatiques.

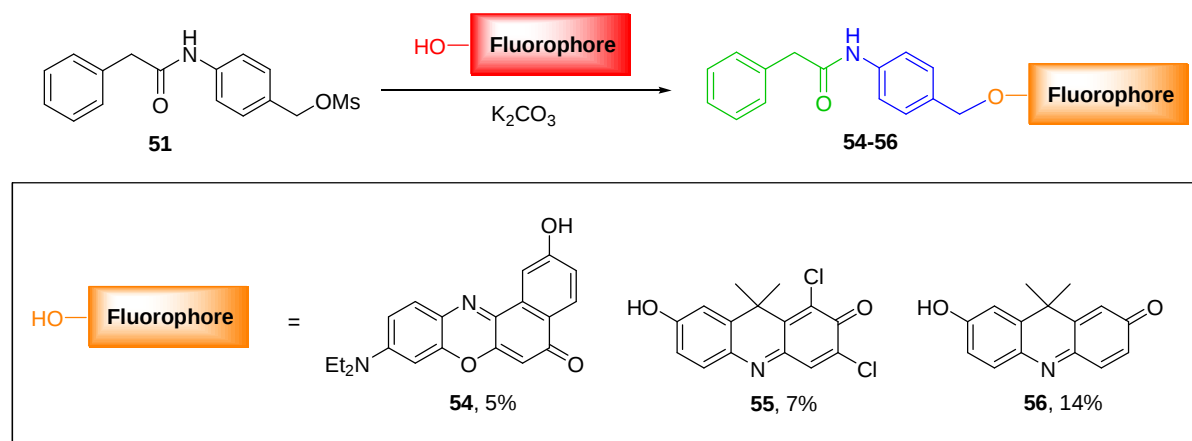


Schéma 2-31. Synthèse des sondes pro-fluorescentes **54**, **55** et **56** portant un fluorophore émettant dans le rouge.

²¹⁸ Briggs, M. S. J.; Bruce, I.; Miller, J. N.; Moody, C. J.; Simmonds, A. C.; Swann, E. J. *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1051-1058.

²¹⁹ Jose, J.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7835-7839.

2. 2. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la PGA

La sonde **54** est très peu soluble dans l'eau, ses caractéristiques de fluorescence ont donc tout d'abord été évaluées dans l'acétonitrile. La fluorescence de la sonde **54** a été comparée à celle du fluorophore libre à la même concentration et aucune diminution de fluorescence n'a été observée. Parallèlement, la même expérience dans un mélange PB/acétone (8:2, v/v) montre une diminution modeste de l'intensité de fluorescence (divisée par un facteur deux), et l'effet hypsochrome attendu n'a pas été observé. La sonde émet donc une quantité non négligeable de lumière à la même longueur d'onde que le fluorophore libre, ce qui diminue très fortement la sensibilité de détection des sondes potentielles.

Un résultat analogue a déjà été reporté par M. S. J. Briggs *et al.* sur d'autres systèmes,²¹⁸ ce qui nous a conforté dans notre choix d'utiliser DDAO (ou ses dérivés) qui est un des seuls pro-fluorophores phénoliques actuellement disponibles émettant dans le rouge. Les autres possibilités sont la naphthofluorescéine²²⁰ dont la fluorescence n'est intéressante qu'en milieu basique ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 595/660 \text{ nm}$, $\epsilon (595 \text{ nm}) = 44\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi_{\text{F}} (\text{pH } 9.5) = 0.14$) et la résorufine ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 571/585 \text{ nm}$, $\epsilon (571 \text{ nm}) = 62\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\Phi_{\text{F}} (\text{pH } 9.5) = 0.74$) qui émet à des longueurs d'onde un peu courtes pour des applications *in vivo* et possède en outre des inconvénients que nous détaillerons ultérieurement.

La sonde **55** est elle aussi peu soluble dans l'eau, elle a donc été dissoute dans le DMF puis diluée dans des tampons aqueux. En particulier, lorsque **55** est diluée dans un mélange PB/acétone (8:2, v/v), un surprenant changement de couleur a été observé puisque la solution a viré du jaune au bleu. Sachant que le bleu est la couleur de DDAO libre **46** en milieu aqueux (la couleur bleue est due à la formation du phénolate de DDAO), une instabilité de la sonde qui se manifesterait par une libération progressive de DDAO **46** en milieu aqueux a été suspectée. Afin de vérifier cette hypothèse, une cinétique de stabilité (i.e., mesure de l'intensité de fluorescence à $\lambda = 652 \text{ nm}$ en fonction du temps) de **55** en absence de PGA a été effectuée. Une augmentation progressive de l'émission de fluorescence à 652 nm a été observée ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 638/652 \text{ nm}$), confirmant l'instabilité de la sonde **55** en milieu aqueux (Figure 2-9).

²²⁰ Pour des exemples d'utilisation, voir Sarpara, G. H.; Hu, S. J.; Palmer, D. A.; French, M. T.; Evans, M.; Miller, J. N. *Anal. Commun.* **1999**, 36, 19-20. Xu, K.; Tang, B.; Huang, H.; Yang, G.; Chen, Z.; Li, P.; An, L. *Chem. Commun.* **2005**, 5974-5976. Xu, K.; Liu, X.; Tang, B. *ChemBioChem* **2007**, 8, 453-458.

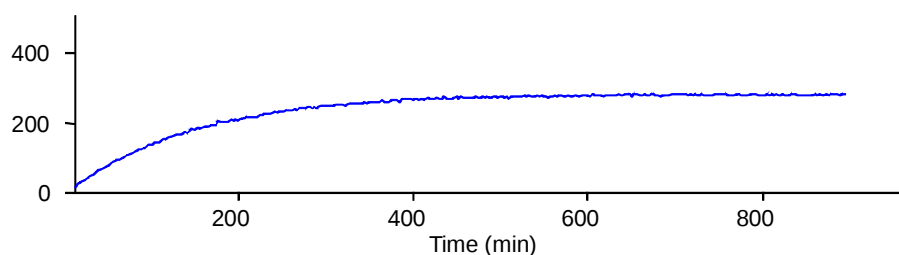


Figure 2-9. Test de contrôle de la stabilité de la sonde **55** dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 37 °C) et d'acétone ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 638/652 \text{ nm}$).

Cependant, un point encourageant est qu'avant sa décomposition, la sonde n'émettait pas de lumière : une sonde pro-fluorescente avait donc bien été obtenue. Cette instabilité était tout de même surprenante dans la mesure où des travaux antérieurs avaient reporté l'utilisation de DDAO **46** comme marqueur pro-fluorescent. Dans les sondes pro-fluorescentes décrites, le phénol était lié au site de reconnaissance (de l'enzyme ciblé) *via* un lien *a priori* plus instable qu'un éther de PABA (i.e., lien éther avec la fonction alcool anomérique de β -galactopyrannose ou lien ester d'acide polyphosphorique) et il n'avait pas été fait mention de problèmes liés à l'hydrolyse non spécifique de ces sondes (Figure 2-10).^{215,221}

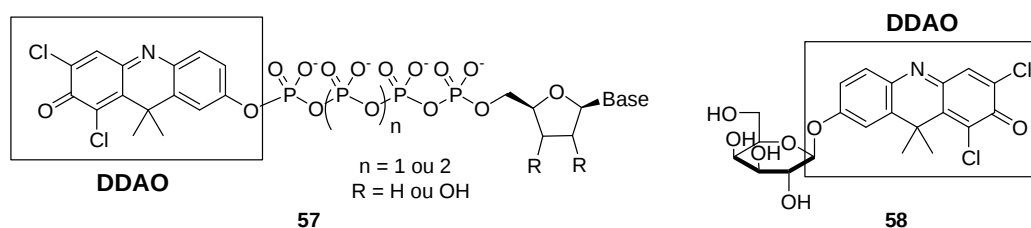


Figure 2-10. Exemples de sondes **57** et **58** précédemment décrites et utilisant le fluorophore DDAO **46**.

Toutefois, il a été supposé que l'instabilité de la sonde pouvait être due à la présence des deux atomes de chlore sur la structure du fluorophore. En effet, ceux-ci sont électro-attracteurs et amplifient son bon caractère nucléofuge, ce qui fragiliserait la sonde. Afin de vérifier cette hypothèse, l'utilisation de DAO **46'**, pour lequel les deux atomes de chlore ont été retirés, a été envisagée.²¹⁶ La sonde **56** ainsi obtenue a été diluée dans le mélange PB/acétone (8:2, v/v) et aucun changement de couleur n'a été observé, préfigurant un gain en stabilité de la sonde. Les spectres d'émission de fluorescence de la sonde **56** et de DAO **46'** ont été comparés à la même concentration et un effet hypsochrome ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 458/600 \text{ nm}$) ainsi qu'une diminution

²²¹ Sood, A.; Kumar, S.; Nampalli, S.; Nelson, J. R.; Macklin, J.; Fuller, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2394-2395.

d'un facteur 8.5 par rapport à la fluorescence de DAO libre **46'** ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 638/652 \text{ nm}$) ont été observés (Figure 2-11).

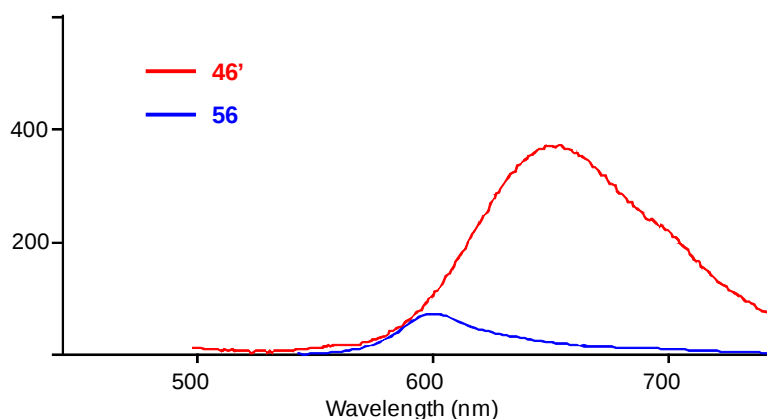


Figure 2-11. Comparaison de l'intensité d'émission de fluorescence de **56** et **46'** (2.2 μM , $\lambda_{\text{Ex.}} = 458 \text{ nm}$ pour **56**, $\lambda_{\text{Ex.}} = 638 \text{ nm}$ pour **46'**, dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 25 °C) et d'acétone.

L'ajout de PGA supportée dans le milieu a permis d'observer une augmentation progressive de l'émission de fluorescence à 652 nm ($\lambda_{\text{Ex.}} = 638 \text{ nm}$), démontrant le clivage de la sonde par l'enzyme. Parallèlement, aucune augmentation n'a été observée lors d'une cinétique réalisée en absence de PGA, ce qui confirme la stabilité de la sonde **56** en milieu aqueux (Figure 2-12).

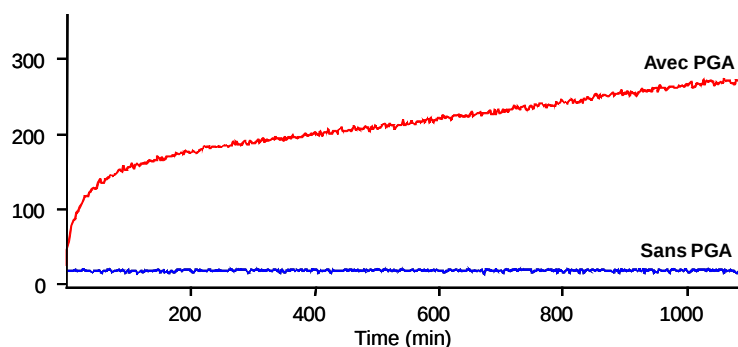


Figure 2-12. Cinétique de clivage de la sonde **56** (2.2 μM) dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4) et d'acétone ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 638/652 \text{ nm}$) : en présence de PGA supportée (6.4 U, 37 °C, courbe rouge) ; b) sans enzyme (courbe bleue).

De la même manière que pour **53**, un test de clivage à une plus grande concentration a permis d'identifier que l'espèce libérée dans le milieu est bien le DAO **46'**. Le clivage est extrêmement lent (réaction seulement amorcée après quinze jours de réaction) dans les mêmes conditions que pour **53**. Cependant, une nette amélioration dans la cinétique de clivage a été observée (réaction terminée après sept jours) grâce à l'ajout d'un large excès de 2,6-di-O-

méthyl- β -cyclodextrine dans le milieu car celle-ci permet une meilleure solubilisation de la sonde **56** dans le mélange PB/acétone (Figure 2-13).

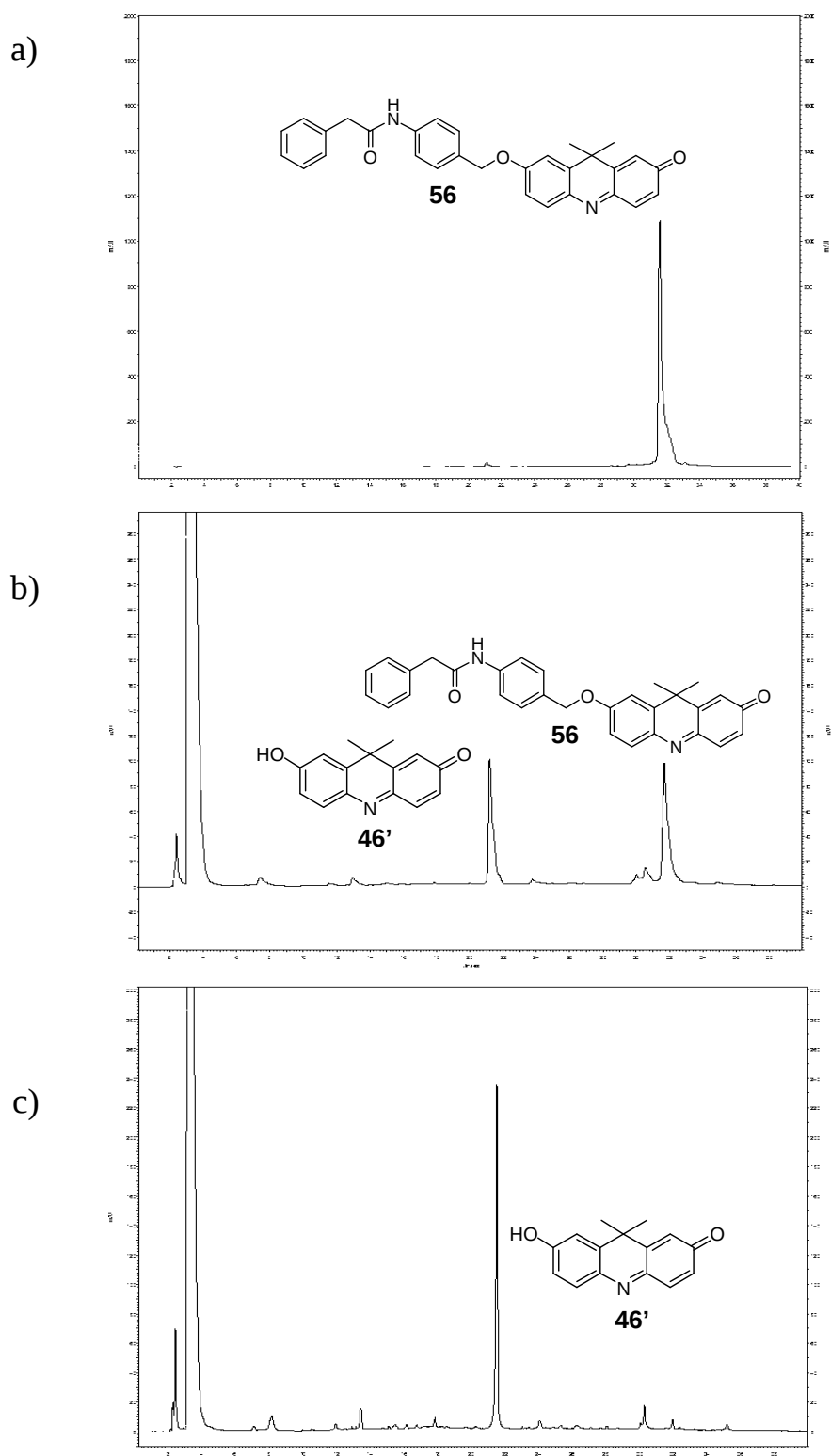


Figure 2-13. Cinétique de clivage (détection « maxplot ») de la sonde **56** (1.2 μ M) dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (50 mM, pH 7.4, 37 °C) et d'acétone en présence de PGA supportée (15 U) et de 2,6-di-O-méthyl- β -cyclodextrine (14 éq.) : a) au temps initial ; b) après 72 h ; c) après 7 jours.

Les propriétés des différentes sondes synthétisées sont résumées dans le tableau 2-1. Elles ont permis de valider l'utilisation du linker PABA pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes stables grâce à une liaison éther entre le fluorophore et le linker. De plus, nous avons identifié que DAO **46'** était un bon candidat pour être utilisé comme pro-fluorophore pour des sondes utilisables *in vivo*. Ainsi, grâce aux renseignements obtenus avec cette enzyme modèle, il nous a été possible d'étendre cette approche à la caspase-3.

Composé	PGA pro-fluorophore ^a			Fluorophore libre ^a	
	Excitation (nm)	Emission (nm)	Intensité de fluorescence ^b	Excitation (nm)	Emission (nm)
53	275	nonfl	nonfl	360	460
54	530	652	Réduction par 2	582	655
55	- ^c	- ^c	- ^c	636	652
56	458	599	Réduction par 8.5	638	652

^aLes propriétés spectrales ont été déterminées dans un mélange 8:2 (v/v) de tampon phosphate (PB, 50 mM, pH 7.4) et d'acétone à 25 °C. ^bCalculée en faisant le rapport d'intensité du maximum de fluorescence entre le pro-fluorophore et le fluorophore libre à la même concentration et excités à leur maximum d'absorption. ^c55 s'est montré instable dans le mélange PB/acétone.

Tableau 2-1. Récapitulatif des caractéristiques de fluorescence des sondes pro-fluorescentes **53-56** et du fluorophore libre correspondant.

3 Utilisation du PABA pour la détection de la caspase-3

3. 1 Introduction de la 7-hydroxycoumarine

3. 1. 1 Synthèse

Dans le but de valider notre approche pour la détection de la caspase-3, la 7-hydroxycoumarine **52** a tout d'abord été introduite sur le linker PABA. La sonde obtenue n'avait pas pour but d'effectuer de l'imagerie *in vivo* puisque la 7-hydroxycoumarine **52** émet dans le bleu. Cependant, cette synthèse a permis de mettre au point les conditions expérimentales pour l'introduction de différents fluorophores sur le bras réactif.

Ainsi, en utilisant le térapeptide **36** précédemment synthétisé (Schéma 2-24), l'introduction du PABA a été effectuée en présence d'un agent de couplage (Schéma 2-32). De la même manière qu'avec le linker de H. Waldmann *et al.*, deux produits **59** et **60** dont les temps de rétention CLHP sont très proches ont été isolés. A la vue des analyses spectroscopiques de ces

deux produits (spectres de masse identiques et signaux ^1H RMN très voisins), il est probable que le deuxième produit soit un diastéréoisomère issu de la même réaction secondaire que celle décrite sur le schéma 2-26 b).

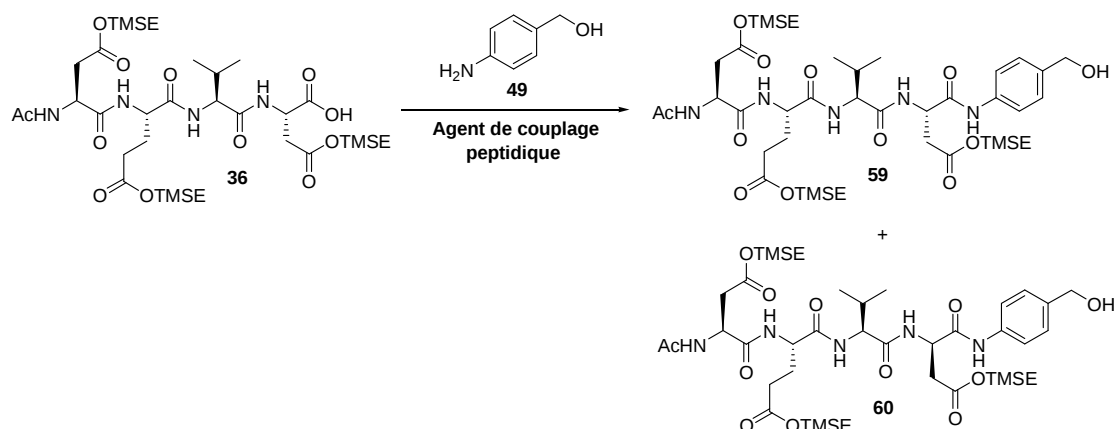


Schéma 2-32. Introduction du linker PABA **49** sur le térapeptide **36**.

Afin de minimiser la formation de ce second diastéréoisomère, une mise au point de conditions peu ou pas racémisantes de cette réaction de couplage a été effectuée. Un aperçu des conditions testées est résumé dans le tableau 2-2 et permet de mettre en évidence les paramètres importants de ce couplage.

La présence de base a un effet très important puisqu'un taux important d'épimérisation a été observé en présence de DIEA dans le milieu (entrées 1-3). Il est donc nécessaire d'effectuer la réaction avec un agent de couplage qui ne nécessite pas de base. Pour cela, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) s'est avéré être un bon candidat puisqu'il permet d'effectuer le couplage avec un rapport **59/60** amélioré (75/25, entrée 3) et a en plus l'avantage de former comme produit secondaire une urée hydrosoluble, ce qui facilite le traitement de la réaction. Afin d'améliorer la vitesse de réaction, l'ajout de *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt) a été effectué (entrée 4) et il est intéressant de noter que sa présence n'a pas d'influence sur le rapport diastéréoisomérique (entrées 3 et 4) contrairement à ce qui est généralement observé avec les couplages peptidiques classiques. L'ajout de l'agent de couplage à 0 °C suivi d'une remontée progressive à température ambiante permet d'améliorer le rapport **59/60** et d'atteindre un rapport 90/10 intéressant et un bon rendement total de 86% (entrées 3 et 5). Enfin, les mêmes conditions appliquées avec la *N*-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine (EEDQ) qui avait été décrit (sans problème

particulier noté par les auteurs) sur un couplage similaire entre le PABA et une lysine n'a pas permis d'améliorer le rapport diastéréoisomérique (entrée 6).²²²

Entrée	T (°C)	Base	HOBt	Solvant	Agent de couplage	59/60
1	20 °C	DIEA (2 éq.)	Non	DMF	EDC	55/45
2	20 °C	DIEA (3 éq.)	Non	DMF	BOP	66/34
3	20 °C	Non	Non	DMF	EDC	75/25
4	20 °C	Non	1 éq.	DMF	EDC	75/25
5	0 °C → 20 °C	Non	Non	DMF	EDC	90/10
6	0 °C → 20 °C	Non	Non	DMF	EEDQ	80/20

Tableau 2-2. Mise au point des conditions de couplage du PABA **49** sur le tétrapeptide **36**.

Une analyse CLHP dans les conditions optimisées de la réaction est représentée sur la figure 2-14 où l'on peut observer un deuxième pic correspondant au sous produit issu de la réaction d'épimérisation.

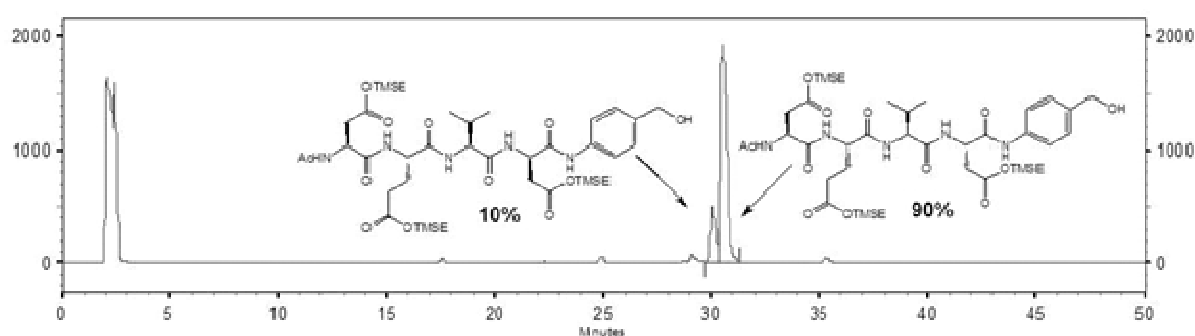


Figure 2-14. Analyse CLHP du brut de réaction de couplage entre le tétrapeptide **36** et le PABA **49**.

Il est intéressant d'examiner les raisons qui conduisent à cette épimérisation. Dans le cas du linker de H. Waldmann *et al.*, il avait été supposé que la formation du cycle à cinq chaînons conduisant à l'épimérisation était due à la pré-activation sous la forme d'ester de NHS qui se réarrangeait en l'absence de nucléophile dans le milieu. En revanche, dans le cas du PABA, le nucléophile est présent dans le milieu dès le début de la réaction. Cependant, celui-ci est un dérivé d'aniline dont le doublet de l'azote est peu disponible, il réagit donc plus lentement qu'une amine classique. Cette moins bonne réactivité laisse donc le temps au réarrangement de s'effectuer et d'éroder la pureté diastéréoisomérique, voire de conduire à une complète épimérisation de l'acide aspartique C-terminal. Cette explication est confortée par le fait que

²²² Jeffrey, S. C.; Torgov, M. Y.; Andreyka, J. B.; Boddington, L.; Cervený, C. G.; Denny, W. A.; Gordon, K. A.; Gustin, D.; Haugen, J.; Kline, T.; Nguyen, M. T.; Senter, P. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1344-1358.

la présence d'une base dans le milieu conduit à une augmentation de l'épimérisation, comme l'indique le mécanisme du schéma 2-26 b).

De manière intéressante, une publication récente a rapporté des difficultés de couplage peptidique similaires entre des substrats de caspases (3 ou 8) et une autre aniline, l'AMC.²²³ Les auteurs ont décrit des résultats très proches des nôtres en présence de base (55/45) et ont optimisé les conditions de réaction jusqu'à atteindre seulement 3% d'épimérisation. Cependant, le fait qu'ils utilisent l'hexafluorophosphate de 2-(7-aza-1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium (HATU) systématiquement avec une base a rendu leur optimisation difficile alors que nos conditions sans base permettent d'atteindre plus facilement un ratio intéressant en faveur du produit désiré.

Ainsi, nous avons décidé de continuer la synthèse avec les 90% de produit majoritaire en supposant que celui-ci était bien le produit désiré et en espérant pouvoir le séparer du produit minoritaire à l'étape suivante. L'identité du produit majoritaire pourra être confirmée par un test de clivage par la caspase-3 des produits déprotégés. Le produit d'épimérisation ne doit pas être clivé puisque le tétrapetide DEVd²²⁴ dont l'acide aspartique du côté C-terminal est de configuration D n'est pas substrat de la caspase-3.²²⁵

L'étape suivante dans la synthèse de la sonde consiste à activer l'alcool benzylique afin d'envisager sa substitution par la 7-hydroxycoumarine **52**. Plusieurs essais ont été effectués : l'introduction directe de la coumarine *via* des réactions de Mitsunobu dans des conditions classiques²²⁶ ou sous activation sonochimique²²⁷ ont seulement conduit à une récupération du l'alcool de départ **59**. D'un autre côté, l'activation de la position benzylique en utilisant une réaction de bromation avec CBr₄/PPh₃ ou une tosylation n'ont respectivement conduit qu'à une récupération du produit de départ et à une activation partielle (~ 50%) de l'alcool **59**. Toutefois, l'introduction d'un groupement mésyle a permis l'obtention du composé **61** de façon quantitative. A la lumière de ces résultats, on peut supposer que le repliement du

²²³ Reszka, P.; Methling, K.; Lalk, M.; Xiao, Z.; Weisz, K.; Bednarski, P. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 49-59.

²²⁴ L'acide aminé d, noté en minuscule, correspond à la configuration opposée de celle de l'acide aminé naturel.

²²⁵ Thornberry, N. A.; Ranon, T. A.; Pieterse, E. P.; Rasper, D. M.; Timkey, T.; GarciaCalvo, M.; Houtzager, V. M.; Nordstrom, P. A.; Roy, S.; Vaillancourt, J. P.; Chapman, K. T.; Nicholson, D. W. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17907-17911.

²²⁶ Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.

²²⁷ Pour la mise au point de conditions de Mitsunobu sous ultrasons avec la 7-hydroxycoumarine, voir Cravotto, G.; Balliano, G.; Tagliapietra, S.; Palmisano, G.; Penoni, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, 39, 917-924.

peptide sur lui-même est à l'origine de la faible accessibilité de la position benzylique, c'est pourquoi seulement un groupement mésyle de petite taille peut réagir avec l'alcool **59**.

Une fois la position benzylique du linker activée, la première étape clé de la synthèse a consisté en l'introduction de la 7-hydroxycoumarine sur le bras réactif. Celle-ci a été introduite en conditions basiques, conduisant au composé **62** avec un rendement de 25% sur deux étapes. Le rendement est modeste, notamment parce que les diastéréomères ont été séparés à cette étape par CLHP semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée.

La deuxième étape clé de la synthèse réside dans la déprotection des esters de TMSE puisqu'elle permet de valider l'utilisation de la liaison éther pour les sondes caspase-3. La mise en réaction de **62** en présence de TBAF conduit à la déprotection totale des esters de TMSE sans libération de 7-hydroxycoumarine **52**. Cependant, le produit obtenu après purification par CLHP s'est avéré contaminé par des sels de tétrabutylammonium et ce quelque soit la phase mobile (eau ultrapure déionisée ou TFA 0.1%/CH₃CN) utilisée. L'utilisation de TBAF supporté sur gel de silice supposé éviter ce problème a également conduit à l'obtention de la sonde **63** contaminé par ces sels. Toutefois, l'utilisation d'un large excès de CsF dans la NMP ou de fluorure de tétraméthylammonium (TMAF) a permis l'obtention de **63** de façon quantitative et avec une grande pureté (Schéma 2-33).

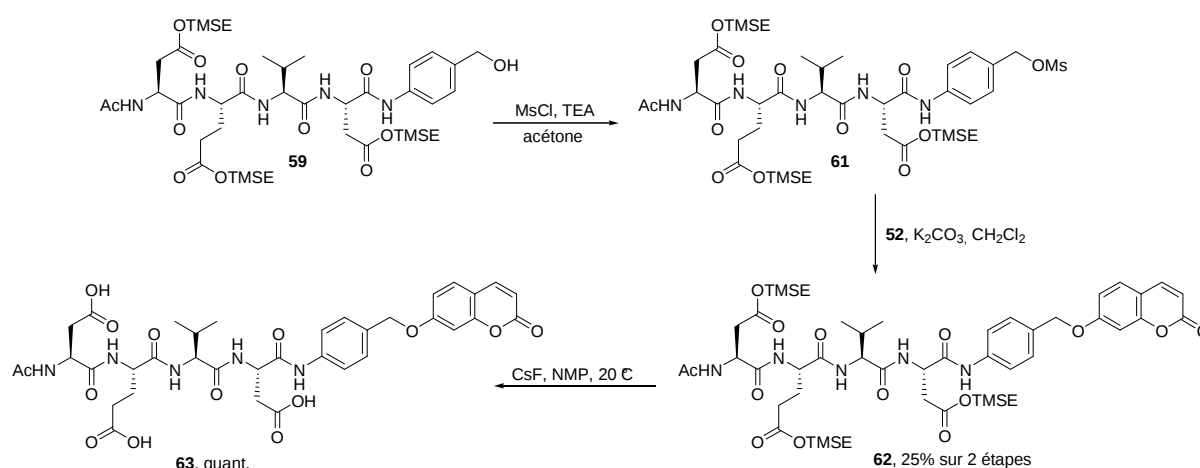


Schéma 2-33. Synthèse de la sonde pro-fluorescente **63**.

3. 1. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la caspase-3

Les caractéristiques de fluorescence de la sonde **63** ont ensuite été évaluées dans un tampon stabilisant de la caspase-3 (10% (m/v) sucrose, 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% (m/v) CHAPS, pH 7.4). Comme espéré, l'intensité maximum de fluorescence de la sonde est diminuée d'un facteur 10 par rapport à la 7-hydroxycoumarine **52** à la même concentration et subit de plus un effet hypsochrome de 63 nm (Figure 2-15).

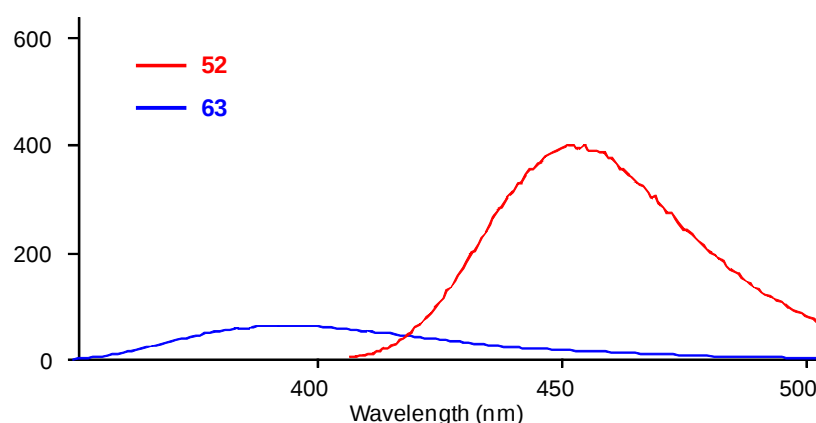


Figure 2-15. Comparaison de l'intensité d'émission de fluorescence de **63** et **52** (3 μ M, $\lambda_{\text{Ex.}}$ = 320 nm pour **63**, $\lambda_{\text{Ex.}}$ = 350 nm pour **52**) dans un tampon caspase-3 (pH 7.4, 37 °C).

Une augmentation nette de l'émission de fluorescence à 460 nm est observée lors de l'ajout de la caspase-3 dans le milieu tandis qu'aucune émission n'a pu être observée en absence d'enzyme. Le caractère pro-fluorescent de la sonde, sa stabilité en milieu physiologique sont donc vérifiés, ainsi que la confirmation que le produit majoritaire isolé lors de l'étape de couplage du linker PABA était bien l'isomère désiré (Figure 2-16).

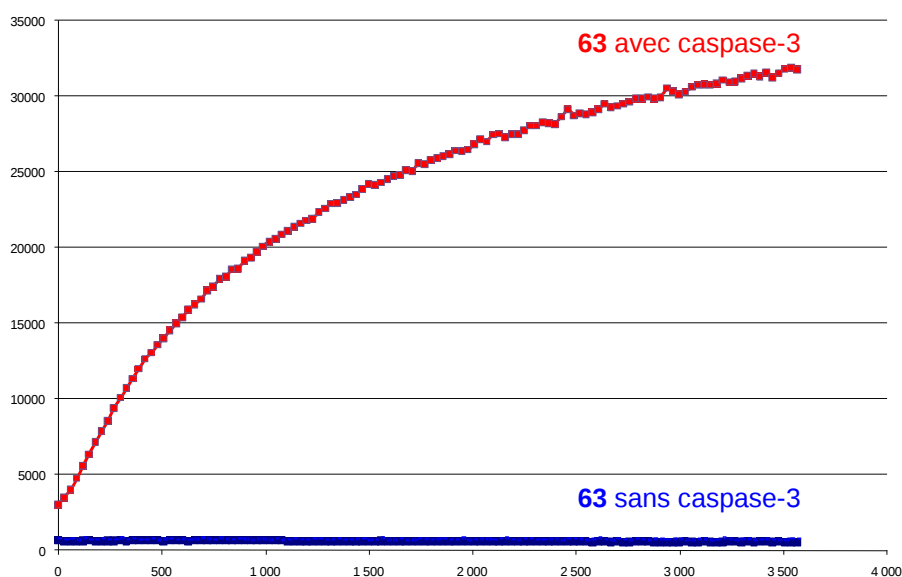


Figure 2-16. Cinétique de clivage de la sonde **63** (3 μM) dans un tampon caspase-3 ($\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 360/460 nm) en présence de caspase-3 (courbe rouge, 1 μL , $1.6 \cdot 10^{-3}$ U, 37 $^{\circ}\text{C}$) et sans enzyme (courbe bleue).

3. 1. 3 Détermination des paramètres de cinétique

Afin d'évaluer l'influence du bras réactif sur la coupure enzymatique, les paramètres de cinétique K_M , V_{max} et k_{cat} ont été déterminés à partir de cinétiques à différentes concentrations en sonde **63**. Puis, l'utilisation de la relation double inverse de Lineweaver-Burk a permis de déterminer les valeurs suivantes : $K_M = 65.7 \pm 12 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 5.6 \pm 1.0 \text{ s}^{-1}$ et $k_{\text{cat}}/K_M = 84\,850 \pm 5\,200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. La comparaison avec les valeurs de la sonde commerciale la plus utilisée Ac-DEVD-AMC $K_M = 9 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.75 \text{ s}^{-1}$ et $k_{\text{cat}}/K_M = 83\,300 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ montre que l'activité de deux sondes est comparable (k_{cat}/K_M voisins) bien que l'affinité de la sonde **63** pour l'enzyme soit plus faible (K_M inférieur).²²⁸ Cependant, cette moins bonne affinité est compensée par une vitesse de clivage bien supérieure (k_{cat} 7.5 fois supérieur). Ainsi, l'éloignement du fluorophore a permis d'améliorer très légèrement la vitesse de coupure enzymatique et il est raisonnable de penser que l'effet du bras réactif aurait été plus spectaculaire dans le cas de la détection d'une enzyme moins tolérante au niveau de l'environnement du substrat.

²²⁸ Moretti, A.; Weig, H.-J.; Ott, T.; Seyfarth, M.; Holthoff, H.-P.; Grewe, D.; Gillitzer, A.; Bott-Flugel, L.; Schomig, A.; Ungerer, M.; Laugwitz, K.-L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 11860-11865.

3. 2 Introduction de DAO

3. 2. 1 Synthèse

Afin d'étendre la sonde caspase-3 **63** à l'imagerie *in vivo*, l'introduction de DAO **46'** a été envisagée selon la même stratégie que précédemment à partir de l'espèce activée **61**. Comme pour la synthèse de la sonde PGA **56**, le DAO **46'** s'est avéré être moins réactif que la 7-hydroxycoumarine **52**. Un rendement modeste de 10% sur 2 étapes a ainsi été obtenu. La sonde *in vivo* désirée **65** a pu être isolée après déprotection des esters de TMSE en présence de CsF dans la NMP (Schéma 2-34). Afin d'obtenir une sonde **65** totalement soluble en milieu aqueux, un court traitement à l'ammoniaque aqueux (3%), permettant la conversion de ses fonctions acide carboxylique en sel d'ammonium, suivi d'une lyophilisation, ont été réalisés. Toutefois, dans ces conditions basiques, une faible quantité de DAO **46'** (évaluée à 10% par analyse CLHP) a été libérée, ce qui pouvait potentiellement perturber la caractérisation spectrale de la sonde.

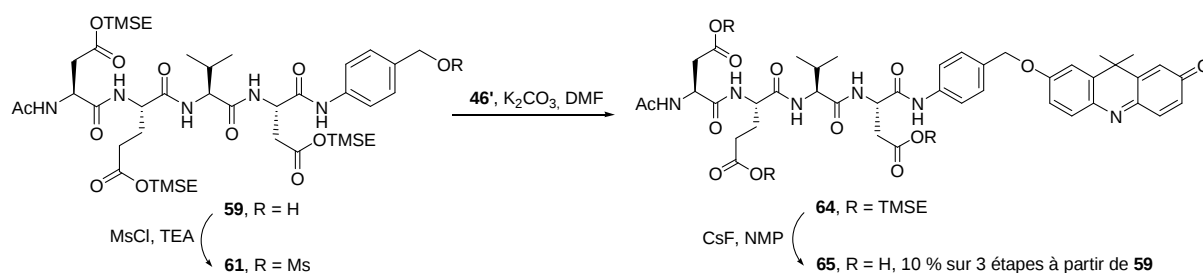


Schéma 2-34. Synthèse de la sonde pro-fluorescente **65**.

3. 2. 2 Evaluation des caractéristiques spectrales et clivage par la caspase-3

Le caractère pro-fluorescent de la sonde **65** a tout d'abord été vérifié. La figure 2-17 représente le spectre d'émission de la sonde **65** ($\lambda_{\text{Ex.}} = 460 \text{ nm}$). Une légère émission de fluorescence a été observée à 606 nm, montrant qu'un effet hypsochrome de 46 nm a bien lieu. La comparaison de ce niveau de fluorescence avec le DAO libre **46'** à la même concentration montre une réduction de l'intensité de fluorescence d'un facteur 12.0. La sonde **65** possède donc bien les caractéristiques de pro-fluorescence attendue. Un deuxième pic d'émission a été observé à 641 nm, cette faible fluorescence a été attribuée aux 10% de DAO libre **46'** contaminant notre lot de sonde.

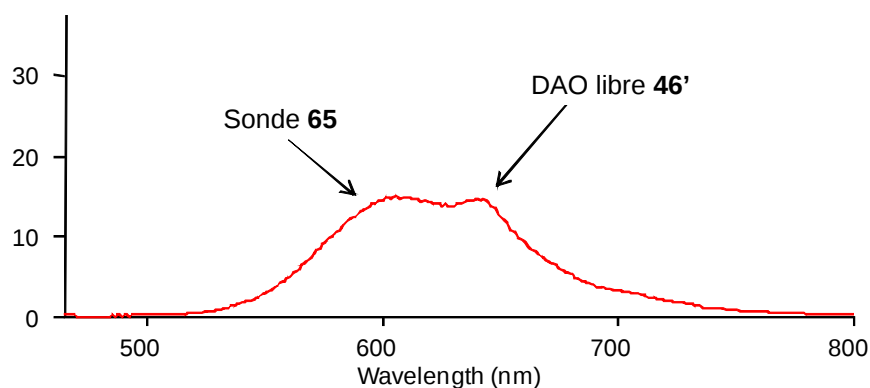


Figure 2-17. Spectre d'émission de fluorescence de **65** (23 μ M, $\lambda_{\text{Ex.}}$ = 460 nm) dans l'eau Milli-Q (pH 6.0, 37 $^{\circ}$ C).

La sonde a ensuite été dissoute dans un tampon caspase-3 et l'enzyme a été ajoutée dans le milieu. De façon surprenante, aucune augmentation de fluorescence n'a été observée. Au contraire, le niveau de fluorescence résiduel du DAO libre **46'** est passé de quelques unités de fluorescence à zéro. La même expérience réalisée dans l'eau Milli-Q a donné les mêmes résultats. Cependant, en laissant la réaction se dérouler sur une période plus longue, une apparition progressive de la fluorescence a été observée après environ 100 min (Figure 2-18). Ainsi, un clivage efficace de la sonde **65** par la caspase-3 a eu lieu mais l'observation du phénomène n'a pu être observée qu'avec un temps de latence important.

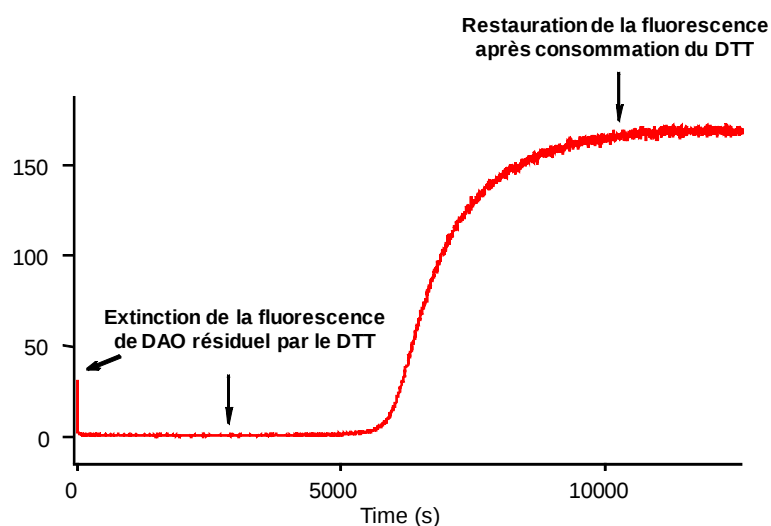


Figure 2-18. Cinétique de clivage de la sonde **65** (23 μ M) dans l'eau Milli-Q ($\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 638/652 nm) en présence de caspase-3 ($3.2 \cdot 10^{-3}$ U dans une solution aqueuse de glycérol contenant 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (m/v) glycérol et 0.1% (m/v) CHAPS, pH 7.4).

Il a été supposé que la fluorescence de DAO **46'** était éteinte au début de la réaction à cause d'un des constituants du tampon permettant la stabilisation de l'enzyme. Pour le confirmer, des expériences complémentaires ont été effectuées.

Ainsi, une cinétique a été réalisée avec uniquement la sonde **65** (dont la fluorescence résiduelle observée est due aux 10% de DAO en mélange avec la sonde) dans la cuve. Après quelques secondes, du DTT a été ajouté dans les mêmes proportions que celles utilisées lors de la cinétique de clivage impliquant la caspase-3 (excès de DTT d'un facteur 20), entraînant une extinction totale de l'émission de la sonde. Après un temps proche de la cinétique précédente, la fluorescence de DAO **46'** est restaurée, prouvant que l'espèce du milieu responsable de l'extinction de fluorescence était le DTT (Figure 2-19).

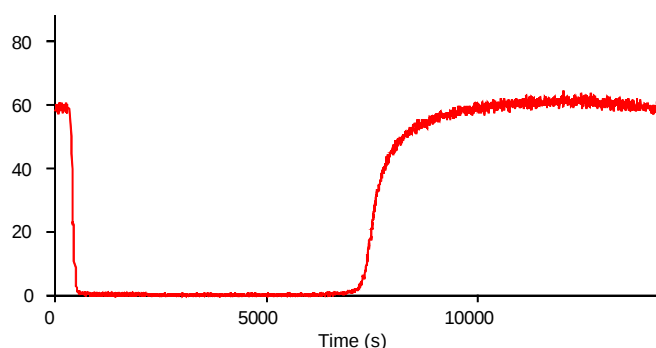


Figure 2-19. Démonstration du quenching de la fluorescence de DAO (concentration de la sonde 23 μM dans l'eau Milli-Q, $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 638/652 nm) par le DTT (440 μM).

La même expérience a été effectuée avec de la cystéine et divers thiols. Un effet analogue à celui du DTT a été montré avec la cystéine (Figure 2-20) tandis que le quenching est irréversible avec le β -mercaptoéthanol, le 1,2-éthanedithiol ou le thiophénol (Figures non présentées). De façon intéressante, aucun quenching n'a été montré avec d'autres espèces telles que l'éthanol ou l'azoture de sodium NaN_3 , montrant que seuls les dérivés soufrés sont capables de produire l'extinction de la fluorescence de DAO.

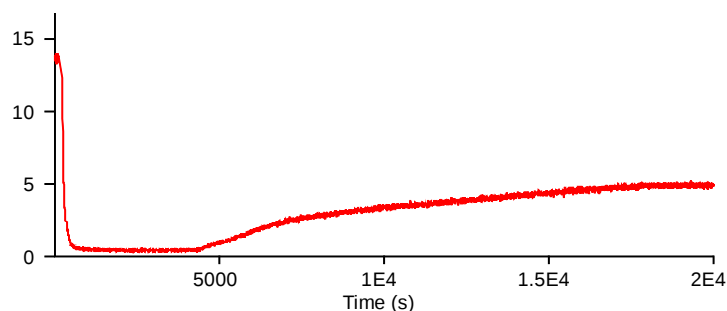


Figure 2-20. Quenching de la fluorescence de DAO (concentration de la sonde 23 μM dans l'eau Milli-Q, $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 638/ 652 nm) par la cystéine (440 μM).

La même expérience conduite cette fois avec le DDAO **46** et le DTT n'a conduit qu'à un quenching partiel de la fluorescence qui est lentement recouvré, ce qui semblerait expliquer pourquoi le groupe de R. Weissleder a réussi à obtenir quelques résultats en imagerie *in vivo* avec ce fluorophore (Figure 2-21).²¹⁵

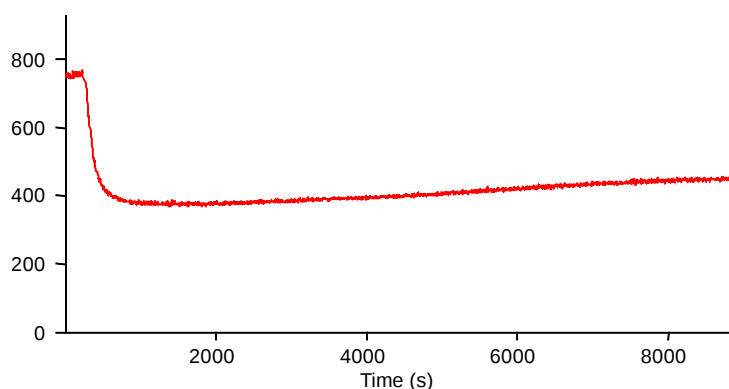


Figure 2-21. Quenching partiel de la fluorescence de DDAO (20 μ M dans l'eau Milli-Q, $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 638/652 nm) par le DTT (400 μ M).

Enfin, une dernière expérience a été effectuée suite à l'observation que l'ajout de DTT dans une solution de DAO conduisait à l'apparition d'une nouvelle espèce qui absorbait fortement à 270 nm. En excitant le milieu à 270 nm, une émission de fluorescence a été observée à 440 nm. La réaction du DTT avec le DAO **46'** conduit donc à la formation d'une nouvelle espèce qui émet à 440 nm. Une cinétique de la réaction a été effectuée afin de suivre l'évolution de l'émission de DAO **46'** et de cette nouvelle espèce fluorescente (Figure 2-22).

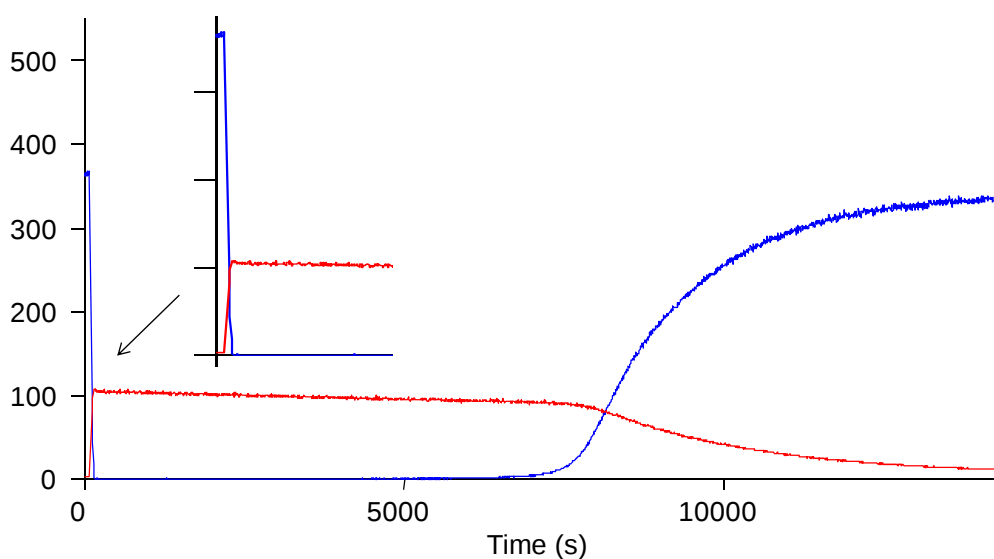


Figure 2-22. Observation de la formation d'un intermédiaire fluorescent lors de la réaction de DAO **46'** avec le DTT (courbe bleue : $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 638/652 nm ; courbe rouge : $\lambda_{\text{Ex./Em.}}$ = 270/440 nm).

La fluorescence de DAO **46'** diminue fortement au moment de l'ajout du DTT dans le milieu (courbe bleue) simultanément avec l'augmentation de l'intensité de fluorescence de la nouvelle espèce (courbe rouge). Puis, après un moment de stagnation des deux émissions, le phénomène inverse est observé, c'est-à-dire la restauration totale de l'émission de DAO **46'** et la disparition de l'émission de l'espèce intermédiaire.

Il est intéressant de noter qu'un désagrément similaire avait déjà été rapporté par T. M. Kitson pour des dérivés de la résorufine. En effet, des dérivés O-substitués de cette oxazinone sont capables de réagir avec des thiols aliphatiques (i.e., β -mercaptoéthanol) soit selon une réaction 1,4 sur le motif quinonimine, soit selon une réaction S_NAr du groupement hydroxyle par le groupement S-CH₂-CH₂-OH.²²⁹ Afin de proposer un mécanisme pouvant expliquer la disparition de fluorescence observée avec DAO, des expériences complémentaires de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont été effectuées afin d'identifier la ou les espèces formées au cours de la réaction. De façon intéressante, suite à l'ajout de DTT à la solution de DAO, le pic du DAO à $m/z = 240.11$ observé sur le spectre de masse a disparu au profit d'un pic à $m/z = 392.04$ qui peut être supposé comme étant un adduit covalent entre l'agent réducteur et le fluorophore. A la lumière des observations de T. M. Kitson et des expériences de fluorescence et de masse que nous avons réalisées, le mécanisme suivant est donc proposé dans le cas du DTT (Schéma 2-35) :

²²⁹ Kitson, T. M. *Bioorg. Chem.* **1998**, 26, 63-73.

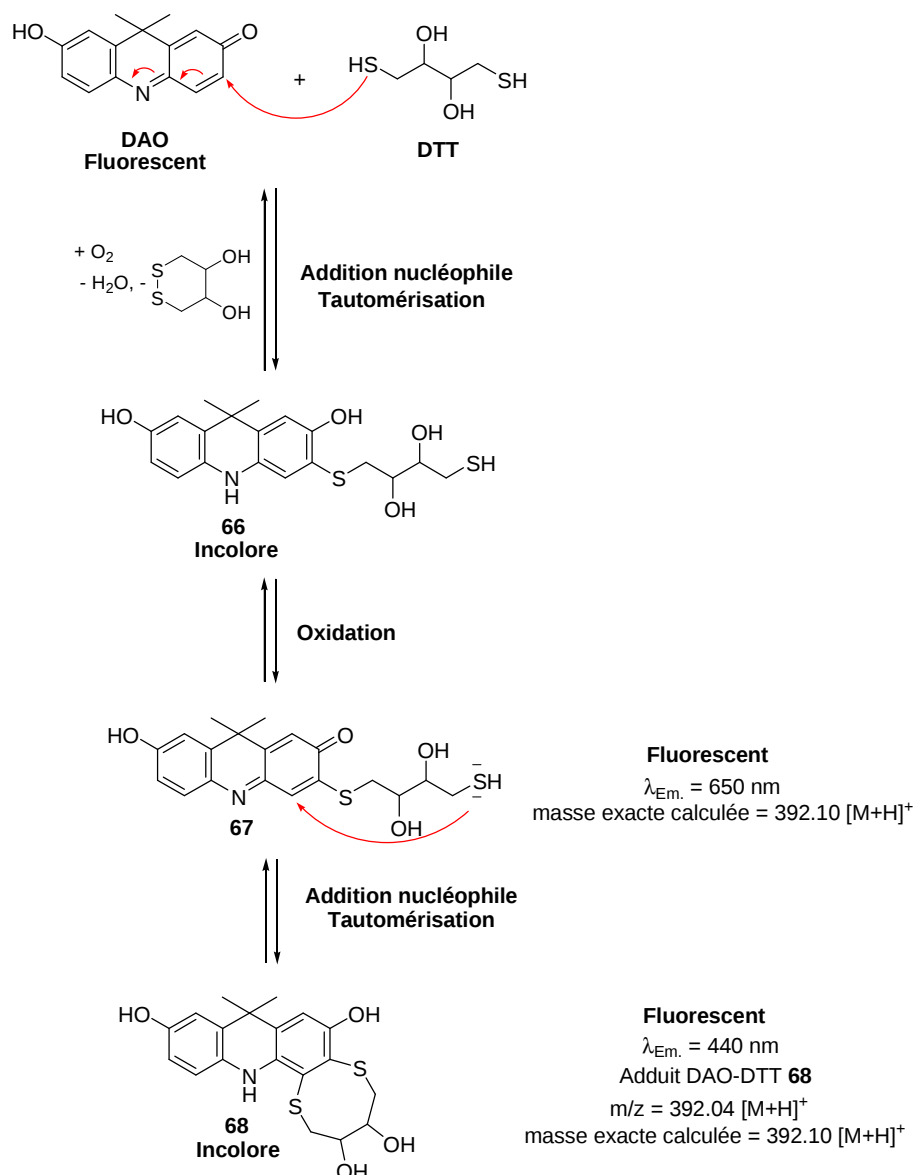


Schéma 2-35. Mécanisme proposé lors de la réaction du DAO **46'** avec les thiols (ici le DTT) du milieu.

Une des fonctions thiol du DTT s'additionnerait sur le motif quinonimine de DAO **46'** pour former l'adduit **66** incolore et non fluorescent à $\lambda = 652 \text{ nm}$, suivi d'une oxydation qui permettrait la formation du dérivé **67**. Cette espèce est aussi conjuguée que DAO **46'** et il est probable que celle-ci émette également de la lumière autour de 650 nm. L'ajout de DTT conduisant instantanément à un changement de couleur du bleu à l'incolore, il est donc probable qu'une cyclisation selon une addition 1,4 ait lieu très rapidement pour former le composé tétracyclique **68**. Cette entité *a priori* stable est moins conjuguée que DAO **46'** et constitue vraisemblablement l'espèce incolore émettant à 440 nm que nous avons observée au cours de nos expériences de fluorescence. Toutes ces réactions seraient équilibrées, la

restauration de la fluorescence de DAO **46'** pourrait être expliquée par l'oxydation progressive du DTT par l'oxygène de l'air dissous dans la solution aqueuse de fluorophore. L'équilibre des réactions dépendrait de l'espèce soufrée présente dans le milieu. Ainsi, en présence de dérivés soufrés aliphatiques, l'équilibre serait déplacé vers la formation d'espèces non fluorescentes de façon quasiment irréversible tandis qu'avec DDAO **46**, les réactions seraient équilibrées et conduiraient à une émission partielle de fluorescence. Dans le cas de la cystéine, l'oxydation moins favorable que celle du DTT pourrait expliquer pourquoi la restauration de la fluorescence n'est pas totale.

3.3 Conclusion

A ce stade de notre étude, nos efforts pour étendre dans le rouge l'émission de notre sonde caspase-3 avec l'utilisation de DAO **46'** ont été remis en question à cause des fluctuations de sa fluorescence en présence de thiols. En effet, supposant que les thiols intracellulaires (le glutathion mais aussi l'homocystéine et la cystéine) puissent avoir le même effet sur DAO **46'**, l'utilisation de la sonde **65** *in vivo* paraît problématique. Confirmant nos craintes, des essais d'utilisation de la sonde **65** en lysat cellulaire n'ont pas permis la détection de la fluorescence de cette acridinone alors que la même expérience avec la sonde **63** ou la sonde commerciale Apo-ONE[®] avaient permis la détection du clivage par la caspase-3. Nos résultats ainsi que ceux de la littérature semblent donc converger pour dire qu'il semble difficile d'envisager l'utilisation de dérivés oxazines ou acridinones comme marqueurs fluorescents en imagerie *in vivo*.

Ainsi, l'utilisation de DAO **46'** comme pro-fluorophore semblant compromise, il a fallu nous tourner vers d'autres structures pro-fluorescentes émettant dans le rouge. Cependant, à notre connaissance, il n'existait pas d'autres pro-fluorophores phénoliques pouvant être potentiellement introduits sur nos sondes. Nous avons donc décidé de développer de nouvelles classes de pro-fluorophores phénoliques en nous fixant un cahier des charges pouvant répondre complètement aux exigences de l'imagerie *in vivo* : 1) émission dans le proche IR ; 2) hydrosolubilité ; 3) forte brillance (estimée à $30\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ par O. S. Wolfbeis²³⁰ pour être utilisable en milieu biologique).

²³⁰ Wolfbeis, O. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2980-2982.

VI DEVELOPPEMENT DE PRO-FLUOROPHORES HYDROSOLUBLES EMETTANT DANS LE PROCHE IR

1 Stratégie

La stratégie la plus courante pour déplacer l'émission d'un fluorophore connu à de plus grandes longueurs d'ondes est d'étendre la conjugaison de son système π . Cependant, l'ajout d'insaturations et de cycles aromatiques entraîne souvent l'obtention de fluorophores très peu hydrosolubles et/ou peu stables (e.g., grande sensibilité au photoblanchiment de certains dérivés cyanine à longue chaîne polyméthène : Cy 7.0 et analogues²³¹). Il était donc nécessaire de trouver une stratégie pouvant concilier l'extension du système π et une bonne solubilité dans l'eau de la structure ciblée. Ainsi, le principe que nous avons voulu mettre en œuvre se basait sur trois points importants : 1) tout d'abord, nous avons envisagé d'utiliser une espèce phénolique dont la substitution de la fonction phénol est connue ou pressentie pour donner des dérivés ayant des caractéristiques de fluorescence modifiées (i.e., comportement de pro-fluorophore) ; 2) notre objectif était ensuite d'introduire la ou les insaturations par l'intermédiaire d'une condensation entre un aldéhyde et un carbanion issu d'un sel d'indolium ou de quinolinium par analogie avec la synthèse des dérivés cyanine bien maîtrisée au laboratoire ; 3) enfin, la solubilité dans l'eau et les tampons aqueux pouvait être obtenue si ces indoles ou quinoléines possédaient des groupements hydrosolubilisants (Schéma 2-36).

²³¹ Touthkine, A.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2775-2777.

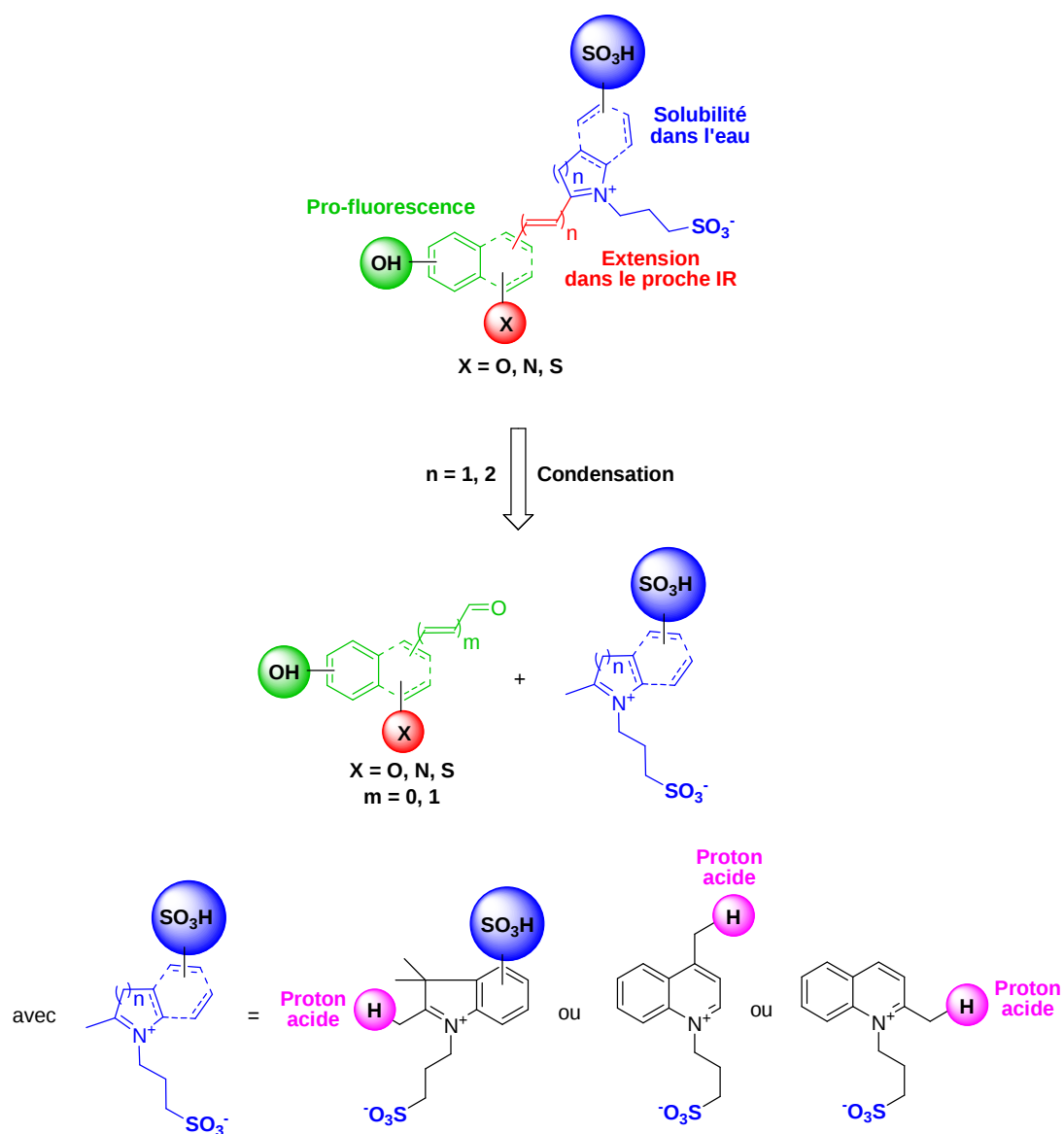


Schéma 2-36. Conception des pro-fluorophores hydrosolubles émettant dans le proche IR.

Ainsi, des expériences préliminaires ont été effectuées au laboratoire afin de développer cette nouvelle classe de pro-fluorophores. Malheureusement, les premiers efforts n'ont pas permis d'obtenir de structures fluorescentes (composés **69-72**, figure 2-23).

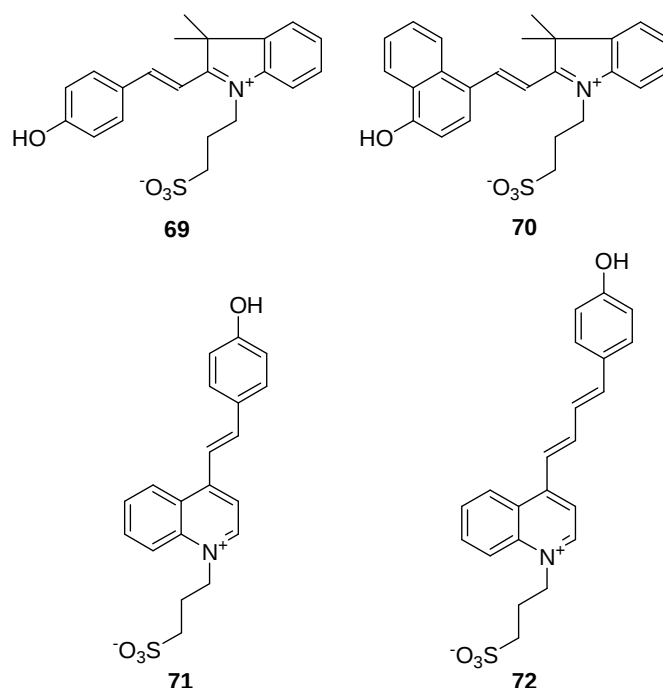


Figure 2-23. Essais préliminaires d'obtention de pro-fluorophores.

Toutefois, des fluorophores commercialisés par la société Dyomics GmbH²³² ont attiré notre attention car ils possédaient des structures intéressantes qui pouvaient être mises à profit dans le cadre de notre stratégie. En effet, parmi son catalogue de marqueurs fluorescents, cette compagnie commercialise des hybrides hémicyanine-coumarine associant une 7-dialkylaminocoumarine et un motif pyridinium *N*-alkylsulfonaté reliés entre eux par l'intermédiaire d'une double liaison. Ainsi, ces fluorophores sont solubles dans l'eau, possèdent un large déplacement de Stokes et émettent à des longueurs d'onde au-delà de 600 nm (Figure 2-24).

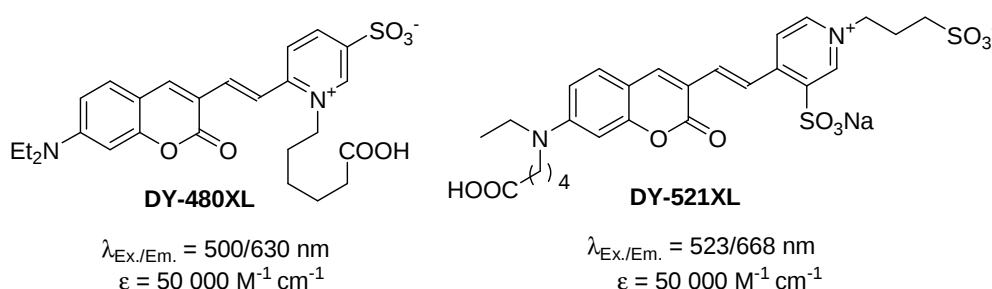


Figure 2-24. Fluorophores émettant dans le proche IR et à large déplacement de Stokes commercialisés par la société Dyomics GmbH.

²³² <http://www.dyomics.com/>. Czerney, P.; Wenzel, M.; Schweder, B.; Lehmann, F. (Dyomics GmbH, Germany). EP 1318177, 2003.

Notre objectif est donc d'introduire une ou plusieurs insaturations en position 3 d'une coumarine afin d'étendre sa longueur d'onde d'émission. Pour cela, l'introduction d'une fonction aldéhyde en position 3 de la coumarine a été envisagée avec pour objectif d'effectuer sa condensation avec un sel d'indolium ou de quinolinium. La présence de groupements sulfonate sur ces hétérocycles devrait permettre l'hydrosolubilisation du fluorophore. Enfin, au lieu d'utiliser une coumarine substituée en position 7 par un groupement dialkylamino (ce qui de ce fait rend la coumarine toujours fluorescente), le remplacement de l'aniline par un phénol a été envisagée afin d'obtenir une coumarine pro-fluorescente (Schéma 2-37).

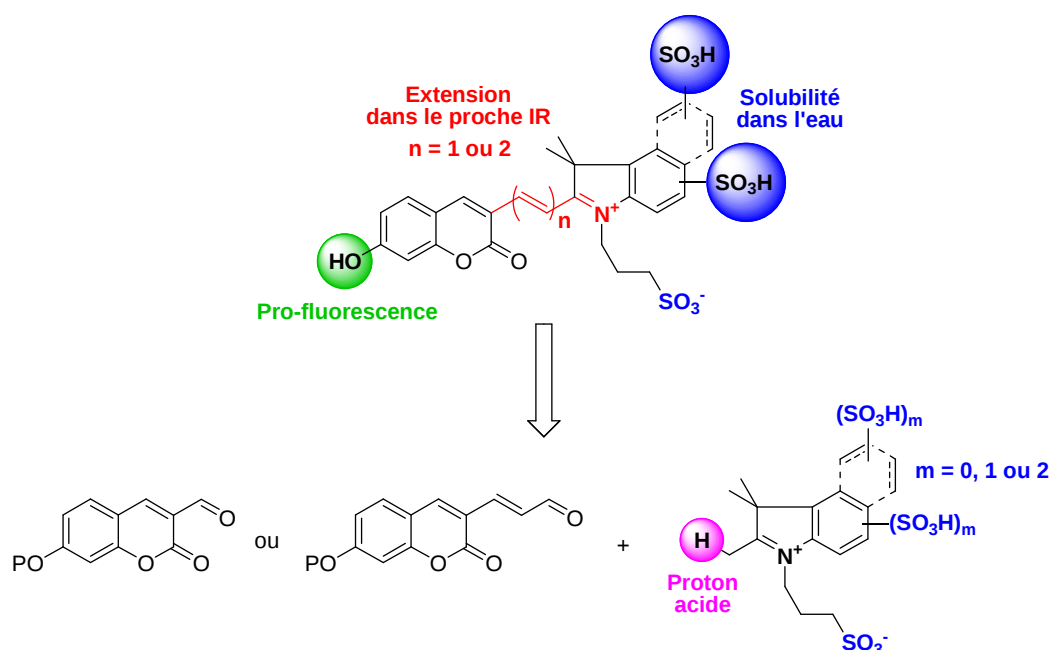


Schéma 2-37. Stratégie envisagée pour obtenir des pro-fluorophores émettant dans le proche IR à partir de 3-formyl ou 3-cinnamyl-7-hydroxycoumarines.

2 Synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine

2.1 Synthèse des aldéhydes précurseurs

L'étape clé de la synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine consiste en l'obtention d'une 7-hydroxycoumarine substituée en position 3 par un groupement formyle. Quelques exemples de synthèse ont été reportés dans la littérature impliquant soit une oxydation par le dioxyde de sélénium,²³³ l'hydrolyse d'une 3-cyano-2-morpholino-2H-chromène,²³⁴ la cyclisation

²³³ Ito, K.; Nakajima, K. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, 25, 511-515.

²³⁴ Rene, L.; Lefebvre, A.; Auzou, G. *Synthesis* **1986**, 567-569.

d'alcynes conjugués selon un mécanisme analogue à celui de Baylis-Hillman²³⁵ ou la mise en œuvre d'une réaction de Rosenmund.²³⁶ Cependant, ces méthodes souffrent de rendements souvent médiocres et impliquent des matières premières parfois difficiles d'accès.

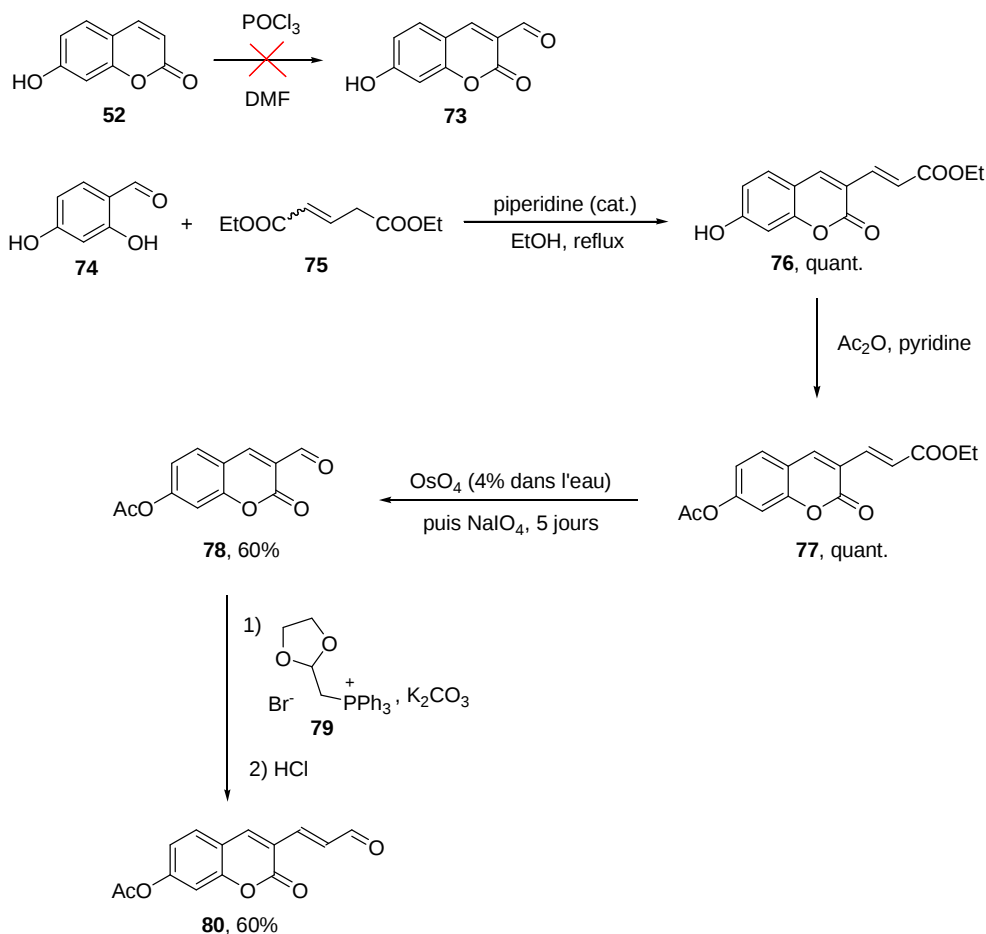


Schéma 2-38. Synthèse des aldéhydes clés **78** et **80**.

Notre objectif est d'utiliser une méthode simple pouvant permettre d'accéder rapidement à des quantités importantes de produit. Une réaction de Vilsmeier-Haack sur la 7-hydroxycoumarine **52** a tout d'abord été effectuée mais malgré plusieurs essais, seulement des traces de produit (~ 5%) ont pu être détectées par analyse CLHP.²³⁷ Toutefois, une autre stratégie s'est avérée plus fructueuse. Son avantage est de mettre en jeu une condensation de Knoevenagel qui est classiquement utilisée pour la synthèse de coumarines car elle est très efficace. Celle-ci a donc été effectuée entre le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **74** et le

²³⁵ Matsuya, Y.; Hayashi, K.; Nemoto, H. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5408-5418.

²³⁶ Boehm, T.; Schumann, G. *Arch. Pharm.* **1933**, *271*, 490-513. Robertson, D. N.; Link, K. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1883-1885.

²³⁷ El-Aal, R. M. A.; Koraierm, A. I. M. *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 389-395.

diéthylglutaconate **75**. La réaction ne permet pas la formation directe du groupement formyle en position 3 mais la double liaison de l'ester α,β -insaturé **76** obtenu peut être transformée en aldéhyde par une séquence dihydroxylation/coupure oxydante du diol formé.²³⁸ Une procédure optimisée de cette séquence réactionnelle a été suivie et plusieurs grammes du composé clé **78** possédant une fonction phénol protégée par un groupement acétyle ont pu être obtenus.²³⁹

Dans le but de déplacer encore plus la longueur d'onde d'émission du fluorophore vers le rouge, une double liaison supplémentaire a été introduite en position 3 pour former le dérivé 3-cinnamyl **80**. Ainsi, une réaction de Wittig entre l'aldéhyde **78** et le bromure de (1,3-dioxolan-2-ylméthyl)triphénylphosphonium **79** a été effectuée et a permis l'obtention de l'aldéhyde **80** après hydrolyse de l'acétal intermédiaire.²⁴⁰ Cette procédure s'est avérée plus raisonnable à mettre en œuvre que la réduction sélective de l'ester **76** en aldéhyde en raison de la présence de la fonction lactone de la coumarine qui est connue pour être sensible aux hydrures métalliques (Schéma 2-38).

2.2 Synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine

Une fois les deux aldéhydes synthétisés, ceux-ci ont été mis en réaction avec différents indoles et quinoléines sulfonates. Ainsi, les composés **81**,²⁴¹ **82**,²⁴² **83**²⁴³ et **84**²⁴⁴ ont été synthétisés au laboratoire selon des procédures déjà décrites dans la littérature (Schéma 2-39 a). Puis, la formation du carbanion du sel d'indolium ou de quinolinium en milieu légèrement basique (i.e., en présence de 2 éq. de pyrrolidine) en présence des aldéhydes **78** et **80** a conduit à une condensation suivie d'une déshydratation pour former la double liaison désirée. De façon intéressante, les conditions basiques utilisées permettent également la déprotection

²³⁸ Padmanabhan, S.; Peri, R.; Triggle, D. J. *Synth. Commun.* **1996**, 26, 827-831.

²³⁹ Lim, N. C.; Schuster, J. V.; Porto, M. C.; Tanudra, M. A.; Yao, L.; Freaque, H. C.; Brueckner, C. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 2018-2030.

²⁴⁰ Daubresse, N.; Francesch, C.; Mhamdi, F.; Rolando, C. *Synthesis* **1994**, 369-371.

²⁴¹ Synthétisé selon une procédure similaire à celle publiée récemment, Constantin, T. P.; Silva, G. L.; Robertson, K. L.; Hamilton, T. P.; Fague, K.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. *Org. Lett.* **2008**, 10, 1561-1564.

²⁴² Narayanan, N.; Patonay, G. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2391-2395.

²⁴³ Strekowski, L.; Mason, J. C.; Lee, H.; Say, M.; Patonay, G. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, 41, 227-232. Synthétisé dans notre cas selon une procédure analogue à celle décrite pour l'introduction d'un bras sulfonaté à quatre carbones, Pham, W.; Medarova, Z.; Moore, A. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 735-740.

²⁴⁴ Rajopadhye, M.; Narayanan, N.; Peterson, J. D. (Visen Medical, Inc). WO 2007028118, 2007. Lin, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Mol. Imaging* **2003**, 2, 87-92.

du groupement acétyle et fournissent donc les hybrides hémicyanine-coumarine en une seule étape avec des rendements allant de 33% à 91% après purification par CLHP semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée (Schéma 2-39 b-c).

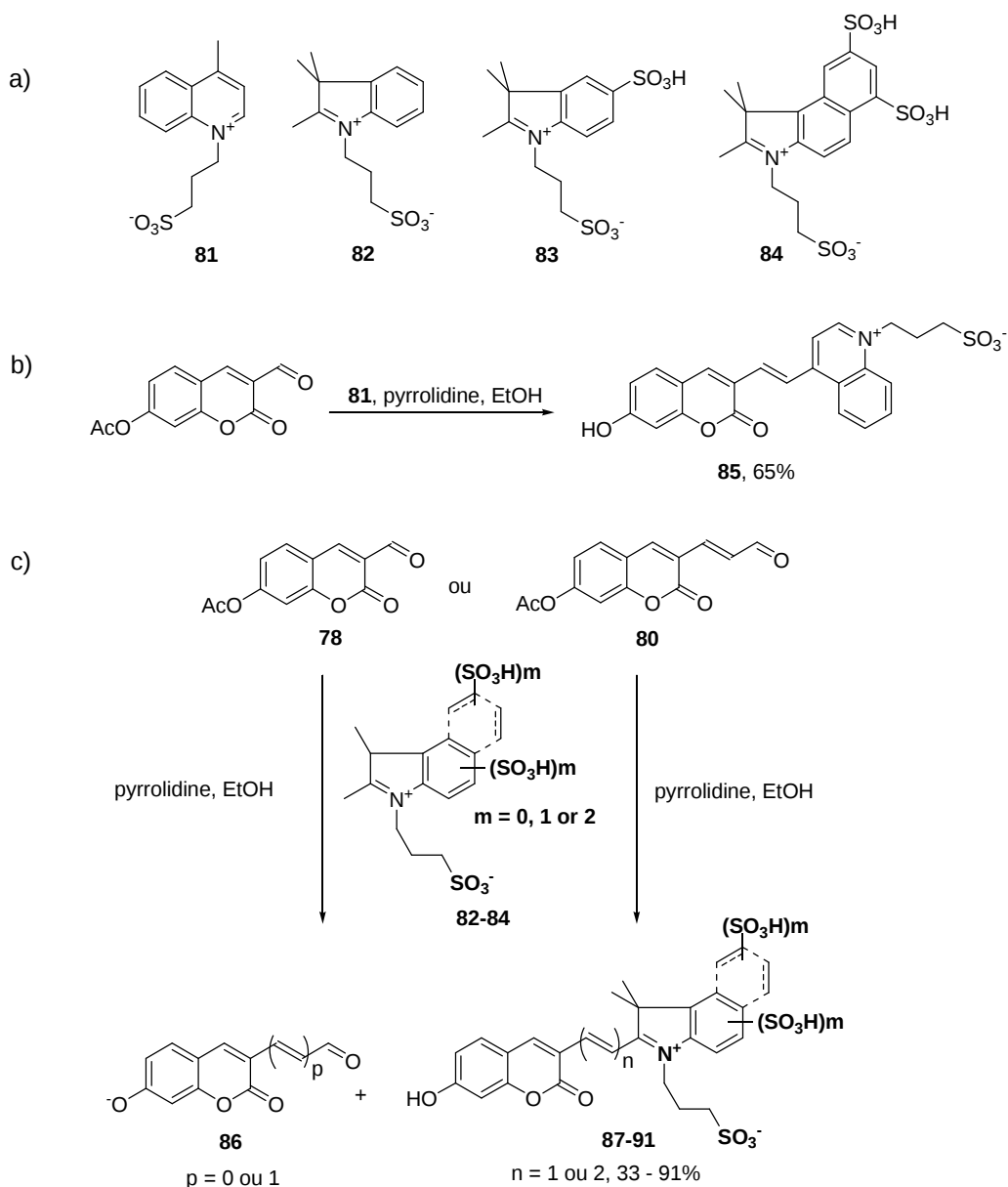


Schéma 2-39. a) Sels d'indolium et de quinolinium sulfonatés utilisés pour la synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine ; Synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine à partir : b) d'un sel de quinolinium *N*-alkylsulfonaté ; c) d'un sel d'indolium mono-, di- ou trisulfonaté.

Les hybrides hémicyanine-coumarine synthétisées et les rendements obtenus sont représentés dans le tableau 2-3 :

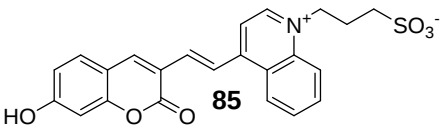
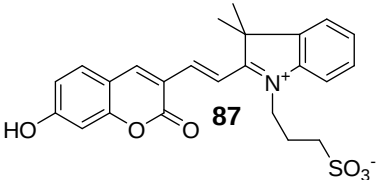
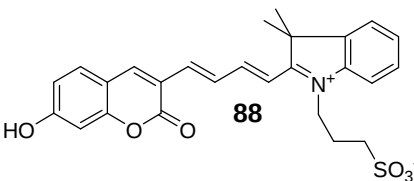
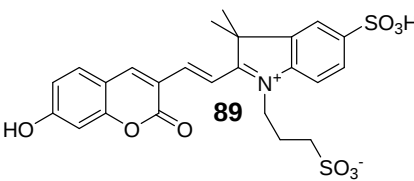
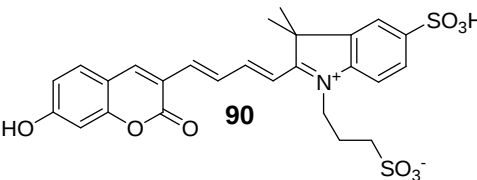
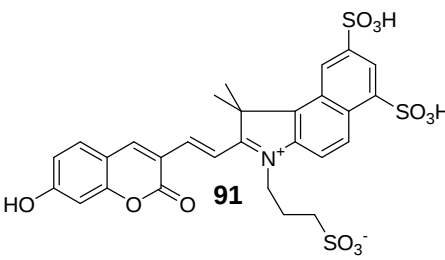
Coumarine	Rendement
 85	65%
 87	91%
 88	33% + 28% 87
 89	77%
 90	30% + 30% 89
 91	48%

Tableau 2-3. Structure et rendements des hybrides hémicyanine-coumarine synthétisées.

Les rendements sont bons pour les synthèses impliquant la coumarine **78** tandis que les réactions mettant en jeu le dérivé 3-cinnamyl **80** conduisent aux produits de condensation désirés avec des rendements plus modestes. En effet, dans ce cas, la réaction est en

compétition avec une réaction de rétro-aldolisation conduisant à l'aldéhyde **78**. Celui-ci peut également réagir dans une réaction de condensation, si bien qu'une quantité égale de produit avec une ou deux doubles liaisons a pu être isolée.

Un autre point important est l'existence d'une réaction concurrente dans les conditions basiques utilisées. En effet, la pyrrolidine est capable de trans-amidifier l'ester protégeant le groupement 7-OH des coumarines **78** et **80**, conduisant ainsi à la formation de **86** dans le milieu. Le problème est que cet aldéhyde est peu réactif car l'électrophilie de son carbonyle est fortement diminuée par les effets mésomères donneur du phénolate. La réaction de condensation doit donc avoir lieu avant celle de déprotection du groupement acétyle. Ce paramètre pourrait expliquer pourquoi le rendement de **91** est moins bon. En effet, la nucléophilie de **84** semble inférieure à celle des autres indoles, probablement à cause de sa plus grande taille, comme le laisse penser la bonne quantité de **86** qui a pu être isolée lors de la réaction de **78** avec **84**. Pour la même raison, l'analogue du composé **91** avec deux doubles liaisons n'a pas pu être obtenu car la formation de **86** est plus rapide que la condensation de **84** sur l'aldéhyde **80**.

3 Caractéristiques spectrales des hybrides hémicyanine-coumarine

La synthèse des hybrides hémicyanine-coumarine permet d'obtenir des produits fortement colorés (bleu, vert ou rouge). Celles-ci sont totalement solubles dans l'eau dans une large gamme de concentrations (1.0 μM - 5.0 mM), ce qui remplit l'un des objectifs que nous nous étions initialement fixés. Les caractéristiques spectrales de ces nouveaux fluorophores ont ensuite été déterminées dans différents milieux (tampon aqueux PBS simulant le milieu physiologique et solvants organiques) afin d'évaluer la longueur d'onde et l'efficacité²⁴⁵ de leur émission de fluorescence (Tableau 2-4) :

²⁴⁵ Les rendements quantiques de fluorescence ont été déterminés selon la procédure décrite par HORIBA Jobin Yvon, <http://www.jobinyvon.com/Fluorescence/Applications/Quantum-Yield>.

Fluorophore	λ_{max} (nm)	$\lambda_{\text{Em.}}$ (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_F (%)	Solvant
85	501	515	14	7525	0.4	PBS
85	447	617	170	n.d.	8.1	DMSO
87	555	620	65	22 800	0.7	PBS
87	630	649	19	22 200	2.3	DMSO
87	623	642	19	22 000	4.9	EtOH
88	581	720	139	27 000	1.3	PBS
88	491	653	162	24 500	1.3	DMSO
89	573	636	63	70 400	1.3	PBS
89	485	604	119	35 500	1.2	DMSO
89	630	648	18	78 000	3.1	EtOH
90	592	722	130	24 500	1.1	PBS
90	494	655	161	23 500	1.7	DMSO
90	508	654	146	25 000	1.0	EtOH
91	578	643	65	65 500	2.7	PBS
91	495	625	130	33 700	2.5	DMSO
91	643	659	16	41 800	1.4	EtOH

Tableau 2-4. Caractéristiques de fluorescence des hybrides hémicyanine-coumarine.

L'utilisation de l'hétérocycle quinoléine pour le composé **85** donne le seul fluorophore ne présentant pas d'émission dans le rouge ($\lambda_{\text{Ex.}} = 515$ nm) en milieu physiologique. De plus, son coefficient d'extinction molaire et son rendement quantique sont très faibles. Etant donné ces propriétés spectrales peu conformes au cahier des charges fixé pour les applications *in vivo*, aucun autre dérivé possédant un noyau quinoléine n'a été synthétisé.

En revanche, l'utilisation de dérivés indoliques donne des résultats beaucoup plus intéressants. En effet, les fluorophores **87** à **91** montrent des déplacements de Stokes spectaculaires pour des structures apparentées à celle des cyanines (63 à 139 nm), ce qui est très intéressant pour réduire les interférences et le bruit de fond occasionnés par la réabsorption de photons qui a lieu avec les fluorophores présentant un faible déplacement de Stokes. Comme suggéré récemment,²⁴⁶ cela pourrait être attribué à un transfert de charge intramoléculaire (ICT pour Internal Charge Transfer) entre le groupement phénolate (donneur) et la partie indolium (accepteur). Un solvatochromisme négatif important de l'absorption des fluorophores **87**, **89** et **91** a été observé à mesure que la polarité du solvant

²⁴⁶ Peng, X.; Song, F.; Lu, E.; Wang, Y.; Zhou, W.; Fan, J.; Gao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4170-4171.

augmente alors qu'aucun solvatochromisme dans l'émission n'a été observé. Cela pourrait être dû à la formation de liaisons hydrogène entre le solvant et le fluorophore et pourrait appuyer l'hypothèse de l'ICT.

De façon intéressante, les fluorophores obtenus émettent à des longueurs d'onde comprises entre 620 et 722 nm selon la longueur de la chaîne polyméthène, ce qui se situe bien dans la zone spectrale que nous visions initialement. L'ajout d'une deuxième double liaison occasionne un effet bathochrome de 100 et 86 nm respectivement entre les fluorophores **87/88** et **89/90**.

Les coefficients d'extinction molaire voisins de $70\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pour **89** et **91** sont également fortement augmentés par rapport celui de la 7-hydroxycoumarine ($\epsilon = 13\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ dans le PBS).²⁰⁰

Cependant, les rendements quantiques sont relativement modestes puisqu'ils n'excèdent pas 3% en conditions physiologiques simulées. Ces faibles valeurs pourraient être liées à une trop grande flexibilité de la structure à l'état excité, en particulier au niveau de la chaîne polyméthène qui est le siège de nombreux mouvements de rotation-vibration, conduisant à une relaxation non radiative. Ce phénomène est fréquemment rencontré avec les fluorophores de la famille des cyanines et a été nommé « loose belt effect ».²⁴⁷

Une évolution intéressante est tout de même observée entre les composés **87**, **89** et **91** pour lesquels le rendement quantique augmente avec le nombre de groupements sulfonate introduits sur le cœur fluorescent. Ce phénomène est sans doute dû à une meilleure solvation du fluorophore par les molécules d'eau qui limite ainsi le phénomène d'agrégation qui est souvent observée avec ce type de structures polycycliques aromatiques (i.e., formation d'agrégats de type H).²⁴⁸

Il est intéressant de noter que pour le dérivé benzoindole **91**, la brillance en milieu physiologique ($1770\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) est proche de celle de DAO ($1930\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) et contrairement à ce dérivé d'acridinone, la structure hybride hémicyanine-coumarine est totalement non réactive vis-à-vis des thiols comme le DTT.

Enfin, la variabilité de l'émission de ce système « push-pull » en fonction de la nature du solvant est un phénomène intéressant qui pourrait être mise à profit pour des études

²⁴⁷ Turro, N. J., *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books: Sausalito, CA, 1991.

²⁴⁸ Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, 7, 356-362. Johansson, M. K.; Cook, R. M. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 3466-3471.

conformationnelles de protéines à la manière des travaux sur les mérocyanines reportés par le groupe de K. Hahn.²⁴⁹

4 Application à la détection de la PGA

Afin de vérifier si les hybrides hémicyanine-coumarine possédaient des caractéristiques de pro-fluorescence, une sonde modèle permettant la détection de la PGA a été synthétisée.

La stratégie a consisté à introduire tout d'abord le sel de sodium **92** de la coumarine **73** sur le linker selon la même méthodologie que celle décrite précédemment puis de condenser la partie indolique. Cette stratégie permet d'introduire les groupements hydrosolubilisants (i.e., sulfonates) lors de la dernière étape, ce qui limite la manipulation et la purification (souvent délicate et/ou fastidieuse) des intermédiaires polaires et hygroscopiques que sont les dérivés polysulfonates d'indole et simplifie la synthèse de ce type de sondes. Le fluorophore choisi pour la synthèse de la sonde a été l'hybride hémicyanine-coumarine **89** car cela permettait d'obtenir un bon compromis entre coefficient d'extinction molaire élevé, rendement quantique correct et simplification de la synthèse.

Ainsi, le composé **93** a été synthétisé avec un rendement de 24% comparable au rendement obtenu pour la synthèse de la sonde **53**. Enfin, la sonde **94** a été obtenue *via* une réaction de condensation avec l'indole **89** avec un rendement de 55% après purification par CLHP semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée (Schéma 2-40).

²⁴⁹ Toutchkine, A.; Kraynov, V.; Hahn, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4132-4145. Toutchkine, A.; Han, W. G.; Ullmann, M.; Liu, T.; Bashford, D.; Noodleman, L.; Hahn, K. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10849-10860. Toutchkine, A.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1344-1348.

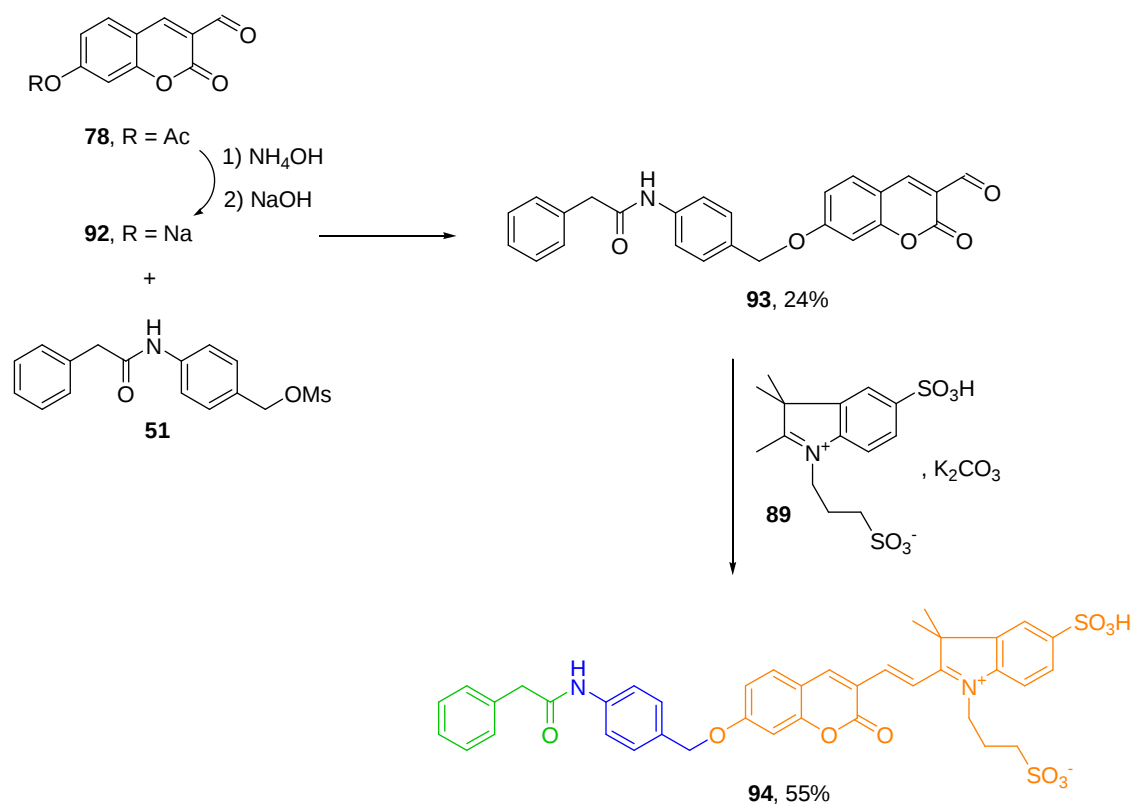


Schéma 2-40. Synthèse de la sonde pro-fluorescente **94** pour la détection de la PGA et utilisant une coumarine hybride disulfonatée.

Une fois la synthèse de la sonde effectuée, ses caractéristiques spectrales ont été déterminées en conditions physiologiques simulées et comparées à celles du fluorophore original **89** (Figure 2-25).

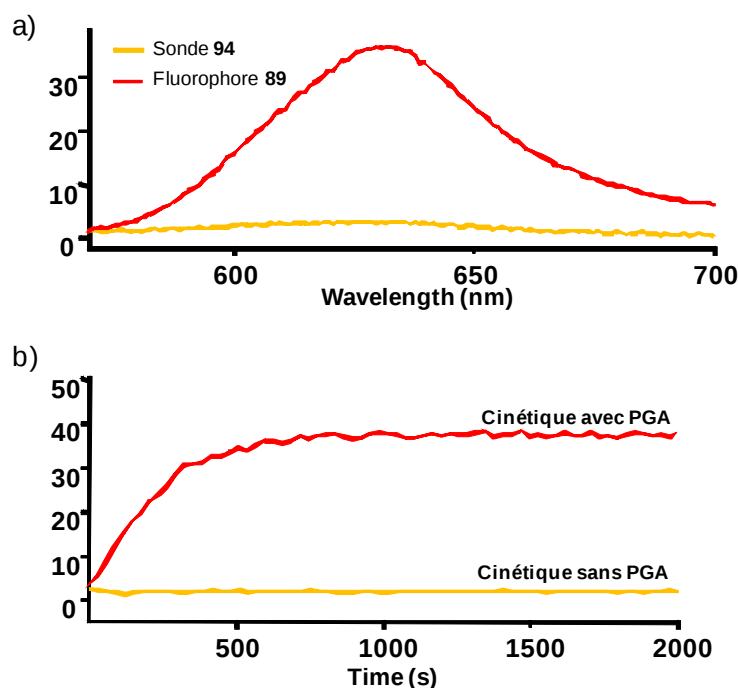


Figure 2-25. a) Comparaison des intensités de fluorescence entre la sonde **94** et l'hybride hémicyanine-coumarine **89** dans le PBS ($\lambda_{\text{Ex.}} = 470$ nm pour **94**, $\lambda_{\text{Ex.}} = 570$ nm pour **89**, 37 °C, 3.9 μM , pH 7.4) ; b) Cinétique de clivage par la PGA (0.0105 U) dans le tampon phosphate ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 570/636$ nm, 37 °C, 3.9 μM , pH 7.4).

Comme attendu, un effet hypsochrome (~ 110 nm) est observé pour le maximum d'absorption de la sonde **94** comparé à celui du fluorophore libre **89**. Après excitation à $\lambda = 470$ nm, une très faible émission de fluorescence à $\lambda = 636$ nm a été observée. Par comparaison, la fluorescence du fluorophore **89** à la même concentration s'est avérée être 11 fois supérieure (Figure 2-25 a). Ainsi, les propriétés de pro-fluorescence espérées ont été obtenues avec ces nouveaux dérivés de la 7-hydroxycoumarine.

Enfin, une cinétique de clivage avec la PGA a été réalisée. L'ajout de la protéase dans le milieu a permis d'observer une augmentation progressive de l'émission de fluorescence à 636 nm, montrant ainsi le clivage de la sonde. Parallèlement, aucune augmentation n'a été observée lors d'une cinétique réalisée en absence de PGA, ce qui confirme la stabilité de la sonde **94** en milieu aqueux (Figure 2-25 b). Il est intéressant de noter que le clivage enzymatique de la sonde **94** est également visible à l'œil nu car la coloration de la solution de sonde change progressivement passant de l'orange au violet (couleur caractéristique du fluorophore **89** sous sa forme phénolate) (Figure 2-26).

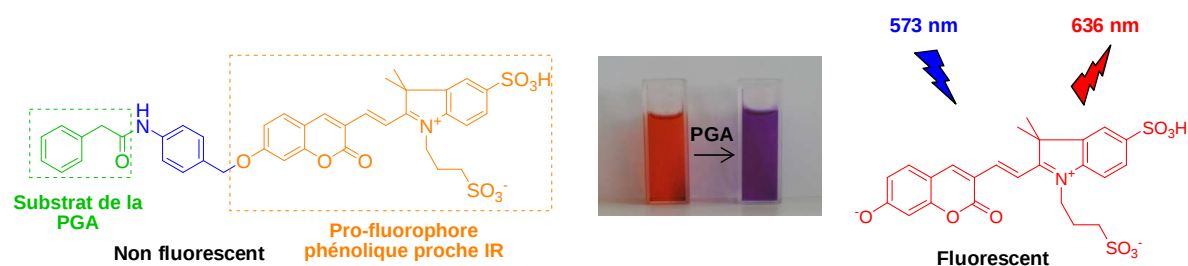


Figure 2-26. Changement de couleur de la solution de sonde (orange→violet) lors du clivage par la PGA.

VII CONCLUSION-PERSPECTIVES

Notre travail visant au développement de nouvelles sondes pro-fluorescentes a permis d'étendre l'utilisation des pro-fluorophores à phénol à la détection de peptidases. Pour cela, une stratégie impliquant un bras réactif auto-immolable a été mise au point et a permis de mettre en évidence que l'utilisation du PABA d'une part et la connexion de celui-ci au pro-fluorophore *via* une liaison éther d'autre part constituaient une stratégie efficace pour obtenir des sondes stables en milieu aqueux et activables par une enzyme cible.

Cette stratégie a été appliquée sur une enzyme modèle, la PGA, et sur une enzyme d'intérêt pour des études biologiques, la caspase-3 (Figure 2-27).

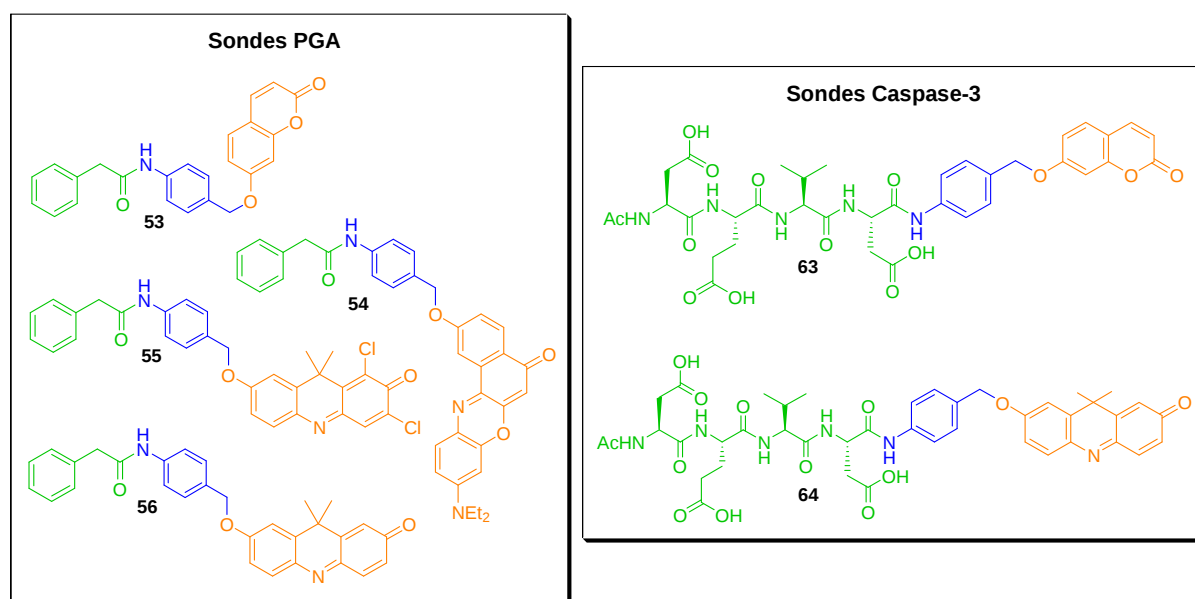


Figure 2-27. Sondes pro-fluorescentes pour la détection de la PGA et la caspase-3

Dans le but d'utiliser ces sondes dans des applications en imagerie *in vivo*, l'utilisation de pro-fluorophores émettant dans le rouge a été envisagée. Les études effectuées ont montré que les pro-fluorophores actuels émettant à ces longueurs d'onde étaient fortement limités. En effet, ceux-ci sont tout d'abord très peu solubles dans l'eau ; la naphthofluorescéine ne présente des caractéristiques de fluorescence intéressantes qu'en milieu basique; DDAO s'est avéré être un fluorophore trop électroattracteur pour permettre d'obtenir des sondes stables en milieu aqueux ; la fluorescence de la résorufine et de DAO sont trop sensibles à la présence de thiols dans le milieu (Figure 2-28).

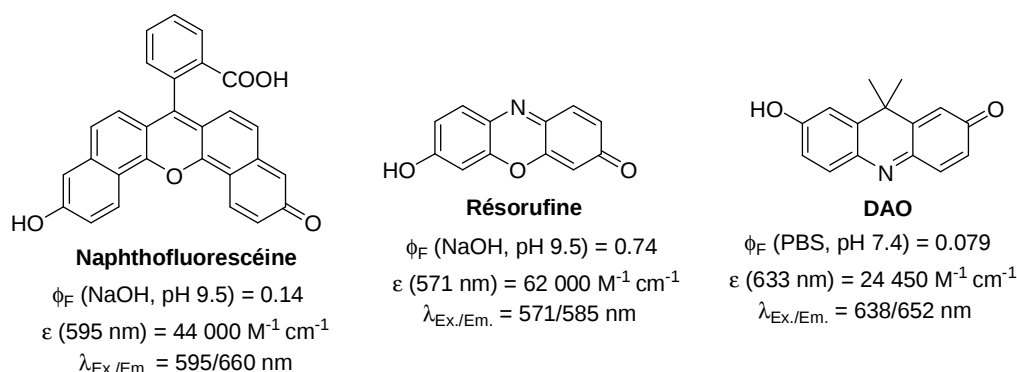


Figure 2-28. Pro-fluorophores à phénol disponibles et émettant dans le rouge.

Pour pallier ce manque, de nouveaux pro-fluorophores pouvant remédier à ces inconvénients ont été développés, et nos efforts ont abouti à l'obtention d'hybrides hémicyanine-coumarine possédant à la fois une excellente solubilité dans l'eau, un large déplacement de Stokes (60 – 140 nm), une émission dans le rouge comprise entre 620 et 720 nm et une insensibilité à la présence de thiols dans le milieu (Figure 2-29).

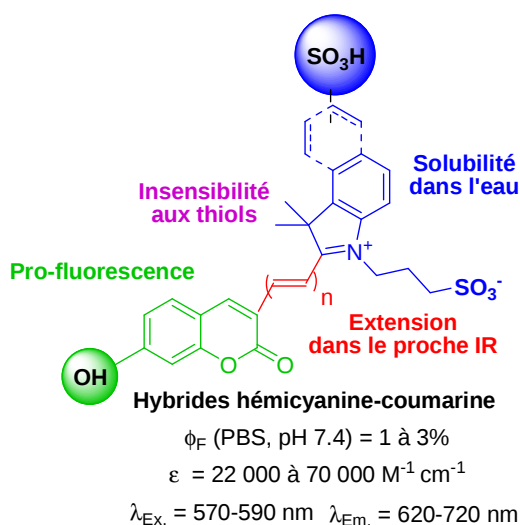


Figure 2-29. Nouveaux pro-fluorophores à phénol basés sur une structure hémicyanine-coumarine.

Cependant, les rendements quantiques se sont avérés décevants mais les structures obtenues sont prometteuses dans la mesure où une rigidification de la structure des pro-fluorophores devrait permettre d'augmenter leurs caractéristiques de fluorescence.

L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet (Quidd - Université de Rouen)²⁵⁰ ainsi que deux publications dans *Bioconjugate Chemistry*²⁵¹ et *Organic Letters*²⁵² dont les manuscrits sont présentés ci-après.

²⁵⁰ Renard, P. Y.; Romieu, A.; Richard, J. A.; Massonneau, M. (Quidd, Fr.; Université de Rouen). FR 2910897, 2008.

²⁵¹ Richard, J.-A.; Meyer, Y.; Jolivel, V.; Massonneau, M.; Dumeunier, R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1707-1718.

²⁵² Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4175-4178.

Latent Fluorophores Based on a Self-Immolative Linker Strategy and Suitable for Protease Sensing[†]

Jean-Alexandre Richard,^{‡,§} Yves Meyer,^{‡,§} Valérie Jolivel,^{§,⊥,¶,¶} Marc Massonneau,[§] Raphaël Dumeunier,[§] David Vaudry,^{⊥,¶,¶} Hubert Vaudry,^{⊥,¶,¶} Pierre-Yves Renard,^{*,‡,¶,¶,▽} and Anthony Romieu^{*,‡,¶,¶}

Equipe de Chimie Bio-Organique, Université de Rouen, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, UMR CNRS 6014, COBRA, IRCOF, rue Lucien Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan, France, QUIDD, Technopôle du Madrillet, 50, rue Ettore Bugatti, 76800 Saint-Etienne du Rouvray, France, Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U413, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, and Plate-forme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie, IFRMP23, Université de Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France. Received May 17, 2008; Revised Manuscript Received June 24, 2008

The self-immolative spacer *para*-aminobenzyl alcohol (PABA) was used as a key component in the design of new protease-sensitive fluorogenic probes whose parent phenol-based fluorophore is released through an enzyme-initiated domino reaction. First, the conjugation of the phenylacetyl moiety to 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) and 7-hydroxy-9*H*-(9,9-dimethylacridin-2-one) (DAO) by means of the heterobifunctional PABA linker has led to pro-fluorophores **6a** and **6d** whose enzyme activation by penicillin amidase was demonstrated. The second part of this study was devoted to the extension of this latent fluorophore strategy to the caspase-3 protease, a key mediator of apoptosis in mammalian cells. Fluorogenic caspase-3 substrates **11** and **13** derived from umbelliferone and DAO, respectively, were prepared. It was demonstrated that pro-fluorophore **11** is a sensitive fluorimetric reagent for the detection of this cysteine protease. Furthermore, *in vitro* assays with fluorogenic probe **13** showed a deleterious effect of biological thiols on fluorescence of the released acridinone fluorophore DAO that, to our knowledge, had not been reported until now.

INTRODUCTION

Latent fluorophores (or pro-fluorophores) are molecules in which a physical property of the fluorophore is altered upon interaction with an analyte (enzyme, metal cation, reactive oxygen species, and so forth), resulting in a change in the fluorescence spectrum and/or an increase in the fluorescence quantum yield at a particular wavelength, and/or a change in some other fluorescent properties of the molecule (*1*). Most of these fluorogenic probes unmask their intense fluorescence only by a user-designated chemical reaction and so they display a unique selectivity and limited interferences associated with the probe's concentration, excitation intensity, and emission sensitivity (*2, 3*). Thus, they are widely used in many fields because of their powerful ability to improve analytical sensitivity and also because they offer greater temporal and spatial sampling capability. For example, latent fluorophores are valuable tools for modern biochemical and biological research especially for the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), high-throughput screening of enzyme inhibitors, detection of DNA and RNA, and evaluation of cell viability (*4*). Furthermore, emerging and more challenging biomedical applications such as *in vivo* fluorescence imaging also require the use of such

smart fluorogenic probes (*5*). Thus, numerous pro-fluorophores suitable for the visualization of biologically relevant molecules (H₂O₂ (*6*), O₂^{•−} (*7–9*), ONOO[−] (*10*), NO (*6, 11*), cysteine/homocysteine (*12, 13*), glutathione *14–17*), and enzyme activities (esterases *1–3, 18*), caspase-3 (*19, 20*), dipeptidyl peptidase IV substrate (DPP-IV) (*21, 22*), β -galactosidase (*23, 24*), β -lactamases (*25*), phosphatases (*1*) in various *in vitro* and *in cellulo* models, have been developed. However, few of them fulfill all the requirements for *in vivo* use (i.e., far-red or near-IR excitation and emission maxima (*26*), water solubility, serum stability, cell-membrane permeability, and so forth). Inspired by prodrug design (*27–29*), Jones et al. have proposed an attractive approach to develop efficient imaging probes which relies on the conjugation of the recognition unit (responsible for the selective reaction with the target analyte) to a masked aniline-based fluorophore *via* a “self-immolative” spacer (*30*). This latter reactive linker enables the unmasking of the pro-fluorophores through a multistep cascade reaction triggered by the analyte of interest and leading to the release of the free fluorescent molecule. As the target analyte is often a hydrolytic enzyme, the presence of a spacer between the recognition unit and the bulky fluorophore is beneficial to prevent steric hindrance around the cleavage site in order to generate better enzyme substrates. Furthermore, a heterobifunctional spacer permits the conjugation of fluorescent cores that do not necessarily contain the reactive group involved in the enzyme-cleavable bond of the target pro-fluorophore and so widens the scope of fluorescent labels that can be used to prepare the fluorogenic probes (e.g., the use of phenol, thiophenol, or aniline-based fluorophores to prepare protease-sensitive fluorogenic probes). Moreover, phenol-, thiophenol-, and even aniline-based fluorescent species often are good leaving groups: direct ester, thioester, or amide linkage of the fluorescent species at the enzyme-cleavable bond thus frequently gives rise to a

* pierre-yves.renard@univ-rouen.fr or anthony.romieu@univ-rouen.fr. Phone: +33-2-35-52-24-14 (or 24-15). Fax: +33-2-35-52-29-59.

[†] Such fluorogenic probes were covered by a patent entitled “New pro-fluorescent compounds”. Renard, P.-Y., Romieu, A., Richard J.-A., and Massonneau, M. Fr. Demande (2008), FR 2910897 A1 20080704.

[‡] COBRA-CNRS UMR 6014.

[§] QUIDD.

[⊥] INSERM U413.

[¶] IFRMP23.

[¶] Université de Rouen.

[▽] Institut Universitaire de France.

fragile bioprobe (2, 3), that often turns out to be sensitive to pH changes, and displays a noticeable nonspecific cleavage, often detrimental when highly sensitive phenomena are targeted. Because of the use of an intermediate self-immolative linker, the chemical functionality leading to the fluorophore release can be tuned in order to reduce drastically the background noise. Such latent fluorophore strategy was recently employed by some academic groups to prepare fluorogenic substrates of several hydrolytic enzymes (i.e., esterases (31–33) and β -galactosidase (34)) which could potentially be used for *in vivo* imaging. Surprisingly, few published works are devoted to the extension of this strategy to the design and synthesis of protease pro-fluorescent substrates (for recent examples, see the molecular probes with UV–visible and fluorescence outputs for penicillin amidase activity, recently reported by Danieli et al. (35), Sicart et al. (36), and by us (37) and our akin strategy aimed at chemiluminescent probes for protease activity (38)). Given their critical role in numerous diseases, the evaluation of specific protease activities *in vivo* is of a great importance especially for diagnostic and therapeutic purposes. In that context, we describe here the synthesis, photophysical characterization, and preliminary biochemical studies of a new generation of fluorogenic probes resulting from the covalent association between a peptide sequence and a phenol-based fluorophore through the self-immolative spacer *para*-aminobenzyl alcohol (PABA). Latent fluorophores from two dyes (blue for **6a** and far-red for **6d**) were suitable for detecting the protease penicillin amidase (also known as penicillin G acylase, PGA) whereas fluorimetric reagents **11** and **13** were initially designed for imaging caspase-3 protease *in cellulo* and *in vivo*, respectively.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Reagents. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 μ m) from SdS. TLC analyses were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. Compounds were visualized by one or both of the following methods: (1) spray with a 0.2% (w/v) ninhydrin solution in absolute ethanol, (2) spray with a 3.5% (w/v) phosphomolybdic acid solution in absolute ethanol. Acetonitrile was freshly distilled over CaH₂ under an argon atmosphere prior to use. Dichloromethane was dried by distillation over P₂O₅. Anhydrous NMP (H₂O < 100 ppm) was purchased from Fluka and stored over 4 Å molecular sieves. Pyridine was distilled over KOH and stored over BaO. DIEA and triethylamine (TEA) were distilled from CaH₂ and stored over BaO. 7-Hydroxycoumarin **5a** was purchased from Fluka. (Far-red emitting phenol-based fluorophores 2-hydroxy Nile Red **5b**, DDAO **5c**, and DAO **5d** were synthesized according to previously reported procedures (39–41). The fully protected tetrapeptide Ac-Asp(OTMSE)-Glu(OTMSE)-Val-Asp(OTMSE)-OH and its PABA carboxamide derivative **8** were synthesized by using a multistep synthetic procedure recently reported by us (38). Recombinant human caspase-3 enzyme (5.52 U/mg) was purchased from Sigma. Penicillin amidase from *E. coli* and immobilized on Eupergit C (~100 U/g) was purchased from Fluka. HPLC-gradient grade acetone and CH₃CN were obtained from Acros and Panreac, respectively. Buffers (caspase-3 and phosphate buffers) and aq. mobile phases for HPLC were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 M Ω .cm).

Instruments. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from CDCl₃ (δ_H = 7.26, δ_C = 77.36), DMSO-*d*₆ (δ_H = 2.54, δ_C = 40.45), acetone-*d*₆ (δ_H = 2.09, δ_C = 30.60, and 205.87), or CD₃OD (δ_H = 3.34, δ_C = 49.86) (42). *J* values are expressed in Hz. Infrared (IR) spectra were recorded as thin-film on sodium

chloride plates or KBr pellets using a Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500 spectrometer. UV–visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer. Kinetic parameters were determined using a Molecular Devices fluorometric imaging plate reader FlexStation. Black clear-bottom 96-multiwell plates were purchased from Costar. Fluorescence spectroscopic studies were performed with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer. Analytical HPLC was performed on a Thermo Electron Surveyor instrument equipped with a PDA detector. Semipreparative HPLC was performed on a Finnigan SpectraSYSTEM liquid chromatography system equipped with UV–visible 2000 detector. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray source. LC-MS analyses were performed on a Thermo's Surveyor Plus HPLC system coupled with the Finnigan LCQ Advantage MAX (ionization mode, ESI $\pm$; capillary temperature, 270 °C; capillary voltage, $\pm$ 10 V; tube lens offset, 0/–50 V).

HPLC Separations. Several chromatographic systems were used for the analytical experiments, the purification steps and the LC-MS analyses. Each one of these systems was optimized (except System G) in order to improve separation conditions.

System A: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μ m, 4.6 $\times$ 150 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.0) as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 1.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 254 nm.

System B: System A with the following gradient [80% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 20% to 100% (40 min) of CH₃CN].

System C1: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μ m, 10 $\times$ 250 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.0) as eluents [80% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 20% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 5.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 254 and 320 nm.

System C2: System C1 with a Varian Kromasil C₁₈ column (10 μ m, 21.2 $\times$ 250 mm) running at a flow rate of 20.0 mL/min.

System D1: System C1 with visible detection at 450 nm.

System D2: System C2 with visible detection at 450 nm.

System E: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μ m, 10 $\times$ 250 mm) with CH₃CN and aq. TFA 0.1% as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 5% (10 min), 5% to 10% (10 min), and 10% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 3.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 254 and 320 nm.

System F: System E with visible detection at 450 nm.

System G: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈, 5 μ m, 2.1 $\times$ 150 mm) with CH₃CN and formic acid 0.1% (FA 0.1%) as eluents [90% FA (2 min), then linear gradient from 10 to 50% (13 min) and 50 to 90% (27 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL/min. UV detection was achieved at 260 nm. ESI-MS detection was achieved in both the positive and negative modes (mass range 75–750 a.m.u., centroid mode).

N-(4-(Hydroxymethyl)phenyl)-2-phenylacetamide (3). *para*-Aminobenzyl alcohol **2** (322 mg, 2.61 mmol) was dissolved in a mixture of dry CH₂Cl₂/DMF (8:1, v/v, 9 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Dry pyridine (430 μ L, 5.4 mmol) and phenylacetyl chloride **1** (340 μ L, 2.57 mmol) were sequentially added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, the mixture was concentrated under reduced pressure, then CH₂Cl₂ (50 mL) was added and the organic layer was washed with aq. citric acid (10%, w/v, 30 mL) and deionized water (30 mL). The aqueous layer was extracted twice with CH₂Cl₂ (30 mL); the combined organic

layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by chromatography on a silica gel column with a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (7:3, v/v) as the mobile phase, affording phenylacetamide **3** as a white solid (481 mg, 78%). R_f 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 7:3, v/v). IR (KBr) 3304, 3202, 3131, 1660, 1606, 1534, 1518, 1411, 1335, 1260, 1141, 1051 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 3.69 (s, 2H, ArCH_2), 4.57 (s, 2H, CH_2OH), 7.30–7.37 (m, 7H, 2 ArH_{PABA} + 5 ArH), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2 ArH_{PABA}). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CD_3OD): δ 44.7, 64.8, 121.2, 127.9, 128.6, 129.6, 130.1, 136.8, 138.6, 139.0, 172.3. MS (ESI, positive mode): m/z 242.27 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ 242.12.

General Procedure for the Synthesis of the PGA Fluorogenic Probes. (a) *Preparation of the Mesylate Ester of 4.* Alcohol **3** (443 mg, 1.84 mmol) was dissolved in dry acetone (23 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Triethylamine (770 μL , 5.5 mmol) and mesyl chloride (425 μL , 5.5 mmol) were sequentially added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, CH_2Cl_2 (20 mL) was added and the solution was poured into cold 2 N aq HCl. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (30 mL), and the combined organic layers were washed with deionized water (30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure, yielding mesylate ester **4** as a white solid. The crude product was quite unstable and was used without purification in the next step. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.69 (s, 2H, ArCH_2), 4.49 (s, 2H, CH_2OH), 7.22–7.40 (m, 9H, ArH). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 44.7, 46.2, 52.8, 120.5, 127.8, 129.4, 129.6, 129.7, 133.8, 134.6, 138.0.

(b) *Coupling Reaction of 4 with the Fluorescent Label.* The phenol-based fluorophore was dissolved in dry CH_2Cl_2 (for 7-hydroxycoumarin **5a**, 0.1 M final concentration) or in dry DMF (for 2-hydroxy Nile Red **5b**, DDAO **5c** and DAO **5d**, 0.1 M final concentration). Anhydrous K_2CO_3 (2 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, compound **4** (1 equiv) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B), and evaporated under reduced pressure. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the organic layer was washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The crude product was purified by RP-HPLC (system C1 for **6a**, system D1 for **6b**, **6c**, and **6d**) to give after lyophilization the corresponding PGA probe in a pure form.

PGA Fluorogenic Probe (6a). White amorphous powder, overall yield 28%. R_f 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 1:1, v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.66 (s, 2H, ArCH_2), 4.96 (s, 2H, CH_2OH), 6.15 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 6.74–6.81 (m, 2H, ArH_{Coum}), 7.15–7.31 (m, 8H, ArH + ArH_{PABA} + ArH_{Coum}), 7.39 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ArH_{PABA}), 7.54 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH_{Coum}). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 45.1, 70.4, 102.2, 113.5, 113.6, 120.3, 128.0, 128.7, 129.1, 129.6, 129.8, 132.0, 134.7, 138.1, 143.8, 156.0, 161.6, 162.1, 169.6. MS (ESI, positive mode): m/z 386.33 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ 386.14. HPLC (system B): t_R = 29.4 min (purity >95%). UV (CH₃CN, 25 °C): λ_{max} = 275 nm (63 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

PGA Fluorogenic Probe (6b). Red amorphous powder, overall yield 5%. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.20 (t, 6H, J = 7.0 Hz, 2 CH_3), 3.55 (q, 4H, J = 7.0 Hz, 2 CH_2CH_3), 5.29 (s, 2H, ArCH_2CO), 6.25 (s, 1H, ArH), 6.72 (s, 1H, ArH), 6.84–6.90 (m, 1H, ArH), 7.20–7.42 (m, 6H, ArH), 7.50 (d, 2H, J = 9.0 Hz, ArH), 7.62–7.80 (m, 3H, ArH), 8.05–8.12 (m, 2H, ArH). MS (ESI, positive mode): m/z 558.27 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4$ 558.24. HPLC (system B): t_R = 31.7 min (purity 90%). UV–vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): λ_{max} = 543 nm.

PGA Fluorogenic Probe (6c). Orange amorphous powder, overall yield 7%. R_f 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 3:2, v/v). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.78 (s, 3H, CH_3), 1.85 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 2H, ArCH_2), 5.04 (s, 2H, CH_2OH), 6.66–6.69 (m, 1H, ArH_{DDAO}), 7.13 (s, 1H, ArH_{DDAO}), 7.30–7.51 (m, 10H, 5 ArH + 4 ArH_{PABA} + ArH_{DDAO}), 7.63 (s, 1H, ArH_{DDAO}), 7.75 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 29.1, 38.4, 45.2, 75.0, 114.1, 114.3, 120.0, 120.3, 128.1, 128.8, 128.9, 129.1, 129.6(6), 129.7, 129.9, 130.6, 132.5, 132.9, 133.7, 134.6, 138.3, 139.8, 140.4, 141.0, 141.3, 148.7, 153.0, 153.5, 169.5, 187.7. MS (ESI, positive mode): m/z 553.33 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{NaN}_2\text{O}_3$ 553.11. HPLC (system B): t_R = 36.8 min (purity 94%). UV–vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): λ_{max} = 424 nm (15 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

PGA Fluorogenic Probe (6d). Orange amorphous powder, overall yield 14%. ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 1.57 (s, 6H, 2 CH_3), 3.70 (s, 2H, ArCH_2), 5.20 (s, 2H, CH_2OH), 6.55 (dd, J = 2.0 and 10.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 6.68 (d, J = 2.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.07 (dd, J = 3.0 and 9.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.22–7.48 (m, 9H, 5 ArH + 2 ArH_{PABA} + 2 ArH_{DAO}), 7.60 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 2H, 2 ArH_{PABA}). ^{13}C NMR (75.4 MHz, acetone- d_6): δ 32.2, 37.7, 44.3, 70.3, 113.4, 114.4, 119.6, 127.1, 127.6, 128.8, 129.1, 129.7, 131.3, 132.1, 134.0, 136.4, 137.2, 139.9, 140.2, 142.0, 148.1, 150.8, 161.7, 169.4, 186.8. MS (ESI, positive mode): m/z 463.13 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_3$ 463.20. HPLC (system B): t_R = 31.6 min (purity 95%). UV–vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): λ_{max} = 458 nm (17 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Fully Protected Caspase-3 Latent Blue Fluorophore (10). PABA carboxamide derivative **8** (152 mg, 0.16 mmol) was dissolved in dry acetone (2 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Then, triethylamine (67 μL , 0.48 mmol) and mesyl chloride (37 μL , 0.48 mmol) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Thereafter, the reaction was quenched by dilution with CH_2Cl_2 (5 mL) and pouring in cold 2 N aq HCl. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (2 $\times$ 10 mL). The combined organic layers were washed with deionized water (10 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness, affording the mesylate ester **9** as a yellow solid. This crude product was used without purification in the next step. 7-Hydroxycoumarin **5a** (29 mg, 0.18 mmol, 1.1 equiv based on the former step) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (2 mL). Anhydrous K_2CO_3 (44 mg, 0.32 mmol, 2 equiv) was added and the mixture was stirred for 20 min, allowing the solution to become yellow-colored. Then, the crude mesylate ester in solution in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Thereafter, CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the resulting solution was washed with deionized water (10 mL). The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The crude product was purified by RP-HPLC (system C2), to give after lyophilization the corresponding fully protected caspase-3 pro-fluorophore **10** as a white amorphous powder (32 mg, 25%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.96–1.02 (m, 12H, 3 CH_2Si + 2 CH_3Val), 2.07 (s, 3H, CH_3), 2.10–2.20 (m, 2H, CH_2Glu), 2.32–2.39 (m, 1H, CHCH_3), 2.51–2.62 (m, 2H, CH_2COGlu), 2.85–3.12 (m, 4H, 2 CH_2Asp), 4.02–4.28 (m, 8H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Val}}$ + $\text{C}^*\text{H}_{\text{Glu}}$ + 3 OCH_2), 4.67–4.73 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 4.95–5.12 (m, 3H, ArCH_2O + $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 6.24 (d, J = 9.0 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 6.84–6.92 (m, 2H, 2 ArH_{Coum}), 7.09 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.20 (d, J = 7.0 Hz, 1H, NH_{Val}), 7.34–7.37 (m, 3H, 2 ArH_{PABA} + ArH_{Coum}), 7.58–7.64 (m, 2H, ArH_{Coum} + NH_{Asp}), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H, ArH_{PABA}), 8.47 (d, J = 3.0 Hz, 1H, NH_{Glu}), 8.67 (s, 1H, NH_{PABA}). ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.2 (9C), 17.6

(3C), 18.1, 19.6, 23.3, 25.3, 29.3, 31.6, 36.0, 36.8, 50.3, 51.1, 56.9, 60.7, 63.6, 64.3, 64.4, 70.6, 102.3, 113.0, 113.5, 113.6, 120.6 (2C), 128.6 (2C), 129.0, 131.5, 138.7, 143.8, 156.1, 161.6, 162.2, 169.0, 171.3, 171.4, 171.9, 172.5, 172.8, 172.9, 176.0. MS (ESI, positive mode): m/z 1068.40 $[M + H]^+$, calcd for $C_{51}H_{78}N_5O_{14}Si_3$ 1068.49. HPLC (system A): t_R = 42.0 min (purity >98%).

Caspase-3 Latent Blue Fluorophore (11). Fully protected pro-fluorophore **10** (12 mg, 11.2 μ mol) was dissolved in dry NMP and anhydrous CsF salt (31 mg, 210 μ mol) was added. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature. Further amounts of CsF (80 equiv and 100 equiv) were added after 16 and 30 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). Fully protected peptide starting material was completely consumed after 40 h. Finally, the reaction mixture was quenched by dilution with 0.1% aq TFA (3 mL) and purified by RP-HPLC (system E). The product-containing fractions were lyophilized to give the caspase-3 pro-fluorophore **11** as a pale yellow amorphous powder (8.0 mg, quantitative yield). IR (KBr) 3278, 2971, 2883, 1742, 1686, 1664, 1618, 1542, 1490, 1384, 1197, 1140 cm^{-1} . 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.84–0.89 (m, 6H, $2CH_{3Val}$), 1.70–2.10 (m, 6H, $CHCH_3 + CH_{2Glu} + CH_3$), 2.25–2.31 (m, 2H, CH_2CO_{Glu}), 2.52–2.80 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 4.15–4.21 (m, 1H, C^*H_{Val}), 4.35–4.41 (m, 1H, C^*H_{Glu}), 4.50–4.54 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.67–4.73 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 5.18 (s, 2H, $ArOCH_2$), 6.33 (d, J = 9.4 Hz, 1H, $ArH_{C_{coum}}$), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 1H, $ArH_{C_{coum}}$), 7.11 (s, 1H, $ArH_{C_{coum}}$), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 2H, $2ArH_{PABA}$), 7.66 (m, 3H, $ArH_{C_{coum}} + 2ArH_{PABA}$), 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH_{Val}), 8.01–8.15 (m, 3H, $ArH_{C_{coum}} + NH_{Glu} + NH_{Asp}$), 8.42 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH_{Asp}), 10.00 (s, 1H, $COOH$), 12.2–12.5 (m_{broad} , 2H, $2COOH$). MS (ESI, positive mode): m/z 768.20 $[M + H]^+$, calcd for $C_{36}H_{42}N_5O_{14}$ 768.27. HPLC (system A): t_R = 23.6 min (purity 95%). UV (caspase-3 buffer, 37 °C): λ_{max} = 250 and 320 nm ($17\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$).

Fully Protected Caspase-3 Latent Far-Red Fluorophore (12). 7-Hydroxy-9H-(9,9-dimethylacridin-2-one) (DAO) **5d** (10 mg, 42 μ mol) was dissolved in dry DMF (800 μ L). Anhydrous K_2CO_3 (12 mg, 84 μ mol) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min, allowing the solution to become blue-colored. Then, mesylate ester **9** (35 mg, 35 μ mol) was added and the labeling reaction mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Thereafter, CH_2Cl_2 (15 mL) was added and the organic layer was washed with deionized water (7 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness. The crude product was purified by RP-HPLC (system D2), to give after lyophilization the corresponding fully protected caspase-3 pro-fluorophore **12** as an orange amorphous powder (4 mg, 13%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.02 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.05 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.78–1.02 (m, 12H, $3CH_2Si + 2CH_{3Val}$), 1.19 (s, 3H, CH_{3DAO}), 1.25 (s, 3H, CH_{3DAO}), 1.95–2.20 (m, 5H, $CH_{2Glu} + CH_3$), 2.25–2.39 (m, 1H, $CHCH_3$), 2.45–2.62 (m, 2H, CH_2CO_{Glu}), 2.80–3.12 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 3.95–4.22 (m, 8H, $C^*H_{Val} + C^*H_{Glu} + 3OCH_2$), 4.65–4.72 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.95–5.09 (m, 3H, $ArCH_2O + C^*H_{Asp}$), 6.58–6.66 (m, 3H, $3ArH_{DAO}$), 6.93–6.97 (m, 1H, ArH_{DAO}), 7.08–7.12 (m, 2H, $NH_{Val} + NH_{Asp}$), 7.35–7.41 (m, 3H, $ArH_{DAO} + 2ArH_{PABA}$), 7.58–7.63 (m, 2H, $NH_{Asp} + ArH_{DAO}$), 7.77–7.80 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $2ArH_{PABA}$), 8.47 (d, J = 4.2 Hz, 1H, NH_{Glu}), 8.67 (s, 1H, NH_{PABA}). MS (ESI, positive mode): m/z 1145.33 $[M + H]^+$, calcd for $C_{57}H_{85}N_6O_{13}Si_3$ 1145.55. HPLC (system A): t_R = 39.5 min (purity 90%).

Caspase-3 Latent Far-Red Fluorophore (13). Fully protected peptide **12** (3.0 mg, 2.6 μ mol) was dissolved in dry NMP. A large excess of anhydrous CsF salt (79.0 mg, 520 μ mol) was

added and the deprotection reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). Finally, the reaction mixture was quenched by dilution with 0.1% aq TFA (3 mL) and purified by RP-HPLC (system F). The product-containing fractions were lyophilized to give the caspase-3 pro-fluorophore **13** as an orange amorphous powder. This fluorogenic caspase-3 substrate was water-solubilized through its conversion into the tris- NH_4^+ salt by brief treatment with 5 μ L of 3% aq NH_4OH followed by lyophilization. Quantification was achieved in caspase-3 buffer at λ_{max} = 457 nm by using the ϵ value $6500\,M^{-1}\,cm^{-1}$ (yield after RP-HPLC purification: 82%). MS (ESI, negative mode): m/z 843.33 $[M - H]^-$, calcd for $C_{42}H_{47}N_6O_{13}$ 843.32. HPLC (system A): t_R = 25.8 min (purity 91%). UV-vis (caspase-3 buffer, 37 °C): λ_{max} = 247 and 457 nm ($6500\,M^{-1}\,cm^{-1}$).

General Procedure for the *in Vitro* Cleavage PGA Fluorogenic Probes by Immobilized Penicillin Amidase.

(a) *Fluorescence Assay.* A solution of PGA fluorogenic probe (final concentration: 2.6 μ M for **6a** and 2.2 μ M for **6d**) was prepared with a mixture of phosphate buffer (PB, 50 mM, pH 7.4) and acetone (PB/acetone, 8:2, v/v). 1.25 mL of this solution was transferred into a semimicro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 $\times$ 4 mm, 1400 μ L) and immobilized penicillin amidase (6.4 U, 64 mg) was added. The resulting mixture was incubated at 37 °C. Fluorescence emission of the enzymatically released phenol-based fluorophore (i.e., 7-hydroxycoumarin **5a** at λ = 460 nm or DAO **5d** at λ = 651 nm) was monitored over time with measurements every 6 s, after excitation at λ = 360 nm (for **5a**) or 638 nm (for **5d**). The same conditions were applied to the control sample without adding the enzyme and no significant fluorescence signal was detected.

(b) *Characterization of Cleavage by RP-HPLC.* PGA fluorogenic probe was dissolved (final concentration: 1.65 mM for **6a** and 1.2 mM for **6d**) in a mixture of phosphate buffer and acetone (PB/acetone 8:2, v/v, 2 mL). For the fluorogenic probe **6d**, 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (46 mg, 35 μ mol) was added to improve the solubility in the aq buffer. Immobilized penicillin amidase (16.7 U, 167 mg for **6a** or 15.0 U, 150 mg for **6d**) was added and the resulting suspension was stirred at 37 °C for 24 h. Periodically, 100 μ L of the crude enzymatic mixture were sampled (the biocatalyst was filtered off), dissolved with 300 μ L of triethylammonium acetate buffer (TEAA, 100 mM, pH 7.0), and analyzed by RP-HPLC (system A, injection volume: 10 μ L). Quantification of **5a/6a** (or **5d/6d**) was achieved by measurement of the corresponding peak areas at t_R = 15.6 and 29.3 min (or t_R = 21.2 and 31.5 min).

Optical Properties of DAO 5d. The absorption spectrum of DAO was recorded (220–900 nm) in PBS (0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.4) (a 4.2 mM stock solution was prepared in DMSO and diluted with PBS to reach a final concentration of 14.0 μ M) at 25 °C. Emission spectrum was recorded under the same conditions after excitation at 610 nm (excitation and emission slit = 5 nm). Relative quantum yield was measured in PBS at 25 °C by a relative method using sulfo cyanine dye Cy 5.0 (Φ_F = 0.20 in PBS (43)). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(DAO) = (A_{Cy5.0}/A_{DAO})(F_{DAO}/F_{Cy5.0})(n_{DAO}/n_{Cy5.0})^2\Phi_F(Cy\,5.0) \quad (1)$$

where A is the absorbance (in the range 0.01–0.1 A.U.), F is the area under the emission curve (620–850 nm after excitation at 610 nm), and n is the refractive index of the solvent (at 25 °C) used in measurements (n = 1.337 for PBS). The slopes were determined to be: 9.65×10^4 and 2.43×10^5 (R^2 = 0.99) for DAO and Cy 5.0, respectively.

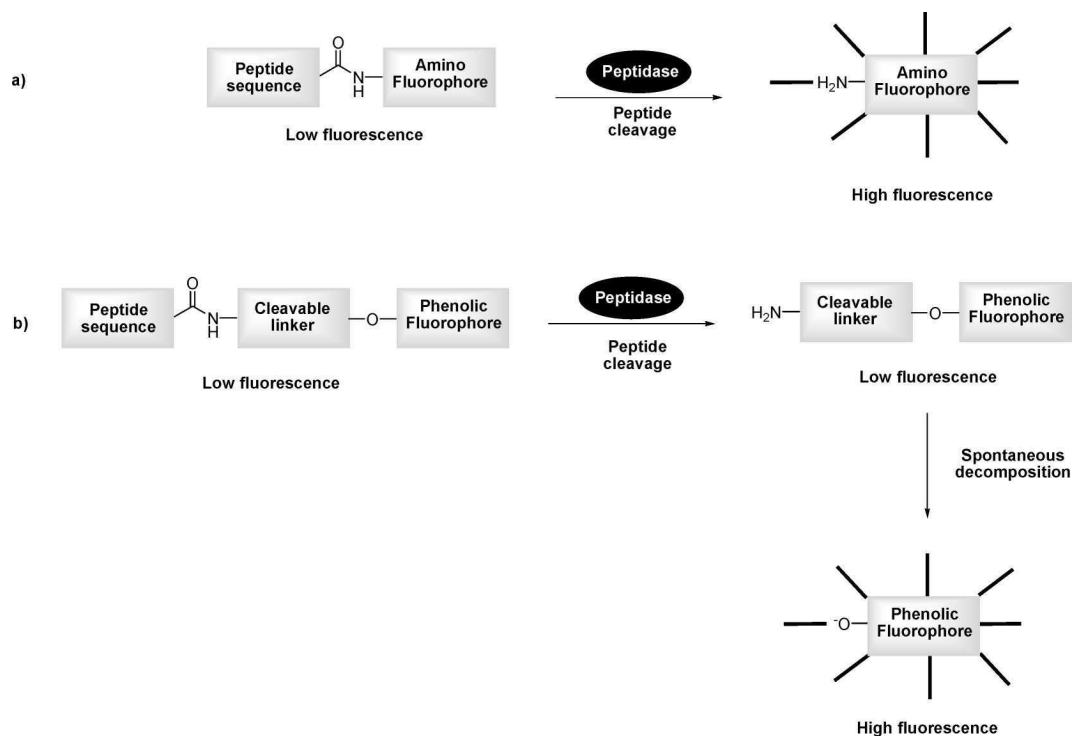


Figure 1. General mechanisms of the activation of pro-fluorophores by proteolytic enzymes. (a) Release of aniline-based fluorophores. (b) Release of phenol-based fluorophores through a self-immolative strategy.

General Procedure for the *in Vitro* Cleavage of Latent Blue and Far-Red Fluorophores **11 and **13** by Recombinant Human Caspase-3.** (a) *Fluorescence Assay.* A solution of latent fluorophore (final concentration: 3.0 μM for **11** and 23.0 μM for **13**) was prepared with the following caspase-3 buffer: 100 mM NaCl, 40 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, and 0.1% (w/v) CHAPS, pH 7.4. 50 μL of this solution were transferred into an ultramicro fluorescence cell (Hellma, 105.51-QS, 3×3 mm, 45 μL), human recombinant caspase-3 (1 μL , 1.6×10^{-3} U for **11** and 2 μL , 3.2×10^{-3} U for **13**) was added and the resulting mixture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. Fluorescence emission of the enzymatically released phenol-based fluorophore (i.e., 7-hydroxycoumarin **5a** at $\lambda = 460$ nm or DAO **5d** at $\lambda = 651$ nm) was monitored over time with measurements every 5 s, after excitation at $\lambda = 360$ nm (for **5a**) or 638 nm (for **5d**). The same conditions were applied to the control sample solution without adding enzyme. No significant fluorescence signal was detected.

(b) *Determination of the Kinetic Parameters for the Caspase-3 Hydrolysis of **11**.* Latent blue fluorophore **11** was diluted in caspase-3 buffer at the following concentrations 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , and 3.125 μM and put into a black clear-bottom 96-multiwell plate. Then, 1.0 pmol of recombinant human caspase-3 preheated during 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ was added (final concentration: 20 nM). The reaction was monitored with FlexStation for 2 h with measurements every 30 s (Ex. $\lambda = 370$ nm, Em. $\lambda = 460$ nm, 37 $^{\circ}\text{C}$, cutoff filter $\lambda = 455$ nm). A calibration curve using umbelliferone **5a** was used to convert relative fluorescence units in mole of transformed product. Initial velocity V_0 was measured for each substrate concentration, and K_M , V_{max} , k_{cat} , and k_{cat}/K_M values were determined with the double-inverse Lineweaver–Burk relationship. The determination of the kinetic parameters was performed in triplicate; the kinetic constants presented are an average of the values found.

RESULTS AND DISCUSSION

Choice of the Self-Immolative Linker. During the past decade, numerous self-immolative linker strategies have been

developed for the design of efficient prodrugs of various pharmaceuticals (29) and functionalized solid supports suitable for the synthesis of organic compound libraries through combinatorial or parallel methods (44–47). As suggested in some recent publications (30, 34), the use of a self-cleavable linker as a spacer unit between the peptidyl substrate and a fluorescent label is potentially beneficial to improve both enzymatic reactivity and spectral properties (especially in the far-red to NIR region) and to reduce the background noise associated with nonspecific hydrolysis of the resulting pro-fluorophore compared to “standard” two-component fluorogenic protease substrates. Indeed, the self-decomposition of the linker through a protease-initiated domino reaction allows the release of a wide range of fluorophores bearing an aniline, a phenol, or a thiophenol moiety (48). Therefore, structures more sophisticated than basic carboxamide derivatives of fluorescent amines (i.e., 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), rhodamine 110, or cresyl violet) can be envisaged to get protease-activated optical probes with excellent analytical properties (Figure 1). In this context, we first explored the use of the enzyme-labile safety catch linker recently reported by Grether and Waldmann, which allows the release of alcohols or amines through an original enzyme-initiated lactam-cyclization (49, 50). A latent blue fluorophore of penicillin amidase derived from this traceless linker was prepared in six steps from homovanilinic acid; however, *in vitro* cleavage experiments (fluorescence and HPLC assays) with PGA have clearly shown the moderate stability of its ester linkage under simulated physiological conditions due to the good leaving-group character of the 7-hydroxycoumarin fluorophore employed. Consequently, we decided to graft the phenol-based fluorophore through a less reactive ether bond by using the commercially available *para*-aminobenzyl alcohol (PABA) as the self-immolative spacer (Figure 2) (51). PABA is one of the most popular self-immolative linker applicable in prodrug design (52) and its utility in the field of spectroscopic bioprobes was recently demonstrated by Jones et al. through the design of an image contrast agent employing AMC as fluorophore and

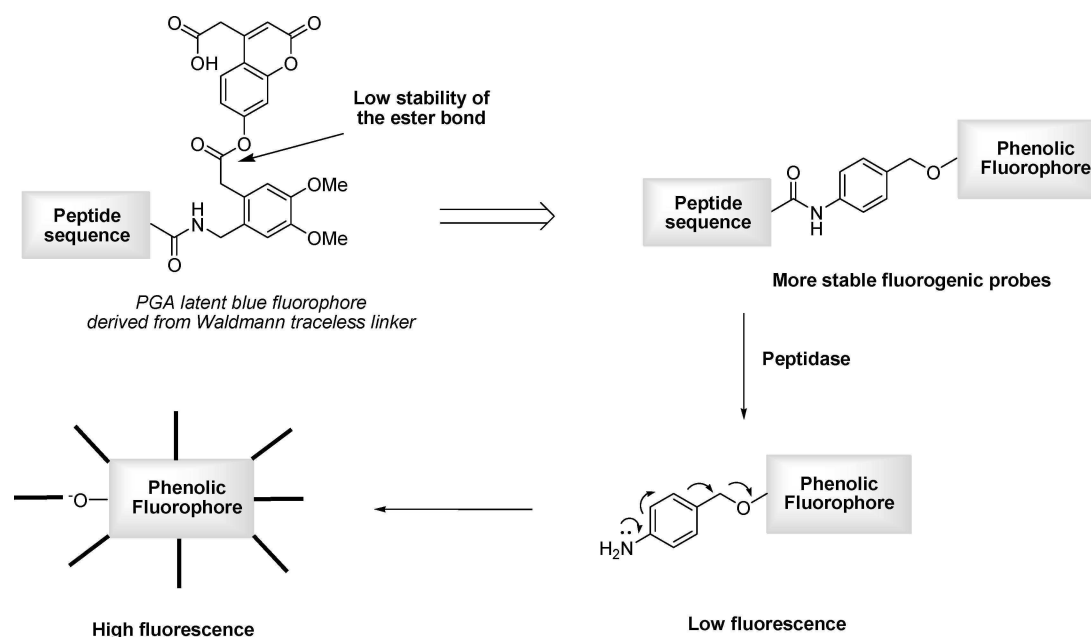


Figure 2. General structure of the first generation peptidase-sensitive pro-fluorophores based on the Waldmann enzyme-labile safety catch linker. General structure of the second generation peptidase-sensitive pro-fluorophores and principle of their activation through the self-immolation of PABA linker.

selective activation by the serine protease prostate specific antigen (PSA) (30).

Penicillin Amidase-Sensitive Pro-Fluorescent Probes. To validate our self-immolative approach in the context of protease-sensitive pro-fluorescent probes, we first carried out assays with penicillin amidase (PGA), a commercially available and widely used biocatalyst in the enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics, since it allows the deprotection of phenacetyl protected amines (53). As this enzyme is inexpensive and readily available under an immobilized form which tolerates the use of an organic cosolvent such as acetone or methanol, it is widely employed as a suitable reagent or catalyst in organic synthesis especially for the selective deprotection of amino groups within complex molecular architectures (dendrimers (54–56), peptides (57), and so forth), both in solution or on solid phase. Interestingly, the current method for *in vitro* detection of PGA activity relies on the use of phenylacetamide derivatives of fluorescent amines (e.g., AMC) as fluorogenic substrates (58). Thus, we synthesized a novel class of PGA-sensitive pro-fluorescent probes in order to check if the PABA moiety inserted between the fluorophore and the protease-reactive group of our latent fluorophores was suitable to fulfill all requirements for biomolecular imaging applications: (1) changes of the fluorescence properties (especially significant increase in emission intensity) upon reaction with enzyme, (2) chemical stability under physiological conditions, and (3) efficiency of the enzyme-initiated fluorophore releasing process. Theoretically, our latent fluorophore strategy is applicable to all labeling dyes having a phenol moiety whose acylation (or alkylation) significantly affects their fluorescence properties. However, as *in cellulo* and *in vivo* applications require the use of fluorescent compounds exhibiting a significant emission in the range 450–750 nm (650–750 nm for *in vivo*) our choice was guided toward four well-known fluorescent phenols, namely, 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) **5a**, 2-hydroxy Nile Red **5b**, 7-hydroxy-9*H*-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one) (DDAO) **5c**, and 7-hydroxy-9*H*-(9,9-dimethylacridin-2-one) (DAO) **5d**. The corresponding PGA-sensitive pro-fluorescent probes were prepared as shown in Scheme 1. condensation of the fluorescent phenol with the phenylacetamide derivative of PABA **3** was achieved by a nucleophilic substitution of the mesylate derivative **4**. Purification of all pro-

fluorophores was performed by semipreparative RP-HPLC using 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA, pH 2.0) and acetonitrile as eluents (overall yields for two steps 10–28%). The modest isolated yields are explained by the competitive degradation of **4** under basic reaction conditions and the significant loss of fluorogenic substrate during the subsequent chromatographic purification. All spectroscopic data, especially NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structures assigned.

The spectral properties of the four novel PGA-sensitive pro-fluorophores were evaluated, compared with those of the corresponding parent phenol-based fluorophore, and collected in Table 1 (for their emission spectra compared with those of free fluorophores, see Supporting Information). The pro-fluorescent probes **6a**, **6c**, and **6d** displayed the expected hypsochromic shift of excitation and emission spectra relative to the free fluorophores and exhibited no significant fluorescence at the maximum emission wavelength of the corresponding parent phenol dye (460 nm for **5a**, 651 nm for **5c** and **5d**). Indeed, the chemical modification of the hydroxyl group (i.e., modification of the phenol either to an ether or an ester) of a fluorescent phenol is known to effectively quench its fluorescence (59) and this property has already been used to design efficient fluorogenic probes for detection of β -galactosidase, β -lactamases, and phosphatases (1). However, we observed that this particular trend for phenol-based fluorophores was not followed by the benzophenoxazine derivative **6b**, because in our measurements, its fluorescence intensity showed only a 2-fold decrease compared to the parent 2-hydroxy Nile Red and the expected blue-shift of its maximum emission wavelength was not observed. This result is consistent with an earlier report from Briggs et al. showing that the esterification of the hydroxyl group of Nile Red derivatives does not significantly affect their optical properties and prevents the use of such phenol-based fluorophores in the context of fluorogenic probes based on the pro-fluorescence concept (41). Furthermore, during the course of our spectroscopic studies, we observed an anomalous behavior of the pro-fluorophore **6c** whose fluorescence significantly increases during incubation with a 8:2 mixture of phosphate buffer (PB, pH 7.4) and acetone. This nonenzymatic fluorescence unveiling of probe **6c** was attributed to the release of the DDAO dye through the hydrolytic cleavage of its ether

Scheme 1. Synthesis of PGA-Sensitive Pro-Fluorescent Probes

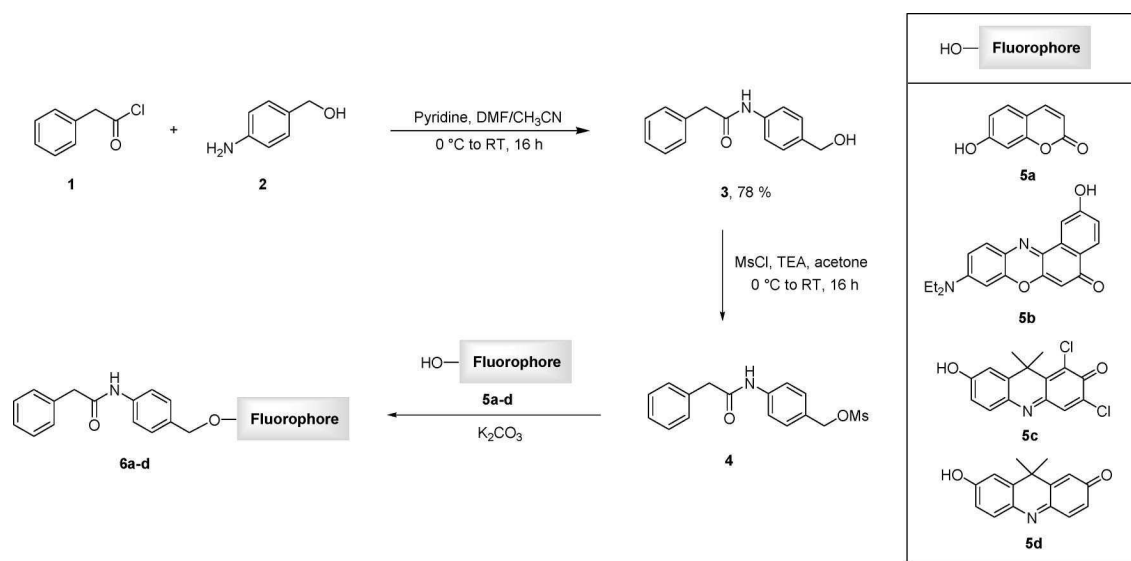


Table 1. Fluorescence Excitation and Emission Wavelengths of PGA-Sensitive Pro-Fluorophores and the Free Phenol Dyes Released by the Enzyme-Initiated Domino Reaction

compound	PGA pro-fluorophore ^a			free fluorophore ^a	
	excitation (nm)	emission (nm)	fluorescence intensity ^b	excitation (nm)	emission (nm)
6a	275	nonfl	nonfl	360	460
6b	530	652	2-fold reduction	582	655
6c	- ^c	- ^c	- ^c	636	651
6d	458	599	8.5-fold reduction	638 ^d	651 ^d

^a All spectral properties were determined in a 8:2 (v/v) mixture of phosphate buffer (PB, 50 mM, pH 7.4) and acetone at 25 °C. ^b Calculated by the fluorescence intensity ratio between pro-fluorophore and free fluorophore at the same concentration. ^c Compound **6c** was found to be unstable in the mixture PB/acetone. ^d The fluorescence quantum yield of free DAO **5d** is 0.079 (determined in PBS at 25 °C by using sulfoeyanine dye Cy 5.0 ($\Phi_F = 0.20$ in PBS at 25 °C (43) as a standard) and the molar extinction coefficient at $\lambda_{\max} = 633$ nm is $24\,450\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

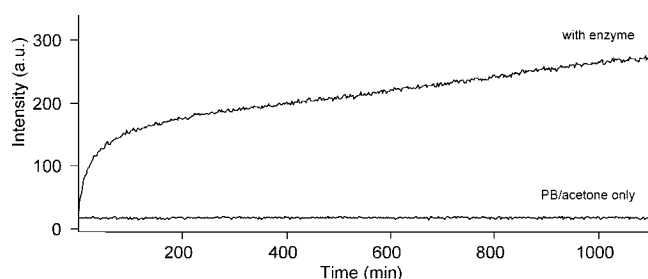


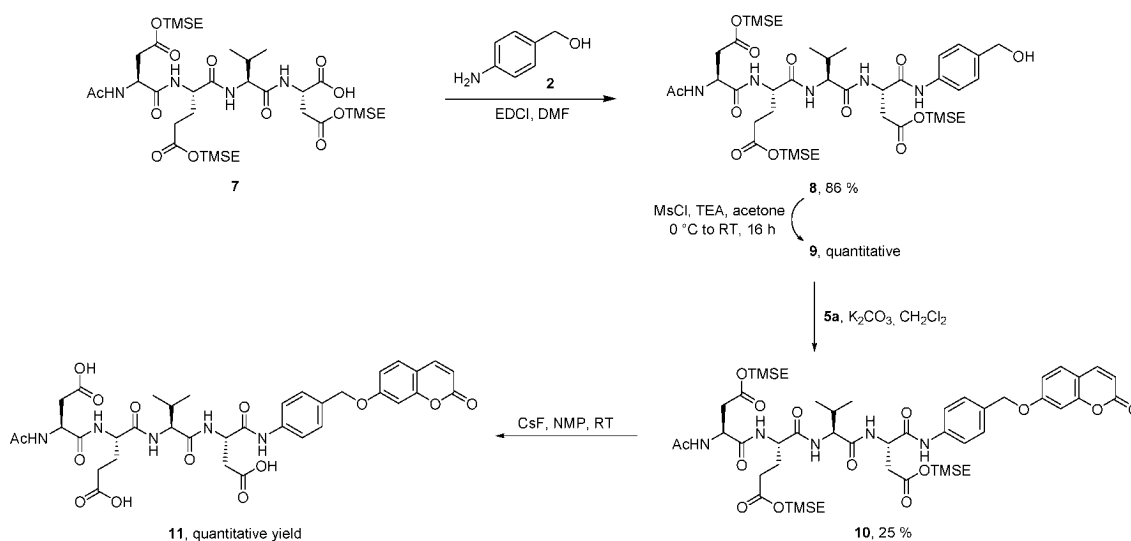
Figure 3. Fluorescence emission time course of pro-fluorescent probe **6d** (concentration $2.2\text{ }\mu\text{M}$) with immobilized penicillin amidase (6.4 U, incubation time 24 h at 37 °C) in a 8:2 (v/v) mixture of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and acetone at 651 nm (Ex. $\lambda = 638$ nm).

bond in neutral physiological conditions. Due to the presence of two chlorine atoms within its acridin-2-one core, DDAO is too good as a leaving group to be a valuable candidate for the latent fluorophore strategy. Surprisingly, the low chemical stability of fluorogenic substrates using DDAO as a pro-fluorescent label in aqueous solution has never been observed and reported in the literature, whereas some DDAO esters and ether derivatives of biomolecules (i.e., β -D-galactopyranose, nucleotide polyphosphates) have been developed and successfully used to monitor enzyme activities *in vivo* or as reagents for various homogeneous nucleic acid assays (23, 60).

Finally, only the two completely quenched and stable pro-fluorophores **6a** and **6d** were tested against immobilized PGA. As an illustrative example, the time-course for the amidase catalyzed hydrolysis of **6d** is shown in Figure 3 (see Supporting Information for results obtained with **6a**). After adding immobilized PGA to the substrate solution, a strong fluorescence

signal generated at 651 nm indicated the catalytic cleavage of the carboxamide bond and the release of the free DAO dye. Furthermore, no nonspecific cleavage of the probe was detected in a control reaction where **6d** was incubated only with the mixture PB/acetone (8:2, v/v). Overall, these results confirm that the latent red fluorophore **6d** is a substrate for penicillin amidase. In addition to these spectral measurements, RP-HPLC analyses of the enzymatic hydrolysis mixture of **6d** were performed to prove the identity of the released fluorescent phenol (i.e., DAO, $t_R = 15.6$ min) and the efficacy of this release process (see Supporting Information). Thus, we validated that the connection of a protease-sensitive substrate to a phenol-base fluorophore through a self-immolative PABA linker is an efficient way to obtain activatable pro-fluorescent probes exhibiting both chemical stability and enzymatic reactivity. We then extended the scope of this approach to the detection of a more challenging protease belonging to the caspase family (i.e., caspase-3) in an attempt to perform *in cellulo* and *in vivo* imaging of apoptosis.

Synthesis of Caspase-3 Sensitive Pro-Fluorescent Probes. Caspases are Cysteine-ASpartic-acid-ProTEASES that play a critical role as mediators for apoptotic cell death (61). Caspase-3 has been specifically identified as being a key mediator of apoptosis in mammalian cells (62): activation of caspase-3 indicates that the apoptotic pathway has progressed to an irreversible stage. As apoptosis disorders are involved in many diseases or malfunctionings such as ischemia, neurodegenerative diseases, or cancers, this protease is an attractive target for diagnostic and therapeutic applications through its detection in biological media using smart optical bioprobes. The main strategy for both *in vitro* and *in cellulo* sensing of caspase-3 relies on the use of fluorescent probes. Numerous

Scheme 2. Synthesis of Caspase-3 Latent Blue Fluorophore 11

latent blue or green fluorophores (i.e., peptide conjugated to 7-aminocoumarin or rhodamine fluorescent tags) (19, 20) and fluorogenic probes based on the fluorescence resonance energy transfer (FRET) mechanism (63–69) have been developed, and some of them are routinely used as caspase-3 substrates for enzyme and cell-based fluorescent assays. All these probes are based on the fact that upon binding with caspase-3, protease-mediated cleavage of their peptide substrate occurs after the aspartic acid residue at the C-terminal side. The preferred sequence for caspase-3 cleavage is Asp-Glu-Val-Asp. To our knowledge, only one caspase-3 latent red fluorophore derived from the oxazine dye cresyl violet and marketed under the Magic Red name by ICN Biomedicals and Immunochemistry Technologies has been reported in the literature (70). Despite the spectral properties of cresyl violet dye in the far-red region, which enable good tissue penetration and low background noise in biological samples, the poor solubility of this fluorogenic probe in aqueous-based media and its poor kinetics due to the bulky fluorescent moiety prevents its efficient use for *in vivo* real-time imaging of caspase-3 activity. In this context, we wished to develop a novel class of water-soluble and far-red-emitting caspase-3-sensitive pro-fluorescent probes based on the validated “PABA” strategy (*vide supra*). As a first step of this challenging project, we have considered the synthesis of original caspase-3 latent fluorophores from two well-known dyes (umbelliferone **5a** and DAO **5d**), both linked by a PABA moiety to the caspase-3 tetrapeptidyl substrate (Scheme 2). First, the fully protected Ac-Asp(OTMSE)-Glu(OTMSE)-Val-Asp(OTMSE)-OH tetrapeptide **7** was synthesized on the gram scale by solution-phase peptide synthesis according to a multistep procedure developed by us (38). The carboxylic acid functionalities of the side chains were protected as 2-trimethylsilylethyl esters (TMSE esters) (71, 72). This protecting group is stable to the solution-phase peptide synthesis conditions and can be removed by treatment with various fluoride ion sources under mild conditions fully compatible with the stability of the ether bond linking the fluorescent phenol to the PABA moiety. Thereafter, the PABA linker **2** was introduced at the C-terminal side of **7** and the corresponding benzylic alcohol **8** was obtained in good yield. The introduction of the phenol-based fluorophore was achieved through nucleophilic substitution and required the activation of alcohol **8**. Mitsunobu reaction, bromination with $\text{PPh}_3/\text{CBr}_4$, or esterification with tosyl chloride were explored but failed to yield the target phenol-reactive derivative. Finally, we found that the only way to readily activate the alcohol was its conversion into mesylate ester **9**. We suspected that steric

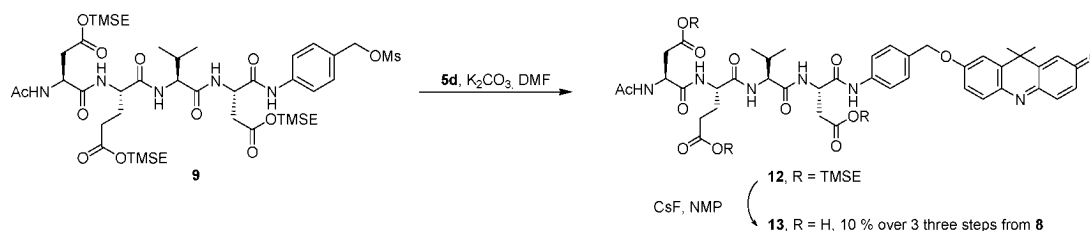
hindrance around the benzylic hydroxyl group probably induced by the tetrapeptide folding prevented the introduction of leaving groups bigger than mesylate. The resulting activated derivative was reacted with 7-hydroxycoumarin **5a** under mild basic conditions to give after purification by semipreparative RP-HPLC the fully protected pro-fluorescent probe **10** in 25% yield. Finally, the selective removal of the TMSE side chains protecting groups within the tetrapeptide scaffold was undertaken with different fluoride ion sources. No reaction was observed when an acidic fluoride ion source such as triethylamine-trishydrofluoride ($\text{TEA} \cdot 3\text{HF}$) was used. Mild basic fluoride ions provided by the tetrabutylammonium fluoride salt (TBAF or silica gel supported TBAF) allowed the complete deprotection of the TMSE esters, but isolation of the caspase-3-sensitive pro-fluorescent probe **11** in a pure form was not possible. Indeed, despite several semipreparative RP-HPLC purification runs (with aq TFA, 0.1% or deionized water as aq mobile phase), pro-fluorophore **11** was always found to be contaminated with significant amounts of tetrabutylammonium salts. This problem was circumvented by the use of tetramethylammonium fluoride (TMAF) or CsF which afforded the caspase-3 latent blue fluorophore **11** in a pure form with a quantitative yield.

To access longer wavelengths, we have applied the same synthetic strategy to the far-red dye DAO **5d** (Scheme 3). Sequential nucleophilic substitution, CsF-mediated deprotection, and final RP-HPLC purification afforded the caspase-3 latent far-red fluorophore **13** in a moderate 10% overall yield. The lower yield obtained for **11** was explained by the lower nucleophilic character of DAO compared to umbelliferone which directly affects the efficacy of the substitution step. To get a water-soluble fluorogenic caspase-3 substrate, **13** was converted into the corresponding tris- NH_4^+ salt by a brief treatment with 3% aq NH_4OH followed by lyophilization.

The structures of latent blue and far-red fluorophores **11** and **13** were confirmed by detailed analytical measurements, including ESI mass spectrometry and ^1H NMR analyses (see Figure 4 and Supporting Information).

Fluorescence Properties and Enzymatic Reactivity. Photophysical properties of fluorogenic probe **11** were evaluated in caspase-3 buffer (for the composition of this buffer, see Experimental Procedures section). This pro-fluorophore displayed the expected hypsochromic (~ 60 nm) and hypochromic shifts (10-fold diminution of fluorescence intensity) of emission spectrum relative to free umbelliferone (see Table 2 and Supporting Information). As this background fluorescence level

Scheme 3. Synthesis of Caspase-3 Latent Far-Red Fluorophore 13



was not affected by a prolonged incubation of **11** with caspase-3 buffer, the 7-O-substituted derivative of umbelliferone proved to be fully stable in the aq solution. Concerning the reactivity of **11** as a substrate for caspase-3, *in vitro* fluorescence assay was performed with the corresponding recombinant human protease. The increase of fluorescence upon enzyme-induced hydrolytic cleavage of **11** was indicative of single hit kinetics (see Supporting Information). Kinetic constants were calculated to be $k_{\text{cat}} = 5.6 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{m}} = 65.7 \mu\text{M}$, and $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 84\,852 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 5). Comparison with the apparent kinetic constants from commercially available Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC fluorogenic substrate ($k_{\text{cat}} = 0.75 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{m}} = 9.0 \mu\text{M}$, and $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} =$

Table 2. Fluorescence Excitation and Emission Wavelengths of Caspase-3-Sensitive Pro-Fluorophores and the Free Phenol Dyes Released by the Enzyme-Initiated Domino Reaction

compound	caspase-3 pro-fluorophore ^a			free fluorophore ^a	
	excitation (nm)	emission (nm)	fluorescence intensity ^b	excitation (nm)	emission (nm)
11	320	397	10-fold reduction	360	460
13	460	606	12-fold reduction	638	651

^a Spectral properties of **5a/11** were determined in caspase-3 buffer at 37 °C. Deionized water was used for compounds **5d/13** to avoid fluorescence quenching of DAO derivatives by DTT. ^b Calculated by the fluorescence intensity ratio between pro-fluorophore and free fluorophore at the same concentration.

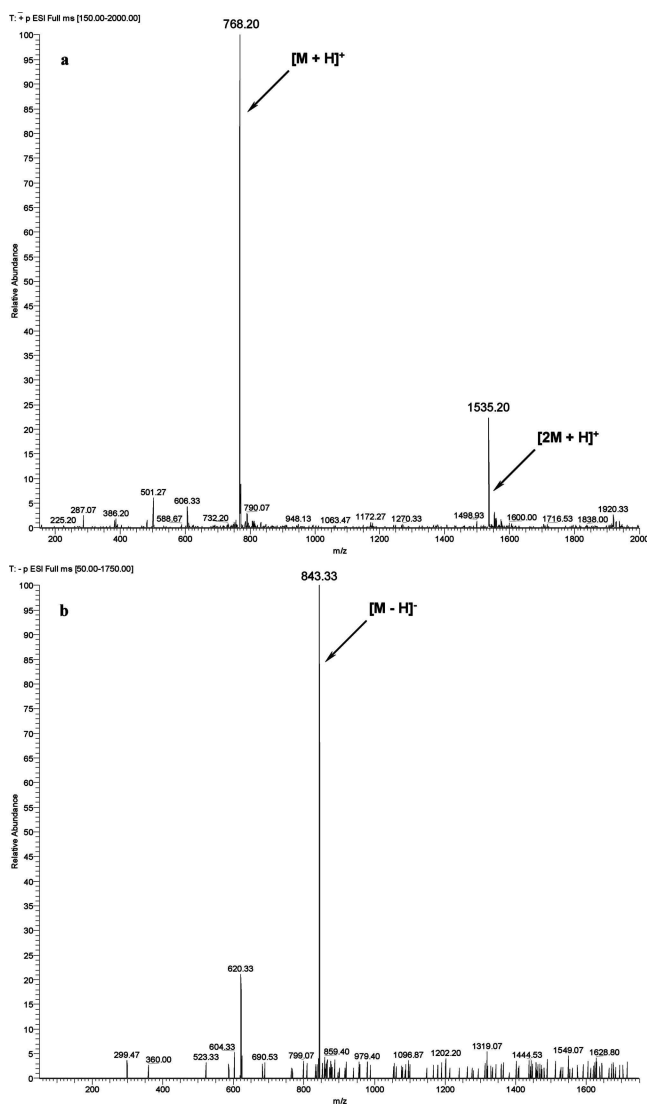


Figure 4. ESI mass spectra of caspase-3 latent fluorophores. (a) positive mode for compound **11** [M + H]⁺: m/z calcd mass 768.27, found 768.20. (b) negative mode for compound **13** [M - H]⁻: m/z calcd mass 843.32, found 843.33.

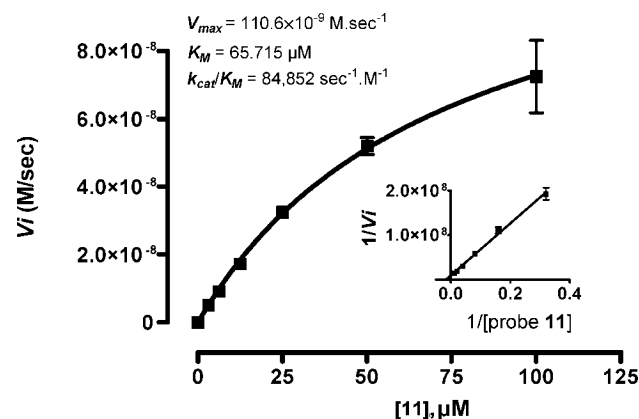


Figure 5. Michaelis–Menten plot for the hydrolysis of pro-fluorophore **11** (100 μM $\rightarrow$ 3.12 μM) by caspase-3.

83 300 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (73)) shows no significant increase in the $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ value, but a 7.5-fold improvement of the catalytic constant. Thus, the use of PABA linker not only maintained but even improved the recognition of the probe by the targeted enzyme. One can suspect that the beneficial effect of moving away the bulky fluorophore from peptidic substrate should be even more obvious with proteases exhibiting a lower degree of substrate tolerance. Besides this, further experiments aimed at demonstrating the utility of the pro-fluorescent reagent **11** for the measurement of apoptosis in whole cell assays are currently in progress and will be reported elsewhere.

The latent far-red fluorophore **13** was subjected to the same fluorescence measurements. As expected, alkylation of the 7-OH group of DAO caused a blue-shift of excitation and emission peaks of this acridin-2-one dye (Ex./Em. $\lambda = 460/606 \text{ nm}$ compared to 638/651 nm for DAO). However, contrary to the latent blue fluorophore **11**, the *in vitro* proteolytic cleavage experiment with caspase-3 gave unexpected results. Indeed, dissolution of the pro-fluorophore **13** in caspase-3 buffer resulted in a 12-fold quenching of its residual fluorescence emission at $\lambda = 606 \text{ nm}$ and, after the addition of protease, the red fluorescence of the released DAO dye did appear, but only after a delay correlated with both probe and buffer amounts (around 100 min in the representative experiment displayed in Figure 6). We suspected that one chemical component of the caspase-3

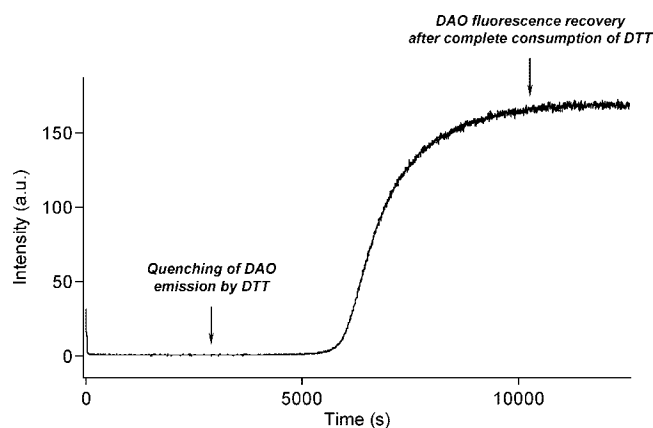


Figure 6. Fluorescence emission time course of pro-fluorescent probe **13** (concentration 23.0 μ M) with recombinant human caspase-3 (3.2×10^{-3} U, form: buffered aq glycerol solution containing 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (w/v) glycerol, and 0.1% (w/v) CHAPS) in deionized water (37 $^{\circ}$ C) at 651 nm (Ex. λ = 638 nm). (note: The expected level of fluorescence intensity for the released DAO was not reached because of irreversible quenching of some fluorophore molecules through their reaction with DTT.)

buffer should be responsible of this temporary fluorescence extinction. Further experiments have enabled the identification of the dithiol reducing agent DTT as the sole molecule reactive toward DAO dye. LC-MS analyses of the reaction mixture of free DAO **5d** with DTT were performed to check the formation of the nonfluorescent compound and to identify its structure (see Supporting Information). By analogy with the mechanism proposed by Kitson to explain the reaction between some 7-O-substituted derivatives of resorufin and β -mercaptoethanol (**74**), we proposed a pathway compatible with both the observed on/off fluorescence switch of **5d** mediated by the dithiol-reducing agent and the mass value determined for the reaction product (Figure 7): nucleophilic addition of a thiol group of DTT to the α,β -unsaturated imine moiety followed by tautomerization to give the aromatic ring of a phenol as an intermediate nonfluorescent product; this in turn is followed by an oxidation step to reform the acridinone moiety. Thereafter, the same two-step reaction sequence (i.e., nucleophilic addition and tautomerization) occurs with the remaining free thiol group to give the nonfluorescent product **14**. This clock reaction takes place until the complete consumption of reduced DTT which is progressively oxidized either by the atmospheric oxygen dissolved in buffer or through the reverse elimination reaction giving back the fluorescent DAO dye. This unexpected competing reaction does not represent an insuperable defect for *in vitro* applications of pro-fluorescent reagent **11**. However, its evaluation as a reporter molecule for *in cellulo* and *in vivo* imaging of caspase-3 activity cannot be considered due to high levels of thiols (e.g., glutathione) in living organisms.

CONCLUSION

We have demonstrated how common phenol-based fluorophores can be converted to sophisticated molecular tools suitable for protease sensing. The use of a self-cleavable PABA linker provided pro-fluorophores with high chemical stability while maintaining enzymatic reactivity. Furthermore, the modularity of two components of our latent fluorophores (i.e., the dye and the enzyme-reactive group) was demonstrated through the preparation of blue- and far-red-emitting fluorogenic substrates of two different proteolytic enzymes: PGA and caspase-3 protease. Particularly, the implementation of this latent fluorophore strategy to *in vitro* imaging has led us to a ca. 10-fold increase of the enzyme velocity toward the fluorogenic pseu-

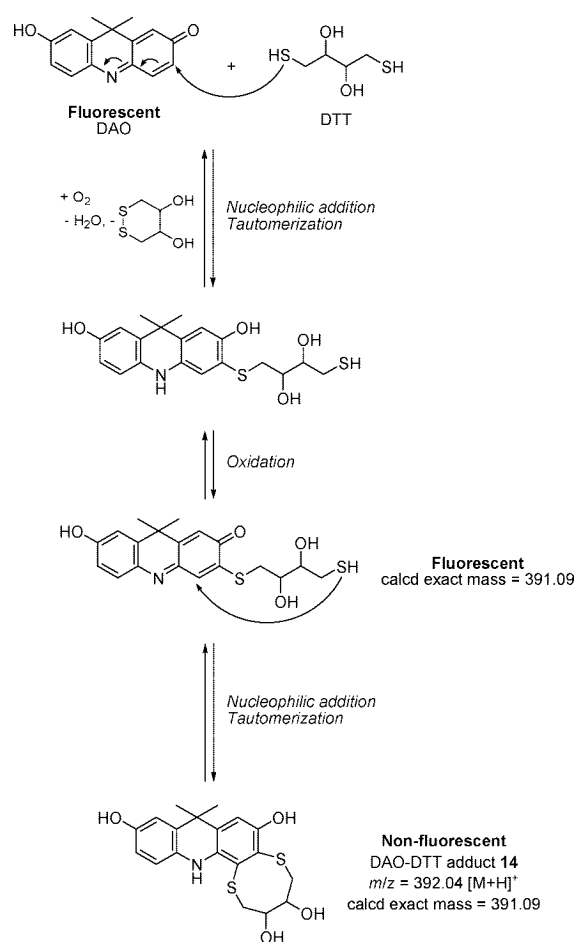


Figure 7. Proposed mechanism to explain the observed on/off fluorescence switch of the DAO dye during the caspase-3 assay with latent far-red fluorophore **13**. (note: As suggested by Kitson et al. (**74**) only the DAO derivatives bearing the quinonimine ring were considered as colored and fluorescent species.)

dosubstrate **11** as compared to the commercially available pro-fluorophore Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC. For *in vivo* imaging of protease activities, the self-immolative linker strategy has led us to explore the preparation of the original caspase-3-sensitive far-red-emitting fluorogenic probe **13** by using DAO as a fluorescent phenol. Unfortunately, our preliminary biochemical studies have allowed us to exhibit a yet unprecedented observation: the fluorescence of the enzymatically released acridinone dye is efficiently quenched in the presence of thiols, probably through a nucleophilic addition of these reducing agents to its quinonimine ring. To our knowledge, all known far-red-emitting phenol-based fluorophores (i.e., acridinone and oxazinone derivatives) contain this latter thiol-reactive moiety. Thus, the present study clearly showed the urgent need to design new red-emitting inert phenol-based fluorophores in order to expand the scope of promising latent fluorophore strategies to the visualization of various biologically relevant molecules and activities inside living cells. With this goal in mind, new conjugation-extended 7-hydroxycoumarin NIR dyes are currently under investigation in our laboratory and their use as fluorogenic labels for biomolecular imaging will be reported in due course.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by La Région Haute-Normandie, QUIDD and Institut Universitaire de France (IUF). We thank Elisabeth Roger (INSA de Rouen) for IR measurements and

Dr. Christophe Portal (QUIDD) for careful reading and English corrections of the manuscript.

Supporting Information Available: Characterization data for compounds **6a**, **6d**, **10–12**. Fluorescence and HPLC PGA assays of fluorogenic probes **6a** and **6d**. Caspase-3 assay of latent blue fluorophore **11**. LC-MS analyses of the reaction between DAO **5d** and DTT. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

LITERATURE CITED

- (1) Chen, X., Sun, M., and Ma, H. (2006) Progress in spectroscopic probes with cleavable active bonds. *Curr. Org. Chem.* **10**, 477–489.
- (2) Goddard, J.-P., and Reymond, J.-L. (2004) Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 314–322.
- (3) Goddard, J. P., and Reymond, J. L. (2004) Recent advances in enzyme assays. *Trends Biotechnol.* **22**, 363–370.
- (4) Haugland, R. P., Spence, M. T. Z., Johnson, I. D., and Basey, A. (2005) *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th ed., Molecular Probes, Eugene, OR.
- (5) Johnsson, N., and Johnsson, K. (2007) Chemical tools for biomolecular imaging. *ACS Chem. Biol.* **2**, 31–38.
- (6) Miller, E. W., and Chang, C. J. (2007) Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 620–625.
- (7) Maeda, H., Yamamoto, K., Nomura, Y., Kohno, I., Hafsi, L., Ueda, N., Yoshida, S., Fukuda, M., Fukuyasu, Y., Yamauchi, Y., and Itoh, N. (2005) A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 68–69.
- (8) Maeda, H., Yamamoto, K., Kohno, I., Hafsi, L., Itoh, N., Nakagawa, S., Kanagawa, N., Suzuki, K., and Uno, T. (2007) Design of a practical fluorescent probe for superoxide based on protection-deprotection chemistry of fluoresceins with benzene-sulfonyl protecting groups. *Chem. Eur. J.* **13**, 1946–1954.
- (9) Xu, K., Liu, X., and Tang, B. (2007) A phosphinate-based red fluorescent probe for imaging the superoxide radical anion generated by RAW264.7 macrophages. *ChemBioChem* **8**, 453–458.
- (10) Yang, D., Wang, H.-L., Sun, Z.-N., Chung, N.-W., and Shen, J.-G. (2006) A highly selective fluorescent probe for the detection and imaging of peroxynitrite in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6004–6005.
- (11) Lim, M. H., and Lippard, S. J. (2007) Metal-based turn-on fluorescent probes for sensing nitric oxide. *Acc. Chem. Res.* **40**, 41–51.
- (12) Zhang, M., Yu, M., Li, F., Zhu, M., Li, M., Gao, Y., Li, L., Liu, Z., Zhang, J., Zhang, D., Yi, T., and Huang, C. (2007) A highly selective fluorescence turn-on sensor for cysteine/homocysteine and its application in bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10322–10323.
- (13) Bouffard, J., Kim, Y., Swager, T. M., Weissleder, R., and Hilderbrand, S. A. (2008) A Highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging. *Org. Lett.* **10**, 37–40.
- (14) Ahn, Y.-H., Lee, J.-S., and Chang, Y.-T. (2007) Combinatorial rosamine library and application to in vivo glutathione probe. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4510–4511.
- (15) Matsumoto, T., Urano, Y., Shoda, T., Kojima, H., and Nagano, T. (2007) A thiol-reactive fluorescence probe based on donor-excited photoinduced electron transfer: key role of ortho substitution. *Org. Lett.* **9**, 3375–3377.
- (16) Tang, B., Xing, Y., Li, P., Zhang, N., Yu, F., and Yang, G. (2007) A rhodamine-based fluorescent probe containing a Se-N bond for detecting thiols and its application in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11666–11667.
- (17) Pires, M. M., and Chmielewski, J. (2008) Fluorescence imaging of cellular glutathione using a latent rhodamine. *Org. Lett.* **10**, 837–840.
- (18) Kim, Y., Choi, Y., Weissleder, R., and Tung, C.-H. (2007) Membrane permeable esterase-activated fluorescent imaging probe. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5054–5057.
- (19) Gurtu, V., Kain, S. R., and Zhang, G. (1997) Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal. Biochem.* **251**, 98–102.
- (20) Wang, Z.-Q., Liao, J., and Diwu, Z. (2005) N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110: novel caspase-3 fluorogenic substrates for cell-based apoptosis assay. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 2335–2338 and references cited therein.
- (21) Ho, N.-H., Weissleder, R., and Tung, C.-H. (2006) Development of a dual fluorogenic and chromogenic dipeptidyl peptidase IV substrate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2599–2602.
- (22) Lai, K. S., Ho, N.-H., Cheng, J. D., and Tung, C.-H. (2007) Selective fluorescence probes for dipeptidyl peptidase activity-fibroblast activation protein and dipeptidyl peptidase IV. *Bioconjugate Chem.* **18**, 1246–1250.
- (23) Tung, C.-H., Zeng, Q., Shah, K., Kim, D.-E., Schellingerhout, D., and Weissleder, R. (2004) In vivo imaging of β -galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Res.* **64**, 1579–1583.
- (24) Urano, Y. (2008) Sensitive and selective tumor imaging with novel and highly activatable fluorescence probes. *Anal. Sci.* **24**, 51–53.
- (25) Gao, W., Xing, B., Tsien, R. Y., and Rao, J. (2003) Novel fluorogenic substrates for imaging β -lactamase gene expression. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11146–11147.
- (26) Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **9**, 123–128.
- (27) Papot, S., Tranoy, I., Tillequin, F., Florent, J. C., and Gesson, J. P. (2002) Design of selectively activated anticancer prodrugs: elimination and cyclization strategies. *Curr. Med. Chem.* **2**, 155–185.
- (28) Gomes, P., Vale, N., and Moreira, R. (2007) Cyclization-activated prodrugs. *Molecules* **12**, 2484–2506.
- (29) Kratz, F., Muller, I. A., Ryppa, C., and Warnecke, A. (2008) Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem* **3**, 20–53.
- (30) Jones, G. B., Crasto, C. F., Mathews, J. E., Xie, L., Mitchell, M. O., El-Shafey, A., D'Amico, A. V., and Bubley, G. J. (2006) An image contrast agent selectively activated by prostate specific antigen. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 418–425.
- (31) Chandran, S. S., Dickson, K. A., and Raines, R. T. (2005) Latent fluorophore based on the trimethyl lock. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1652–1653.
- (32) Lavis, L. D., Chao, T.-Y., and Raines, R. T. (2006) Latent blue and red fluorophores based on the trimethyl lock. *ChemBioChem* **7**, 1151–1154.
- (33) Lavis, L. D., Chao, T.-Y., and Raines, R. T. (2006) Fluorogenic label for biomolecular imaging. *ACS Chem. Biol.* **1**, 252–260.
- (34) Ho, N.-H., Weissleder, R., and Tung, C.-H. (2007) A self-immolative reporter for β -galactosidase sensing. *ChemBioChem* **8**, 560–566.
- (35) Danieli, E., and Shabat, D. (2007) Molecular probe for enzymatic activity with dual output. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 7318–7324.
- (36) Sicart, R., Collin, M.-P., and Reymond, J.-L. (2007) Fluorogenic substrates for lipases, esterases, and acylases using a TIM-mechanism for signal release. *Biotechnol. J.* **2**, 221–231.
- (37) Meyer, Y., Richard, J.-A., Massonneau, M., Renard, P.-Y., and Romieu, A. (2008) Development of a new nonpeptidic self-immolative spacer. Application to the design of protease sensing fluorogenic probes. *Org. Lett.* **10**, 1517–1520.
- (38) Richard, J. A., Jean, L., Romieu, A., Massonneau, M., Noack-Fraissignes, P., and Renard, P. Y. (2007) Chemiluminescent probe for the in vitro detection of protease activity. *Org. Lett.* **9**, 4853–4855.
- (39) Bruce, J. M., and Knowles, P. (1966) Light-induced and related reactions of quinones Part III. Light-induced reactions

- of some monosubstituted 1,4-benzoquinones. *J. Chem. Soc., C*, 1627–1634.
- (40) Corey, P. F., Trimmer, R. W., and Biddlecom, W. G. (1991) A new chromogenic β -galactosidase substrate: 7- β -D-galactopyranosyloxy-9,9-dimethyl-9H-acridin-2-one. *Angew. Chem., Int. Ed.* 103, 1646–1648.
- (41) Briggs, M. S. J., Bruce, I., Miller, J. N., Moody, C. J., Simmonds, A. C., and Swann, E. (1997) Synthesis of functionalized fluorescent dyes and their coupling to amines and amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1051–1058.
- (42) Gottlieb, H. E., Kotlyar, V., and Nudelman, A. (1997) NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* 62, 7512–7515.
- (43) Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J., and Waggoner, A. S. (1993) Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjugate Chem.* 4, 105–111.
- (44) Bräse, S., and Dahmen, S. (2000) Traceless linkers - Only disappearing links in solid-phase organic synthesis. *Chem. Eur. J.* 6, 1899–1905.
- (45) Comely, A. C., and Gibson, S. E. (2001) Tracelessness unmasked: A general linker nomenclature. *Angew. Chem., Int. Ed.* 40, 1012–1032.
- (46) Wills, A. J., and Balasubramanian, S. (2003) Recent developments in linker design and application. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 346–352.
- (47) Gil, C., and Bräse, S. (2004) Traceless and multifunctional linkers for the generation of small molecules on solid supports. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 230–237.
- (48) Mayer, S. F., Kroutil, W., and Kurt, F. (2001) Enzyme-initiated domino (cascade) reactions. *Chem. Soc. Rev.* 30, 332–339.
- (49) Grether, U., and Waldmann, H. (2000) An enzyme-labile safety catch linker for combinatorial synthesis on a soluble polymeric support. *Angew. Chem., Int. Ed.* 39, 1629–1632.
- (50) Grether, U., and Waldmann, H. (2001) An enzyme-labile safety catch linker for synthesis on a soluble polymeric support. *Chem. Eur. J.* 7, 959–971.
- (51) Renard, P.-Y., Romieu, A., Richard, J.-A., and Massonneau, M. New pro-fluorescent compounds Fr. Demande (2008), FR 2910897 A1 20080704.
- (52) Carl, P. L., Chakravarty, P. K., and Katzenellenbogen, J. A. (1981) A novel connector linkage applicable in prodrug design. *J. Med. Chem.* 24, 479–480.
- (53) Ninkovic, M., Riester, D., Wirsching, F., Dietrich, R., and Schwienhorst, A. (2001) Fluorogenic assay for penicillin G acylase activity. *Anal. Biochem.* 292, 228–233.
- (54) Gopin, A., Ebner, S., Attali, B., and Shabat, D. (2006) Enzymatic activation of second-generation dendritic prodrugs: conjugation of self-immolative dendrimers with poly(ethylene glycol) via click chemistry. *Bioconjugate Chem.* 17, 1432–1440.
- (55) Adler-Abramovich, L., Perry, R., Sagi, A., Gazit, E., and Shabat, D. (2007) Controlled assembly of peptide nanotubes triggered by enzymatic activation of self-immolative dendrimers. *ChemBioChem* 8, 859–862.
- (56) Sagi, A., Segal, E., Satchi-Fainaro, R., and Shabat, D. (2007) Remarkable drug-release enhancement with an elimination-based AB₃ self-immolative dendritic amplifier. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 3720–3727.
- (57) Kadereit, D., and Waldmann, H. (2001) Enzymatic protecting group techniques. *Chem. Rev.* 101, 3367–3396.
- (58) Scheper, T., Weiss, M., and Schuegerl, K. (1986) Two new fluorogenic substrates for the detection of penicillin-G-acylase activity. *Anal. Chim. Acta* 182, 203–206.
- (59) Setsukinai, K.-I., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., and Nagano, T. (2000) Fluorescence switching by O-dearylation of 7-aryloxycoumarins. Development of novel fluorescence probes to detect reactive oxygen species with high selectivity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2453–2457.
- (60) Sood, A., Kumar, S., Nampalli, S., Nelson, J. R., Macklin, J., and Fuller, C. W. (2005) Terminal phosphate-labeled nucleotides with improved substrate properties for homogeneous nucleic acid assays. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2394–2395.
- (61) Denault, J.-B., and Salvesen, G. S. (2002) Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.* 102, 4489–4499.
- (62) Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Koths, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294–298.
- (63) Mizukami, S., Kikuchi, K., Higuchi, T., Urano, Y., Mashima, T., Tsuruo, T., and Nagano, T. (1999) Imaging of caspase-3 activation in HeLa cells stimulated with etoposide using a novel fluorescent probe. *FEBS Lett.* 453, 356–360.
- (64) Komoriya, A., Packard, B. Z., Brown, M. J., Wu, M.-L., and Henkart, P. A. (2000) Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J. Exp. Med.* 191, 1819–1828.
- (65) Pham, W., Weissleder, R., and Tung, C.-H. (2002) An azulene dimer as a near-infrared quencher. *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, 3659–3662.
- (66) Bullok, K., and Piwnica-Worms, D. (2005) Synthesis and characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis. *J. Med. Chem.* 48, 5404–5407.
- (67) Poupart, S., Boudou, C., Peixoto, P., Massonneau, M., Renard, P.-Y., and Romieu, A. (2006) Aminopropargyl derivative of terpyridine-bis(methyl-enamine) tetraacetic acid chelate of europium (Eu (TMT)-AP3): a new reagent for fluorescent labelling of proteins and peptides. *Org. Biomol. Chem.* 4, 4165–4177.
- (68) Bullok, K. E., Maxwell, D., Kesarwala, A. H., Gammon, S., Prior, J. L., Snow, M., Stanley, S., and Piwnica-Worms, D. (2007) Biochemical and in vivo characterization of a small, membrane-permeant, caspase-activatable far-red fluorescent peptide for imaging apoptosis. *Biochemistry* 46, 4055–4065.
- (69) Bouteiller, C., Clavé, G., Bernardin, A., Chipon, B., Massonneau, M., Renard, P.-Y., and Romieu, A. (2007) Novel water-soluble near-infrared cyanine dyes: synthesis, spectral properties, and use in the preparation of internally quenched fluorescent probes. *Bioconjugate Chem.* 18, 1303–1317.
- (70) Lee, B. W., Johnson, G. L., Hed, S. A., Darzynkiewicz, Z., Talhouk, J. W., and Mehrotra, S. (2003) DEVDase detection in intact apoptotic cells using the cell permeant fluorogenic substrate, (z-DEVD)2-cresyl violet. *BioTechniques* 35, 1080–1085.
- (71) Gerlach, H. (1977) 2-(Trimethylsilyl)ethyl esters as a carboxyl protecting group; application in the synthesis of (-)-(S)-curvularin. *Helv. Chim. Acta* 60, 3039–3044.
- (72) Sieber, P. (1977) The 2-trimethylsilylethyl residue, a selectively cleavable carboxyl protecting group. *Helv. Chim. Acta* 60, 2711–2716.
- (73) Moretti, A., Weig, H.-J., Ott, T., Seyfarth, M., Holthoff, H.-P., Grewe, D., Gillitzer, A., Bott-Flugel, L., Schomig, A., Ungerer, M., and Laugwitz, K.-L. (2002) Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11860–11865.
- (74) Kitson, T. M. (1998) The oxidative addition reaction between compounds of resorufin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) and 2-mercaptoethanol. *Bioorg. Chem.* 26, 63–73.

7-Hydroxycoumarin—Hemicyanine Hybrids: A New Class of Far-Red Emitting Fluorogenic Dyes

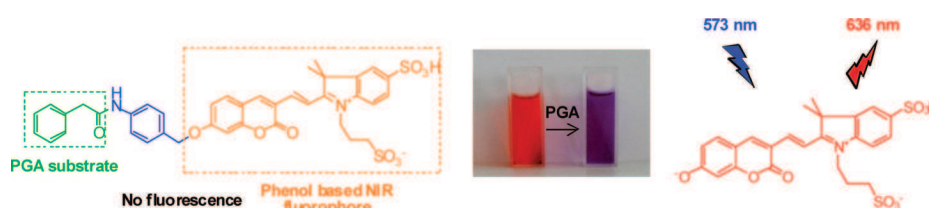
Jean-Alexandre Richard,^{†,‡} Marc Massonneau,[‡] Pierre-Yves Renard,^{*,†,§} and Anthony Romieu^{*,†,§}

Equipe de Chimie Bio-Organique, Université de Rouen, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan, France, UMR CNRS 6014, COBRA, IRCOF, rue Lucien Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan, France, and QUIDD, Technopôle du Madrillet, 50, rue Ettore Bugatti, 76800 Saint-Etienne-du-Rouvray, France

pierre-yves.renard@univ-rouen.fr; anthony.romieu@univ-rouen.fr

Received July 11, 2008

ABSTRACT



The design and synthesis of novel water-soluble far-red emitting phenol-based fluorophores derived from 7-hydroxycoumarin are described. These hemicyanine—coumarin hybrids display promising spectroscopic features such as large apparent Stokes shift (ranging from 60 to 140 nm) and fluorescence emission maxima between 620 and 720 nm in physiological conditions. Their utility was then illustrated by the preparation of an original fluorogenic probe of penicillin G acylase (PGA) whose fluorescence is unveiled through an enzyme-initiated domino reaction.

During the past two decades, intensive research efforts have been devoted to the development of numerous enzyme assays for various bioanalytical and biological applications including high-throughput screening or biomolecular imaging.¹ The use of spectroscopic probes whose fluorescence properties dramatically change upon reaction, covalent interaction, or reversible binding with target analytes is often required. Indeed, molecular fluorescence spectroscopy is one of the most powerful and simple methods to visualize *in vitro* and *in vivo* biochemical and cell biological processes in a real-time manner, with a high degree of accuracy, and by using simple instruments and facilities.² Thus, numerous profluorescent probes that unmask their intense fluorescence

only by a user-designated chemical reaction have been elaborated for the visualization of biologically relevant molecules (metal cations, reactive oxygen species, thiols)³ and the detection of various enzymes like esterases, phosphatases, proteases, or β -galactosidase.⁴

Recently, the research of optical bioprobes absorbing and emitting in the near-infrared (NIR) region has gained a huge interest.⁵ Indeed, light in the region 650–900 nm is poorly

(2) Haugland, R. P.; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A. *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, 10th ed.; Molecular Probes; Eugene, OR, 2005. de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.

(3) Kim, H. N.; Lee, M. H.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1465–1472. Chen, X.; Wang, X.; Wang, S.; Shi, W.; Wang, K.; Ma, H. *Chem.—Eur. J.* **2008**, *14*, 4719–4724. Miller, E. W.; Chang, C. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 620–625. Li, X.; Zhang, G.; Ma, H.; Zhang, D.; Li, J.; Zhu, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11543–11548.

(4) Chen, X.; Sun, M.; Ma, H. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 477–489. Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 1479–1485.

[†] COBRA-CNRS UMR 6014.

[‡] QUIDD (QUantitative Imaging in Drug Development).

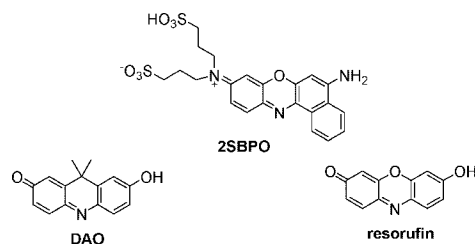
[§] Université de Rouen.

(1) Johnsson, N.; Johnsson, K. *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 31–38. Goddard, J. P.; Reymond, J. L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 314–322.

absorbed by biomolecules and thus can penetrate more deeply into tissues (up to several centimeters).⁶ Autofluorescence is also minimized in this region as well as Rayleigh–Tyndall light scattering artifacts.⁷ Thus, much higher signal-to-noise ratios can be obtained, and the corresponding NIR fluorescent probes are expected to be suitable for emerging and challenging biomedical applications such as *in vivo* diagnostic imaging.

The most popular synthetic strategy to obtain NIR fluorophores consists of the extension of the π – π conjugation system of conventional dyes (i.e., cyanine dyes, fluorescein, rhodamines, and BODIPYs) but such chemical modification often leads to molecules poorly or not soluble in aqueous media, sometimes chemically unstable (especially for the long polymethine chain cyanine dyes such as Cy 7.0 and its analogues) and/or highly sensitive to photobleaching.⁸ Furthermore, few water-soluble NIR dyes having a reactive group (i.e., an aniline, a phenol, or a thiophenol moiety) whose reversible chemical modification (e.g., acylation, alkylation) significantly affects their fluorescence properties have been reported to date. The chemistry of such fluorogenic dyes was recently investigated by the group of Weissleder through the development of original Nile Blue analogues (i.e., benzo[*a*]phenoxazine dyes) and new symmetric and asymmetric xanthene dyes (i.e., naphthofluorescein and rhodanaphthofluor derivatives).⁹ The potential utility of their disulfonated benzo[*a*]phenoxazine scaffold (2SBPO) was illustrated by the preparation of fluorogenic probes suitable for the *in vivo* imaging of two different hydrolytic enzymes: β -galactosidase and dipeptidyl peptidase IV.¹⁰ Given their critical role in numerous diseases, the detection of specific protease activities *in vivo* is of great importance, especially for diagnostic and therapeutic purposes. In that context, we recently reported original profluorescent substrates of penicillin G acylase (PGA) and caspase-3, whose strong fluorescent 7-hydroxycoumarin dye is released through enzyme-initiated domino reactions.¹¹ Such a strategy requires the introduction of a self-immolative spacer (e.g., *p*-aminobenzyl alcohol, PABA) between the peptidyl substrate and the fluorophore that results in many beneficial effects such as higher stability in physiological media as well as better enzymatic recognition and cleavage kinetics. In order to extend this approach to the NIR range, we have applied the same synthetic strategy to the red-emitting acridinone and oxazinone phenol dyes already reported in the literature (i.e., DAO and resorufin).

However, we found that thiols have a deleterious quenching effect on the fluorescence of these fluorophores thus preventing their use in imaging applications of living systems.¹¹ To circumvent this issue, we decided to explore a novel class of NIR dyes derived from 7-hydroxycoumarin that do not contain a thiol-sensitive quinoimine ring. Herein, we report the synthesis of these water-soluble far-red emitting phenol-based fluorophores, their promising spectral properties in physiological conditions (large Stokes shift and fluorescence emission maxima between 620 and 720 nm) and their application for the preparation of latent fluorescent probes aimed at the detection of the model protease, PGA.



The targeted fluorogenic phenol dyes were designed as follows: (1) the pro-fluorescence properties should be obtained taking into account that 7-alkoxycoumarins emit weakly compared to the phenol free 7-hydroxycoumarins;¹² (2) a push–pull device was designed between the phenol functionality of the 7-hydroxycoumarin and an indolium moiety; (3) the red-shift of the wavelength emission should be obtained by the introduction of one or two double bonds in the 3-position of the coumarin, thus extending the π -conjugation of the resulting dye; (4) water solubility of the fluorophore should be obtained through the introduction of up to three sulfonate groups onto the indolium moiety (Figure 1).

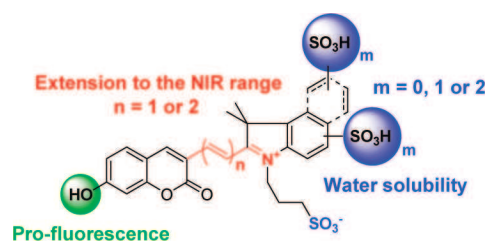


Figure 1. General structure of the targeted water-soluble far-red emitting phenol-based fluorophore.

Fluorophores **4a–e** were synthesized *via* a base-mediated electrophilic substitution of indolium derivatives **3a–c**¹³ as depicted in Scheme 1. First, the reaction with 3-formylcoumarin **1** in ethanol in the presence of pyrrolidine gave the water-soluble hemicyanine–coumarin hybrids **4a**, **4c**, and **4e** in good yields. Interestingly, the removal of the acetyl

(5) Kiyose, K.; Kojima, H.; Nagano, T. *Chem.-Asian J.* **2008**, *3*, 506–515.

(6) Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123–128.

(7) Licha, K. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *222*, 1–29.

(8) Touthkine, A.; Nguyen, D.-V.; Hahn, K. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2775–2777.

(9) Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4383–4385. Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 578–585.

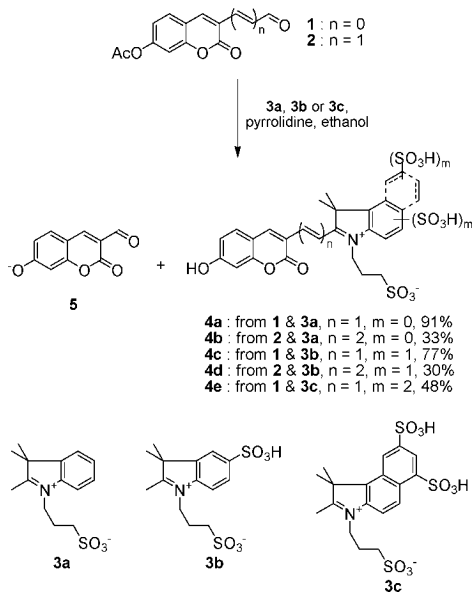
(10) Lai, K. S.; Ho, N.-H.; Cheng, J. D.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1246–1250. Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 560–566. Ho, N.-H.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2599–2602.

(11) Richard, J.-A.; Meyer, Y.; Jolivel, V.; Massonneau, M.; Dumeunier, R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1707–1718. Meyer, Y.; Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1517–1520.

(12) Setsukinai, K.-I.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Higuchi, T.; Nagano, T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**, 2453–2457.

(13) For the synthesis of **3a–c**, see the Supporting Information.

Scheme 1. Synthesis of Water-Soluble Far-Red Emitting Phenol-Based Fluorophores **4a–e**



group of phenol moiety occurred simultaneously during this base-mediated condensation reaction. In order to shift the fluorescence emission to longer red wavelengths, an additional double bond was added to the coumarin core of **1** by means of a Wittig reaction and afforded 3-cinnamyl coumarin **2** in 60% yield (see the Supporting Information). This latter aldehyde was then condensed with indolium derivatives **3a,b** under the same conditions as used for **1**. However, the corresponding fluorophores **4b** and **4d** were obtained in lower yields (30–35%) than the dimethine dyes. These modest yields were explained by a competitive pyrrolidine-catalyzed retroaldol reaction of **2** transiently leading to the 3-formylcoumarin **1** which subsequently reacts with indolium to give **4a** or **4c**. All spectroscopic data (see the Supporting Information), especially NMR and mass spectrometry, were in agreement with the structures assigned. As expected, fluorophores **4a–e** were found to be perfectly soluble in water and related aqueous buffers in the range of concentrations suitable for biomolecular labeling applications (1.0 μM to 5 mM). The inertness of these fluorescent phenols toward thiols was also demonstrated through incubation with 1,4-dithioerythritol (DTE) and subsequent LC–MS analyses (see the Supporting Information).

The photophysical properties of the five novel water-soluble phenol-based fluorophores available were evaluated in various solvents (i.e., PBS and polar organic solvents) and collected in Table 1 (for their normalized absorption and emission spectra, see the Supporting Information). As expected, the extension of the aromatic system conjugation of parent 7-hydroxycoumarin resulted in a dramatic red-shift of the emission maxima beyond 600 nm. Interestingly, compounds **4a–e** exhibited a large Stokes shift (ranging from 60 to 140 nm according to the solvent and the length of polymethine chain) which is beneficial for a better detection sensitivity thanks to the decrease of the reabsorption

Table 1. Absorption and Fluorescence Data for Hemicyanine-Coumarin Hybrids

dye	$\lambda_{\text{max}}(\text{abs})$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}(\text{em})$ (nm)	Stokes shift (nm)	ϵ^a ($\times 10^4$)	Φ_F^b (%)	solvent
4a	555	620	65	2.28	0.7	PBS ^c
	630	649	19	2.22	2.3	DMSO
	623	642	19	2.20	4.9	ethanol
4b	564	720	139	2.70	1.3	PBS
	491	653	162	2.45	1.3	DMSO
4c	573	636	63	7.04	1.3	PBS
	485	604	119	3.55	1.2	DMSO
	630	648	18	7.80	3.1	ethanol
4d	592	722	130	2.45	1.1	PBS
	494	655	161	2.35	1.7	DMSO
	508	654	146	2.50	1.0	ethanol
4e	578	643	65	6.55	2.7	PBS
	495	625	130	3.37	2.5	DMSO
	643	659	16	4.18	1.4	ethanol

^a Molar extinction coefficient are in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. ^b The fluorescence quantum yields were determined at 25 °C by using rhodamine 6G ($\Phi_F = 90\%$ in water at 25 °C) or sulfocyanine dye Cy 5.0 ($\Phi_F = 20\%$ in PBS at 25 °C) as standards. ^c PBS = 100 mM phosphate buffer + 150 mM NaCl, pH 7.4.

of photons and a diminution of the fluorophore self-quenching. This might be attributed to an excited-state intramolecular charge transfer (ICT) between the phenolate group (donor) and the indolium moiety (acceptor) within the same dye molecule. Furthermore, a marked negative solvatochromism in the absorption spectrum of dimethine hemicyanine–coumarin hybrids **4a**, **4c**, and **4e** (~ 60 nm shift from PBS to ethanol) was observed with increasing polarity of the solvents, but no apparent solvatochromism in the emission spectra was detected. These properties are due to hydrogen-bonding interaction between the solvents and the dye molecule and proved that an excited-state ICT should take place in the present case.¹⁴ A slight improvement of the quantum yields was observed along with the increase in the number of negatively charged sulfonate groups directly attached to the (benzo)indole ring. Indeed, this hydro-solubilization strategy enabled reducing dye–dye interactions in water because of Coulombic repulsion and partially prevents static quenching through association. Brightness ($\Phi_F \epsilon$) values in physiological conditions (e.g., 1770 for **4e** in PBS) are comparable to those determined for the commercially available red-emitting acridinone or oxazinone phenol dyes (e.g., 1930 for DAO in PBS).¹¹

Several possible hypotheses to explain the relatively modest fluorescence efficiency of phenol dyes **4a–e** can be found: dynamic quenching of excited dye molecules through collision with dye in the ground-state and excited-state twisting (rotation/vibration) of the central tetramethine bridge separating the two (hetero)cyclic heads (“loose belt effect”)¹⁶ or static quenching through association (other than H-aggregation) of ground-state

(14) Peng, X.; Song, F.; Lu, E.; Wang, Y.; Zhou, W.; Fan, J.; Gao, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4170–4171.

(15) Magde, D.; Wong, R.; Seybold, P. G. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327–334. Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105–111.

dye molecules. Thus, current work is ongoing in our laboratory to rigidify these pseudocyanines in order to improve the quantum yields in physiological conditions.

Prior to the use of these novel phenol-based fluorophores in the context of fluorogenic probes based on the pro-fluorescent concept, it was essential to check that the chemical modification of their hydroxyl group (i.e., modification of the phenol either to an ether or an ester) effectively quenched their red fluorescence emission. For this purpose, we synthesized a fluorogenic probe suitable for the detection of model amidase PGA. We chose to use hemicyanine–coumarin hybrid **4c** as the fluorescent phenol because it represented a good compromise between high molar extinction coefficient, acceptable quantum yield and ease of synthesis. Thus, our synthetic strategy to the PGA sensitive profluorescent probe **7** involved the introduction of

mediated condensation reaction with aldehyde **6**. Spectroscopic measurements performed in PBS at pH 7.5 revealed that the etherification of the 7-OH group of **4c** effectively quenched its fluorescence at 636 nm (Figure 2B).¹⁷ This particular trend confirmed that hemicyanine–coumarin hybrids **4a–e** can be used in the design and synthesis of fluorogenic probes sensitive to various analytes. Finally, profluorophore **7** was tested against PGA. Figure 2C showed the time-course for the amidase-catalyzed hydrolysis of **7**. After PGA was added to the substrate solution, a strong fluorescence signal generated at 636 nm indicated the catalytic cleavage of the carboxamide bond and the release of the free fluorescent phenol **4c**. Furthermore, no nonspecific cleavage of the probe was detected in a control reaction where **7** was incubated only in phosphate buffer. Overall, these results confirm that the latent red fluorophore **7** is a suitable substrate for penicillin amidase. Thus, in addition to the profluorescent character of our phenol-based fluorophores, the full stability of fluorogenic probe **7** as well as its suitability for the detection of a model protease have been shown.

In summary, we have designed a novel class of water-soluble far-red emitting phenol-based fluorophores by coupling a polysulfonated (benzo)indolium unit to the 3-formyl (or the 3-cinnamyl) derivative of umbelliferone. Contrary to the commercially available red-emitting acridinone and oxazinone phenol dyes, these fluorescent labels are not reactive toward biological thiols. They exhibit a large Stokes shift, and the emission maximum wavelength can be easily tuned between 620 and 720 nm thanks to the extension of the electron density to the indole moiety *via* a push–pull device. Furthermore, we confirmed the profluorescent features of our pseudocyanine dyes through the synthesis and *in vitro* validation of the PGA sensitive fluorogenic probe **7**. In order to expand the scope of these promising latent far-red fluorophores to the visualization of various biologically relevant molecules and activities inside living cells, further works are in progress to improve both the brightness of these fluorescent phenols and their cell permeability by using bioactivatable masking groups for the negative charges of sulfonate moieties.¹⁸

Acknowledgment. This work was supported by La Région Haute-Normandie, QUIDD, and Institut Universitaire de France (IUF). We thank Elisabeth Roger (INSA de Rouen) for IR measurements and Dr. Christophe Portal (QUIDD) for English correction of the manuscript.

Supporting Information Available: Procedures and additional data for syntheses and analyses (HPLC, MS, NMR) reported herein. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL801582W

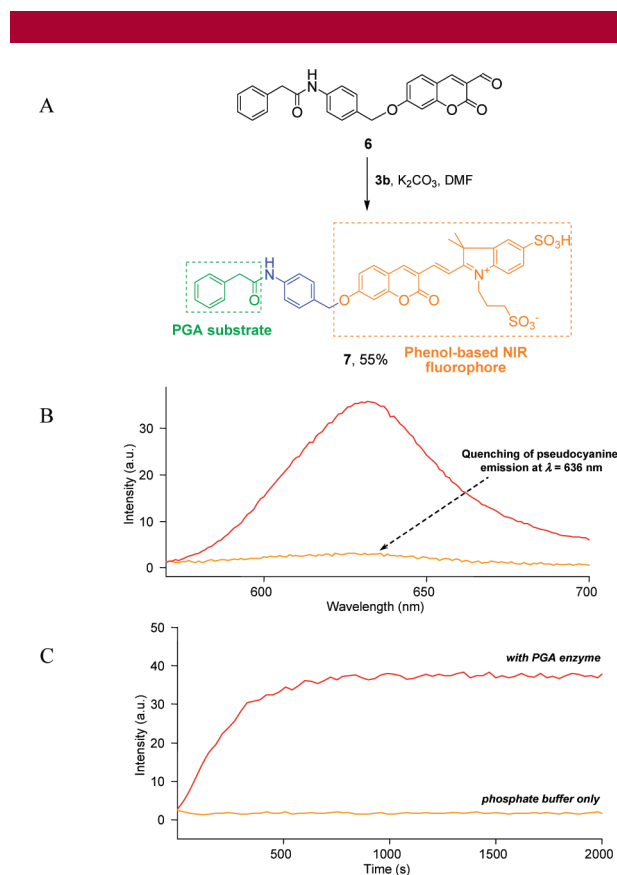


Figure 2. (A) Synthesis of the PGA sensitive fluorogenic probe **7**. (B) Emission spectra (ex $\lambda = 560$ nm) of pseudocyanine dye **4c** (red line) and fluorogenic probe **7** (orange line) at 37 °C in phosphate buffer (concentration 3.9 μ M). (C) Fluorescence emission time-course of probe **7** (concentration 3.9 μ M) with PGA (0.0105 U) in phosphate buffer (37 °C) at 636 nm (ex 560 nm).

the self-immolative PABA linker between the phenylacetyl moiety (i.e., PGA-sensitive substrate) and the phenol-based fluorophore (Figure 2A). However, to avoid the laborious and time-consuming handling and purification of highly polar synthetic intermediates, the disulfonated indole **3b** was introduced at the final stage of the synthesis through a K₂CO₃-

Chapitre 3

Synthèse de sondes chémiluminescentes
pour la détection de peptidases

Synthèse de sondes chémiluminescentes pour la détection de peptidases

I LA CHEMILUMINESCENCE

La chémiluminescence est une forme de luminescence différente de la fluorescence. Elle résulte du retour à l'état fondamental d'une espèce excitée à la suite d'une réaction chimique. La bioluminescence est un cas particulier de chémiluminescence puisqu'il s'agit d'une réaction biochimique ayant lieu dans les organismes vivants. L'utilisation de ce type de luminescence est d'un grand intérêt puisqu'elle permet d'obtenir une meilleure sensibilité que la fluorescence principalement grâce à une diminution du bruit de fond. En effet, l'absence d'excitation photonique permet à la fois de s'affranchir de l'absorption et de l'auto-fluorescence des tissus et de réduire les interférences liées à la dispersion de la lumière.

1 La bioluminescence

1.1 Origines et mécanismes de la bioluminescence

La bioluminescence est très courante dans le monde du vivant et l'émission de lumière par les organismes vivants est un des phénomènes les plus intrigants de la nature. En effet, des espèces aussi variées que les insectes, poissons, crustacés, mollusques ou champignons possèdent la capacité d'émettre de la lumière *via* le phénomène de bioluminescence. Elle est ainsi observée dans des milieux terrestres avec les lucioles ou dans des milieux marins comme par exemple dans une mer agitée ou au fond des océans. Celle-ci remplit de nombreuses fonctions d'éclairage, de communication pour aider à la capture des proies (avec des

leurres par exemple) ou facilite la reproduction en attirant l'espèce de sexe opposée. Elle joue aussi un grand rôle dans des stratégies de défense de l'espèce comme le camouflage ou l'émission d'éclairs pour effrayer les prédateurs.

Bien que le phénomène soit observé depuis plus de deux mille ans, ce n'est qu'en 1887 que Raphaël Dubois met en évidence l'étape clé de l'émission de bioluminescence en étudiant la *pholade*, un mollusque qui émet de la lumière quand il se sent menacé (Figure 3-1).

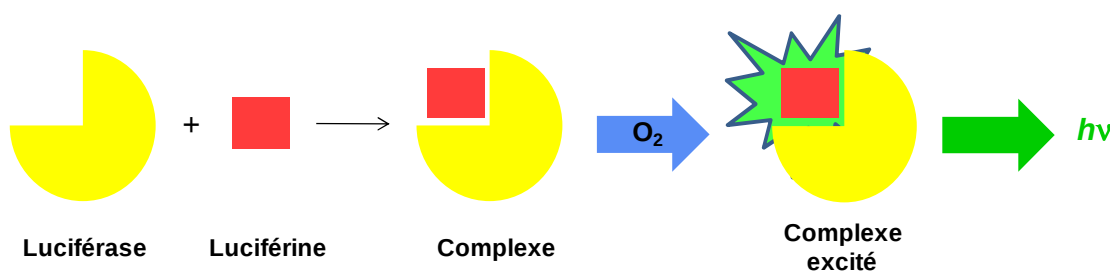


Figure 3.1. L'interaction entre la luciférine et la luciférase, étape clé de la bioluminescence.

En effet, Dubois met en évidence que l'oxydation d'une espèce qu'il a baptisée « luciférine » est responsable de l'émission d'une lumière verte. Il a également montré que cette réaction a lieu en présence d'une enzyme qu'il appelle « luciférase ». Plusieurs dizaines d'années de recherche ont été nécessaires afin de proposer un mécanisme pour cette réaction. Le mécanisme actuellement accepté met en jeu la luciférine qui en présence de luciférase réagit avec une molécule d'ATP pour former l'espèce luciféryl-adénylate. En présence d'oxygène, une espèce luciféryl-péroxy lactone (ou 1,2-dioxétanone) est formée et sa décomposition génère l'espèce oxyluciférine à l'état excité qui revient à l'état fondamental en émettant de la lumière verte (Schéma 3-1).

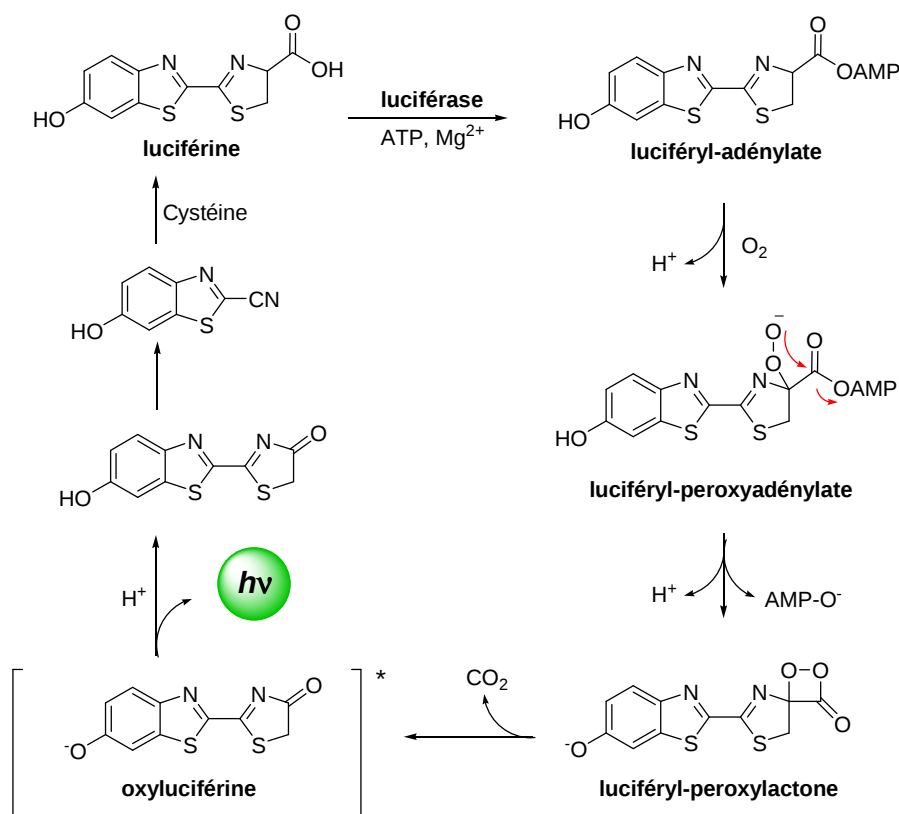


Schéma 3-1. Mécanisme actuellement accepté d'oxydation de la luciférine de luciole en présence de luciférase, d'ATP, d'ions Mg^{2+} et d'oxygène.

Le mécanisme proposé est valable pour la luciole mais diffère par exemple dans le cas des bactéries. En effet, dans ce cas la flavine mononucléotide (FMN) réduite joue le même rôle que la luciférine tandis que l'énergie est apportée par le NADPH au lieu de l'ATP.

Il existe d'autres mécanismes de bioluminescence dont le plus répandu fait intervenir la coelenterazine, jouant le rôle de chromophore et possédant un noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, qui en présence de la protéine apo-aequorine et d'oxygène forme un complexe appelé aequorine. La présence d'ions Ca^{2+} permet un changement de la conformation du complexe et engendre la formation d'une 1,2-dioxétanone. Celle-ci est instable, libère une molécule de CO_2 et l'espèce excitée coelenteramide anionique générée émet une lumière bleue en revenant à l'état fondamental (Schéma 3-2).²⁵³

²⁵³ Teranishi, K. *Bioorg. Chem.* **2007**, 35, 82-111.

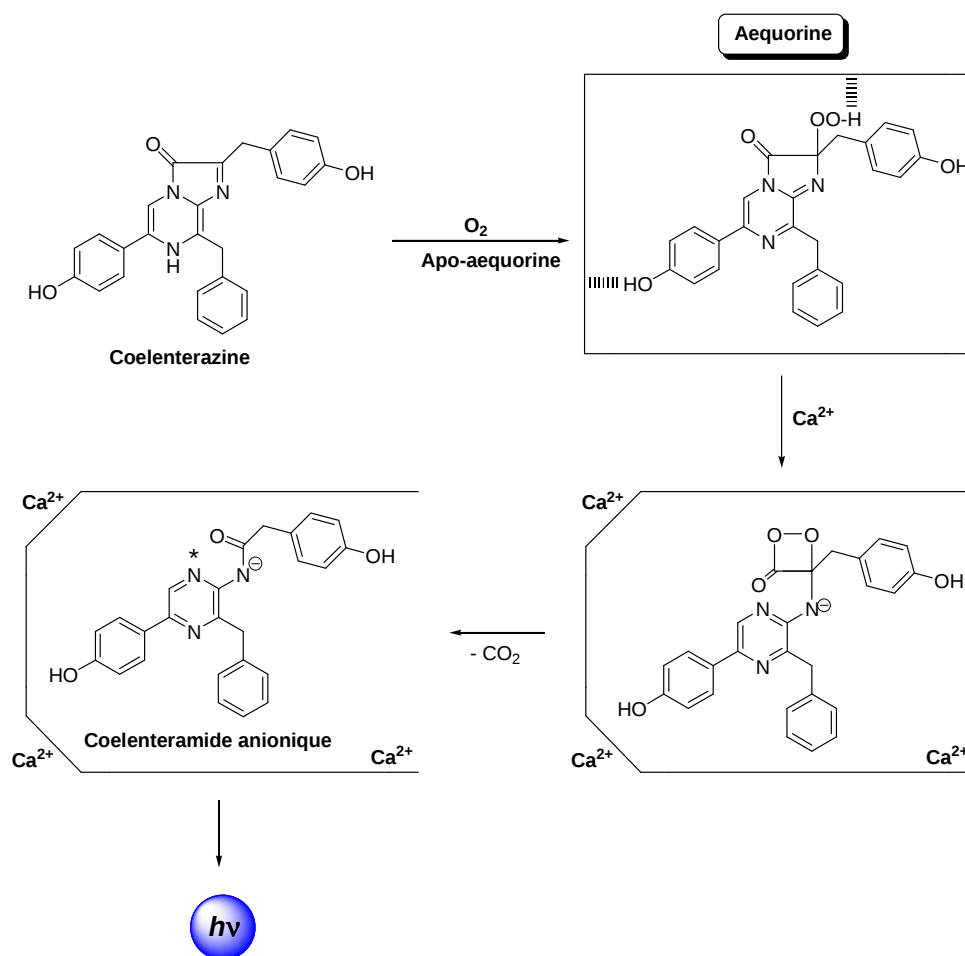


Schéma 3-2. Mécanisme d'émission de lumière par bioluminescence en présence de coelenterazine, d'oxygène, d'apo-aequorine et d'ions Ca^{2+} .

Le point commun de ces différents mécanismes est la formation supposée d'un intermédiaire de type 1,2-dioxétanone, ce qui est une information de grande importance pour la mise au point des espèces chémiluminescentes qui seront discutées ultérieurement.

1. 2 Applications de la bioluminescence

La bioluminescence a été mise à profit dans quelques applications bioanalytiques courantes dont la plus notoire est la détection de l'ATP dans le but de mettre en évidence l'activité microbienne ou bactérienne. Ainsi des kits commerciaux d'ATPmétrie sont disponibles et permettent aussi bien de faire des estimations de biomasse, de vérifier l'hygiène des surfaces en contact avec des aliments que de détecter des moisissures sur des œuvres d'art. La luciférase de luciole est également couramment utilisée comme enzyme reportrice dans

différentes expériences d'ingénierie génétique. La bioluminescence est ainsi devenue un outil puissant d'analyse²⁵⁴ et d'aide au développement des médicaments.²⁵⁵

Cependant, les applications les plus intéressantes pour notre étude se situent dans l'imagerie optique. Parmi les exemples récents d'application de la bioluminescence dans ce domaine, l'un des axes de recherche du groupe de P. A. Wender vise à développer des transporteurs pour délivrer des principes actifs dans la cellule. Dans ce contexte, une sonde bioluminescente a été développée afin d'évaluer la capacité de leur transporteur à entrer dans la cellule. La sonde présente un intérêt pour notre étude puisqu'elle est constituée d'un motif poly-arginine pour faciliter la pénétration cellulaire, de la luciférine pour l'émission de lumière et également d'un bras réactif auto-immolable. Celui-ci est basé sur l'utilisation d'un linker disulfure du type « dithioalkoxycarbonyl » récemment mis au point et de plus en plus utilisé dans le contexte des pro-drogues.²⁵⁶ La sonde serait clivée dans la cellule par le glutathion, libérant le thiol libre qui cyclise pour libérer la luciférine et émet de la lumière en présence de luciférase et d'ATP (Schéma 3-3).²⁵⁷

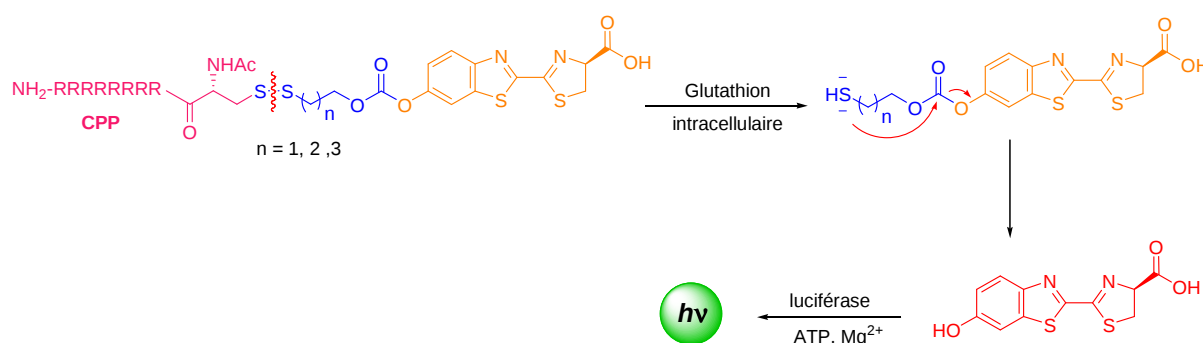


Schéma 3-3. Sonde bioluminescente pour l'évaluation de la pénétration cellulaire d'un transporteur.

Une stratégie similaire a été récemment employée pour la détection de la phosphatase alcaline ; elle utilise la luciférine ou son analogue aminé qui sont associés au motif phosphate

²⁵⁴ Roda, A.; Pasini, P.; Guardigli, M.; Baraldini, M.; Musiani, M.; Mirasoli, M. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, 752-759.
Roda, A.; Pasini, P.; Mirasoli, M.; Michelini, E.; Guardigli, M. *Trends Biotechnol.* **2004**, 22, 295-303.

²⁵⁵ Roda, A.; Guardigli, M.; Pasini, P.; Mirasoli, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 826-833.

²⁵⁶ Pour des exemples récents, voir Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 5350-5355. El Alaoui, A.; Schmidt, F.; Amessou, M.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J. C.; Johannes, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6469-6472. Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; Wang, Y.; Kleindl, P. J.; You, F.; Howard, S. J.; Westrick, E.; Reddy, J. A.; Leamon, C. P. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 5968-5972. Pour l'utilisation de ce type de linker disulfure dans les contexte des groupes protecteurs pour la synthèse peptidique, voir Lapeyre, M.; Leprince, J.; Massonneau, M.; Oulyadi, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Turcatti, G.; Vaudry, H. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 3655-3671.

²⁵⁷ Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6526-6527. Wender, P. A.; Goun, E. A.; Jones, L. R.; Pillow, T. H.; Rothbard, J. B.; Shinde, R.; Contag, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10340-10345.

via un bras réactif auto-immolable PABA ou TriMéthyl Lock (Figure 3-2 a et b respectivement).²⁵⁸

La détection d'enzymes telles que la β -lactamase (Figure 3-2 c)²⁵⁹ et la caspase-3 (toutefois sans que l'utilisation d'un bras réactif ne soit impliquée) a également été rapportée en utilisant la même stratégie.²⁶⁰ La principale limitation de cette approche est qu'il est nécessaire de transfecter les cellules/l'organisme cible avec la luciférase, et/ou de l'injecter en parallèle avec la sonde.

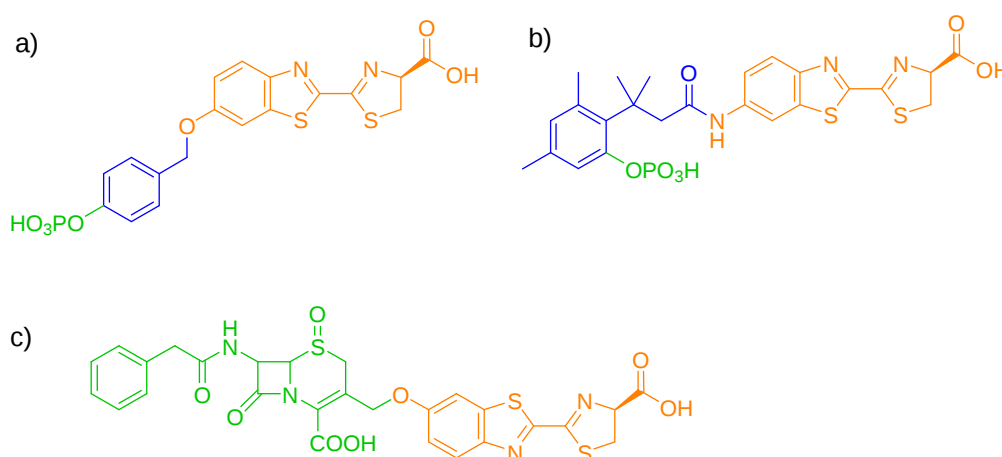


Figure 3-2. Sondes bioluminescentes pour la détection de: a) la phosphatase alcaline utilisant la luciférine et le bras réactif PABA ; b) la phosphatase alcaline utilisant l'amino-luciférine et le bras réactif Triméthyl Lock ; c) la β -lactamase.

Un autre concept intéressant qui se développe depuis quelques années est la possibilité d'effectuer du FRET entre une espèce bioluminescente et un accepteur comme une GPF par exemple.²⁶¹ Ce phénomène est appelé BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) et est important pour comprendre les développements que nous avons apportés à nos espèces chémioluminescentes. Ainsi, un dispositif de BRET original a été récemment publié : il met en jeu d'une part l'enzyme HaloTag (HTP) fusionnée à une luciférine ; d'autre part, la cible de l'HaloTag (une liaison carbone-halogène) a été greffée sur un quantum dot (QD). Ainsi, la reconnaissance de la cible par l'enzyme HTP entraîne l'accrochage covalent du QD sur la

²⁵⁸ Zhou, W.; Andrews, C.; Liu, J.; Shultz, J. W.; Valley, M. P.; Cali, J. J.; Hawkins, E. M.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *ChemBioChem* **2008**, 9, 714-718.

²⁵⁹ Yao, H.; So, M. K.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7031-7034.

²⁶⁰ O'Brien, M. A.; Daily, W. J.; Hesselberth, P. E.; Moravec, R. A.; Scurria, M. A.; Klaubert, D. H.; Bulleit, R. F.; Wood, K. V. *J. Biomol. Screening* **2005**, 10, 137-148. Kanno, A.; Yamanaka, Y.; Hirano, H.; Umezawa, Y.; Ozawa, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 7595-7599.

²⁶¹ Prinz, A.; Diskar, M.; Herberg, F. W. *ChemBioChem* **2006**, 7, 1007-1012 et références citées.

chimère HTP-Luc8 et en présence de coelentérazine, l'émission du QD est observée grâce à un transfert d'énergie de type BRET (Figure 3-3).²⁶² Les mêmes auteurs ont également rapporté un dispositif analogue pour la détection de protéases.²⁶³

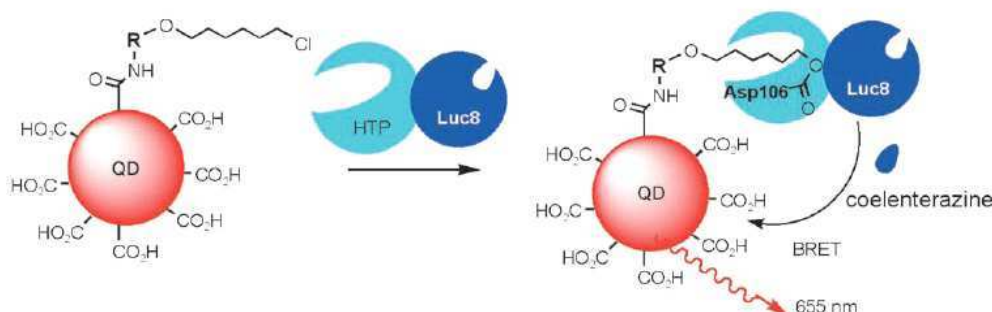


Figure 3-3. Mécanisme de BRET entre le couple Luc8/coelentérazine et un QD.

Les réactions de bioluminescence sont extrêmement utilisées et sont très attractives notamment grâce au fort rendement quantique (compris entre 0.90 et 1) qui est observé pour ce type de réactions. Cependant, dans la perspective d'applications en imagerie *in vivo*, l'implication de la luciférase dans les processus bioluminescents nécessitent de mettre en place des dispositifs où cette enzyme est produite. Pour cela, l'ingénierie génétique est indispensable pour permettre, grâce à la fusion de gènes reporteurs, de la faire exprimer par l'animal étudié, ce qui soulève quelques interrogations quant à l'extension de ces techniques à l'homme. C'est pourquoi, les réactions de chémioluminescence à partir de composés purement organiques apparaissent comme une alternative prometteuse à la bioluminescence.

2 La Chémioluminescence

La chémioluminescence est un phénomène relativement courant. Un exemple de la vie quotidienne est la flamme bleue d'une gazinière qui est due au retour à l'état fondamental de molécules de CO₂ excitées.

La réaction de chémioluminescence la plus connue est l'émission de lumière suite à la décomposition du luminol en présence de H₂O₂ et d'un catalyseur (habituellement la HRP (peroxydase de raifort), le cytochrome C, le fer ou d'autres complexes métalliques, schéma 3-

²⁶² Zhang, Y.; So, M.-k.; Loening, A. M.; Yao, H.; Gambhir, S. S.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 4936-4940.

²⁶³ Yao, H.; Zhang, Y.; Xiao, F.; Xia, Z.; Rao, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4346-4349.

4). Ainsi, le luminol est notamment utilisé en criminologie pour détecter le fer de l'hémoglobine répandue sur les scènes de crime.

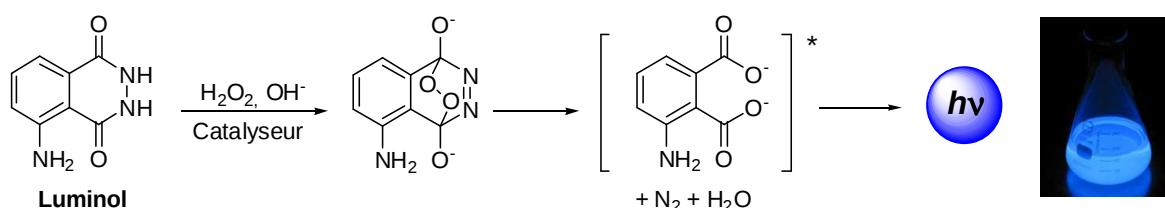


Schéma 3-4. Réaction chémiluminescente du luminol en présence de H₂O₂, d'une base et d'un catalyseur.

Une autre application de la chémiluminescence qui se retrouve dans la vie « quotidienne » est l'émission de lumière des bracelets fluorescents commercialisés dans les fêtes foraines ou lors de manifestations publiques comme la célébration de la fête nationale. En effet, il s'agit d'une réaction chémiluminescente qui peut être expliquée par la mise en contact d'un oxalate de 2,4,6-trichlorophényle avec de l'eau oxygénée. La réaction permet de libérer une 1,2-dioxétanone à l'état excité qui en elle-même n'émet pas de lumière. En revanche, celle-ci peut transférer son énergie à un fluorophore présent dans le milieu et lui permettre d'émettre de la lumière dont la couleur dépend de la nature du fluorophore choisi (Schéma 3-5 a). Une dernière réaction courante de chémiluminescence est l'utilisation d'esters d'acridinium. En effet, en présence de H₂O₂ et en milieu basique, ceux-ci génèrent une 1,2-dioxétanone qui se décompose en acridinone excitée qui revient à l'état fondamental en émettant de la lumière (Schéma 3-5 b).²⁶⁴

²⁶⁴ Beck, S.; Koster, H. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2258-2270.

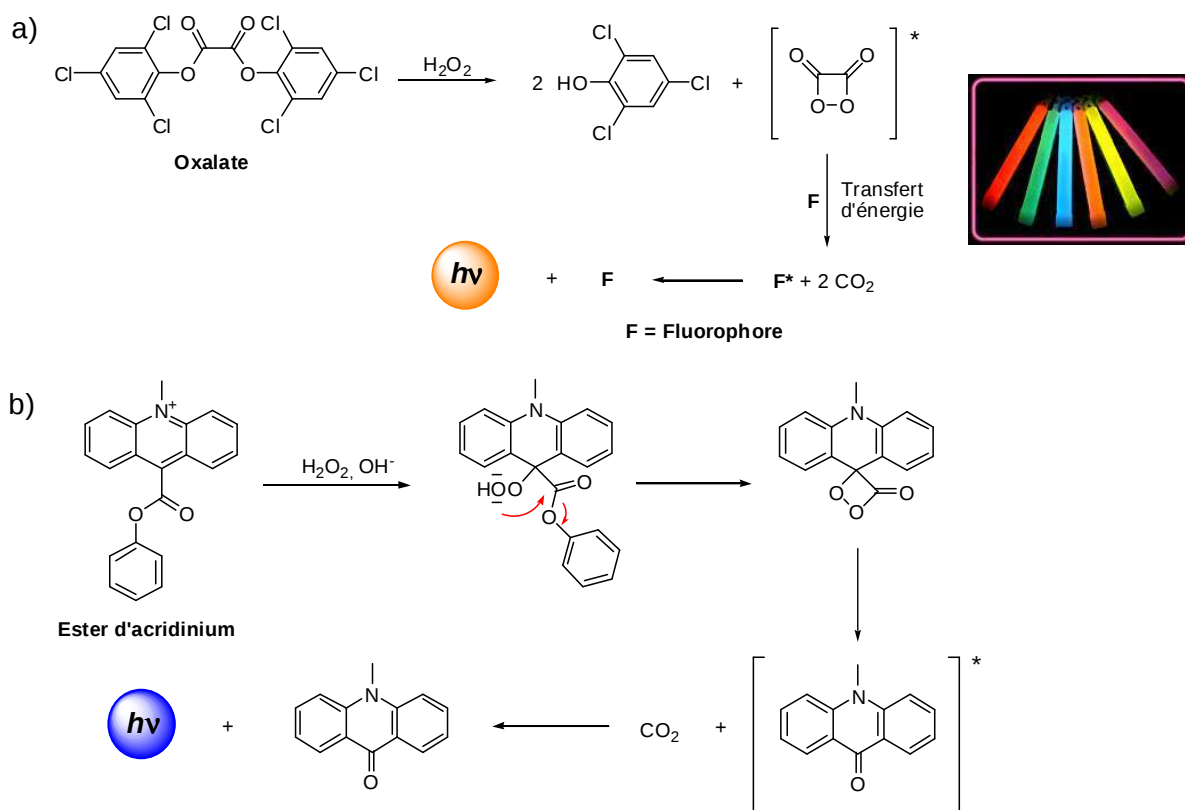


Schéma 3-5. Réactions chémiluminescentes en présence d' : a) oxalate d'aryle, b) ester d'acridinium.

Un point commun à toutes ces réactions chémiluminescentes est l'intervention d'une molécule de peroxyde d'oxygène (H_2O_2) dans leur mécanisme de déclenchement de l'émission de lumière. Mais l'élément important est que pour les deux derniers exemples, cette molécule de H_2O_2 sert à la formation d'une 1,2-dioxétanone ou d'une dioxetanedione qui sont des dérivés de 1,2-dioxétane. En se décomposant, celles-ci permettent à la molécule d'atteindre un niveau d'énergie suffisant pour générer une entité à l'état excité qui émet de la lumière en revenant à l'état fondamental.

Toutefois, afin d'étendre la chémiluminescence à d'autres applications, notamment biologiques, des dispositifs ont dû être développés afin de permettre le déclenchement de l'émission de lumière sans la présence d'un agent oxydant tel que H_2O_2 . Pour cela, la Nature a fourni une brillante source d'inspiration aux chimistes. En effet, on se souvient de l'efficacité de la bioluminescence du couple lucifirine/luciférase qui elle aussi mettait en jeu une 1,2-dioxétanone. Une approche biomimétique visant à déterminer les éléments importants pour une bonne émission de lumière a ainsi permis de mettre au point des espèces chémiluminescentes pouvant être déclenchées chimiquement ou de manière enzymatique (Figure 3-4) :

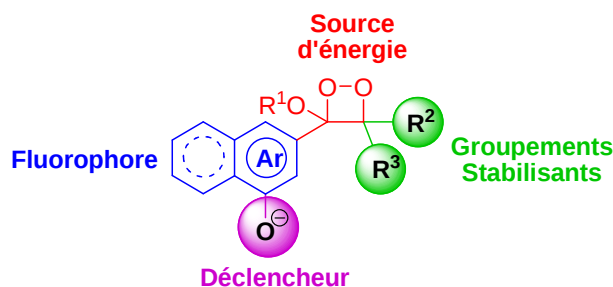


Figure 3-4. Formule générale des 1,2-dioxétanes chémioluminescents.

L'élément qui est le plus important est la source d'énergie. Comme dans les exemples précédents, il s'agit de la décomposition d'une molécule haute en énergie : un 1,2-dioxétane. Un autre élément important pour l'observation de la bioluminescence de la luciférine est la nécessité de disposer d'un phénolate libre sur la structure. En effet, celui-ci s'avère indispensable pour effectuer le déclenchement de la chémioluminescence.

Un troisième élément concerne la stabilisation de la structure de cet hétérocycle stériquement contraint. Celle-ci peut être obtenue par la substitution du motif 1,2-dioxétane par des groupements encombrants comme des groupements isopropyle, *tert*-butyle ou adamantyle. Enfin, la nature du dérivé aromatique utilisé (phényle et naphtyle ont essentiellement été décrits mais d'autres possibilités sont envisageables) détermine la longueur d'onde, l'intensité et le type de chémioluminescence qui peut être obtenue (*vide infra*).²⁶⁵

Le mécanisme proposé pour expliquer le phénomène de chémioluminescence des 1,2-dioxétanes a été décrit par G. B. Schuster il y a quelques années. Il propose un mécanisme appelé CIEEL (Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence) où le déclenchement, chimique ou enzymatique, génère un phénolate qui subit un transfert d'électron afin de former une espèce biradicalaire anionique. Une rupture homolytique suivie d'un retour d'électron (BET pour Back Electron Transfer) permet de former un phénolate à l'état excité qui revient à l'état fondamental en émettant de la lumière (Schéma 3-6).²⁶⁶

²⁶⁵ Adam, W.; Reinhardt, D.; Saha-Moeller, C. R. *Analyst* **1996**, *121*, 1527-1531.

²⁶⁶ Schuster, G. B. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 366-373.

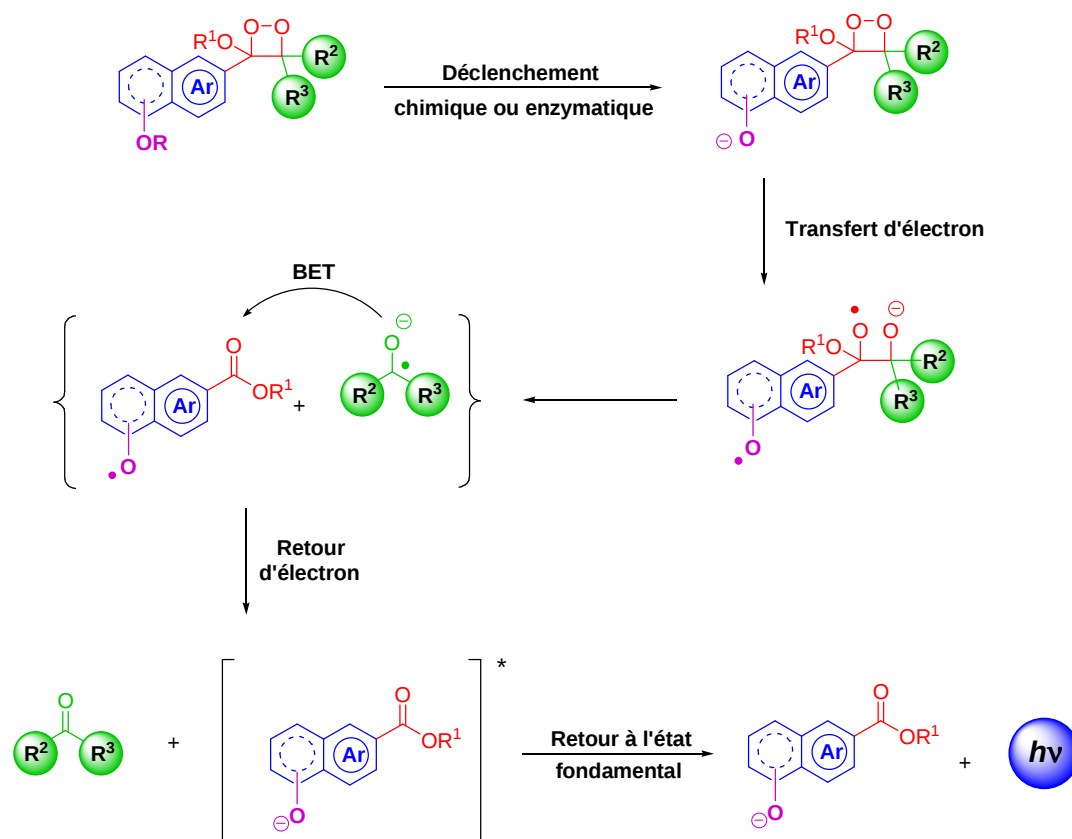


Schéma 3-6. Mécanisme CIEEL pour le déclenchement de la chémiluminescence des 1,2-dioxétanes.

Enfin, il existe un dernier paramètre qui permet de définir l'émission de lumière de la réaction chémiluminescente d'un 1,2-dioxétane : celle-ci peut être de type « flash » lorsque l'émission est brève et intense (comme pour la luciférine) ou de type « glow » si celle-ci s'effectue sur un laps de temps plus long. Dans le but de visualiser une émission de lumière déclenchée par un évènement biologique, l'objectif serait plutôt d'obtenir une chémiluminescence de type « glow ». Ainsi, il existe une règle empirique qui permet de prévoir si un 1,2-dioxétane émet une lumière de type « flash » ou « glow ». En effet, le déclenchement de la chémiluminescence entraîne la formation d'une molécule excitée possédant une fonction carbonyle. Si le phénol déclencheur est conjugué avec celui-ci, il a été montré que la chémiluminescence était de type « flash » (exemple de la luciférine, schéma 3-7 a) alors qu'en l'absence de conjugaison, la chémiluminescence était de type « glow » (Schéma 3-7 b avec un exemple courant de 1,2-dioxétane).²⁶⁷

²⁶⁷ Pour une revue générale sur les différents types de dioxétanes et les sondes ayant été décrites, voir Matsumoto, M. J. *Photochem. Photobiol.*, C **2004**, 5, 27-53.

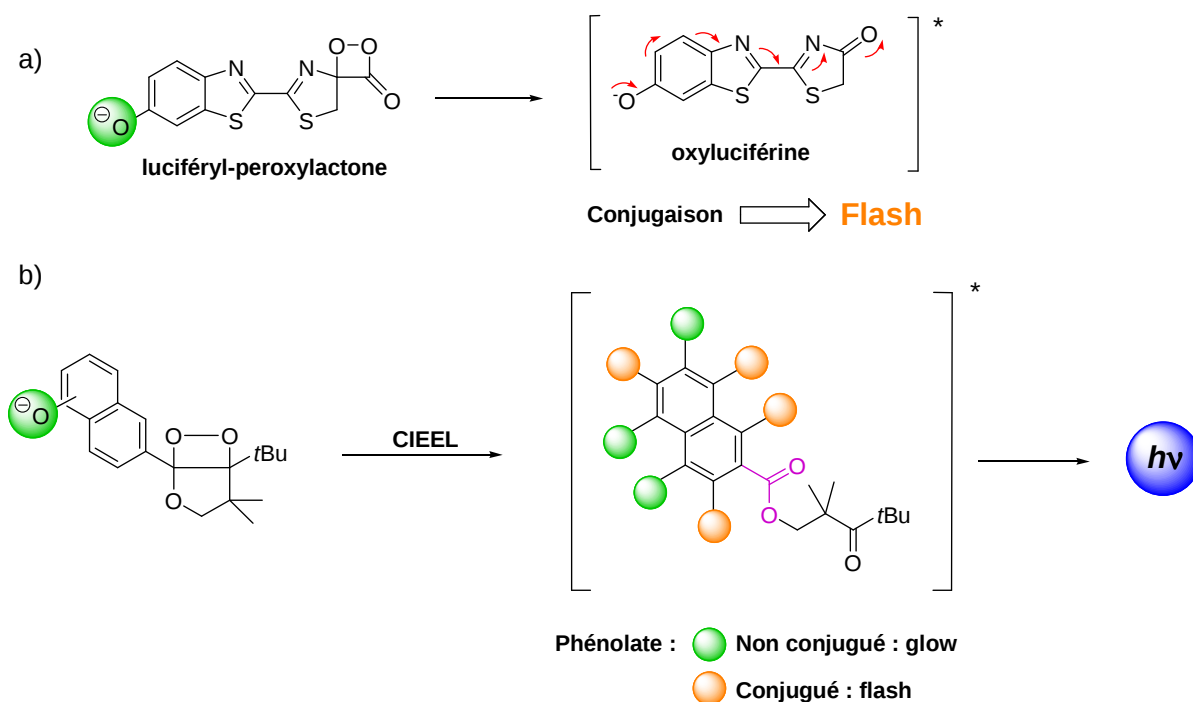


Schéma 3-7. Règle empirique régissant une émission de type « flash » ou « glow ».

Parmi les 1,2-dioxétanes ayant déjà été synthétisés, un dispositif ingénieux a été décrit avec la synthèse de 1,2-dioxétanes « bifonctionnels » : leur émission de lumière peut être déclenchée soit à partir d'ions fluorure (Schéma 3-8, voie a), soit à partir d'une base (Schéma 3-8, voie b). Cela permet de libérer respectivement un groupement amide ArN^- ou un groupement phénoxy ArO^- qui conduisent tous les deux à un transfert d'électron de type CIEEL avec *in fine* une émission de lumière de type « flash » pour les raisons évoquées précédemment. Toutefois, la stabilité de ces structures s'est avérée rédhibitoire (certaines chromatographies ont été effectuées à $-10\text{ }^\circ\text{C}$) et les rendements quantiques décrits sont très faibles même en solvant organique ($\sim 10^{-6}$, *vide infra*).²⁶⁸

²⁶⁸ Adam, W.; Reinhardt, D. *Liebigs Ann. Recl.* **1997**, 1359-1364. Adam, W.; Reinhardt, D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 1453-1463.

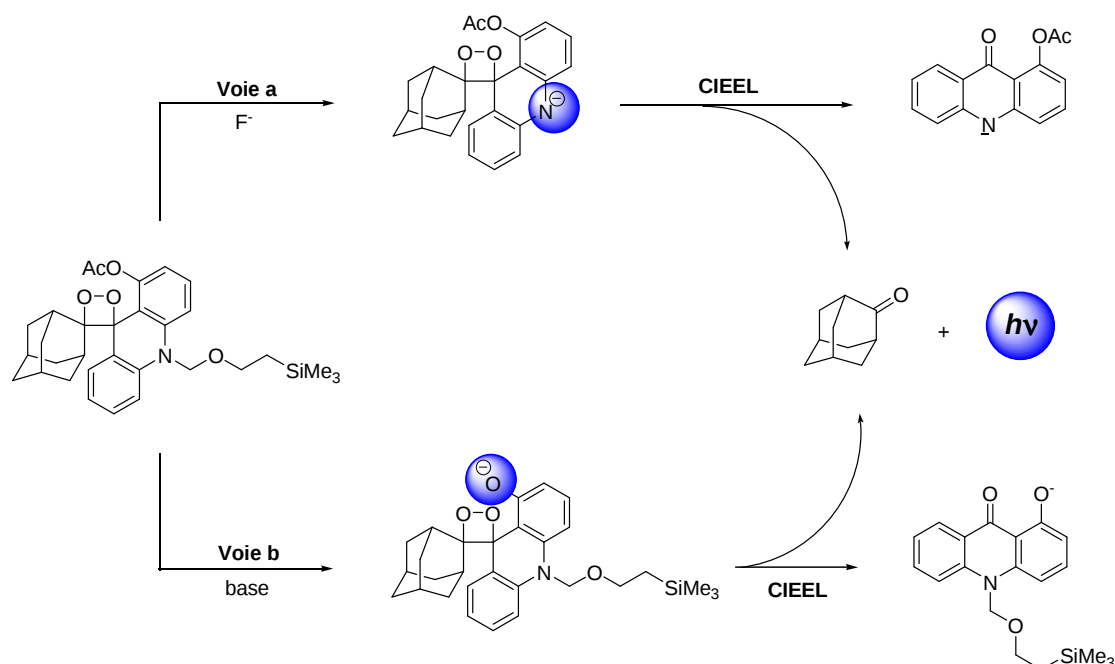


Schéma 3-8. Déclenchement de la chémiluminescence sur un 1,2-dioxétane bifonctionnel.

Un type de déclenchement original a également été décrit avec un transfert d'électron effectué à partir d'une fonction carboxylate.²⁶⁹ De façon intéressante, les rendements quantiques décrits sont légèrement meilleurs ($\sim 10^{-4}$) que les 1,2-dioxétanes spiroacridine précédents (Schéma 3-9).

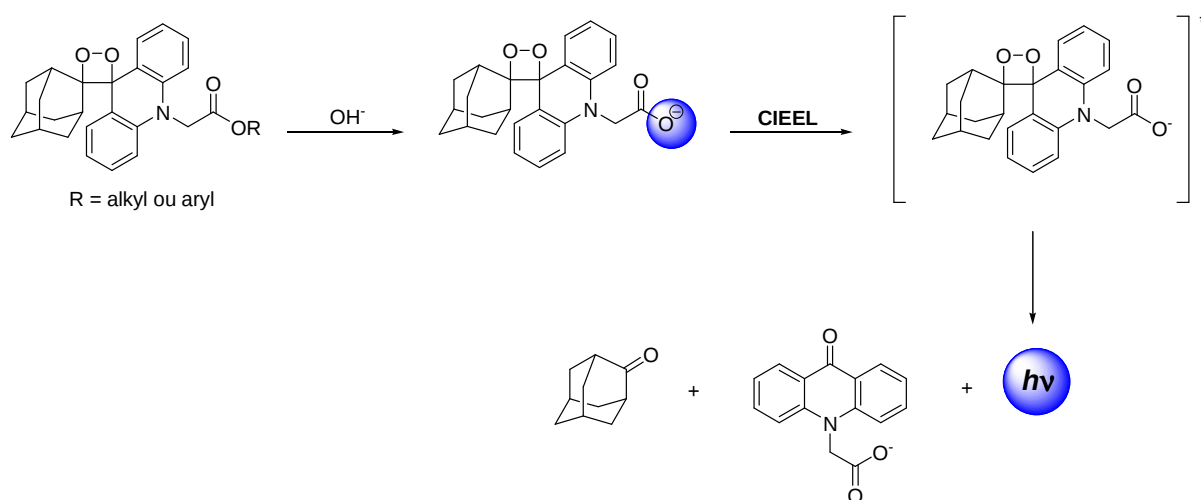


Schéma 3-9. Mécanisme CIEEL déclenché à partir d'une fonction carboxylate à proximité d'un 1,2-dioxétane.

²⁶⁹ Imanishi, T.; Ueda, Y.; Tainaka, R.; Miyashita, K.; Hoshino, N. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 841-844.

3 Les sondes chémioluminescentes

Les avantages de la chémioluminescence en termes de sensibilité et la possibilité de déclencher l'émission de lumière par une réaction enzymatique ont entraîné le développement de sondes chémioluminescentes. En particulier, l'utilisation de 1,2-dioxétanes est un excellent outil car le déclenchement de l'émission de lumière suite à la libération d'un phénol permet d'envisager de nombreuses cibles enzymatiques. Toutefois, et de façon assez surprenante, ce type de sondes est à ce jour moins décrit que les sondes bioluminescentes libérant le luminol (avec notamment plusieurs exemples d'utilisation de bras réactifs auto-immolables, voir section 1.2).

L'exemple précurseur décrit il y a une vingtaine d'années visait à la détection de la phosphatase alcaline²⁷⁰ et a permis la commercialisation de kits qui sont couramment utilisés.²⁷¹ Ce premier exemple a ensuite ouvert la voie pour la détection d'autres substrats comme la β -galactosidase,²⁷² la neuraminidase,²⁷³ la détection d'anticorps catalytiques (à activité estérase)²⁷⁴ ou de l'acétylcholine estérase²⁷⁵ en utilisant un thiophénol à la place du phénol (Figure 3-5).

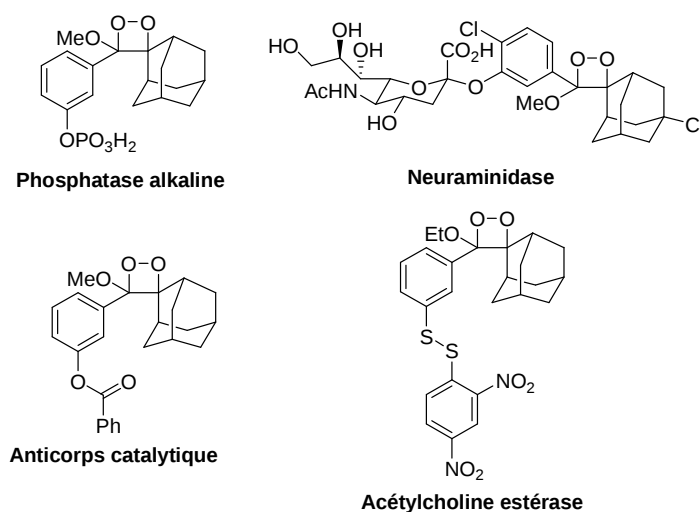


Figure 3-5. 1,2-Dioxétanes comme sondes chémioluminescentes pour la détection de diverses espèces.

²⁷⁰ I. Bronstein, H. G. T., L. J. Kricka, B. Edwards, J. C. Voyta *Clin.Chem.* **1989**, 2319-2321. I. Bronstein, J. C. V., G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, G. Armstrong *Clin.Chem.* **1989**, 1441-1446.

²⁷¹ <http://www.lumigen.com/>

²⁷² Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F.; Mielke, K.; Adam, W. *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 35-43.

²⁷³ Buxton, R. C.; Edwards, B.; Juo, R. R.; Voyta, J. C.; Tisdale, M.; Bethell, R. C. *Anal. Biochem.* **2000**, 280, 291-300.

²⁷⁴ Stevenson, J. D.; Dietel, A.; Thomas, N. R. *Chem. Commun.* **1999**, 2105-2106.

²⁷⁵ Sabelle, S.; Renard, P.-Y.; Pecorella, K.; de Suzzoni-Dezard, S.; Creminon, C.; Grassi, J.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4874-4880.

En revanche, peu de possibilités ont été décrites pour la détection de peptidases. Le seul exemple à notre connaissance est revendiqué de façon sommaire dans un brevet de la société Tropix, Inc.²⁷⁶ Il s'agit du greffage d'un 1,2-dioxétane dérivé d'une aniline sur une séquence peptidique dont le clivage permet l'émission de lumière. Cependant, la quantité de lumière émise est très faible,²⁷⁷ probablement à cause d'un mauvais transfert d'électron dû au fait que l'aniline libérée ne peut pas être sous forme anionique à pH physiologique (Schéma 3-10).

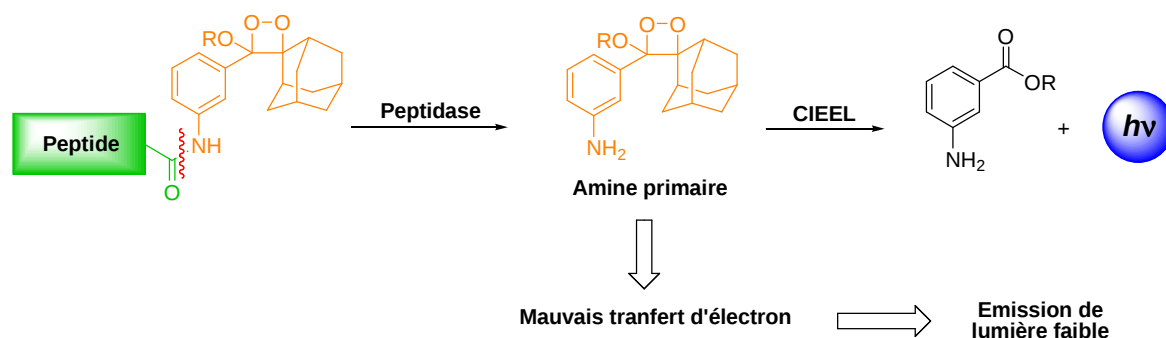


Schéma 3-10. Utilisation de 1,2-dioxétanes dérivés d'aniline pour l'obtention de sondes chémiluminescentes pour la détection de peptidases.

Des espèces carbanioniques ont également montré des aptitudes intéressantes pour le déclenchement de la chémiluminescence (*vide infra*). Cependant, comme pour le cas de l'aniline, il n'est pas possible d'utiliser ces 1,2-dioxétanes en milieu physiologique car la réaction la plus rapide est une réaction de reprotonation plutôt que le transfert d'électron.

Ainsi, la possibilité de libérer une espèce chargée négativement au pied d'un dérivé aryle (e.g., un phénolate ou un thiophénolate) semble être un critère primordial pour déclencher efficacement la chémiluminescence.

Dans le but d'obtenir un nouvel outil pour la détection de protéases, nous avons donc envisagé d'adapter le dispositif mis au point pour les sondes pro-fluorescentes (et présenté dans le chapitre 2) à la chémiluminescence des 1,2-dioxétanes. De la même manière que les sondes précédemment décrites permettent la libération d'un fluorophore phénolique suite à une coupure enzymatique, l'objectif est dans ce cas de libérer le phénolate d'un 1,2-dioxétane et d'en détecter l'émission de lumière.

²⁷⁶ Bronstein, I.; Edwards, B.; Martin, C.; Sparks, A.; Voyta, J. C. (Tropix, Inc., USA.). WO 9624849, 1996.

²⁷⁷ Watanabe, N.; Ichikawa, M.; Ono, A.; Murakami, H.; Matsumoto, M. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 718-719.

II SYNTHÈSE ET ÉVALUATION D'UNE SONDE CHEMILUMINESCENTE POUR LA DÉTECTION DE LA CASPASE-3

1 Résultats préliminaires

Des études préliminaires effectuées en parallèle de la synthèse des sondes pro-fluorescentes ont donné des indications concernant la stabilité de la sonde désirée.

Tout d'abord, l'éther d'énol **95** a été synthétisé selon une procédure déjà décrite.²⁷⁸ Celui-ci a ensuite été introduit sur le linker de H. Waldmann *et al.* en espérant que son caractère électroattracteur inférieur (et donc moins bon groupe partant) à celui des fluorophores **52** et **46'** permettrait une déprotection sélective des esters de TMSE par rapport à celui-ci. Ainsi, **96** a été obtenu à partir des composés **39** et **95** avec un rendement de 89%. Cet excellent rendement montre que le doublet de l'oxygène du dérivé phénolique **95** est plus disponible pour réagir avec l'ester actif que ne l'était celui de la 7-hydroxycoumarine **52** ou des fluorophores à phénol de la famille des acridinones et des oxazinones. A ce stade de la synthèse, un test de stabilité de l'ester **96** formé a été effectué afin de vérifier si une déprotection sélective des esters de TMSE était possible. Malheureusement, l'ajout de TAS-F dans le milieu a conduit à une déprotection partielle des esters de TMSE simultanément avec la libération de **95** (Schéma 3-11).

Ainsi, malgré une apparente plus grande stabilité de la sonde par rapport aux composés **44** et **47**, l'utilisation du linker de H. Waldmann *et al.* a définitivement été abandonnée au profit du linker PABA.

²⁷⁸ Sabelle, S.; Hydrio, J.; Leclerc, E.; Mioskowski, C.; Renard, P.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3645-3648. Bastos, E. L.; Ciscato, L. F. M. L.; Weiss, D.; Beckert, R.; Baader, W. J. *Synthesis* **2006**, 1781-1786.

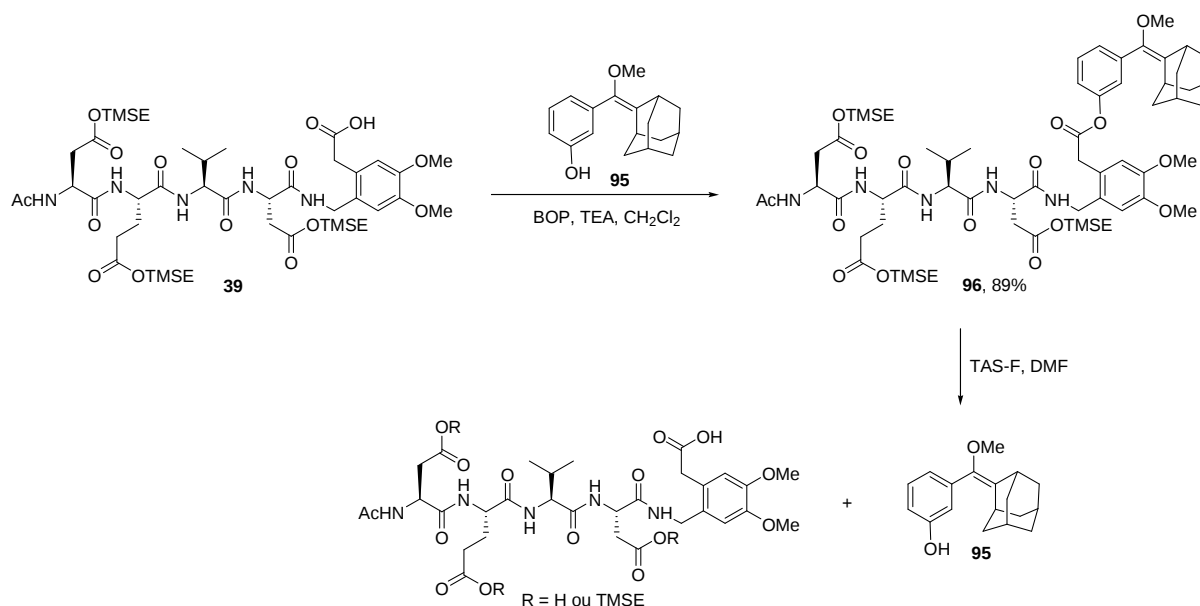


Schéma 3-11. Synthèse de l'éther d'énol **96** et test de stabilité dans les conditions de déprotection des esters de TMSE.

Comme présentée sur la figure 2.29, l'utilisation du PABA comme bras réactif auto-immolable permettait d'envisager deux possibilités pour connecter le phénol : un lien carbonate ou une liaison éther. Avant d'adopter la liaison éther pour la mise au point de nos sondes pro-fluorescentes, la possibilité d'utiliser un carbonate entre le PABA et le 1,2-dioxétane a également été explorée (Schéma 3-12). L'avantage principal de l'utilisation du motif carbonate est l'amélioration de la voie synthèse malgré un plus grand nombre d'étapes car les rendements obtenus avec cette stratégie sont plus reproductibles.

Ainsi, l'alcool benzylique **59** a été activé en présence de chloroformiate de *p*-nitrophényle **97** pour fournir le carbonate activé **98** qui réagit ensuite avec le phénol **95**. L'éther d'énol **99** ainsi obtenu subit la réaction clé de la synthèse, la cycloaddition [2+2] en présence d'oxygène singulet. Il existe plusieurs méthodes pour générer l'oxygène singulet *in situ*. La plus utilisée consiste en une irradiation sous rayonnement visible en présence d'un photosensibilisateur (le rose Bengal ou la tétraphénylporphyrine TPP par exemple). Cependant, de précédentes expériences au laboratoire ont montré que dans ces conditions, nos précurseurs de sondes se dégradent, probablement car le bras réactif utilisé (i.e., un chromophore diméthoxyphényle possédant deux positions benzyliques) était photo-réactif. Ainsi, une méthode plus douce a été choisie où l'oxygène singulet est généré à partir d'un triarylphosphite et d'ozone.²⁷⁹ Cette méthode avait notamment montré son efficacité pour la synthèse de 1,2-dioxétanes analogues

²⁷⁹ Stephenson, L. M.; Zielinski, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5819-5820.

à ceux que nous visions²⁷⁵ et a ainsi permis de former le composé **100** avec un rendement de 20% après purification par CLHP semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée. Ce rendement modeste s'explique par la faible conversion (évaluée à environ 50% par CLHP analytique) du réactif de départ même en présence d'un large excès de triphénylphosphite. Cependant, suffisamment de matériel était disponible pour conduire des essais de déprotection des esters de TMSE de **100**. Malheureusement, comme avec le bras réactif de H. Waldmann *et al.*, la sonde s'est avérée instable en présence de TBAF ou de TAS-F. Cette instabilité est d'autant plus spectaculaire que l'espèce libérée étant un 1,2-dioxétane, celle-ci se décompose instantanément en émettant une intense lumière bleue fluorescente (Schéma 3-12).

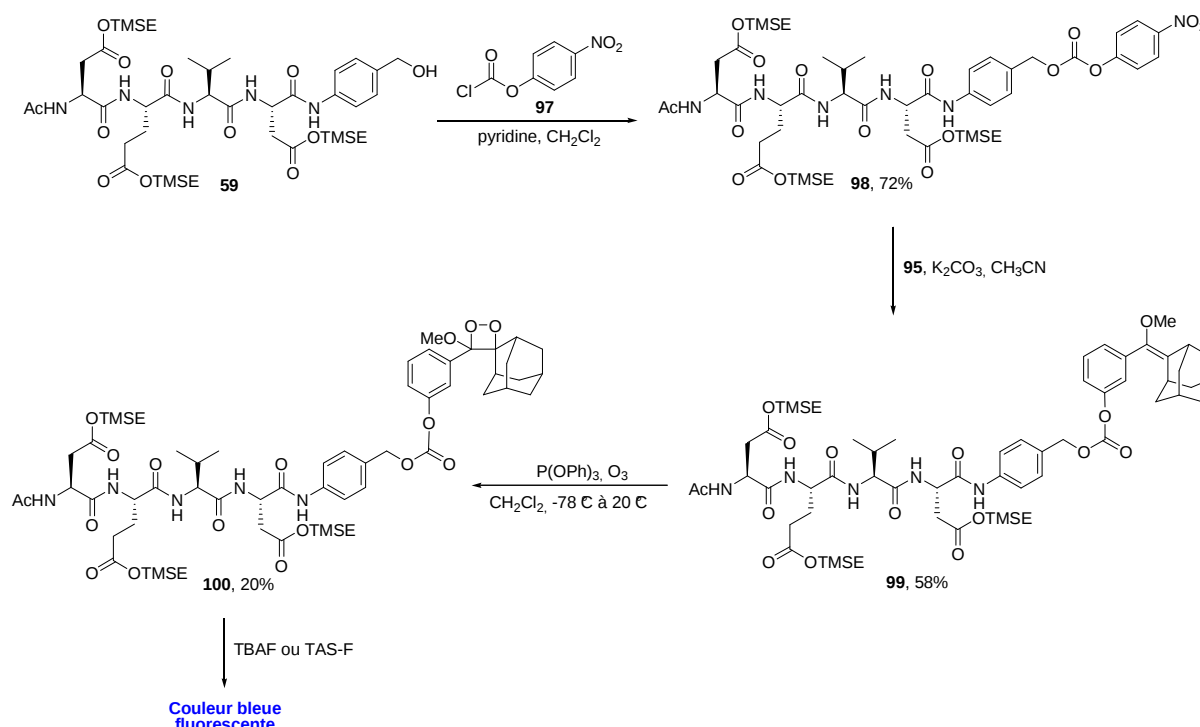


Schéma 3-12. Synthèse de la sonde caspase-3 présentant un lien carbonate entre le motif 1,2-dioxétane et le bras réactif.

2 Synthèse de la sonde chémioluminescente

Ainsi, les différentes approches envisagées ont montré que le bras réactif de H. Waldmann *et al.* et le PABA utilisant une fonction carbonate n'étaient pas appropriés pour notre voie de synthèse, même avec un phénol peu activé comme **95**. Toutefois, notre expérience concluante

menée en parallèle sur les sondes pro-fluorescentes en utilisant un lien éther permettait d'être optimiste quant à l'extension de cette stratégie à la chémioluminescence.

Ainsi, l'introduction de l'éther d'énol **95** a pu être effectuée selon la même méthode que précédemment et **101** a été obtenu avec un rendement amélioré de 44% comparativement aux composés **62** et **64**. L'étape clé de cycloaddition [2+2] s'est déroulée de façon analogue à la synthèse de **100**, avec un rendement de 25% en produit isolé (rendement de 50% basé sur la récupération du réactif de départ) après purification par CLHP semi-préparative. Il est important de noter que le choix de la phase mobile aqueuse utilisée lors de cette purification CLHP est ici crucial. En effet, connaissant l'instabilité des 1,2-dioxétanes en milieu acide, les phases mobiles composées d'acides organiques (acide acétique, formique ou trifluoroacétique) en solution dans l'eau (teneur : 0.1%), habituellement utilisées en chromatographie en phase inverse, ont été exclues. De plus, il a été mis en évidence que le 1,2-dioxétane était également instable dans l'eau ultrapure dé-ionisée (purifiée à l'aide d'un système Milli-Q) dont le pH est généralement compris entre 5 et 6. Ainsi, nous avons été amenés à utiliser une phase mobile de pH légèrement basique : une solution aqueuse de bicarbonate de triéthylammonium (TEAB, 50 mM, pH 7.5) qui présente en outre l'avantage d'être un tampon qui peut s'éliminer par lyophilisation.

Enfin, la déprotection des esters de TMSE en présence de TBAF a été effectuée et a permis l'obtention d'un seul produit totalement déprotégé et surtout aucune libération prématurée de **95** dans le milieu. Ainsi, comme espéré, le lien éther s'est avéré être suffisamment solide pour subir la déprotection des esters de TMSE sans être affecté par les conditions de réaction. Une purification finale par CLHP semi-préparative en utilisant là encore le tampon TEAB comme phase mobile aqueuse a ainsi permis l'obtention de la première sonde chémioluminescente pour la détection de la caspase-3 (Schéma 3-13).²⁸⁰

²⁸⁰ Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Massonneau, M. (Quidd, Fr.; Université De Rouen). WO 2006129036, 2006. Richard, J. A.; Jean, L.; Romieu, A.; Massonneau, M.; Noack-Fraissignes, P.; Renard, P. Y. *Org. Lett.* **2007**, 9, 4853-4855.

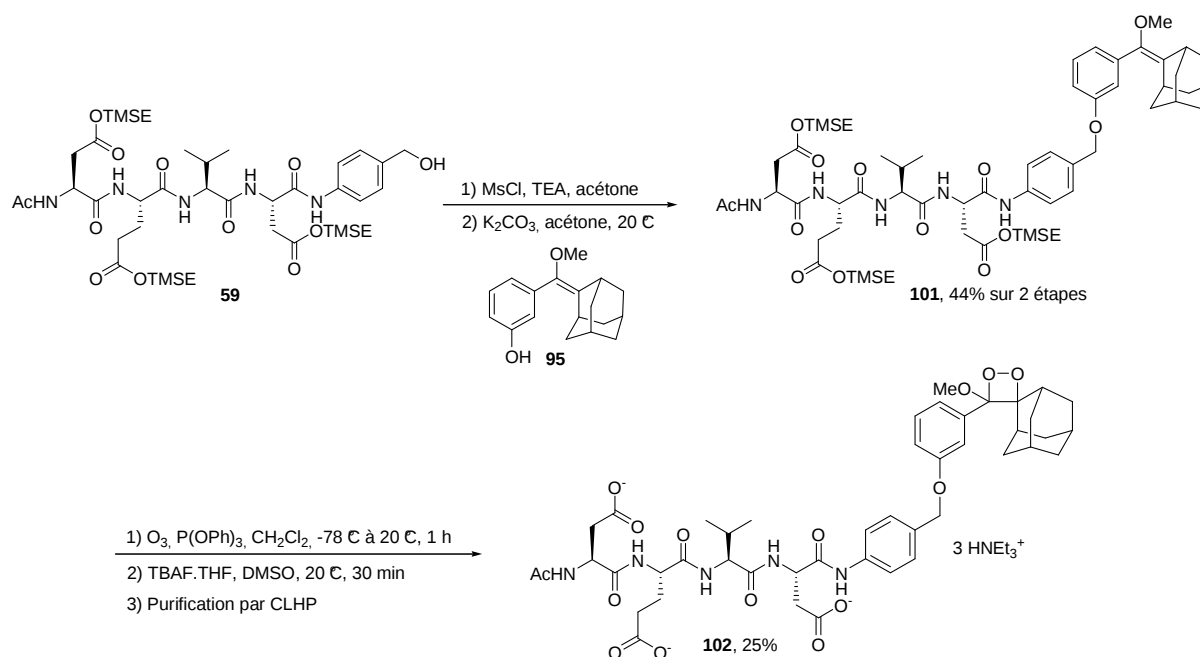


Schéma 3-13. Synthèse de la sonde caspase-3 avec un lien éther entre le 1,2-dioxétane et le bras réactif.

3 Clivage par la caspase-3

Une fois la synthèse de la sonde réalisée, des conditions analytiques ont été mises au point afin de visualiser l'émission de lumière faisant suite au clivage par la caspase-3 et à la décomposition du bras réactif libérant le phénolate.

Il est tout d'abord important de noter que l'émission de lumière du 1,2-dioxétane que nous avons utilisé est plus efficace dans les solvants organiques qu'en milieu aqueux. En effet, le rendement quantique du 1,2-dioxétane **103** dans le DMSO est voisin de 25% alors que la même espèce dans l'eau voit son rendement quantique subir une diminution drastique dans un rapport 1/39 000.²⁸¹ Cette diminution peut être attribuée à un moins bon transfert d'électron dû à une reprotonation du phénolate libéré à pH 7.0.

Ainsi, afin de visualiser l'émission en milieu aqueux de façon plus efficace, il est nécessaire de mettre en place un dispositif qui puisse amplifier artificiellement l'émission du 1,2-dioxétane. Pour cela, les conditions utilisées ont été adaptées de procédures décrites par la société Lumigen, Inc. qui commercialise les kits permettant la détection de la phosphatase alcaline. En effet, leurs kits sont vendus sous la forme d'un mélange contenant la sonde, un

²⁸¹ Adam, W.; Bronstein, I.; Edwards, B.; Engel, T.; Reinhardt, D.; Schneider, F. W.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10400-10407.

tensio-actif et un fluorophore dans un tampon à pH 9.6. Le tensio-actif (CTAB, bromure de cétyltriméthylammonium) est destiné à la formation de micelles permettant d'obtenir un environnement hydrophobe autour du 1,2-dioxétane, ce qui est propice à une meilleure émission. Le fluorophore utilisé est la 5-(stéaroylamino)fluorescéine qui absorbe à la longueur d'onde d'émission du 1,2-dioxétane et dont le rôle est de restituer efficacement l'énergie libérée par celui-ci. Le transfert d'énergie est d'autant plus efficace que la fluorescéine est présente en large excès dans le milieu et est en étroite proximité du 1,2-dioxétane car elle porte une longue chaîne hydrophobe qui lui permet de participer à la formation de la micelle (Figure 3-6 a-b). Enfin, les conditions basiques ont pour but de favoriser la formation du phénolate ($pK_a = 9.0$) et permettent donc un bon transfert d'électron (Figure 3-6 c). Il a ainsi été décrit que le système émettait 370 fois plus que lorsque les mesures sont effectuées en absence d'additifs.²⁸²

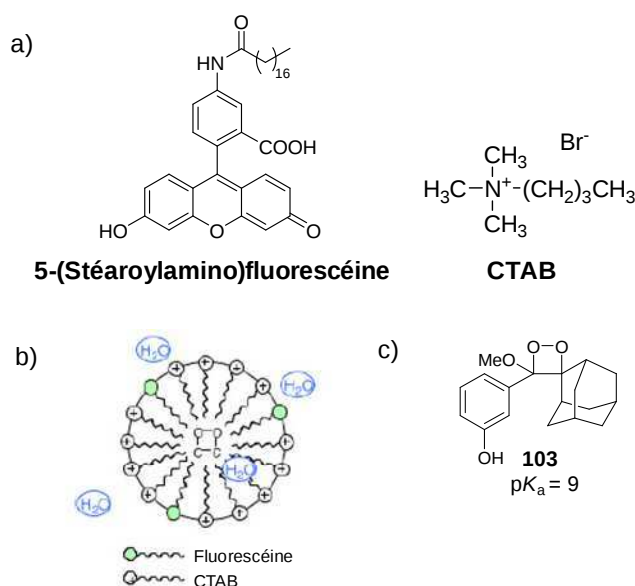


Figure 3-6. a) Un fluorophore et un tensio-actif comme additifs ajoutés au milieu pour améliorer l'efficacité de l'émission ; b) Formation d'une micelle et d'un environnement hydrophobe autour du 1,2-dioxétane ; c) Utilisation d'un tampon basique pour favoriser la formation de la forme phénolate de **103**.

Le pH utilisé dans ce système est approprié pour la détection de la phosphatase alcaline puisque celle-ci a une activité optimale à pH 10.0. En revanche, le pH optimal pour la caspase-3 a été évalué à 7.2 par le groupe de G. S. Salvesen.²⁸³ La réaction de clivage enzymatique ne peut donc pas être effectuée en milieu basique sous peine de détruire cette

²⁸² Beck, S.; Koster, H. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2258-2270.

²⁸³ Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25719-25723.

peptidase. Ainsi, comme il a déjà été reporté dans la littérature,²⁷⁵ il a été nécessaire d'opérer une détection en temps final : en effet, une solution basique contenant les additifs a été préparée d'une part (CTAB, 2 mM ; 5-(stéaroylamino)fluorescéine, 0.18 mM ; pH 12.3). D'autre part, la sonde a été dissoute dans le tampon de la caspase-3 (200 μ L, 10% (m/v) sucrose, 50 mM HEPES, 100 mM, NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% (m/v) CHAPS, pH 7.4) et la caspase-3 recombinante humaine a été introduite. Puis, une partie du milieu réactionnel a été prélevée toutes les 15 minutes, mélangée au tampon basique et l'émission de lumière a été enregistrée pendant 10 minutes (Figure 3-7).

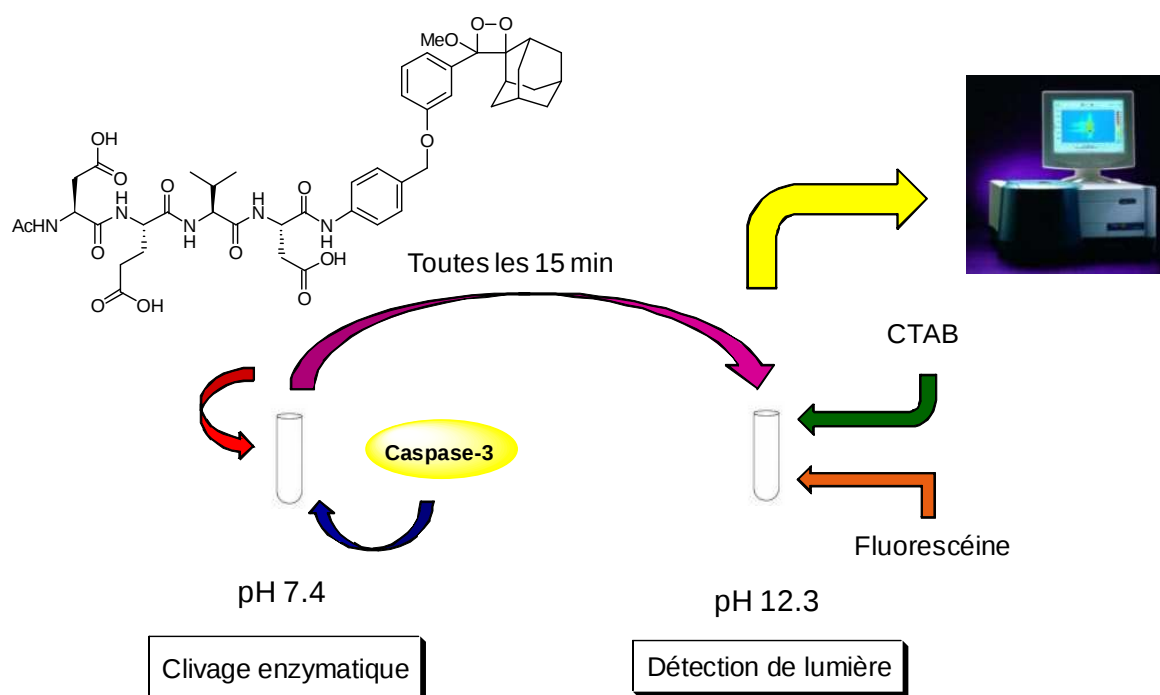
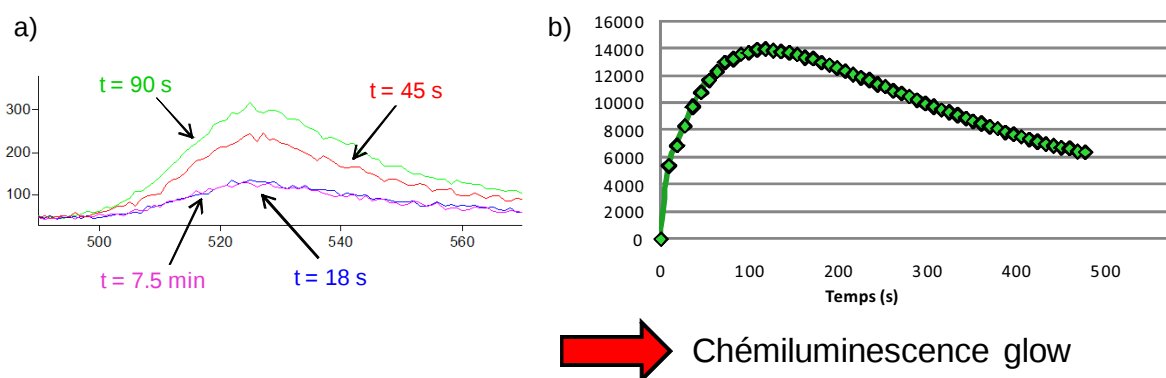


Figure 3-7. Procédure en temps final utilisée pour la détection de lumière suite au clivage par la caspase-3.

Ainsi, l'émission de lumière a été enregistrée entre 490 et 570 nm et une émission à 530 nm correspondant à l'émission de la fluorescéine a pu être détectée (quatre spectres d'émission sont représentés sur la figure 3-8 a). Il est à noter qu'aucune émission notable de lumière n'a pu être observée en effectuant la même expérience en absence de fluorophore, montrant ainsi l'utilité de celui-ci et l'efficacité du transfert d'énergie. Pour chaque prélèvement, la quantité de lumière émise dure plusieurs minutes, par exemple, pour le prélèvement effectué au temps $t = 105$ minutes, le maximum de l'émission de lumière est atteint après seulement 90 secondes et une quantité non négligeable de lumière est encore émise après 7.5 minutes.



➔ Chémiluminescence glow

Figure 3-8. a) Spectre d'émission de lumière détectée à 530 nm et b) quantification totale de la lumière émise, pour le prélèvement effectué au temps $t = 1 \text{ h } 45 \text{ min}$ de la cinétique enzymatique.

La totalité des courbes d'émission ont été intégrées et la somme de la lumière émise en fonction du temps est représentée sur la figure 3-8 b). L'allure de la courbe est très intéressante puisqu'elle montre bien une émission de lumière étalée dans le temps. L'émission suit donc bien une chémiluminescence de type « glow » qui est caractéristique du 1,2 dioxétane **103**.

De même, la quantité totale de lumière émise pour chaque prélèvement (écrêté après 500 secondes d'émission) a été représentée en fonction du temps de la cinétique enzymatique et une augmentation de l'émission de lumière a été observée (Figure 3-9, a). Enfin, un test de sensibilité de la sonde a été effectué dans le but d'évaluer la quantité minimale d'enzyme pouvant être détectée. Une quantité décroissante d'enzyme a été ajoutée à la sonde et une limite de détection de la caspase-3 a pu être estimée autour de 1 pmol (Figure 3-9, b). Parallèlement, des tests de contrôle ont montré que dans les mêmes conditions d'expérience, aucune émission de lumière n'était détectée en absence de caspase-3 ou en présence de caspase-9 ou de PGA, montrant la spécificité de la sonde pour la caspase-3.

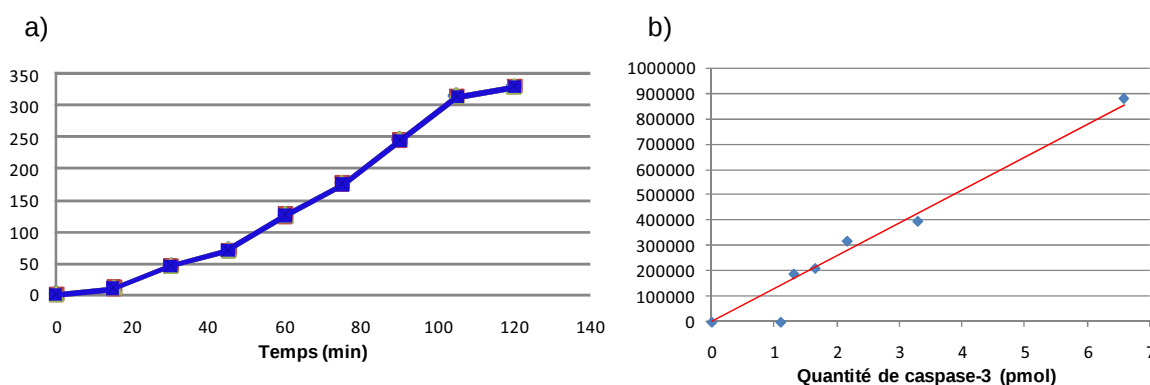


Figure 3-9. a) Evolution de la quantité de lumière émise par la sonde **102** (concentration finale : 30 μM) en fonction du temps de la réaction enzymatique ($1.6 \cdot 10^{-3} \text{ U}$) ; b) Détermination de la limite de détection de la caspase-3 (temps d'incubation : 1 h).

4 Conclusion

La sonde obtenue a permis de valider notre stratégie de bras réactif auto-immolable pour la mise au point de sondes chémiluminescentes. Pour cela, l'utilisation du lien éther reliant le phénol (porteur du 1,2-dioxétane) au bras réactif s'est de nouveau imposée pour obtenir une sonde totalement stable. Les expériences de cinétique ont montré l'efficacité de la sonde pour la détection *in vitro* de la caspase-3 et ouvrent de nouvelles possibilités pour imager cette enzyme par chémiluminescence.

Cependant, le dispositif mis au point doit être amélioré afin de répondre aux critères de l'imagerie en milieu biologique. En effet, afin de remédier aux limitations du protocole employé pour les mesures de chémiluminescence avec la sonde **102**, il est tout d'abord nécessaire de pouvoir observer l'émission sans la nécessité d'ajouter des additifs dans le milieu. Des 1,2-dioxétanes émettant une quantité plus importante de lumière en milieu aqueux ont donc dû être développés. Ensuite, ces nouveaux 1,2-dioxétanes doivent répondre aux exigences de l'imagerie *in vivo* en émettant à des longueurs d'ondes voisines ou supérieures à 650 nm. Enfin, il est nécessaire d'abaisser le pKa du phénol libéré autour de 7.0 afin d'envisager l'observation de l'émission de lumière en temps réel. Tous ces paramètres combinés devraient permettre d'envisager l'utilisation de sondes chémiluminescentes pour la visualisation d'évènements biologiques en milieu vivant.

Ainsi, des travaux pour améliorer l'émission de lumière ainsi que l'extension de l'émission à de plus grandes longueurs d'ondes ont été effectués et vont être présentées dans cette dernière partie. Par ailleurs, les travaux visant à diminuer le pKa du phénol sont en cours de développement au sein du département Chimie de la société Quidd.²⁸⁴

²⁸⁴ Travaux réalisés par le Dr. Christophe Portal.

III AUGMENTATION DE L'EMISSION DES DIOXETANES ET EXTENSION DE L'EMISSION VERS LE ROUGE

1 Remarques préliminaires

Jusqu'à présent, il n'a été question que du 1,2-dioxétane **103** qui est la structure la plus couramment rencontrée dans les sondes chémioluminescentes, notamment celles commercialisées par Lumigen, Inc., et qui présente actuellement les propriétés de luminescence les plus intéressantes pour des applications *in vitro*. Cependant, un équivalent **104** ($\lambda_{Em.} = 469$ nm, $\Phi = 0.20$ au lieu $\lambda_{Em.} = 460$ nm, $\Phi = 0.25$ pour **103**) dont la structure porte un cycle tétrahydrofurane au lieu d'un groupement adamantane a également été rapporté et a été montré comme étant plus stable.²⁸⁵ Sachant que la sonde chémioluminescente **102** a présenté quelques problèmes de stabilité, en particulier lors des purifications par CLHP, il nous a semblé plus intéressant de développer de nouveaux 1,2-dioxétanes en se basant sur ce cycle tétrahydrofurane.

Plusieurs 1,2-dioxétanes émettant à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm ont déjà été rapportés dans la littérature.²⁸⁶ Par exemple, le remplacement du phénol de **104** par une aniline permet l'obtention de **105** et une émission intéressante à 642 nm mais malheureusement avec un très faible rendement quantique de $4.8 \cdot 10^{-6}$.²⁷⁷ De même, la génération d'un carbanion stabilisé dans la même position permet une émission de **106** entre 622 et 758 nm mais avec également de très faibles rendements quantiques, et exclusivement dans des milieux purement organiques (Figure 3-10).²⁸⁷

²⁸⁵ Matsumoto, M.; Ito, Y.; Murakami, M.; Watanabe, N. *Luminescence* **2002**, 17, 305-312. Watanabe, N.; Nagashima, Y.; Yamazaki, T.; Matsumoto, M. *Tetrahedron* **2003**, 59, 4811-4819.

²⁸⁶ Tous les rendements quantiques ont été déterminés à 25 °C dans le DMSO en utilisant **103** comme référence et selon une procédure mise au point par le groupe de M. Matsumoto.

²⁸⁷ Matsumoto, M.; Mizuno, T.; Watanabe, N. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3779-3782. Watanabe, N.; Mizuno, T.; Matsumoto, M. *Tetrahedron* **2005**, 61, 9569-9585.

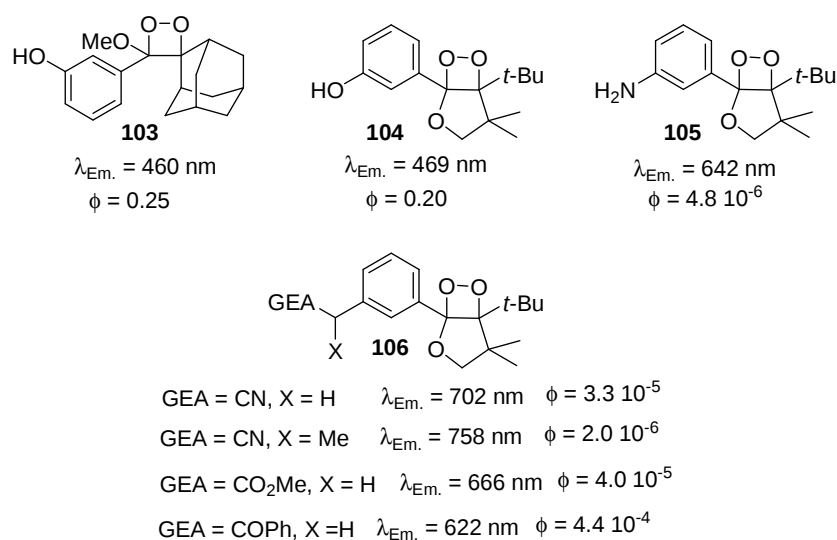


Figure 3-10. 1,2-Dioxétanes de référence **103** et **104** et modification du déclencheur pour déplacer l'émission vers le rouge.

D'autres modifications ont été effectuées sur la structure afin de déplacer l'émission dans le rouge tout en conservant le déclenchement de la chémioluminescence par un phénol. Ainsi, de façon intéressante, l'intercalation d'une double ou d'une triple liaison entre le motif 1,2-dioxétane et le cycle aromatique permet une émission à 644 et 630 nm respectivement pour **107** et **108**.²⁸⁸ L'utilisation de cycles aromatiques ou hétéroaromatiques plus complexes pour **109**, **110** et **111** permet également d'obtenir des émissions dans le rouge.²⁸⁹ Cependant, le rendement d'émission de toutes ces structures est fortement diminué par rapport à **104**, empêchant leur utilisation dans les applications que nous visons. Enfin, la structure **112** présente un intérêt particulier dans la mesure où la « simple » introduction d'un noyau anthracène sur la structure a permis de déplacer l'émission de 469 à 709 nm par comparaison avec le composé parent **104** (cependant, le rendement quantique n'est pas indiqué). Ainsi, cela montre que la modification du noyau aromatique semble être une stratégie pertinente pour déplacer de façon significative l'émission vers le rouge (Figure 3-11).²⁹⁰

²⁸⁸ Matsumoto, M.; Ishihara, T.; Watanabe, N.; Hiroshima, T. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4571-4574.

²⁸⁹ Watanabe, N.; Nagamatsu, K.; Mizuno, T.; Matsumoto, M. *Luminescence* **2005**, 20, 63-72.

²⁹⁰ Matsumoto, M.; Kasai, D.; Yamada, K.; Fukuda, N.; Watanabe, N.; Ijuin, H. K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 8079-8082.

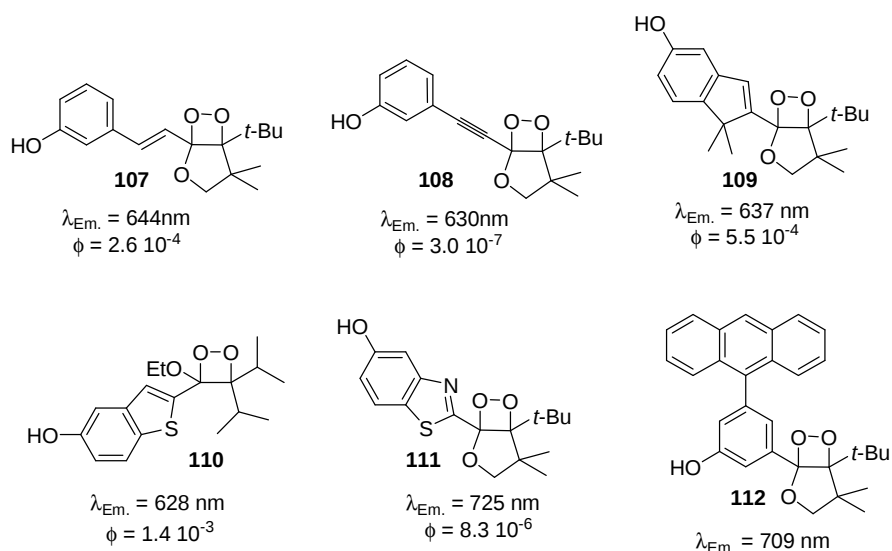


Figure 3-11. Modifications de 1,2-dioxétanes pour déplacer l'émission vers le rouge.

Enfin, la substitution de différentes positions d'un noyau naphthalène a également montré des différences au niveau de l'émission du 1,2-dioxétane. En effet, lorsque le phénol est positionné en *méto* du 1,2-dioxétane **113**, l'émission est voisine de 500 nm. En revanche, le déclenchement de la chémioluminescence sur le deuxième noyau aromatique dans les positions non conjuguées avec le 1,2-dioxétane (comme discuté précédemment pour obtenir une chémioluminescence de type « glow ») a été décrit pour émettre à des longueurs d'onde plus intéressantes (respectivement 628 et 642 nm pour **114** et **115**), avec des rendements quantiques modestes mais qui restent acceptables (Figure 3-12).

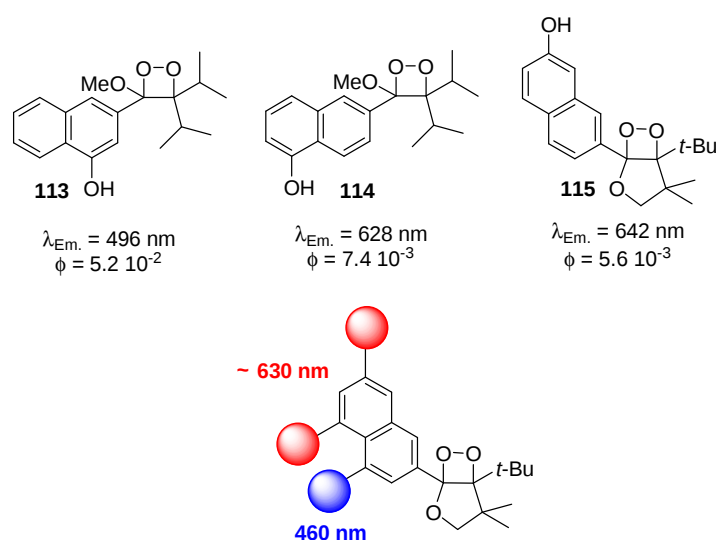


Figure 3-12. Influence de la position du phénol déclencheur sur la couleur de l'émission du 1,2-dioxétane.

2 Première stratégie : Transfert d'énergie à travers l'espace

2.1 Principe

Les structures précédemment synthétisées nous ont renseignés sur les moyens envisageables pour déplacer l'émission de lumière vers le rouge mais assez peu sur les possibilités d'augmenter son efficacité. Dans ce but, le dispositif que nous avons utilisé pour le test de clivage par la caspase-3 semblait intéressant. En effet, il s'agissait d'un transfert d'énergie assez efficace entre le 1,2-dioxétane et la fluorescéine présente dans le milieu. Ce dispositif peut être apparenté à du CRET (Chemiluminescence Resonance Energy Transfer), équivalent du FRET mais sans la nécessité d'exciter le donneur puisque celui-ci émet spontanément *via* une réaction chimique.

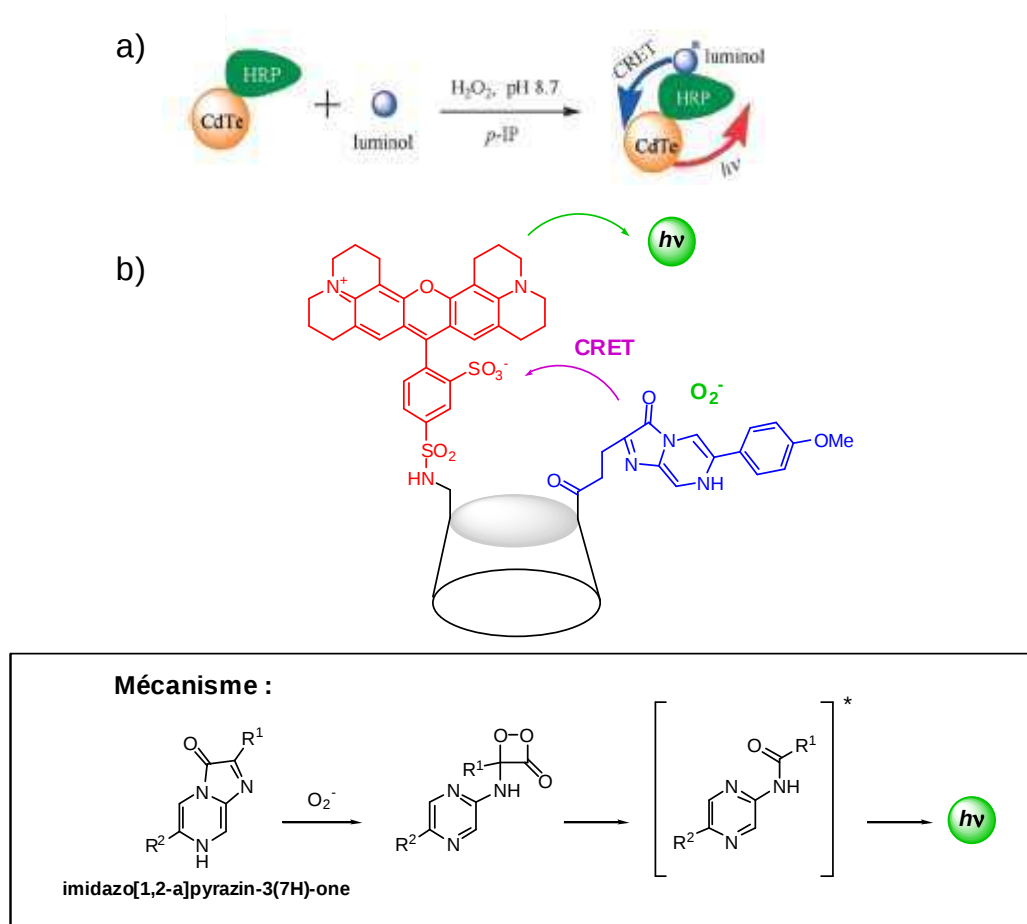


Figure 3-13. Utilisation du CRET pour la détection : a) du luminol avec transfert d'énergie à un QD ; b) de l'anion radical superoxyde avec émission d'une rhodamine.

Ce mécanisme connaît un intérêt croissant dans la communauté scientifique, à l'image de l'utilisation du BRET. Pour deux exemples récents, on peut citer la détection du luminol par la HRP qui en présence de luciférase permet un transfert d'énergie de type CRET à un QD (Figure 3-13 a).²⁹¹ Pour un exemple avec un fluorophore organique, l'équipe de K. Teranishi a rapporté le greffage d'une espèce imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one et de la sulforhodamine 101 (ou Texas Red[®]) sur diverses cyclodextrines. Ainsi, la détection de l'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) permet un transfert d'énergie entre l'espèce chémiluminescente et le fluorophore qui peut ainsi émettre à 610 nm (Figure 3-13 b).²⁹²

Dans le but d'adapter ce même concept à nos sondes, nous avons envisagé de modifier notre dispositif afin d'éviter une émission de lumière *via* un transfert d'énergie intermoléculaire entre le 1,2-dioxétane et le fluorophore. Il semble donc pertinent d'associer de façon covalente un fluorophore à la structure du 1,2-dioxétane afin de rapprocher spatialement les deux partenaires et permettre un transfert d'énergie intramoléculaire plus efficace. Cette approche a précédemment été utilisée avec un 1,2-dioxétane et une fluorescéine et a montré une augmentation par un facteur 460 de l'émission de lumière dans l'eau, atteignant un niveau comparable au dispositif contenant les additifs (Figure 3-14, a).²⁹³

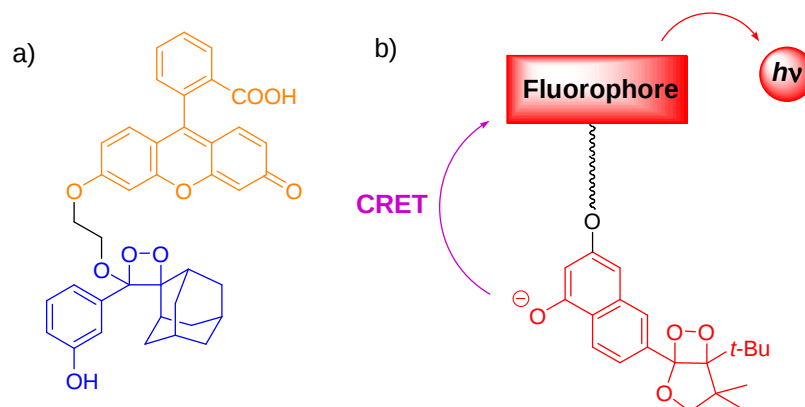


Figure 3-14. a) Greffage covalent d'une fluorescéine sur un 1,2-dioxétane ; b) Dispositif envisagé pour effectuer un transfert d'énergie de type CRET entre un 1,2-dioxétane et un fluorophore émettant dans le rouge.

Afin d'atteindre des longueurs d'onde situées dans le rouge, il est donc envisageable d'utiliser l'émission au-delà de 600 nm d'un 1,2-dioxétane greffé sur une plate-forme naphthalène et

²⁹¹ Huang, X.; Li, L.; Qian, H.; Dong, C.; Ren, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5140-5143.

²⁹² Teranishi, K. *Luminescence* **2007**, 22, 147-156.

²⁹³ Beck, S.; Koster, H. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2258-2270.

d'introduire un fluorophore à proximité de celui-ci. Un transfert d'énergie entre les deux partenaires conjugué à un bon recouvrement des spectres d'émission du 1,2-dioxétane et d'absorption du fluorophore pourrait permettre d'améliorer sensiblement l'émission du 1,2-dioxétane (Figure 3-14, b).

2.2 Synthèse

Afin d'effectuer la synthèse de ce 1,2-dioxétane, une stratégie a été mise au point dans le but d'obtenir :

- deux fonctions phénols sur un même cycle naphthalène : un phénol pour déclencher la chémioluminescence et un autre pour introduire *via* un bras de couplage le fluorophore nécessaire pour effectuer le CRET.

- un motif 1,2-dioxétane, dont l'ester résultant de la décomposition du 1,2-dioxétane n'est pas conjugué avec le phénol déclencheur, sur l'autre cycle.

Les positions présentées sur le schéma 3-14 ont donc été choisies car elles ne sont pas conjuguées avec le 1,2-dioxétane **116** et toutes deux ont déjà montré qu'elles permettaient le déclenchement d'une émission de chémioluminescence au-delà de 600 nm.

Afin de pallier une éventuelle instabilité du 1,2-dioxétane **116**, il a été prévu d'introduire celui-ci en fin de synthèse, juste après l'introduction également tardive du fluorophore sur le composé **118**. La formation du cycle à cinq chaînons contenant l'éther d'énol précurseur du 1,2-dioxétane a été envisagée à partir de l'ester **119** en utilisant une méthodologie développée par le groupe de M. Matsumoto.²⁹⁴ La formation du naphthalène substitué par deux fonctions phénols en *méta* l'une de l'autre peut ensuite être envisagée grâce à une réaction de Friedel-Crafts de l'aldéhyde **120**,²⁹⁵ lui-même obtenu après un ajustement du degré d'oxydation de l'acide carboxylique **121**. Enfin, cet acide peut dériver d'une réaction de Stobbe à partir de l'aldéhyde **123** possédant deux fonctions phénol protégées orthogonalement et synthétisé à partir de l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **124** (Schéma 3-14).

²⁹⁴ Pour un exemple récent sur des naphthalènes, voir Hoshiya, N.; Fukuda, N.; Maeda, H.; Watanabe, N.; Matsumoto, M. *Tetrahedron* **2006**, 62, 5808-5820.

²⁹⁵ Pour un exemple récent de ce type de réaction, voir Amonkar, C. P.; Patre, R. R.; Tilve, S. G. *Synth. Commun.* **2006**, 36, 13-20.

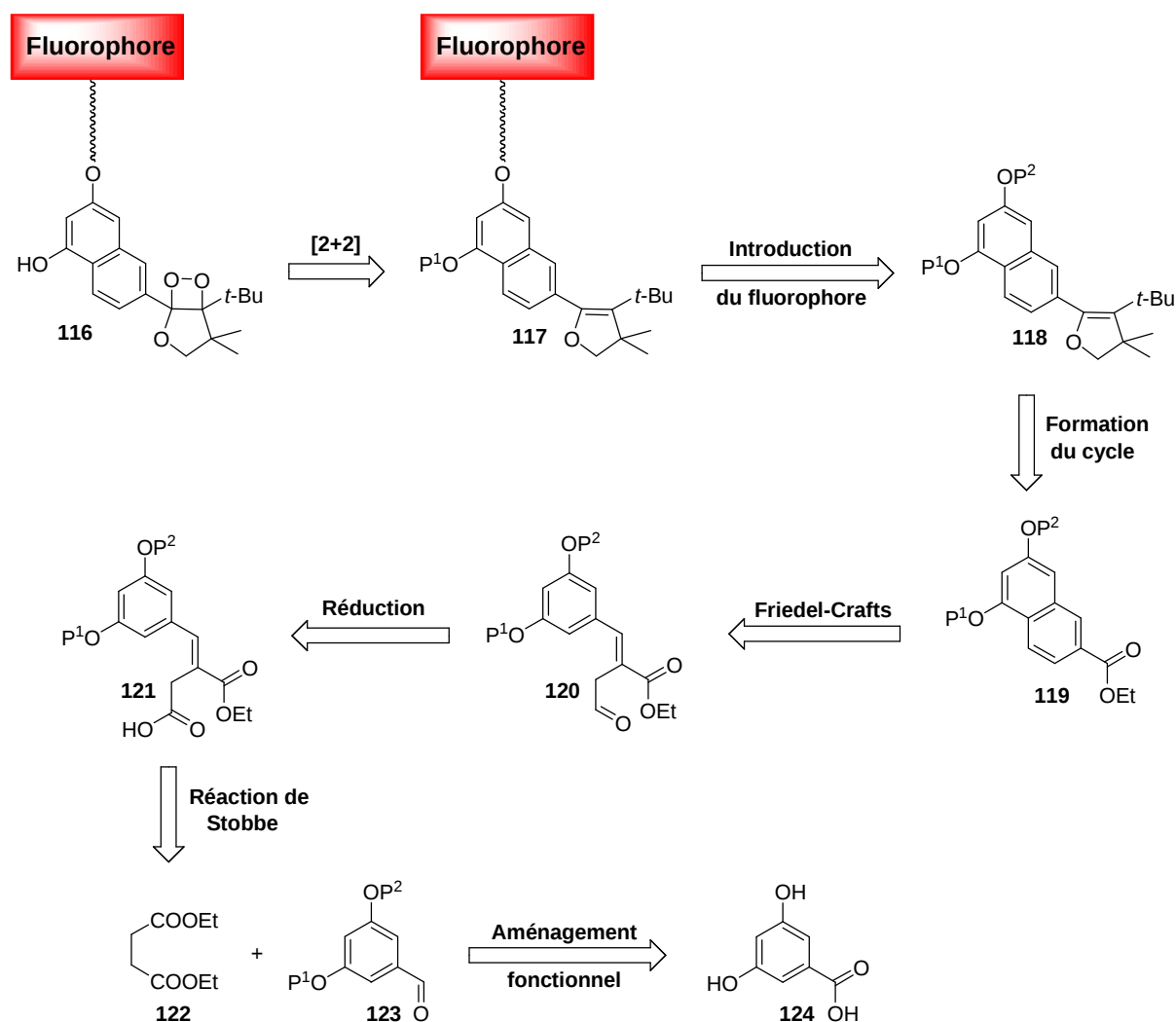


Schéma 3-14. Stratégie de synthèse envisagée pour l'obtention d'un 1,2-dioxétane à plate-forme naphthalène et porteur d'un fluorophore.

A partir d'un composé bon marché, l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque **124**, plusieurs étapes de protections et d'aménagement fonctionnel permettent l'accès à l'aldéhyde **127** utilisable dans la réaction de Stobbe ciblée. Tout d'abord, une estérification de Fischer et la monoprotection d'une des fonctions phénol par un groupement benzyle permettent l'accès au composé **125** avec un rendement de 95% sur deux étapes. Puis, l'alcool **126** est obtenu après la protection du deuxième phénol par un groupement TBDMS suivie de la réduction de l'ester avec un bon rendement de 93% sur deux étapes. Enfin, une oxydation en présence d'un excès de MnO_2 conduit quantitativement à l'aldéhyde **127**.

Une des réactions clé de la synthèse met en jeu une réaction de Stobbe en présence de diéthyle succinate **122**. Les premières conditions expérimentées et qui sont classiquement utilisées

pour cette réaction (à savoir l'utilisation d'une base forte : NaH^{296} ou $t\text{-BuOK}^{297}$) ont conduit à des résultats non reproductibles et avec des rendements maximums de 30%. Cependant, en présence d'éthylate de sodium (NaOEt) généré *in situ* par réaction de sodium métallique avec l'éthanol,²⁹⁸ l'acide **128** est obtenu avec un rendement correct de 55% après purification par chromatographie sur gel de silice (Schéma 3-15).

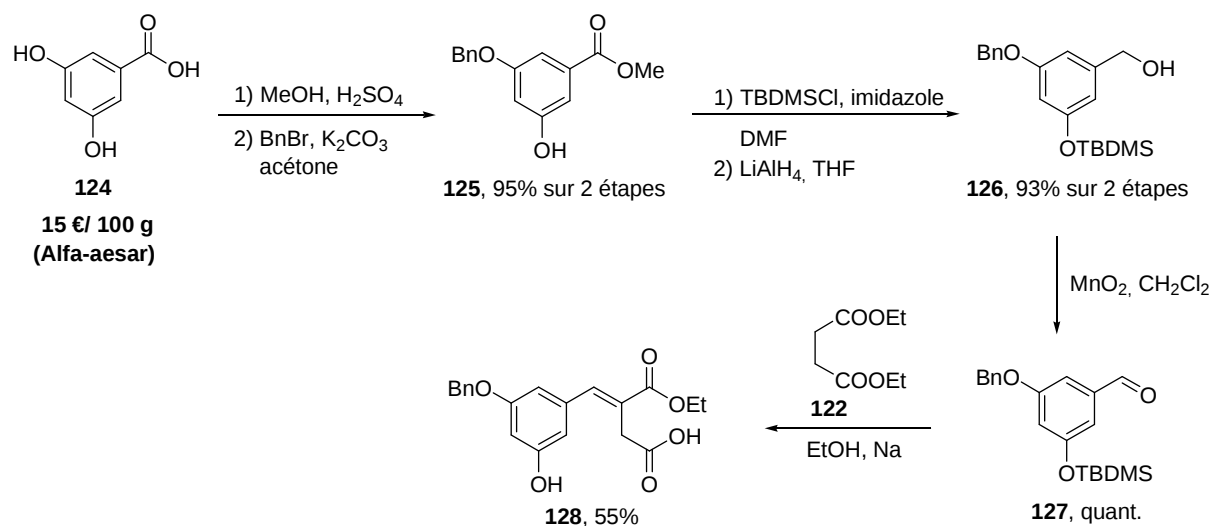


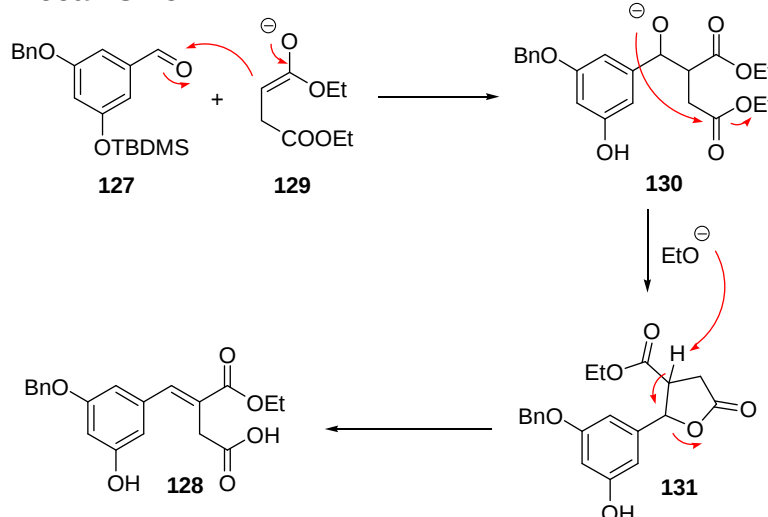
Schéma 3-15. Voie d'accès au composé **128** via une réaction de Stobbe à partir de l'aldéhyde **127**.

Le mécanisme de la réaction de Stobbe est représenté sur le schéma 3-16. Elle commence par la formation de **130** via une condensation de l'énolate **129** sur l'aldéhyde **127**. Puis une réaction de cyclisation permet la formation du cycle à cinq chaînons **131** et l'expulsion d'un équivalent d'alcoolate qui arrache le proton acide en α de l'ester et ainsi permettre la réouverture du cycle pour conduire au composé **128**.

²⁹⁶ Daub, G. H.; Johnson, W. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 418-19. Daub, G. H.; Johnson, W. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 501-4. Bloomer, J. L.; Stagliano, K. W.; Gazzillo, J. A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7906-7912.

²⁹⁷ Boger, D. L.; McKie, J. A.; Cai, H.; Cacciari, B.; Baraldi, P. G. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1710-29. Meyers, A. I.; Willemsen, J. J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10493-10511.

²⁹⁸ Yvon, B.; Datta, P.; Le, T.; Charlton, J. *Synthesis* **2001**, 1556-1560.

Mécanisme :**Schéma 3-16.** Mécanisme de la réaction de Stobbe.

Nos efforts ont ensuite été dirigés vers la transformation de l'acide carboxylique en aldéhyde afin d'envisager la réaction de Friedel-Crafts. Le composé **128** a été réduit en présence d'un réactif qui puisse réagir sélectivement avec l'acide plutôt qu'avec l'ester. Pour cela, BH_3 semble approprié, d'autant plus que ce réactif est décrit comme réagissant plus rapidement avec les acides qu'avec les oléfines, éliminant ainsi le risque d'une réaction secondaire d'hydroboration. De façon surprenante, la réaction de **128** avec BH_3 -THF (ou BH_3 - Me_2S) a permis d'isoler trois produits. Tout d'abord, le produit majoritaire a été supposé comme étant le composé de réduction **132** comme semble l'indiquer le spectre de masse ESI obtenu. Cependant, le spectre RMN ^1H n'a pas clairement montré le profil attendu avec des pics assez larges et des signaux dédoublés, jetant un doute sur l'identité réelle du produit isolé. Désirant poursuivre malgré tout la séquence réactionnelle, des essais d'oxydation de **132** ont été effectués en présence de PCC ou d'IBX.²⁹⁹ De façon surprenante, aucune conversion du réactif de départ n'a pu être observée, laissant supposer que l'alcool supposé **132** pourrait être sous une forme non réactive. Par exemple, le produit **132** isolé pourrait être complexé à des dérivés du bore, ce qui pourrait expliquer l'allure du spectre RMN ^1H . Des essais de traitement de **132** en milieu acide ont alors été effectués mais ils n'ont pas permis d'obtenir une espèce différente de celle isolée au départ. Toutefois, à ce stade de l'étude aucun essai de traitement par $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$ n'avait été tenté.

²⁹⁹ Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4537-4538. More, J. D.; Finney, N. S. *Org. Lett.* **2002**, 4, 3001-3003.

Mais de façon plus intéressante, les deux autres produits isolés lors de la réaction se sont avérés être des chromophores absorbant fortement la lumière UV et ont pu être identifiés comme étant les naphthalènes **133** et **134** qui étaient théoriquement attendus deux étapes plus tard (Schéma 3-17).

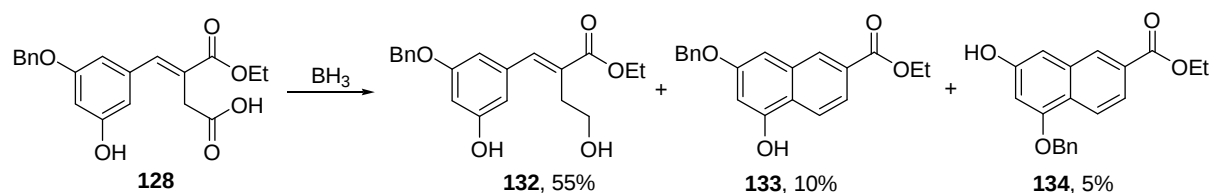


Schéma 3-17. Formation de trois produits suite à la réduction de l'acide **128** par BH_3 -THF.

Ce résultat surprenant pourrait être expliqué par le mécanisme suivant : l'acide carboxylique **128** complexerait une molécule de BH_3 et serait réduit une première fois selon un mécanisme classique de réduction par le borane. Puis, **135** subirait une réaction de Friedel-Crafts grâce à la forte densité électronique du cycle aromatique enrichi par deux fonctions phénol. Après une première réaromatisation, la réaction serait répétée deux fois pour former le borate **136**. Finalement, une deuxième élimination de proton permettrait la réaromatisation conduisant au composé **133** (Schéma 3-18, voie a). Un mécanisme analogue pourrait également expliquer la formation du régioisomère **134** (Schéma 3-18, voie b). Parallèlement, **135** pourrait subir une deuxième réduction par transfert d'un atome d'hydruure pour fournir **137**, dérivé du composé **132** isolé (Schéma 3-18, voie c).

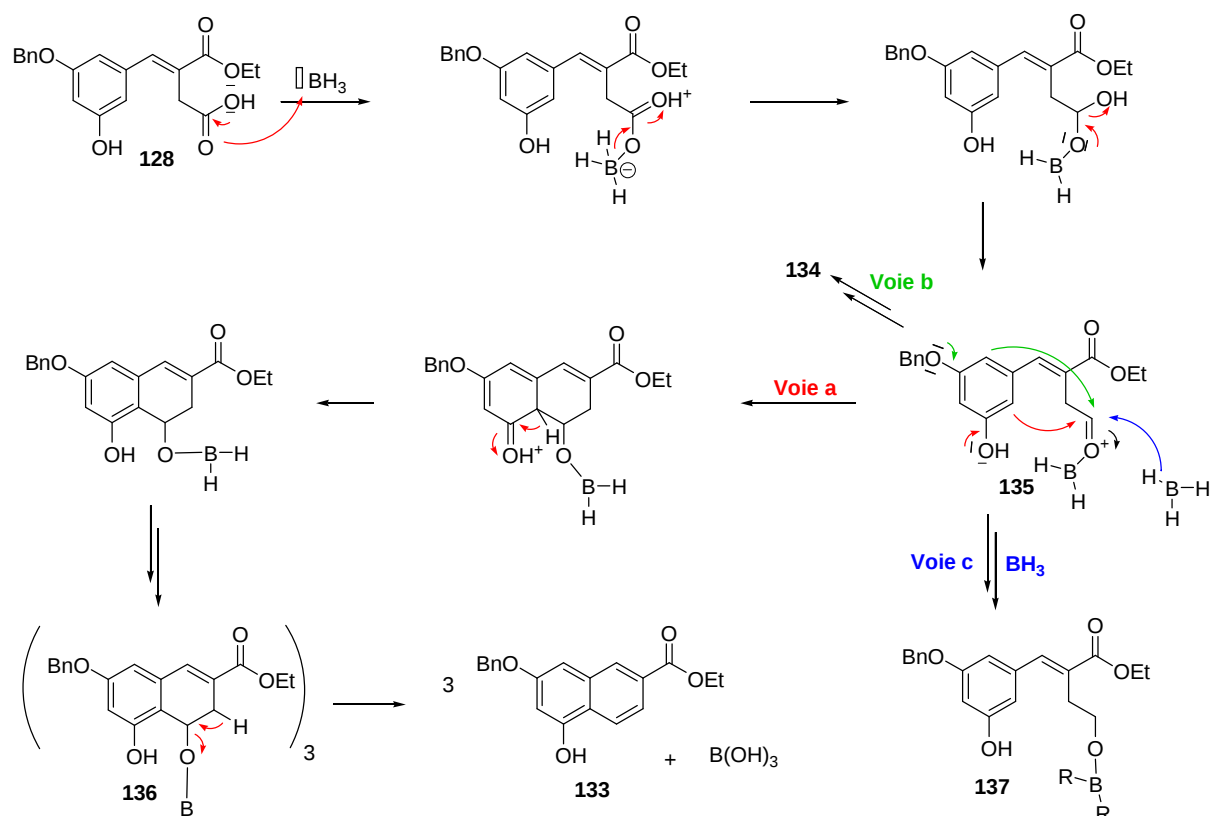


Schéma 3-18. Mécanisme proposé pour la formation de **133**, **134** et du précurseur **137** du produit isolé **132**.

Cependant, malgré les différents essais effectués pour optimiser les conditions de réaction afin de maximiser la formation de **133** et **134** (variation de température, nature du solvant, source de BH_3), il n'a pas été possible d'améliorer le rendement de 5-10% obtenu pour chacun des produits.

A ce stade de l'étude, plusieurs éléments négatifs pouvaient mettre à mal la voie de synthèse envisagée. En effet, l'alcool **132** n'a pas réellement pu être isolé et n'a donc pas pu être mis à profit pour la formation de l'aldéhyde précurseur du naphthalène **133** (ou **134**). De plus, la formation de deux composés **133** et **134** a souligné une des faiblesses de la voie de synthèse qui est la régiosélectivité de la cyclisation lors de la formation du naphthalène. Même si cet élément était prévu et ne présente pas de problèmes théoriques dans la mesure où les deux composés potentiellement formés sont intéressants au niveau de l'émission dans le rouge, une conséquence pratique est tout de même la division par deux de la matière à ce moment de la synthèse. A ces problèmes d'accessibilité de matières premières s'est ajoutée une publication

très intéressante du groupe de K. Burgess parue en début d'année 2007 et qui nous a amenés à réviser notre stratégie.³⁰⁰

3 Deuxième stratégie : Transfert d'énergie à travers les liaisons

3.1 Introduction

Depuis une dizaine d'années, le groupe de K. Burgess développe des cassettes moléculaires pouvant fluorescer à diverses longueurs d'ondes avec une seule source d'excitation. Celles-ci permettent d'améliorer les systèmes actuels utilisant le principe de FRET et trouvent des applications intéressantes notamment pour le séquençage de l'ADN en remplacement des marqueurs habituellement utilisés dans la méthode de Sanger.³⁰¹ Les cassettes sont également utilisées pour le marquage de protéines et les premiers essais sur la protéine ACBP (pour Acyl-Coenzyme Binding Protein) ont montré des résultats *in cellulo* prometteurs.³⁰² Afin de concevoir ses cassettes, le Pr. K. Burgess s'est inspiré des recherches menées dans le développement de nouveaux matériaux opto-électroniques et basés sur le concept de transfert d'énergie à travers les liaisons.³⁰³ Ainsi, les cassettes développées possèdent un donneur et un accepteur comme pour les couples de FRET mais sont séparés par un linker acétylénique aromatique. Ce linker a été mis au point avec pour objectif de rompre la conjugaison entre les deux cycles qui, pour des raisons stériques, se placent de façon perpendiculaire l'un par rapport à l'autre. Cette atropoisométrie permet d'empêcher la fluorescence d'une seule entité isolée (ce qui aurait été observé si le système avait été complètement conjugué) et favorise plutôt un transfert d'énergie à travers les liaisons entre les deux partenaires (Figure 3-15).

³⁰⁰ Han, J.; Jose, J.; Mei, E.; Burgess, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1684-1687.

³⁰¹ Burghart, A.; Thoresen, L. H.; Chen, J.; Burgess, K.; Bergstrom, F.; Johansson, L. B.-Å. *Chem. Commun.* **2000**, 2203-2204. Wan, C.-W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergström, F.; Johansson, L. B.-Å.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4430-4441.

³⁰² Bandichhor, R.; Petrescu, A. D.; Vespa, A.; Kier, A. B.; Schroeder, F.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10688-10689.

³⁰³ Tour, J. M. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 537-554. Bunz, U. H. F. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1605-1644.

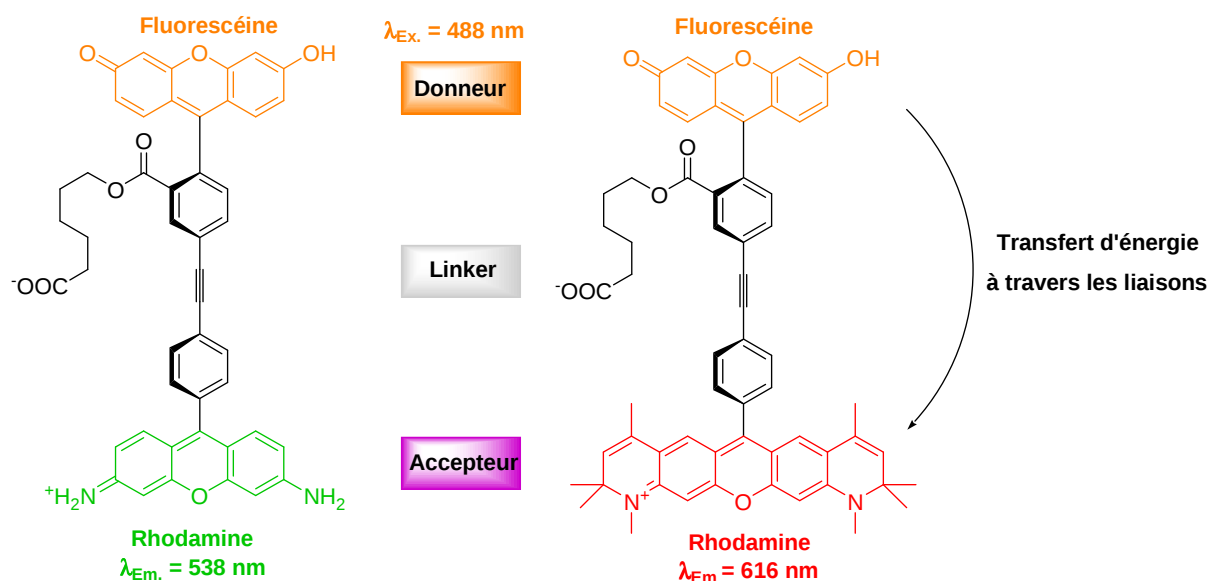


Figure 3-15. Cassettes développées par le groupe de K. Burgess : transfert d'énergie à travers les liaisons entre un donneur et divers accepteurs.

Le transfert d'énergie à travers les liaisons a été décrit comme étant plus rapide que les dispositifs FRET où le transfert se fait dans l'espace. Une première conséquence est que le transfert d'énergie est si rapide que le retour non radiatif à l'état fondamental est défavorisé, ce qui permet une augmentation des niveaux de fluorescence atteints par rapport au fluorophore seul (d'un facteur 2 à 7 selon les structures, avec une amélioration croissante à mesure que l'émission se déplace dans le rouge), et cela en excitant à une longueur d'onde inférieure. De même, le passage à l'état triplet est supposé comme étant la raison du photobleaching de la fluorescéine. Mais avec un transfert d'énergie aussi rapide pour les cassettes, le croisement intersystème menant à l'état triplet est défavorisé, il en résulte donc une amélioration de la photostabilité de la cassette par comparaison avec le fluorophore libre (e.g., lorsque 55% de l'émission initiale de la fluorescéine est perdue, il reste encore 95% de l'émission de la cassette après la même durée d'irradiation). Enfin, le paramètre le plus important est la possibilité d'effectuer un transfert d'énergie efficace entre deux partenaires n'ayant pas forcément un bon recouvrement spectral alors que cela constitue un paramètre indispensable pour obtenir de bons couples de FRET.³⁰⁴

Cette petite digression générale sur les cassettes fluorescentes permet d'aborder le point important publié par le groupe de K. Burgess et qui a attiré notre attention.³⁰⁰ En effet, celui-ci

³⁰⁴ Jiao, G.-S.; Thoresen, L. H.; Burgess, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14668-14669. Jiao, G.-S.; Thoresen, L. H.; Kim, T. G.; Haaland, W. C.; Gao, F.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Metzker, M. L.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7816-7826.

a étendu son concept de cassettes fluorescentes à un dispositif chémioluminescent faisant intervenir un donneur luminol et un accepteur fluorescéine ou benzophénoxazine séparés l'un de l'autre par une triple liaison. Sachant que le luminol seul émet à 460 nm, il n'existe pas ou peu de recouvrement spectral entre le donneur et l'accepteur. Or, en présence de H_2O_2 , l'énergie du luminol est transférée aux fluorophores et les cassettes ont montré une intense émission de lumière à la longueur d'onde des fluorophores utilisés, respectivement à 524 et 634 nm (Figure 3-16 a).

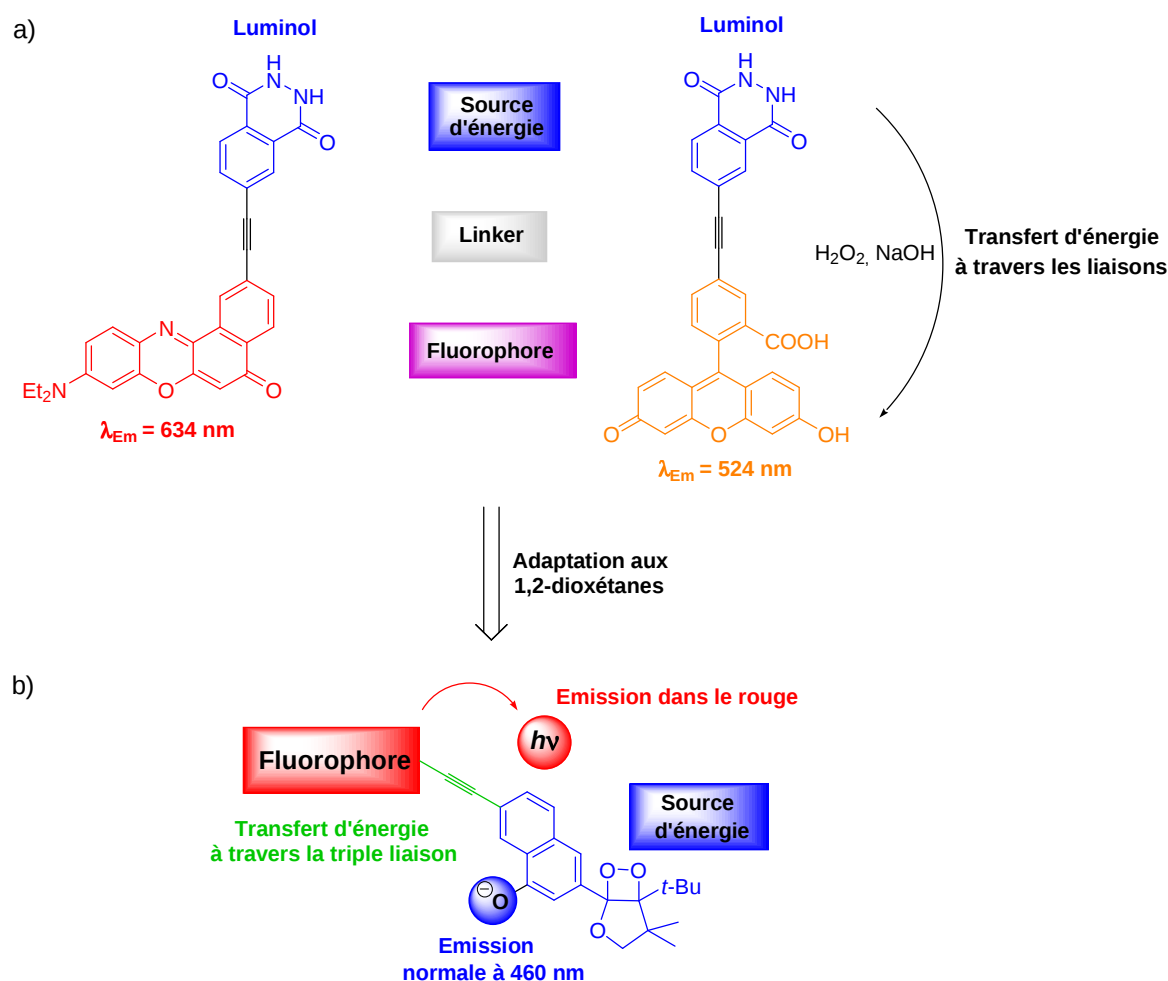


Figure 3-16. a) Cassettes chémioluminescentes utilisant un transfert d'énergie à travers les liaisons entre le luminol et un fluorophore (fluorescéine ou BPO) ; b) Adaptation du concept aux 1,2-dioxétanes.

Ainsi, le transfert d'énergie à travers les liaisons pourrait permettre de s'affranchir d'un bon recouvrement spectral entre une espèce chémioluminescente et un fluorophore et pourrait être appliqué à nos 1,2-dioxétanes. Notre système initial fondé sur un transfert d'énergie à travers l'espace (*via* le phénomène de CRET) devrait donc être fortement amélioré en utilisant par

analogie avec les travaux de K. Burgess un dispositif utilisant une triple liaison reliant le motif 1,2-dioxétane à un fluorophore émettant dans le rouge (Figure 3-16 b).

3.2 Synthèse d'un cœur chémioluminescent dérivé du naphthalène

3.2.1 Synthèse

Le concept de transfert d'énergie à travers les liaisons s'avère donc intéressant à la fois pour améliorer l'émission de lumière des 1,2-dioxétanes et pour la déplacer vers le rouge. Une telle stratégie a également des conséquences intéressantes pour la synthèse des 1,2-dioxétanes (Schéma 3-19).

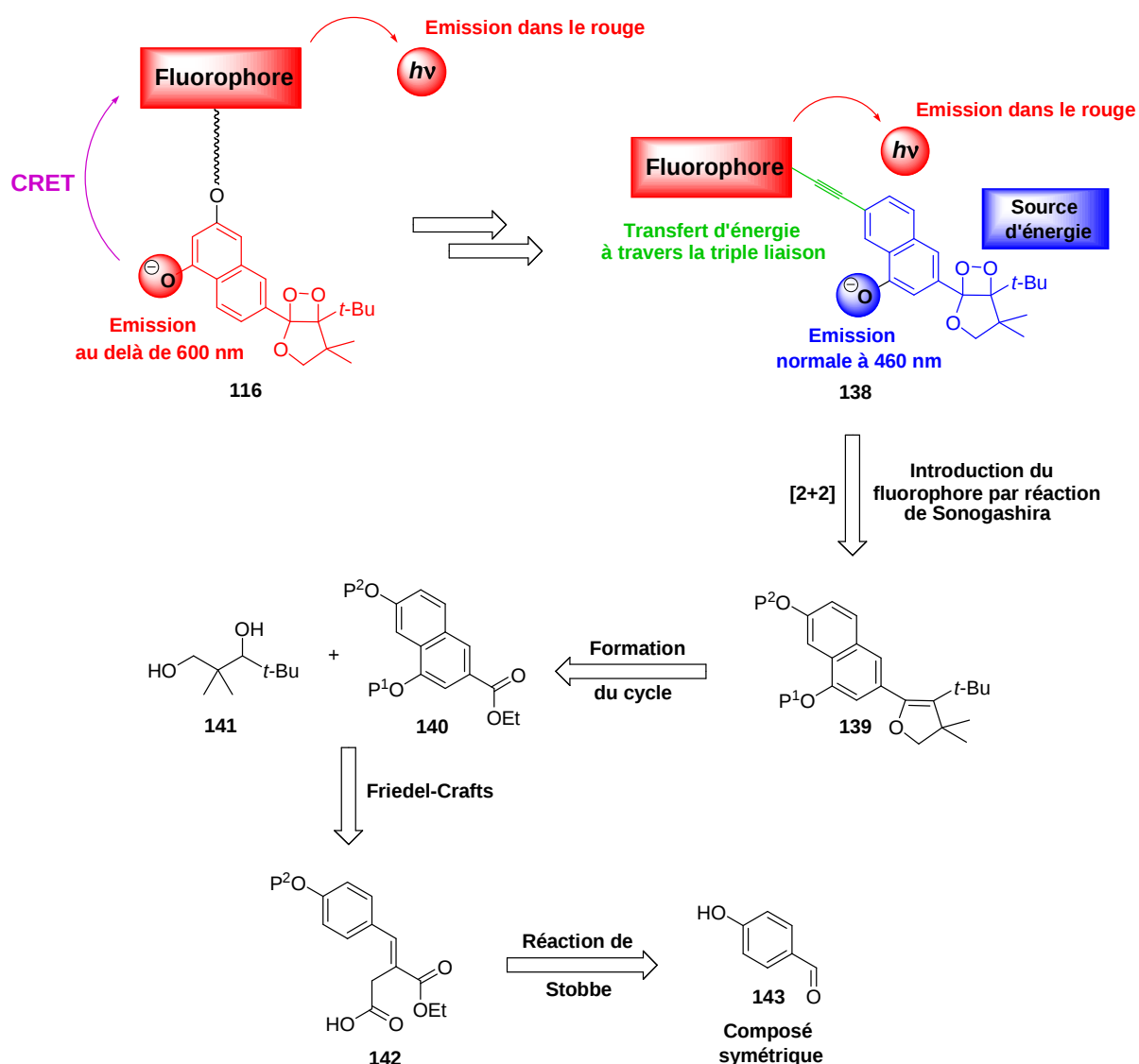


Schéma 3-19. Adaptation aux 1,2-dioxétanes du concept de transfert d'énergie à travers les liaisons. Schéma rétrosynthétique envisagé pour l'obtention des nouveaux 1,2-dioxétanes.

En effet, au lieu d'effectuer le déclenchement de l'émission sur un cycle aromatique différent de celui portant le 1,2-dioxétane (afin d'obtenir une émission au-delà de 600 nm, Schéma 3-19, **116**), il serait possible de déclencher l'émission à partir de la position *méta* par rapport au 1,2-dioxétane qui donne les rendements quantiques les plus intéressants. En l'absence de fluorophore sur la structure, une émission à 460 nm devrait avoir lieu mais l'introduction d'un fluorophore approprié *via* une triple liaison pourrait permettre de s'affranchir de la nécessité d'avoir un bon recouvrement spectral entre l'espèce chémioluminescente donneur et le fluorophore accepteur. Une augmentation de l'émission de la chémioluminescence et un déplacement de cette émission vers le rouge devraient donc être observés (Schéma 3-19, **138**).

La formation de la cassette **138** pourrait donc résulter de l'introduction tardive du fluorophore par une réaction de Sonogashira³⁰⁵ suivie de la cycloaddition [2+2] sur l'espèce clé **139** dont les fonctions phénol sont différenciées par deux groupements protecteurs orthogonaux. Celle-ci pourrait être issue de l'ester **140**, lui-même obtenu par une réaction de Friedel-Crafts à partir de **142**. Enfin, le composé **142** pourrait être obtenu à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde **143** par une réaction de Stobbe. L'aspect fondamental de cette voie de synthèse est que la perspective d'émettre à partir d'un phénol placé sur le même cycle aromatique que le 1,2-dioxétane permet d'avoir plus de liberté concernant la position de la fixation du fluorophore sur l'autre cycle. Ainsi, il est possible d'effectuer la synthèse à partir d'une espèce symétrique **143**, ce qui permet d'éviter les problèmes de régiosélectivité rencontrés lors de la stratégie précédente.

La fonction phénol du 4-hydroxybenzaldéhyde **143** a donc été protégée par un groupement benzyle pour fournir **144** de façon quantitative. Puis, une réaction de Stobbe dans les mêmes conditions que précédemment permet d'obtenir l'acide **145** avec un rendement amélioré de 71% pour ce substrat. Il est intéressant de noter que cette stratégie possède l'avantage de s'affranchir des premières étapes de désymétrisation et d'aménagement fonctionnel qui permettraient d'accéder au précurseur **127** de la réaction de Stobbe. Le composé **145**, précurseur direct du naphthalène est ainsi obtenu après seulement deux étapes. Comme espéré, une réaction de Friedel-Crafts en présence d'anhydride acétique à 110 °C permet la formation efficace du naphthalène **146** sans problème de régiosélectivité puisque les deux réactions de cyclisation potentielles conduisent au même produit.

³⁰⁵ Negishi, E.; Anastasia, L. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1979-2018. Chinchilla, R.; Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922. Doucet, H.; Hierro, J.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 834-871.

Des réactions d'aménagement fonctionnel ont ensuite été effectuées afin d'envisager l'introduction de la chaîne alkyle précurseur du cycle tétrahydrofurane. Le groupement acétate du phénol formé pendant la réaction de Friedel-Crafts a été libéré par traitement en milieu basique et remplacé par un groupement TBDMS. Le groupement TBDMS est très souvent utilisé car il est très commode pour évaluer l'efficacité du chémiluminophore *via* sa déprotection en milieu organique en présence d'ions fluorure.²⁶⁷ La réduction de l'ester **147** en présence de LiAlH_4 permet ensuite d'obtenir l'alcool **148** avec un rendement quasi-quantitatif (Schéma 3-20).

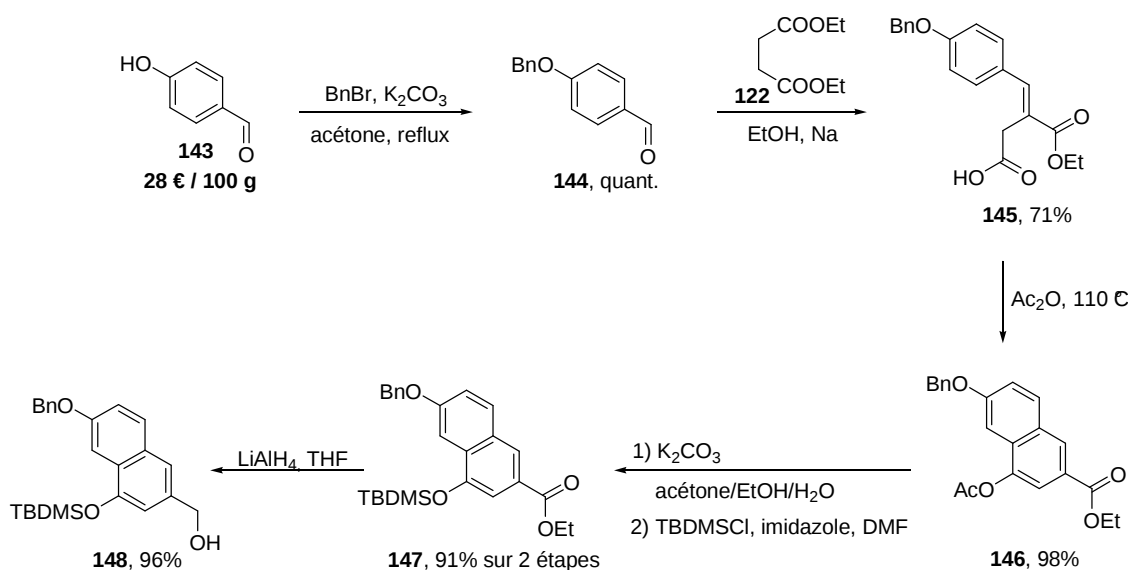


Schéma 3-20. Synthèse du cycle naphtalène *via* une réaction de Stobbe et obtention de l'alcool **148**.

L'alcool benzylique a ensuite été activé sous la forme de son dérivé chloré puis a été mis en réaction avec le diol **141**, préparé en trois étapes à partir de **150**. Malheureusement, les conditions utilisées n'ont pas permis d'obtenir le produit **151**, probablement parce que le milieu basique conduit à la déprotection prématurée du groupement TBDMS et à des réactions secondaires du phénol libre qui n'ont pas été identifiées (Schéma 3-21).

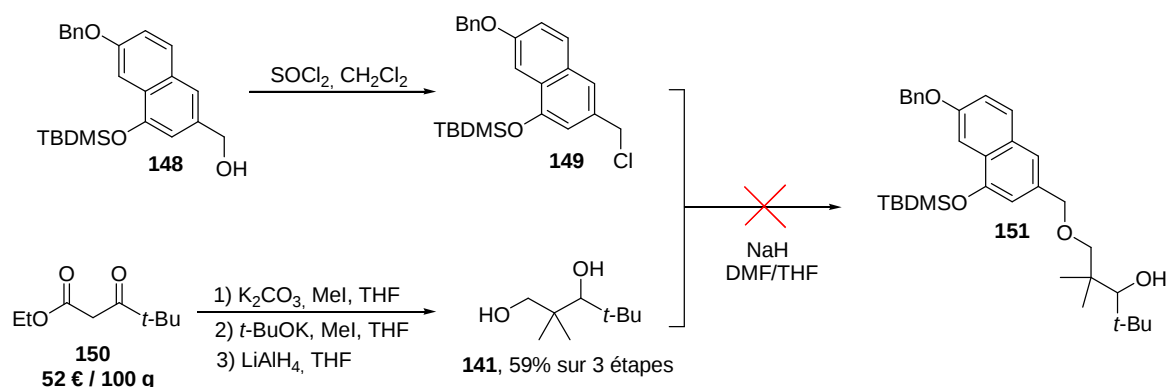


Schéma 3-21. Synthèse du diol **141** et premier essai d'introduction de la chaîne alkyle.

Ce résultat décevant explique sans doute pourquoi dans leurs différentes synthèses, le groupe de M. Matsumoto protège systématiquement le phénol déclencheur par un groupement méthoxy qui est remplacé en fin de synthèse par un groupement TBDMS.

Ainsi, le phénol a été protégé par un méthoxy et la même séquence que précédemment a permis d'accéder à l'alcool **152**. Celui-ci a été converti en dérivé chloré par traitement au SOCl_2 puis le diol **141** a été introduit dans les mêmes conditions que celles décrites par M. Matsumoto *et al.*, permettant d'obtenir l'alcool secondaire correspondant.²⁹⁴ La pureté du brut de réaction étant très bonne, celui-ci a directement été oxydé en présence de PCC pour fournir la cétone **153** avec un bon rendement de 65% sur trois étapes.

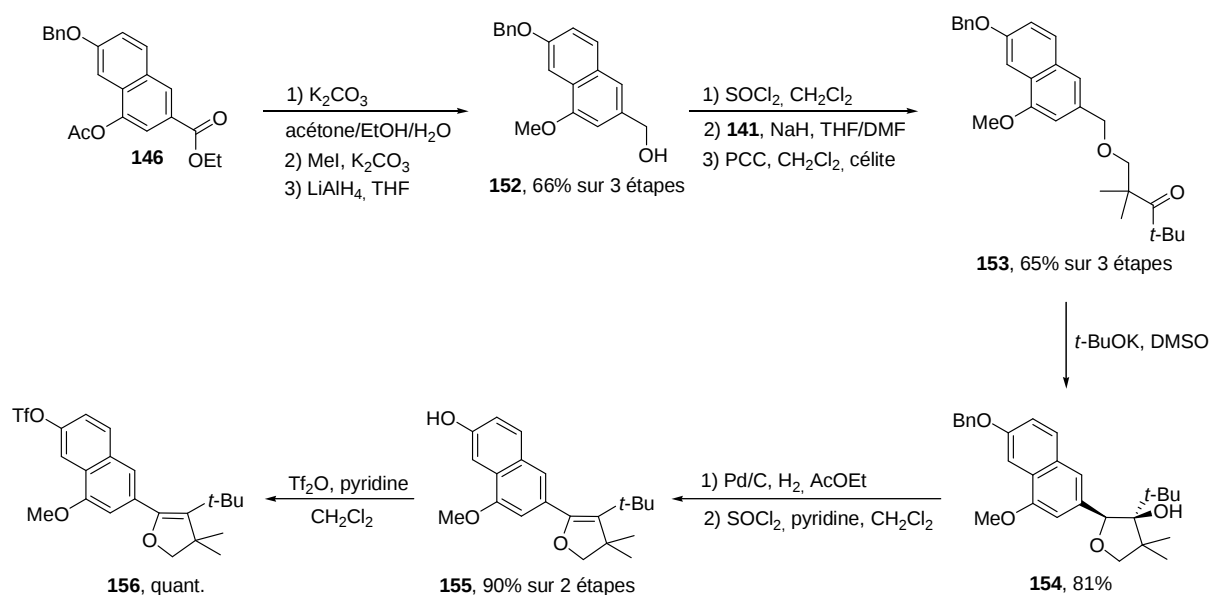


Schéma 3-22. Formation du cycle tétrahydrofurane et activation du phénol précurseur de la réaction de Sonogashira.

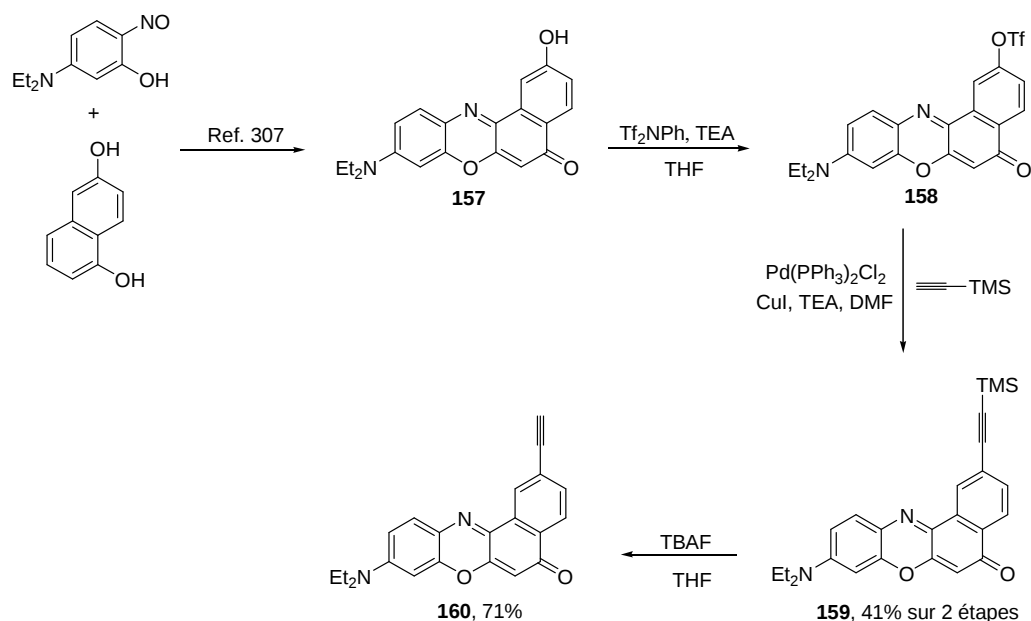
La formation du cycle tétrahydrofurane, une des réactions clé de la synthèse a ensuite été effectuée. Cette réaction a également été bien étudiée par M. Matsumoto *et al.*, deux types de conditions ayant été décrites. La première possibilité consiste en l'utilisation de LDA comme base afin de déprotoner sélectivement la position benzylique pour former le cycle à cinq chaînons avec le cycle aromatique et l'alcool tertiaire en position *trans*. Cependant, dans notre cas ces conditions ont conduit à des résultats non reproductibles et avec des rendements modestes voisins de 50%. Les autres conditions décrites par M. Matsumoto *et al.* ont donc été explorées avec comme base le dimsyl de potassium formé par déprotonation du DMSO par *t*-BuOK. Dans ces conditions, la réaction de cyclisation attendue se produit pour fournir **154** avec un très bon rendement de 81%. De façon intéressante, le produit isolé possède une stéréochimie différente (le cycle aromatique et l'alcool tertiaire en *cis*) que celle observée pour la réaction utilisant le LDA comme base. En effet, dans ce dernier cas le cation lithium permet de chélater l'oxygène de la cétone et d'orienter l'attaque du carbanion alors qu'une telle chélation n'est pas observée avec le dimsyl potassium.³⁰⁶

Le groupement benzyle a ensuite été retiré par hydrogénation catalytique suivi de la formation de l'éther d'énol **155** par traitement avec un large excès de SOCl₂. La conversion du phénol formé sous la forme d'un triflate permet enfin d'envisager l'introduction du fluorophore *via* une réaction de Sonogashira (Schéma 3-22).

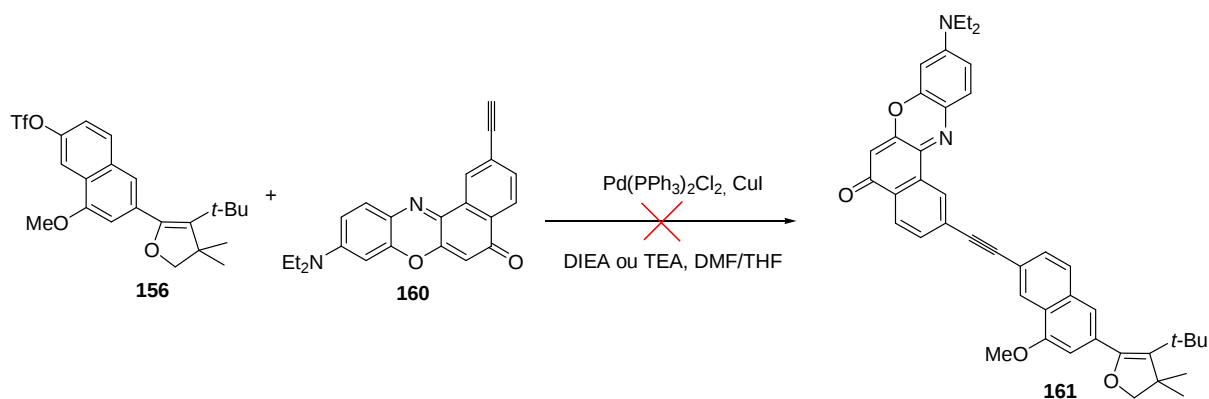
En utilisant les données fournies par la publication de K. Burgess *et al.*, l'introduction d'une BPO sur le naphthalène a tout d'abord été envisagée. L'objectif était donc d'effectuer la réaction de Sonogashira et de retirer le groupement méthoxy juste avant d'effectuer la réaction de cycloaddition [2+2]. Ainsi, la BPO **157** a été synthétisée selon une méthode précédemment décrite.^{300,307} Puis l'activation du phénol en triflate **158** a été effectuée dans des conditions douces en présence de *N*-phényl-bis(trifluorométhanesulfonimide). La réaction de Sonogashira effectuée dans les mêmes conditions que celles utilisées par K. Burgess *et al.* (Pd(PPh₃)₄, TEA, CuI, DMF, 80 °C) a conduit au composé **159** à un rendement faible de 21% au lieu des 60% (sur deux étapes) annoncés. Le changement de source de palladium pour PdCl₂(PPh₃)₂ permet toutefois d'améliorer le rendement jusqu'à 41%. Puis, une désilylation permet l'obtention de l'alcyne terminal **160** (Schéma 3-23).

³⁰⁶ Matsumoto, M.; Watanabe, N.; Ishikawa, A.; Murakami, H. *Chem. Commun.* **1997**, 2395-2396.

³⁰⁷ Briggs, M. S. J.; Bruce, I.; Miller, J. N.; Moody, C. J.; Simmonds, A. C.; Swann, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1051-1058.



Le composé **160** une fois disponible, des essais de couplage du fluorophore sur le naphthalène activé **156** ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment. Malheureusement, quels que soient les conditions de couplage de Sonogashira testées, aucune réaction n'a pu être mise en évidence et les réactifs de départ ont été récupérés intacts (Schéma 3-24).



Emettant des doutes quant à la réactivité de **160** et notamment sur l'insertion du palladium puisqu'aucune conversion des réactifs n'a été observée, une réaction de Sonogashira entre **156** et un alcyne plus simple comme le triméthylsilylacétylène a été testée. Cela permettrait l'introduction de la triple liaison sur le naphthalène et le fluorophore pourrait ensuite être introduit grâce à un fluorophore halogéné ou activé par un groupement triflate.

Ainsi, dans les mêmes conditions de réaction, le composé **162** a été obtenu avec un excellent rendement de 91% après déprotection de la triple liaison. Ce bon résultat montre ainsi que l'insertion du palladium se fait correctement et que l'absence de réaction lors de l'essai précédent était due à une faible réactivité de la BPO **160**. Cette plus faible réactivité pourrait être attribuée à une approche difficile de **156** par rapport au système avec le luminol en raison d'une plus grande gêne stérique venant du cycle tétrahydrofurane porteur de groupements encombrants *gem*-diméthyle et *tert*-butyle (Schéma 3-25).

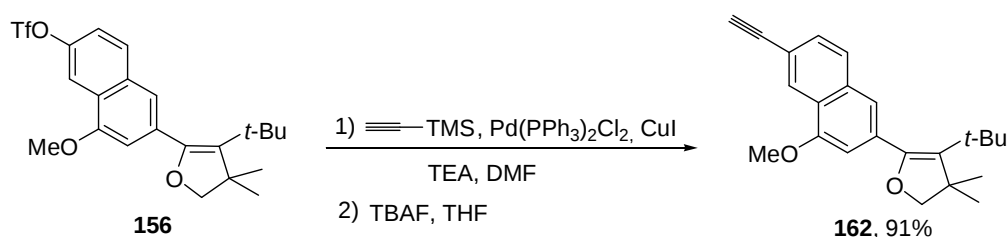


Schéma 3-25. Introduction de la triple liaison sur le naphthalène **156**.

Cette stratégie de synthèse est plus flexible puisque différents fluorophores peuvent être introduits sur le naphthalène sans avoir à les transformer au préalable en leur dérivé acétylénique. Un premier essai de couplage de Sonogashira a donc été envisagé. Nous avons choisi de simplifier la nature du fluorophore afin qu'il soit plus facilement manipulable que les BPOs. C'est pourquoi l'introduction d'une coumarine dont la chimie est bien maîtrisée au laboratoire a été envisagée. Par ailleurs, nous avons montré dans le chapitre 2 qu'il était possible de déplacer vers le rouge l'émission des coumarines substituées en position 3 par un groupement formyl par dérivatisation de ce dernier en dérivé hémicyanine.

Ainsi, un essai de couplage de Sonogashira en présence de la coumarine **163** a permis d'isoler quelques milligrammes de produit **164**. Le rendement modeste de 25% s'explique par la réaction secondaire de l'alcyne terminal **162** pour former le produit de dimérisation de Glaser **165**, réaction catalysée par les sels de cuivre (I), et qui s'avère majoritaire dans nos conditions.³⁰⁸ Cependant, ce résultat encourageant montre la possibilité d'introduire le fluorophore à ce stade de la synthèse (Schéma 3-26).

³⁰⁸ Glaser, C. *Ber.* **1869**, 2, 422-424. Siemsen, P.; Livingston, R. C.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2633-2657.

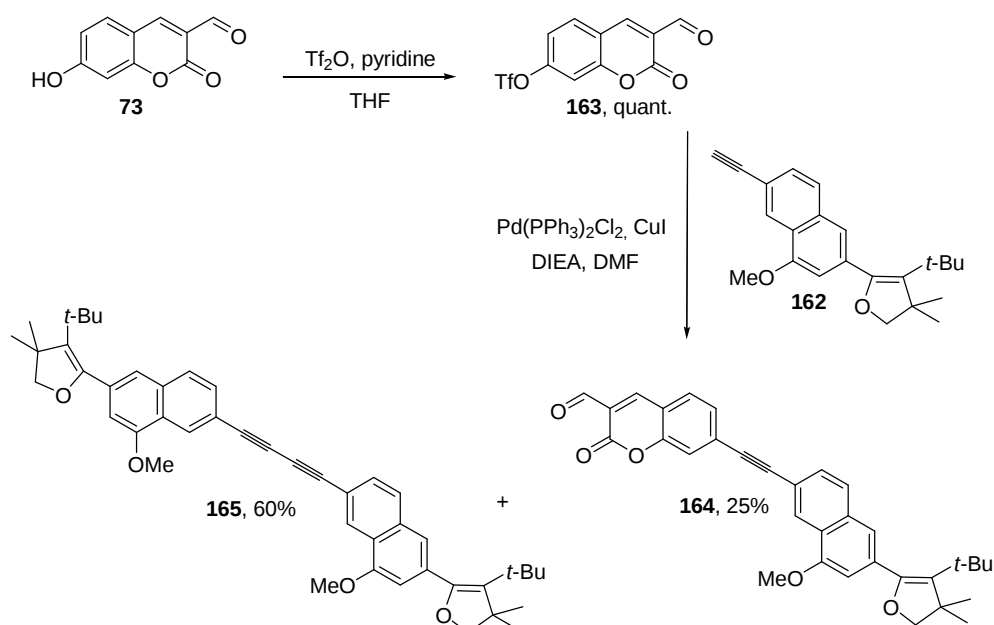


Schéma 3-26. Introduction de la coumarine formylée en position 3 sur le naphthalène **162**.

La déprotection du groupement méthoxy est ensuite nécessaire pour libérer le phénol déclencheur de la chémioluminescence. Toutefois, les conditions classiques favorisant une $\text{S}_{\text{N}}2$ et utilisant un thiolate au reflux du DMF, ne permettent pas d'envisager celle-ci sur le composé **164** en raison de la fragilité de la coumarine dans ces conditions. C'est pourquoi les conditions de déprotection ont plutôt été mises au point sur le composé **162**.

Celui-ci a été chauffé au reflux du DMF en présence de thiométhanolate de sodium et un nouveau produit avec un R_f inférieur au réactif de départ a été observé lors de l'analyse CCM. Un chauffage prolongé et un large excès de thiolate ont cependant été nécessaires afin de consommer la totalité du réactif de départ. La ^1H RMN du produit **166** montre bien la déprotection espérée du groupement méthoxy mais les signaux du spectre semblaient dédoublés. De plus, deux nouveaux pics à $\delta = 2.39$ et 2.41 ppm dans une proportion 2/1 ainsi que des protons éthyléniques sont apparus. Une analyse de masse et un spectre ^{13}C RMN ont permis de confirmer l'identité des deux produits isolés comme étant les deux isomères Z et E de **166** issus de l'addition de l'ion thiométhanolate sur la triple liaison (Schéma 3-27). Cette réaction est connue pour avoir lieu préférentiellement sur des triples liaisons activées par des groupements attracteurs comme un ester, un nitro ou un cyano. L'addition sur une triple liaison activée seulement par un aromatique de type naphthyle montre que celui est assez appauvri en électrons.

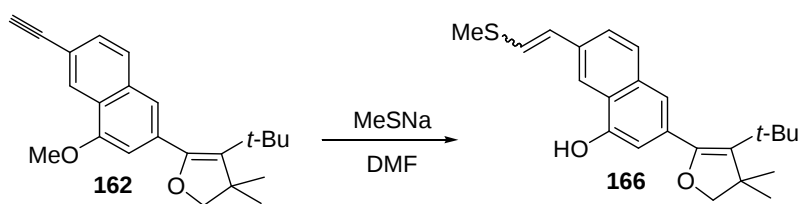


Schéma 3-27. Déprotection du groupement méthoxy du phénol. Réduction simultanée de la triple liaison par l'ion thiométhanolate.

Ces conditions de déprotection du groupement méthoxy ne pouvant être utilisées, un large éventail de conditions ont été testées et sont résumées dans le tableau 3-1 :

Entrée	Conditions	Température	Résultat
1	AlBr ₃ , EtSH, CH ₂ Cl ₂	20 °C	Addition sur la triple liaison
2	AlCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	40 °C	Pas de réaction
3	pyridine/HCl	180 - 200 °C	Pas de réaction et dégradation
4	LiCl, DMF	150 °C	Pas de réaction
5	BCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	20 °C ou 0 °C	Pas de réaction
6	BCl ₃ , TBAI, CH ₂ Cl ₂	- 40 °C à 20 °C	Pas de réaction
7	BBr ₃ , CH ₂ Cl ₂	-78 °C, - 40 °C ou - 20 °C à 20 °C	Pas de réaction
8	TMSI, CH ₃ CN	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol
9	SiCl ₄ , CH ₂ Cl ₂ /toluène	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol
10	BBr ₃ /Me ₂ S	20 °C	Dégradation de l'éther d'énol

Tableau 3-1. Conditions testées pour la déprotection du phénol.

Tout d'abord, AlBr₃ a été utilisé comme acide Lewis pour activer le groupement méthoxy (entrée 1).³⁰⁹ De l'éthanethiol a été ajouté afin qu'il attaque le méthyle activé et libère le phénol. Malheureusement, dans ces conditions, seule l'addition du thiol sur la triple liaison a été observée bien que les conditions utilisées (température ambiante) soient plus douces que les précédentes (reflux du DMF). Ce résultat montre ainsi la nécessité d'éviter toute source de thiol pour éviter l'addition sur la triple liaison. Le même type de réaction en présence de

³⁰⁹ Boger, D. L.; Weng, J. H.; Miyazaki, S.; McAtee, J. J.; Castle, S. L.; Kim, S. H.; Mori, Y.; Rogel, O.; Strittmatter, H.; Jin, Q. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10047-10055. K. C. Nicolaou, D. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 761-763. Spera, D.; Cabrera, G.; Fiaschi, R.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A.; Napolitano, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4393-4401.

AlCl₃ au reflux du CH₂Cl₂ mais sans ajout de thiol n'a pas permis d'observer l'apparition du produit déprotégé (entrée 2).³¹⁰

D'autres conditions sans thiols ont été testées et notamment des conditions dures non acides comme LiCl à 150 °C³¹¹ ou chlorure de pyridinium entre 180 et 200 °C.^{259,312} Dans ces conditions, aucun produit de déprotection n'a été obtenu et de la dégradation a été observée à des températures trop élevées (entrées 3 et 4).

Des conditions plus douces ont donc été testées, mais elles présentent l'inconvénient d'opérer en milieu acide, ce qui peut être délétère quant à la stabilité de l'éther d'énol. Ainsi, aucune réaction n'a été observée en présence de réactifs classiques pour la déprotection de méthoxy comme BCl₃,³¹³ BCl₃/TBAI³¹⁴ ou BBr₃³¹⁵ (entrées 5 à 7). Cette faible réactivité peut être expliquée par l'absence de groupements attracteurs activants en position *ortho* ou *para* de la position substituée par le méthoxy. En revanche, avec d'autres réactifs comme TMSI (généralisé *in situ* avec du chlorure de triméthylsilyle et NaI),³¹⁶ SiCl₄³¹⁷ ou BBr₃ stabilisé par Me₂S,³¹⁸ les conditions trop acides ont conduit à la totale destruction de l'éther d'énol nécessaire pour générer le 1,2-dioxétane, sans pour autant effectuer la déprotection escomptée (entrées 8 à 10).

³¹⁰ Jeong, B.-S.; Wang, Q.; Son, J.-K.; Jahng, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 2007, 1338-1344.

³¹¹ Matsumoto, M.; Sakuma, T.; Watanabe, N. *Luminescence* **2001**, 16, 275-280.

³¹² LeBras, G.; Radanyi, C.; Peyrat, J. F.; Brion, J. D.; Alami, M.; Marsaud, V.; Stella, B.; Renoir, J. M. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 6189-6200.

³¹³ Saito, F.; Kuramochi, K.; Nakazaki, A.; Mizushima, Y.; Sugawara, F.; Kobayashi, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 4796-4799. Liu, W.; Buck, M.; Chen, N.; Shang, M.; Taylor, N. J.; Asoud, J.; Wu, X.; Hasinoff, B. B.; Dmitrienko, G. I. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2915-2918.

³¹⁴ Fürstner, A.; Domostoj, M. M.; Scheiper, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8087-8094. Kelly, T. R.; Cai, X.; Damkaci, F.; Panicker, S. B.; Tu, B.; Bushell, S. M.; Cornella, I.; Piggott, M. J.; Salives, R.; Cavero, M.; Zhao, Y.; Jasmin, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 376-386.

³¹⁵ Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; 4th ed.; Wiley: New-York, 2006; pp 376 et références citées.

³¹⁶ Kamal, A.; Laxman, E.; Ramesh Khanna, G. B.; Reddy, P. S. M. M.; Rehana, T.; Arifuddin, M.; Neelima, K.; Kondapi, A. K.; Dastidar, S. G. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4197-4209. Wack, H.; France, S.; Hafez, A. M.; Drury, W. J.; Weatherwax, A.; Lectka, T. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4531-4533. Pour une revue sur les dérivés siliciés, voir Groutas, W. C.; Felker, D. *Synthesis* **1980**, 861-868.

³¹⁷ Bhatt, M. V.; El-Morey, S. S. *Synthesis* **1982**, 1048-50.

³¹⁸ Hellberg, J.; Dahlstedt, E.; Pelcman, M. E. *Tetrahedron* **2004**, 60, 8899-8912. Liang, G.; Xu, Y.; Seiple, I. B.; Trauner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11022-11023.

3. 2. 2 Conclusion

Ainsi, le groupement méthoxy utilisé couramment par le groupe de M. Matsumoto possède l'avantage de résister à la séquence réactionnelle permettant d'obtenir l'éther d'énol mais sa déprotection s'avère délicate dans notre cas en raison de la présence d'un alcyne terminal. En effet, les seules conditions permettant la déprotection du phénol mettent en jeu l'utilisation de thiolates qui s'additionnent également sur la triple liaison pour donner un thioéther d'énol.

Il est intéressant de noter que la réaction du composé **162** avec le 9-bromoanthracène permet d'obtenir un alcyne non terminal possédant un fluorophore pouvant résister aux thiolates (contrairement aux coumarines). Une réaction de déprotection a été effectuée et dans ce cas également, la présence de thiolates a conduit à l'addition sur l'alcyne en dépit du fait qu'il ne soit pas terminal.

Afin de remédier à ce problème, il faudrait donc introduire à la place du méthoxy un groupement protecteur dont la stabilité serait intermédiaire entre le TBDMS (instable dans les conditions basiques de la synthèse de **151**) et OMe qui est trop stable pour être retiré dans des conditions compatibles avec la présence d'un alcyne.

3. 3 Synthèse d'un cœur chémioluminescent dérivé phénylique

Cependant, le changement de groupement protecteur implique de revoir la synthèse quasiment depuis le départ. Avant de débiter cette nouvelle voie de synthèse, une autre possibilité a été envisagée. En effet, une autre thématique au laboratoire a permis de synthétiser le composé **167** à partir de **124** d'après une séquence réactionnelle analogue à celle utilisée pour la synthèse du naphthalène **154** (Schéma 3-28).³¹⁹

³¹⁹ Stage post-doctoral de Jan Koci, Octobre 2006-Mars 2008.

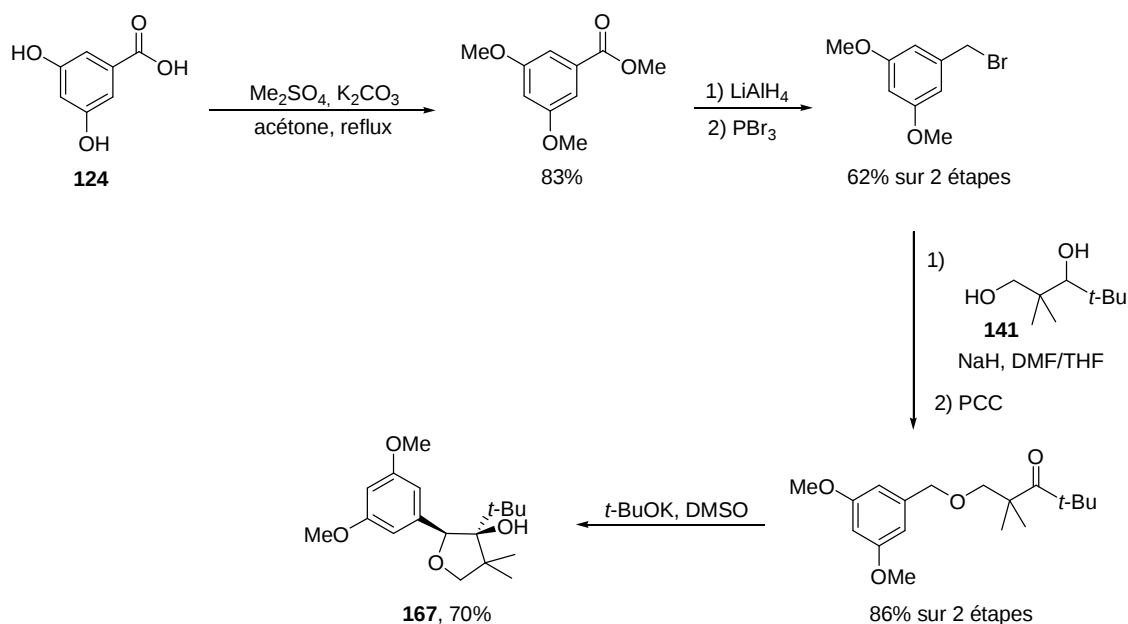
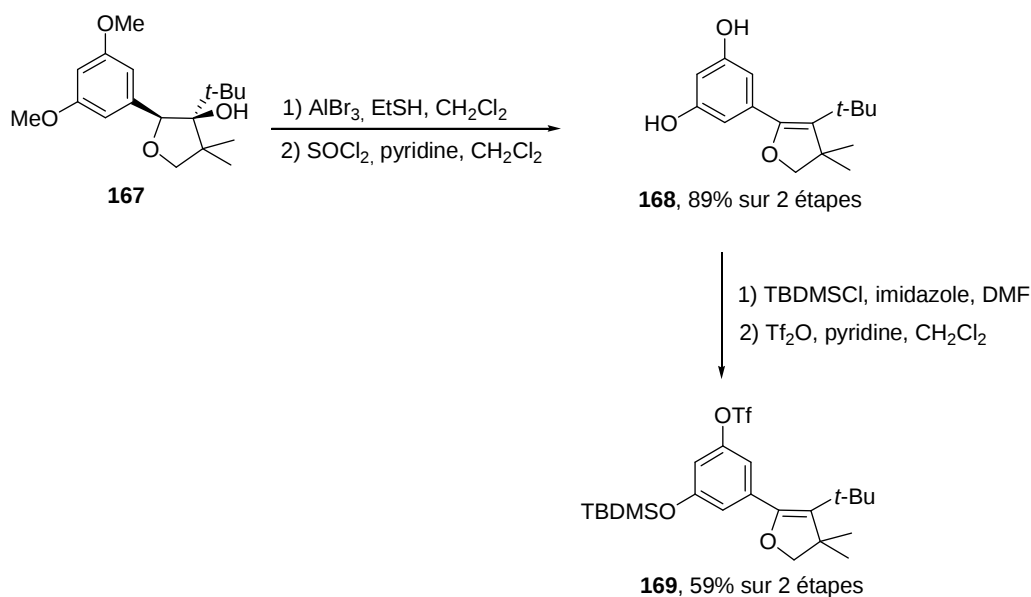


Schéma 3-28. Simplification de la structure de l'aromatique : synthèse du dérivé **167**.

L'avantage de l'utilisation d'un naphthalène comme aromatique était de pouvoir espacer le 1,2-dioxétane du site de fixation du fluorophore et ainsi d'éviter un trop grand nombre de fonctions sur le cycle aromatique. Cependant, l'utilisation d'un phényle comme dérivé aromatique est plus simple et nous avons donc envisagé d'utiliser le composé **167** pour la synthèse de nouveaux dérivés du 1,2-dioxétane.

La stratégie de synthèse implique l'utilisation de deux groupements méthoxy, le premier objectif a donc été de retirer ceux-ci pour pouvoir envisager l'introduction de la triple liaison. Contrairement au dérivé naphtalène **162**, ceux-ci ont pu être retirés très efficacement en présence de $\text{AlBr}_3/\text{EtSH}$ à température ambiante dans le CH_2Cl_2 sans optimisation particulière de la réaction. La formation de l'éther d'énol a ensuite été effectuée dans les mêmes conditions que précédemment pour fournir le composé symétrique **168**. Cette symétrie permet la mono-protection d'un phénol par un groupement TBDMS sans problème de régiosélectivité. Puis l'activation du deuxième phénol sous la forme d'un triflate permet d'obtenir le précurseur **169** pour une réaction de Sonogashira (Schéma 3-29).

Schéma 3-29. Synthèse du précurseur **169** pour la réaction de Sonogashira.

Puis des premiers essais de couplage de Sonogashira, qui avait été très efficace dans le cas du naphthalène **156**, ont été effectués avec le composé **169** (Schéma 3-30).

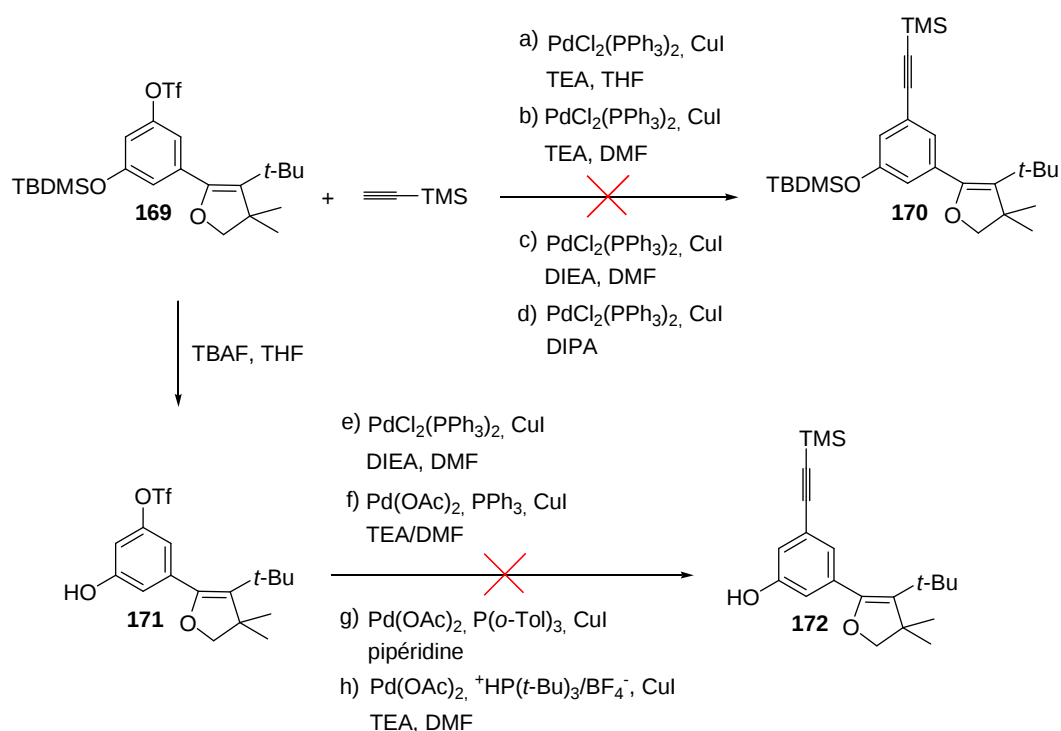


Schéma 3-30. Essais d'introduction de la triple liaison sur le phényle.

Malheureusement, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les couplages impliquant le dérivé naphthalène (conditions a), aucun produit de couplage n'a été obtenu et

seul le réactif de départ **169** a pu être récupéré. La variation de la nature et la quantité de base (conditions b, c et d) n'ont pas non plus permis de convertir le réactif de départ **169**. Supposant que l'insertion oxydante ne s'opérerait pas à cause de l'encombrement du groupement TBDMS en *méta* du triflate, celui-ci a été retiré en présence de TBAF et le composé **171** a été obtenu. Cependant, le même résultat a été observé avec le produit désilylé (conditions e) même en changeant la nature de l'espèce catalytique (conditions f). Il semblerait donc que le paramètre en cause soit la richesse du cycle aromatique qui empêcherait l'insertion oxydante de s'opérer efficacement. Ainsi, des phosphines plus riches en électrons comme la tri(*o*-tolyl)phosphine³²⁰ ou le sel tétrafluoroborate de tri(*tert*-butyl)phosphonium³²¹ ont été évaluées mais les premiers essais effectués n'ont pas permis à la réaction de couplage de se produire (conditions g et h).

³²⁰ Zapf, A.; Beller, M. *Chem. Commun.* **2005**, 431-440.

³²¹ Netherton, M. R.; Fu, G. C. *Org. Lett.* **2001**, 3, 4295-4298.

IV CONCLUSION

Dans un premier temps, la stratégie développée pour la synthèse des sondes pro-fluorescentes a été étendue avec succès aux 1,2-dioxétanes et a conduit à l'obtention d'une sonde chémioluminescente **102** permettant la détection de la caspase-3.

L'utilisation d'un bras réactif auto-immolable s'est avéré être un outil efficace pour permettre le ciblage de peptidases tout en utilisant des 1,2-dioxétanes phénoliques qui sont actuellement les espèces qui émettent le plus efficacement. Ce résultat préliminaire constitue ainsi une première étape vers la mise au point de sondes chémioluminescentes utilisables en milieu biologique (Figure 3-17).

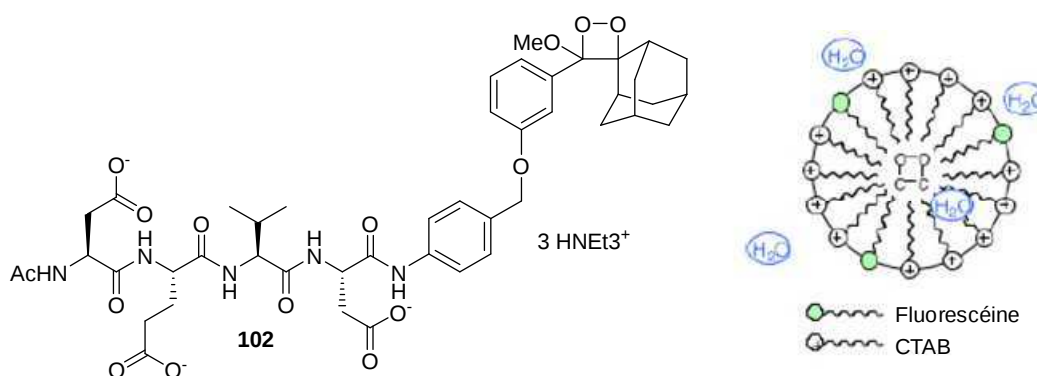


Figure 3-17. Sondes chémioluminescente **102** pour la détection de la caspase-3 et dispositif micellaire permettant la détection de la lumière.

Dans un second temps, il a été envisagé de mettre au point des 1,2-dioxétanes plus stables, avec une émission de lumière accrue et une longueur d'onde d'émission déplacée dans le rouge. Une première stratégie a été explorée et a consisté en la synthèse d'un cœur chémioluminescent effectuant un transfert d'énergie de type CRET entre le 1,2-dioxétane et un fluorophore émettant dans le rouge (Figure 3-18 a).

Une deuxième stratégie basée sur un transfert d'énergie à travers les liaisons (en l'occurrence une triple liaison) est apparue plus attrayante. En effet, d'après les résultats présentés dans la littérature par le groupe de K. Burgess sur le luminol, cette stratégie permet d'envisager un transfert d'énergie plus efficace entre le 1,2-dioxétane et le fluorophore. De plus, elle simplifie la voie de synthèse et permet de s'affranchir d'un bon recouvrement spectral entre la luminescence du 1,2-dioxétane et le fluorophore utilisé pour le transfert d'énergie (Figure 3-18 b).

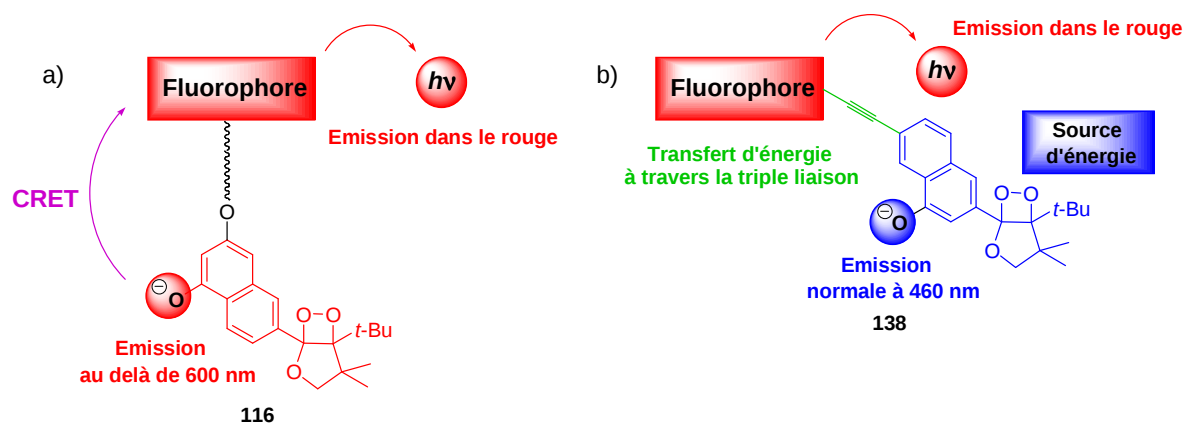


Figure 3-18. Stratégies envisagées pour la synthèse de 1,2-dioxétanes possédant de meilleures caractéristiques de luminescence : a) transfert d'énergie *via* un CRET ; b) transfert d'énergie à travers une triple liaison.

Ainsi, une première voie de synthèse décrivant la synthèse d'un naphthalène possédant deux fonctions phénol, l'une pour le déclenchement de la chémioluminescence et l'autre pour l'introduction de la triple liaison, a été envisagée. Le composé **162** a été synthétisé mais le groupement méthoxy n'a pu être retiré de la structure qu'en présence de thiols qui réduisent prioritairement la triple liaison. Un changement de la nature des groupements protecteurs devra être envisagé. Ainsi, l'utilisation de groupements MOM, PMB, benzyle et/ou allyle pourront être examinés afin d'obtenir le composé **173** sur lequel des fluorophores de nature différentes pourront être introduits (Schéma 3-31).

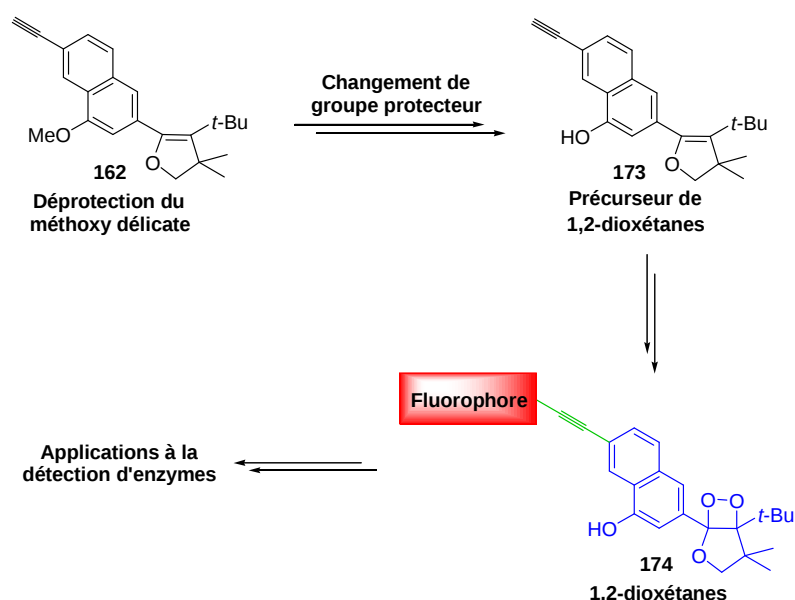


Schéma 3-31. Changement de la stratégie pour l'obtention des 1,2-dioxétanes **174**.

Une fois les synthèses des 1,2-dioxétanes **174** effectuées, leurs émissions de lumière pourront être comparées et des applications dans la synthèse de sondes chémiluminescentes (e.g., la phosphatase alcaline) pourront être effectuées.

Une deuxième voie de synthèse a été envisagée avec un dérivé phényle plus simple que le naphthalène. Cependant, la synthèse a pour l'instant été interrompue par l'impossibilité d'introduire la triple liaison sur le noyau aromatique *via* une réaction de Sonogashira. Ce type de réaction pallado-catalysée sur un substrat aussi riche en électrons (i.e., présence de deux fonctions phénol) a été très peu décrite dans la littérature.³²² Une étude plus approfondie de cette réaction à travers une exploration de systèmes catalytiques différents³²³ ou de ligands plus riches en électrons pourrait permettre d'effectuer ce couplage.^{320,324} En particulier, l'utilisation des ligands développés par les groupes de J. F. Hartwig³²⁵ et de S. L. Buchwald³²⁶ pourra être envisagée. De même, une alternative utilisant des ligands NHCs (N-Heterocyclic Carbenes)³²⁷ pourra également être explorée. En effet, ceux-ci sont de plus en plus utilisés comme ligands pour des réactions pallado-catalysées et sont connus pour leur caractère σ -donneur qui favorise les insertions oxydantes difficiles et pour leur encombrement stérique qui accélère l'élimination réductrice.³²⁸

³²² Pour un exemple sur une structure apparentée, voir Vestergaard, M.; Jennum, K.; Sorensen, J. K.; Kilsa, K.; Nielsen, M. B. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 3175-3183. Un autre exemple non publié décrit une réaction de Suzuki lors de la synthèse de la (+)-cavicularin sur un substrat aromatique portant un groupement triflate substitué en *ortho* par un groupement méthoxy. Les résultats ont montré une insertion oxydante difficile et le meilleur résultat obtenu à ce jour a été un couplage effectué avec un rendement de 20%, présentation orale de S. Kostiuk, groupe du Pr. D. Harrowven, Université de Southampton, à l'Anorcq 9, 3-5 avril 2008, Le Havre.

³²³ C, Xu and E. Negishi in *Handbook of organopalladium chemistry for organic synthesis*, Vol. 1 (Ed.: E. Negishi), Wiley, New York, **2002**, pp. 531 – 549. Pour une redéfinition des frontières de la réaction de Sonogashira, notamment au niveau des nouveaux systèmes métalliques récemment développés, voir Plenio, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6954-6956.

³²⁴ Dupont, J.; Consorti, C. S.; Spencer, J. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2527-2572.

³²⁵ Hartwig, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2008**, sous presse.

³²⁶ Pour une revue récente faisant le point des ligands développés pour la réaction d'amination catalysée par le palladium, voir Surry, D. S.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6338-6361. Pour une rationalisation de l'utilisation de ces ligands dans la réaction de Suzuki, voir Martin, R.; Buchwald, S. L. *Acc. Chem. Res.* **2008**, sous presse. Pour deux exemples de réaction de Sonogashira sur des substrats désactivés, voir Gelman, D.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5993-5996. Anderson, K. W.; Buchwald, S. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6173-6177.

³²⁷ Bourissou, D.; Guerret, O.; Gabbaï, F. P.; Bertrand, G. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 39-91. Herrmann, W., A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1290-1309. Diez-Gonzalez, S.; Nolan, S. P. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 874-883.

³²⁸ Kantchev, E. A. B.; O'Brien, C. J.; Organ, M. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2768-2813. Herrmann, W. A.; Ofele, K.; Von Preysing, D.; Schneider, S. K. *J. Organomet. Chem.* **2003**, 687, 229-248.

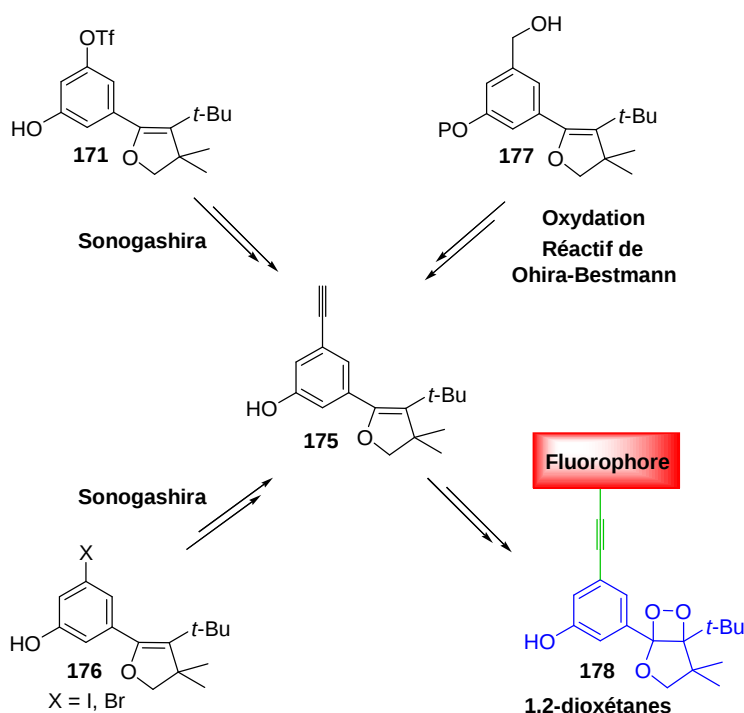


Schéma 3-32. Alternatives aux conditions de couplage de Sonogashira « classiques » pour la synthèse des 1,2-dioxétanes **178**.

Une autre possibilité consisterait en un remplacement de la fonction triflate par un atome d'halogène (e.g., I ou Br), ce qui permettrait de diminuer la densité électronique du noyau aromatique **176** et devrait faciliter le couplage.³²⁹ Enfin, le dérivé **175** précurseur des 1,2-dioxétanes **178** pourrait également être synthétisé grâce à l'introduction de la triple liaison à partir du composé **177** via une oxydation suivie d'une transformation en alcyne par le réactif de Ohira-Bestmann (Schéma 3-32).³³⁰

Il sera finalement intéressant de comparer les émissions de **174** et **178** afin d'évaluer l'influence de l'utilisation d'un noyau naphtalène sur l'émission de lumière du 1,2-dioxétane.

L'ensemble des travaux relatifs à la synthèse et à la validation *in vitro* de la première sonde chémiluminescente caspase-3 (section II) ont fait l'objet d'une publication dans *Organic Letters* dont le manuscrit est présenté ci-après.

³²⁹ Hundertmark, T.; Littke, A. F.; Buchwald, S. L.; Fu, G. C. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1729-1731.

³³⁰ Pietruszka, J.; Witt, A. *Synthesis* **2006**, 4266-4268. Brown, D. G.; Velthuisen, E. J.; Commerford, J. R.; Brisbois, R. G.; Hoyer, T. R. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2540-2541.

Chemiluminescent Probe for the in Vitro Detection of Protease Activity

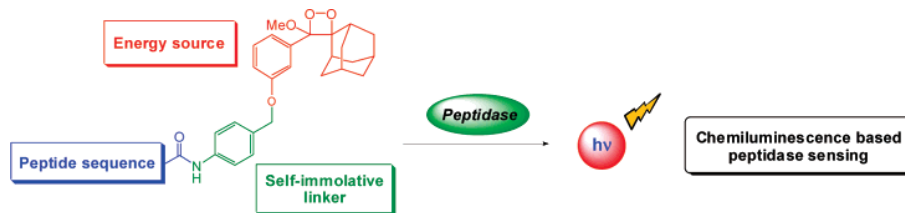
Jean-Alexandre Richard,^{†,‡} Ludovic Jean,[‡] Anthony Romieu,^{*,†}
Marc Massonneau,[‡] Pauline Noack-Fraissignes,[‡] and Pierre-Yves Renard^{*,†}

Equipe de Chimie Bio-Organique, Université de Rouen, INSA de Rouen, CNRS UMR 6014, COBRA, IRCOF, 1 rue Lucien Tesnière, 76131 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, and QUIDD, 50 rue Ettore Bugatti, Technopôle du Madrillet 76800 Saint-Etienne du Rouvray Cedex, France

pierre-yves.renard@univ-rouen.fr

Received September 6, 2007

ABSTRACT



A strategy involving the use of a self-immolative linker has been investigated for the chemiluminescent sensing of proteases. The reactive linker enabled the release of a 1,2-dioxetane light precursor. As a proof of principle, caspase-3, a key peptidase involved in apoptosis has been targeted. An in vitro assay has been carried out and proved the decomposition of the linker and the selectivity for caspase-3.

Chemiluminescence is defined as the electromagnetic radiation (ultraviolet, visible, or infrared) produced when a chemical reaction yields an electronically excited intermediate or product, which either luminesces (direct chemiluminescence) or donates its energy to another molecule responsible for the emission (indirect or sensitized chemiluminescence). Oxalate esters, luminol, acridinium esters, and 1,2-dioxetanes are well-known chemiluminescent species emitting light following a chemical reaction.¹ The advantage of using chemiluminescence in bioanalytical assays is associated with a rapid and sensitive detection of the target through reduction of the background noise thanks to the absence of a photonic excitation. Thus, chemiluminescent probes, especially those derived from 1,2-dioxetanes **1**, have been designed for the highly sensitive detection of various enzymes such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, neuraminidase.² Taking into account the versatility, the sensitivity, and the higher specific localization and quanti-

fication of target analytes in tissue selections offered by chemiluminescence as compared to those by fluorescence, chemiluminescent probes have been also used for the development of immuno- and immunohistoassays.³ In order to widen the scope of chemiluminescent probes, our interest is focused on the development of chemiluminescent assays for new classes of enzymes. We have thus previously reported the design and synthesis of a chemiluminescent probe for the detection of acetylcholinesterase activity using an unprecedented thiophenol trigger.⁴ We report here our first investigations regarding the tricky detection of proteases.

Despite recent advances in the development of chemiluminescent probes,⁵ the detection of proteases still remains challenging. The issue mainly lies in the difficulty to obtain an efficient light signal following the cleavage of the peptide

(2) Matsumoto, M. *J. Photochem. Photobiol., C* **2004**, 5, 27–53 and references therein.

(3) Kricka, L. J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 500, 279–286.

(4) Sabelle, S.; Renard, P.-Y.; Pecorella, K.; de Suzzoni-Dezard, S.; Creminon, C.; Grassi, J.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4874–4880.

(5) For a recent example, see Hewage, H. S.; Wallace, K. J.; Anslyn, E. V. *Chem. Commun.* **2007**, 3909–3911.

[†] Equipe de chimie Bio-Organique.

[‡] QUIDD (QUantitative Imaging in Drug Development).

(1) Beck, S.; Koster, H. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2258–2270; Erratum **1991**, 63, 848.

bond. 1,2-Dioxetanes indeed usually emit light through spontaneous decomposition of a compound such as **2**, bearing a negatively charged atom onto an aromatic ring bearing the 1,2-dioxetane, via a mechanism chemically initiated electron exchange luminescence (CIEEL). **2** can be, in the case of enzymes probes, formed specifically through the enzymatic cleavage of **1** (Figure 1). One possible approach for the

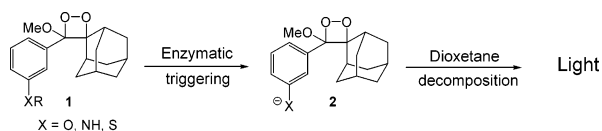


Figure 1. Enzymatic activation of **1** leading to **2** whose decomposition triggers light emission.

detection of proteases would thus be to connect the C-terminus of a peptide sequence directly to the aromatic moiety (i.e., X = NH). However, the amount of light emitted by the release of aniline is by far much weaker than that by the phenol or thiophenol equivalent (i.e., X = O or S).⁶

Thus, inspired by the chemistry of prodrugs widely used in medicinal chemistry for drug delivery applications,⁷ we designed probe **3** which incorporates a reactive linker able to transfer the amide bond-breaking event to a phenolate release (Figure 2). *p*-Aminobenzyl alcohol **8** (PABA) was

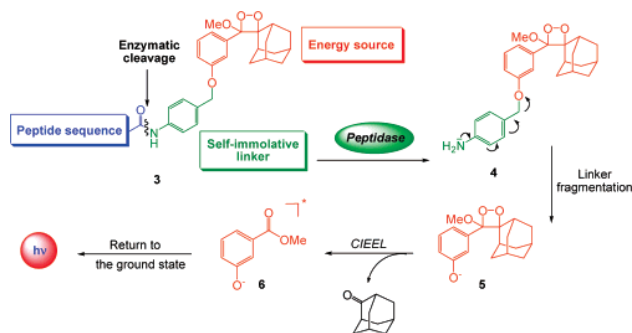


Figure 2. Self-immolative linker strategy for the release of the phenolate moiety **5** after peptide bond cleavage.

chosen as a self-immolative linker.⁸ Thus, aniline **4**, formed by the amide bond cleavage, should spontaneously decompose to release phenolate **5**, leading to the excited compound **6**, which returns to the ground state through light emission.

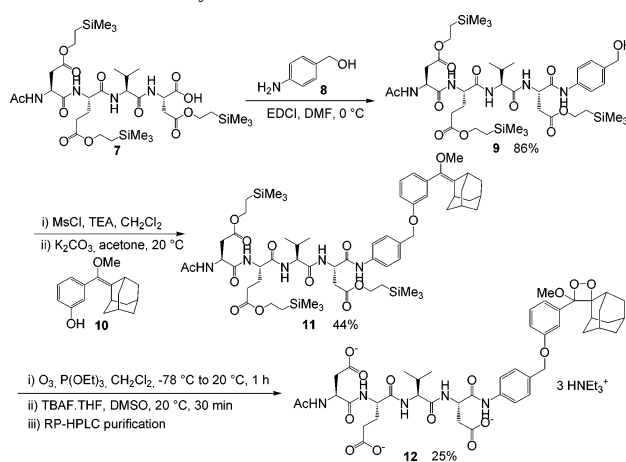
As a proof of concept, we applied our device to the sensing of caspase-3, an effector peptidase which plays a crucial role in the last steps of the apoptotic process.⁹ Although many fluorescent caspase-3-activity probes have been reported so

far,¹⁰ none of them is based on chemiluminescence. Moreover, other caspases have a close substrate profile as compared to caspase-3; thus, providing that the probe shows a high sequence selectivity, this strategy should allow the construction of a flexible set of caspase chemiluminescent substrates. This enzyme thus appeared to be an interesting case study before extending our device to other proteases.

Hence, the linker **8** was introduced onto the DEVD (for Asp-Glu-Val-Asp) peptide sequence **7** which is specifically recognized by caspase-3 and cleaved after the Asp residue at the C-terminal side.¹¹ **7** was prepared in a highly efficient 13-step procedure by solution peptide synthesis using a Boc strategy (93% mean yield for each step, see Supporting Information [SI]). In order to have an orthogonal set of protective groups, the three carboxylic acids of peptide **7** were protected as 2-trimethylsilylethyl (TMSE) esters,¹² easily removed by treatment with fluoride ion sources under mild conditions, shown to be compatible with the 1,2-dioxetane structures.

Then, benzylic alcohol **9** was converted to its mesylate derivative, and enol ether **10**, prepared from 3-hydroxybenzoic acid methyl ester in three steps according to literature procedures,¹³ was incorporated onto the C-terminus of peptide-benzylic alcohol **9** (Scheme 1).

Scheme 1. Synthesis of Chemiluminescent Probe **12**



Finally, compound **11** underwent the key step of the synthesis: a [2+2] cycloaddition between enol ether **11** and singlet oxygen (¹O₂).⁴ The formation of the 1,2-dioxetane derivative was checked by RP-HPLC, and the compound was subsequently isolated in a pure form by semipreparative RP-HPLC. Final deprotection with tetrabutylammonium fluoride

(6) (a) Bronstein, I.; Edwards, B.; Martin, C.; Sparks, A.; Voyta, J. C. (Tropix, Inc., U.S.A.). WO 9624849, 1996. (b) Watanabe, N.; Ichikawa, M.; Ono, A.; Murakami, H.; Matsumoto, M. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 718–719.

(7) (a) Damen, E. W. P.; Nevalainen, T. J.; van den Bergh, T. J. M.; de Groot, F. M. H.; Scheeren, H. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 10, 71–77. (b) de Groot, F. M. H.; Loos, W. J.; Koekkoek, R.; van Berkum, L. W. A.; Busscher, G. F.; Seelen, A. E.; Albrecht, C.; de Bruijn, P.; Scheeren, H. W. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8815–8830. (c) Amir, R. J.; Pessah, N.; Shamis, M.; Shabat, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 4494–4499. (d) Haba, K.; Popkov, M.; Shamis, M.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F., III; Shabat, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 716–720. (e) Amir, R. J.; Danieli, E.; Shabat, D. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 812–821. (f) Shamis, M.; Shabat, D. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4523–4528.

(TBAF) led to chemiluminescent probe **12** after purification by semipreparative RP-HPLC. The structure of this chemiluminescent caspase-3 substrate was confirmed by ESI mass spectrometry (see SI).

With this tool in hand, we investigated the efficiency of our device against recombinant human caspase-3. As the chemiluminescence of a 1,2-dioxetane happens to be less efficient in an aqueous media compared to organic solvents,¹⁴ specific enhancers (namely 5-(stearoylamino)fluorescein (emission wavelength = 530 nm) as well as a surfactant cetyltrimethylammonium bromide [CTAB]) were added to the medium. Thus, caspase-3-mediated cleavage of probe **12** was carried out following a classical final time detection procedure, and a significant light emission at 530 nm could be observed (see SI). The light was persistent for more than 10 min, corresponding to a “glow” chemiluminescence which is known to allow a more sensitive detection than a “flash” emission.¹ The long-lived time course of this light emission is thus an interesting feature for further biological assays (Figure 3A). The maximum of light emission was also represented as a function of time, thus enabling us to follow the kinetics of the enzymatic reaction (Figure 3B).

Finally, the caspase-3 detection limit in this nonoptimized assay format was estimated by decreasing the amount of enzyme until no more light could be significantly detected (see SI). Hence, an encouraging detection limit of 1.31 pmol of enzyme was determined (Figure 3C). Furthermore, control reactions in which probe **12** was incubated with caspase-3 buffer alone, with penicillin amidase (penicillin G acylase), or with other initiator caspases were undertaken. In these conditions, no emission of light was detected, showing that neither spontaneous hydrolysis nor nonspecific enzymatic cleavage of **12** occurred (see SI).

In conclusion, we have designed and synthesized an efficient chemiluminescent probe suitable for the in vitro detection of protease activity. A strategy involving the use of a self-immolative spacer **8** (PABA) was developed to release the light precursor phenolate **5**. An application of this device was undertaken, and the first chemiluminescent caspase-3 probe **12** was synthesized. An in vitro assay enabled the detection of a “glow” luminescence suitable for

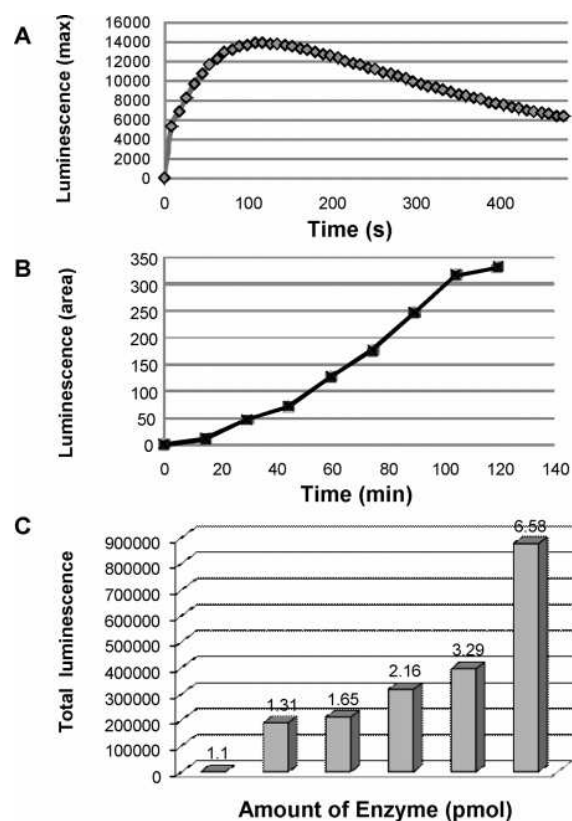


Figure 3. (A) Luminescence intensity (area under the emission curve in the range 490–570 nm) recorded every 9 s with probe **12** after incubation with recombinant human caspase-3 (1.6×10^{-3} U, incubation time 105 min). (B) Maximum light emission of probe **12** as a function of the incubation time with recombinant human caspase-3. (C) Determination of the detection limit of caspase-3.

further biological applications. Moreover, preliminary assays proved that the probe was selective and exhibited a detection limit of around 1 pmol. This new tool constitutes a great innovation in the field of protease-sensing assays and optical bioprobes. Currently, work is in progress in our laboratory to extend this device to other proteases of biological interest.

Acknowledgment. This work was supported by La Région Haute-Normandie and QUIDD. The contribution of Alicia Foucourt (CNRS UMR 6014) and Yves Meyer (QUIDD) to the total synthesis of tetrapeptide **7** is greatly acknowledged. We thank Dr. Jérôme Leprince (U413 INSERM/IFRMP 23) for MALDI-TOF mass measurements and Annick Leboisselier (IRCOF) for the determination of elemental analyses.

Supporting Information Available: Procedures and additional data for syntheses and analyses reported herein. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

OL702190Y

(8) Carl, P. L.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479–480.

(9) Denault, J.-B.; Salvesen, G. S. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4489–4499.

(10) Wang, Z.-Q.; Liao, J.; Diwu, Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2335–2338 and references cited therein. (b) Bouteiller, C.; Clave, G.; Bernardin, A.; Chipon, B.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1303–1317 and references 55–58 therein.

(11) (a) Philchenkov, A. A. *Biochemistry (Moscow)* **2003**, *68*, 365–376.

(b) Fuentes-Prior, P.; Salvesen, G. S. *Biochem. J.* **2004**, *384*, 201–232.

(12) (a) Gerlach, H. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 3039–3044. (b) Sieber, P. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2711–2716.

(13) (a) Sabelle, S.; Hydrio, J.; Leclerc, E.; Mioskowski, C.; Renard, P.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 3645–3648. (b) Bastos, E. L.; Ciscato, L. F. M. L.; Weiss, D.; Beckert, R.; Baader, W. J. *Synthesis* **2006**, 1781–1786. (c) Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Massonneau, M. (Quidd, Fr.; Université De Rouen). WO 2886292, 2006.

(14) (a) Schaap, A. P.; Louis, H. A.; Romano, J. *Clin. Chem.* **1989**, *1863*–1864. (b) Schaap, A. P. (Wayne State University, U.S.A.). EP 0352713, 1990. (c) Adam, W.; Bronstein, I.; Edwards, B.; Engel, T.; Reinhardt, D.; Schneider, F. W.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10400–10407.

Chapitre 4

Experimental section

Experimental section

I GENERAL PROCEDURES

Chemicals and Reagents. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40-63 μm) from SdS unless otherwise noted. Reversed-phase column flash-chromatographies were performed on octadecylfunctionalized silica gel (200-400 mesh loading: 20-22%, surface area $\sim 550 \text{ m}^2/\text{g}$ and mean pore size 60 $\text{\AA}$) from Aldrich. TLC analyses were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. Compounds were visualized by one of the following methods: 1) spray with a 0.2% (w/v) ninhydrin solution in absolute ethanol, 2) spray with a 3.5% (w/v) phosphomolybdic acid solution in absolute ethanol, 3) spray with a 1.0% (w/v) of aq. KMnO_4 solution. Unless otherwise noted, all reagents were purchased from Alfa Aesar, Sigma-Aldrich or Acros. All solvents were dried following standard procedures (CH_3CN : distillation over CaH_2 , CH_2Cl_2 : distillation over P_2O_5 , DMF: distillation over BaO , DMSO: distillation over CaH_2 , THF: distillation over Na/benzophenone , toluene: distillation over Na , and EtOH : distillation over Mg/I_2). Anhydrous NMP ($\text{H}_2\text{O} < 100 \text{ ppm}$) was purchased from Fluka and stored over 4 $\text{\AA}$ molecular sieves. Pyridine was distilled over KOH and stored over BaO . *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) and triethylamine (TEA) were distilled from CaH_2 and stored over BaO . All reactions were performed under an argon atmosphere unless otherwise noted. Recombinant human caspase-3 and 9 enzymes (respectively 5.52 U/mg and 7139.39 U/mg) were purchased from Sigma. Recombinant *A. faecalis* PGA (0.63 U/mg) was gratefully furnished by Pr. L. Fisher, Universität Hohenheim. Penicillin amidase from *E. coli* and immobilized on Eupergit[®] C ($\sim 100 \text{ U/g}$) was purchased from Fluka. HPLC-gradient grade acetone was obtained from Acros and CH_3CN was purchased from Acros, Fisher Scientific or Panreac. Buffers (caspase-3, caspase-9, alkaline and phosphate buffers) and aq. mobile phases for HPLC were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (purified to $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$). Triethylammonium acetate (TEAA, 1.0) and triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0 M)

buffers were prepared from distilled triethylamine and glacial acetic acid or CO₂ gas. Indoles **81**,³³¹ **82**,³³² **83**,³³³ **84**³³⁴ were prepared according to known procedures. 7-acetoxy-3-formylcoumarin **78**,³³⁵ DDAO/DAO **46/46'**,³³⁶ 2-hydroxy Nile Red **157**³³⁷ and Cy 5.0³³⁸ were prepared according syntheses reported in the literature. Commercial 7-hydroxycoumarin **52** (purity > 98%) was obtained from Alfa Aesar. Rhodamine 6G (dye content ~ 95%) and 5-(stearoylamino)fluorescein (purity > 98%) were purchased from Aldrich. Relative quantum yields were measured in DMSO, EtOH, and PBS at 25 °C by a relative method using sulfocyanine dye Cy 5.0 ($\Phi_F = 0.20$ in PBS)⁸ or rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.90$ in water).³³⁹ The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield: $\Phi_F(X) = (A_S/A_X)(F_X/F_S)(n_X/n_S)^2 \Phi_F(S)$ where A is the absorbance (in the range 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 ($n = 1.337$ for PBS, 1.361 for EtOH, and 1.479 for DMSO), and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.³⁴⁰

Instruments. ¹H, ¹³C and ¹⁹F NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) with Si(CH₃)₄, CDCl₃ and CFCl₃ as internal references respectively. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from CDCl₃ ($\delta_H = 7.26$, $\delta_C = 77.36$), DMSO-*d*₆ ($\delta_H = 2.54$, $\delta_C = 40.45$), acetone-*d*₆ ($\delta_H = 2.09$, $\delta_C = 30.60$ and 205.87) or CD₃OD ($\delta_H = 3.34$, $\delta_C = 49.86$).³⁴¹ J values are expressed in Hz. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad signal. Optical rotations were measured with a Perkin Elmer

³³¹ Synthesized according a similar procedure than recently reported, Constantin, T. P.; Silva, G. L.; Robertson, K. L.; Hamilton, T. P.; Fague, K.; Waggoner, A. S.; Armitage, B. A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1561-1564.

³³² Narayanan, N.; Patonay, G. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2391-2395.

³³³ Strekowski, L.; Mason, J. C.; Lee, H.; Say, M.; Patonay, G. *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, *41*, 227-232. Synthesized in our case following a similar protocol reported by W. Pham *et al.* for the introduction of a sulfonated alkyl chain containing four carbon atoms, Pham, W.; Medarova, Z.; Moore, A. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 735-740.

³³⁴ Lin, Y.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Molecular Imaging* **2003**, *2*, 87-92. Rajopadhye, M.; Narayanan, N.; Peterson, J. D. (Visen Medical, Inc). WO 2007028118, 2007.

³³⁵ Lim, N. C.; Schuster, J. V.; Porto, M. C.; Tanudra, M. A.; Yao, L.; Freake, H. C.; Brueckner, C. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 2018-2030.

³³⁶ Corey, P. F.; Trimmer, R. W.; Biddlecom, W. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *103*, 1646-1648.

³³⁷ Briggs, M. S. J.; Bruce, I.; Miller, J. N.; Moody, C. J.; Simmonds, A. C.; Swann, E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 1051-1058.

³³⁸ Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 105-111.

³³⁹ Magde, D.; Wong, R.; Seybold, P. G. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327-334.

³⁴⁰ Procedure from HORIBA Jobin Yvon, <http://www.jobinyvon.com/Fluorescence/Applications/Quantum-Yield>.

³⁴¹ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

341 polarimeter. Concentration c in g/100 ml and solvent are given in brackets. Infrared (IR) spectra were recorded as thin-film on sodium chloride plates or KBr pellets using a Perkin Elmer FT-IR Paragon 500 spectrometer. UV-visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer. Fluorescence spectroscopic studies were performed with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with fluorescence cells from Varian and Hellma[®]. Enzyme kinetic parameters were determined using a Molecular Devices fluorometric imaging plate reader FlexStation. Black clear bottom 96-multiwell plates were purchased from Costar. Analytical HPLC was performed on a Thermo Electron Surveyor instrument equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC was performed on a Finnigan SpectraSYSTEM liquid chromatography system equipped with UV-visible 2000 detector. Mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an ESI or APCI source. Some compounds were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry on a Voyager DE PRO in the reflector mode with α -cyanohydroxycinnamic acid (α -CHCA) as a matrix. LC-MS analyses were performed on a Thermo's Surveyor Plus HPLC system coupled with the Finnigan LCQ Advantage MAX (ionization mode: ESI+, capillary temperature: 270 °C, capillary voltage: +10V, tube lens offset: 0V). Elemental analyses were performed using a CARLO ERBA Model 1106. Ozone was generated from molecular oxygen by means of an ozone generator BMT 802X.

HPLC separations. Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and the purification steps. Each one of these systems was optimized in order to improve separation conditions.

System A: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μ m, 4.6 x 150 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.0) as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 1.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 254 nm.

System B: System A with the following gradient [80% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 20% to 100% (40 min) of CH₃CN].

System C1: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μ m, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, v/v, pH 2.0) as eluents [80% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 20% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 5.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 254 and 320 nm.

System C2: System C1 with a Varian Kromasil C₁₈ column (10 µm, 21.2 x 250 mm) running at a flow rate of 20.0 mL/min.

System D1: System C1 with visible detection at 450 nm.

System D2: System C2 with visible detection at 450 nm.

System E: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and aq. TFA 0.1% as eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 5% (10 min), 5% to 10% (10 min) and 10% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 3.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 254 and 320 nm.

System F: System E with visible detection at 450 nm.

System G: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈, 5 µm, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and 0.1% aq. TFA as the eluents [100% aq. TFA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (50 min) of CH₃CN] at a flow rate of 4.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 250 and 400 nm.

System H: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈, 5 µm, 2.1 x 150 mm) with CH₃CN and formic acid 0.1% (FA 0.1%) as eluents [90% FA (2 min), then linear gradient from 10% to 50% (13 min) and 50% to 90% (27 min) of CH₃CN] at a flow rate of 0.25 mL/min. UV detection was achieved at 260 nm. ESI-MS detection was achieved in the positive mode (mass range 75-1250 a.m.u, centroid mode).

System I: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 4.6 x 150 mm) with CH₃CN and deionized water as the eluents [100% H₂O (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (40 min) of CH₃CN] at a flow rate of 1.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 254 nm.

System J: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and TFA 0.1% as the eluents [80% TFA (5 min), then linear gradients from 20% to 68% (20 min) of CH₃CN, 68% to 80% (10 min) of CH₃CN and 80% to 100% (5 min) of CH₃CN] at a flow rate of 5.0 mL/min. Dual UVe detection was achieved at 210 and 250 nm.

System K: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 4.6 x 150 mm) with CH₃CN and deionized water as the eluents [75% H₂O (2 min), then linear gradient from 25% to 100% (30 min) of CH₃CN] at a flow rate of 1.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 254 nm.

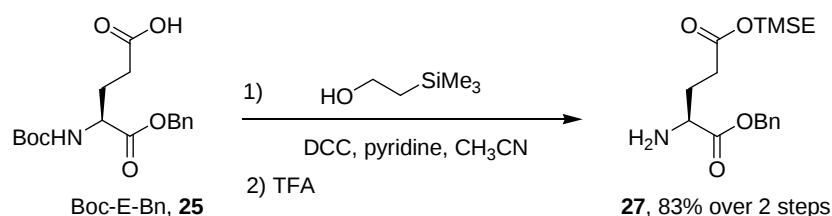
System L: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and deionized water as the eluents [75% H₂O (3 min), then linear gradients from 25%

to 65% (15 min) of CH₃CN and 65% to 100% (60 min) of CH₃CN] at a flow rate of 5.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 250 nm.

System M: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 μm, 10.0 x 250 mm) with CH₃CN and aq. triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB 50 mM, pH 7.5) as the eluents [100% TEAB (5 min), then linear gradients from 0% to 100% (65 min) of CH₃CN] at a flow rate of 4.0 mL/min. Dual UV detection was achieved at 210 and 250 nm.

II SYNTHESIS OF PRO-FLUORESCENT PROBES

H-E(TMSE)-Bn 27.

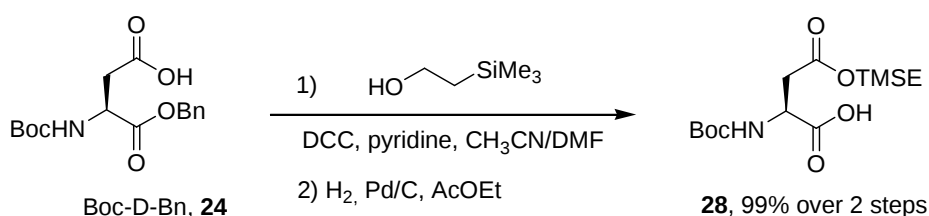


1) Side chain protection. Boc-E(H)-Bn **25** (2.04 g, 6.3 mmol) was dissolved in a mixture of dry CH₃CN (8 mL) and DMF (1 mL). To this solution were added dry pyridine (1.02 mL, 12.6 mmol, 2 eq.) and 2-(trimethylsilyl)ethanol (1.08 mL, 7.56 mmol, 1.2 eq.). The mixture was cooled to 0 °C, then *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1.43 g, 6.93 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Thereafter, oxalic acid (5.0 M in DMF, 185 μL) was added and the mixture was stirred for 20 min. The DCU precipitate was removed by filtration, washed with AcOEt and the filtrate was evaporated to dryness. The resulting oily residue was dissolved in 130 mL of AcOEt and washed successively with a sat. solution of NaHCO₃, deionized water, aq. citric acid (10%) and again with deionized water (60 mL each). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (95:5, v/v) as the mobile phase, to give Boc-E(TMSE)-Bn as a colorless oil (2.66 g, 99%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂Si), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.91-1.96 (m, 1H, 0.5CH₂), 2.15-2.19 (m, 1H, 0.5CH₂), 2.27-2.42 (m, 2H, CH₂CO), 4.14 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.35-4.41 (m, 1H, CH), 5.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.17 (s, 2H, ArCH₂O), 7.35 (s,

5H, 5ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.3 (3C), 17.5, 27.9, 28.5 (3C), 30.7, 53.3, 63.1, 67.4, 80.2, 128.5-128.9 (3 peaks, 5C), 135.5, 155.6, 172.4, 173.0; IR (neat): 3371, 2955, 2899, 1732, 1500, 1455, 1391, 1367, 1251, 1169, 1049 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} +4.6^\circ$ (c 1.12, CHCl_3); $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 95:5, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_6\text{SiNa}]^+$ 460.21, found 460.27; Anal. Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_6\text{Si}$: C, 60.38; H, 8.06; N, 3.20. Found: C, 60.36; H, 8.02; N, 3.44.

2) Boc deprotection. Boc-E(TMSE)-Bn (5.19 g, 11.9 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (140 mL). The solution was cooled to 0 °C and TFA (17 mL, 237 mmol, 20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the mixture was cooled to 0 °C and a solution of sat. NaHCO_3 (250 mL) was added. The aqueous phase was extracted twice with CH_2Cl_2 (100 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (200 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording **27** as a yellow oil (3.37 g, 84%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.97 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, CH_2Si), 1.51 (s, 2H, NH_2), 1.81-1.91 (m, 1H, 0.5 CH_2), 2.04-2.14 (m, 1H, 0.5 CH_2), 2.43 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.49-3.54 (m, 1H, CH), 4.15 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, OCH_2), 5.15 (s, 2H, ArCH_2O), 7.35 (s, 5H, 5ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.2 (3C), 17.6, 30.0, 31.1, 54.2, 63.0, 67.1, 128.6-128.9 (3 peaks, 5C), 135.9, 173.6, 175.8; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 1:1, v/v); IR (neat) 3323, 3019, 2957, 2898, 1732, 1694, 1520, 1455, 1417, 1392, 1326, 1251, 1217, 1042 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} -2.4^\circ$ (c 1.12, CHCl_3); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_4\text{Si}]^+$ 338.18, found 338.47; Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_4\text{Si}$: C, 60.50; H, 8.06; N, 4.15, found C, 60.34; H, 7.89; N, 4.03.

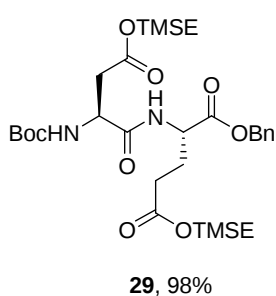
Boc-D(TMSE)-OH **28**.



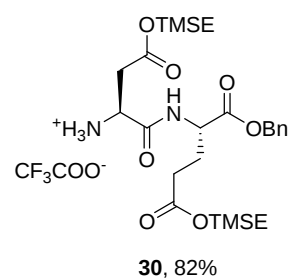
1) Side chain protection. Boc-D(H)-Bn **24** (2.04 g, 6.3 mmol) was dissolved in a mixture of dry CH_3CN (8 mL) and DMF (1 mL). To this solution were added dry pyridine (1.02 mL, 12.6 mmol, 2 eq.) and 2-(trimethylsilyl)ethanol (1.08 mL, 7.56 mmol, 1.2 eq.). The mixture

was cooled to 0 °C, then *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1.43 g, 6.93 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Thereafter, oxalic acid (5.0 M in DMF, 185 μ L) was added and the mixture was stirred for 20 min. The DCU precipitate was removed by filtration, washed with AcOEt and the filtrate was evaporated to dryness. The resulting oily residue was dissolved in 130 mL of AcOEt and washed successively with a sat. solution of NaHCO₃, deionized water, aq. citric acid (10%) and again with deionized water (60 mL each). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using CH₂Cl₂ as the mobile phase, yielding Boc-D(TMSE)-Bn as a colorless oil (2.66 g, quant. yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.93 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, CH₂Si), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.79 (dd, *J* = 4.5 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂), 3.00 (dd, *J* = 4.5 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂), 4.11 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.57-4.63 (m, 1H, CH), 5.14 (ABd, *J* = 12 Hz, 1H, 0.5ArCH₂O), 5.22 (ABd, *J* = 12.0 Hz, 1H, 0.5ArCH₂O), 5.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 7.34 (s, 5H, 5ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.2 (3C), 17.5, 28.6 (3C), 37.2, 50.4, 63.7, 67.7, 80.4, 128.5-128.8 (3 peaks, 5C), 135.6, 155.7, 171.3 (2C); IR (neat): 3376, 2955, 2899, 1724, 1499, 1456, 1412, 1391, 1367, 1342, 1251, 1169, 1046 cm⁻¹; *R*_f = 0.5 (100% CH₂Cl₂); [α]₃₆₅²¹ +12.7° (*c* 0.98, CHCl₃); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₂₁H₃₃NO₆SiNa]⁺ 446.20, found 446.33; Anal. Calcd for C₂₁H₃₃NO₆Si: C, 59.55; H, 7.85; N, 3.31. Found: C, 59.41; H, 7.76; N, 3.33.

2) Bn deprotection. Boc-D(TMSE)-Bn (1.24 g, 2.9 mmol) was dissolved in AcOEt (50 mL). The solution was cooled to 0 °C and Pd/C catalyst (10%, 120 mg) was added. Then, the reaction mixture was set under an hydrogen atmosphere and stirred at room temperature for 16 h. The Pd/C catalyst was removed by filtration through a Celite[®] 545 pad, and the filtrate was concentrated under vacuum, yielding **28** as colorless crystals (977 mg, quant. yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.98 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂Si), 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.80 (dd, *J* = 5.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂), 3.00 (dd, *J* = 4.0 and 17.0 Hz, 1H, CH₂), 4.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, OCH₂), 4.58-4.61 (m, 1H, CH), 5.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, NH), 11.05 (s_{br}, 1H, COOH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 1.2 (3C), 17.6, 28.6 (3C), 37.0, 50.1, 63.9, 80.7, 155.9, 171.7, 176.5; [α]₃₆₅²¹ +106.3° (*c* 0.98, CHCl₃); IR (KBr): 3445, 2956, 1736, 1658, 1519, 1456, 1412, 1393, 1371, 1355, 1335, 1289, 1252, 1219, 1196, 1175, 1066, 1048 cm⁻¹; MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for [C₁₄H₂₆NO₆SiK]⁺ 372.12, found 372.42; Anal. Calcd for C₁₄H₂₆NO₆Si: C, 50.43; H, 8.16; N, 4.20. Found: C, 50.35; H, 8.13; N, 4.21.

Boc-D(TMSE)-E(TMSE)-Bn 29.

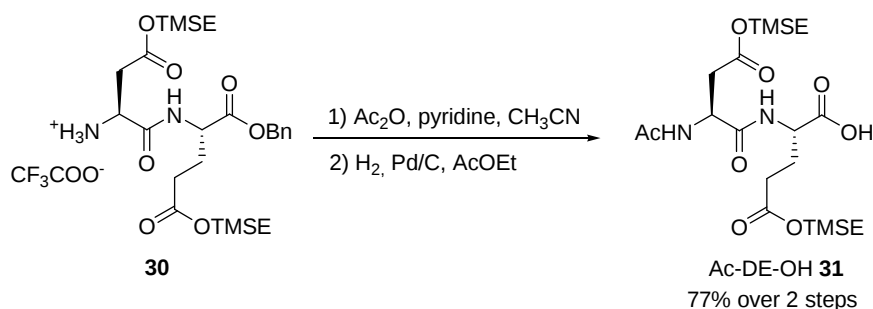
27 (3.64 g, 10.8 mmol) was dissolved in dry CH₃CN (35 mL). Then **28** (3.60 g, 10.8 mmol, 1 eq.), peptide coupling reagent (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP, 4.77 g, 10.8 mmol, 1. eq.) and DIEA (5.35 mL, 32.4 mmol, 3 eq.) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 45 min. The solvent was removed under vacuum, the resulting oil was dissolved in CH₂Cl₂ (140 mL) and washed with a sat. solution of NaHCO₃ (70 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (100 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (70 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, affording **29** as a yellow oil (2.18 g, 98%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 18H, 2Si(CH₃)₃), 0.93-1.01 (m, 4H, 2CH₂Si), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.97-2.04 (m, 1H, 0.5CH₂Glu), 2.19-2.37 (m, 3H, CH₂GluCO + 0.5CH₂Glu), 2.62 (dd, *J* = 6.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 2.99 (dd, *J* = 5.0 and 17 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 4.11-4.20 (m, 4H, 2OCH₂), 4.46-4.54 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 4.59-4.66 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 5.16 (s, 2H, ArCH₂ O), 5.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.18 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Glu}), 7.34 (s, 5H, 5ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.2 (6C), 17.6 (2C), 27.7, 28.6 (3C), 30.4, 36.5, 50.8, 52.1, 63.2, 63.7, 67.6, 80.8, 128.5-128.9 (3 peaks, 5C), 135.5, 155.7, 171.1, 171.6, 172.5, 173.1; IR (neat): 3350, 2955, 2899, 1732, 1682, 1520, 1455, 1391, 1367, 1250, 1170, 1062 cm⁻¹; [α]₃₆₅²¹ +44.7° (c 1.06, CHCl₃); *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 7:3, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α-CHCA matrix): calcd for [C₃₁H₅₂N₂O₉Si₂Na]⁺ 675.31, found 675.62; Anal. Calcd for C₃₁H₅₂N₂O₉Si₂: C, 57.03; H, 8.03; N, 4.29. Found: C, 57.13; H, 7.71; N, 4.26.

H⁺-D(TMSE)-E(TMSE)-Bn 30.

29 (1.32 g, 2.03 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (30 mL). The solution was cooled to 0 °C and TFA (3 mL, 40.6 mmol, 20 eq.) was added. The mixture was stirred at room temperature for 2.5 h. Then, the solution was cooled to 0 °C, AcOEt (40 mL) and a sat. solution of NaHCO₃ (40 mL) was added. The phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with AcOEt (30 mL). The

combined organic phases were washed with deionized water (50 mL), dried over Na₂SO₄ and filtered. TFA (180 μ L, 2.4 mmol, 1.2 eq.) was added and the organic phase was evaporated under reduced pressure, affording **30** as a yellow oil (1.11 g, 82%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.91-1.02 (m, 4H, 2CH₂Si), 1.97-2.23 (m, 2H, CH₂Glu), 2.33 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂GluCO), 2.93 (d, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂Asp), 4.10-4.24 (m, 4H, 2OCH₂), 4.49 (t, J = 7.0 Hz, 1H, C^{*}H_{Asp}), 4.52-4.60 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 5.10 (ABd, J = 12 Hz, 1H, 0.5ArCH₂O), 5.18 (ABd, J = 12 Hz, 1H, 0.5ArCH₂O), 7.33 (s, 5H, 5ArH), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NH_{Glu}); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.4 (3C), -1.3 (3C), 17.4 (2C), 26.8, 30.5, 35.2, 50.1, 52.6, 63.8, 65.1, 67.9, 128.6-129.0 (3 peaks, 5C), 135.2, 168.6, 171.0, 171.4, 174.1; IR (neat): 3361, 2954, 2886, 2360, 1737, 1682, 1506, 1455, 1386, 1250, 1172, 1063 cm⁻¹; [α]₃₆₅²¹ +5.1° (c 1.01, CHCl₃); R_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 1:1, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for [C₂₆H₄₄N₂O₇Si₂Na]⁺ 575.26, found 575.46.

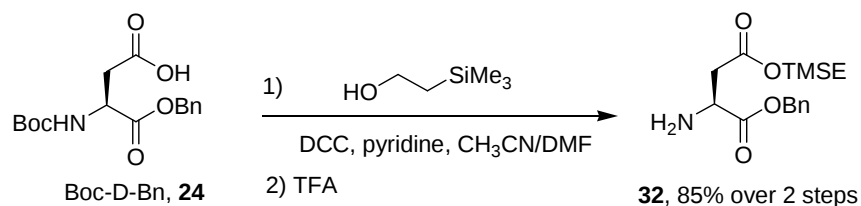
Ac-E(TMSE)-D(TMSE)-OH **31**.



1) Acylation. **30** (892 mg, 1.34 mmol) was dissolved in dry CH₃CN (7 mL). Then, acetic anhydride (505 μ L, 5.35 mmol, 4 eq.) and dry pyridine (650 μ L, 8.04 mmol, 6 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature for 1 h. Thereafter, EtOH (500 μ L) was added and the mixture was stirred for 20 min in order to trap the excess of acetic anhydride in AcOEt. The reaction mixture was concentrated to dryness and the resulting oily residue was dissolved in CH₂Cl₂ (50 mL). The organic phase was successively washed with aq. citric acid (10%), deionized water, sat. NaHCO₃ and deionized water (20 mL each). The combined organic phase were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using CH₂Cl₂/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, affording Ac-D(TMSE)-E(TMSE)-Bn as a colorless oil which quickly crystallized (617 mg, 77%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.03

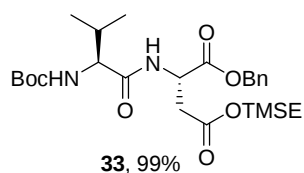
(s, 18H, 2Si(CH₃)₃), 0.93-1.02 (m, 4H, 2CH₂Si), 1.90-2.04 (m, 4H, CH₃ + CH₂Glu), 2.1-2.4 (m, 4H, CH₂GluCO + CH₂Glu), 2.57 (dd, *J* = 6.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 2.98 (dd, *J* = 4.0 and 17 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 4.11-4.21 (m, 4H, 2OCH₂), 4.52-4.62 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 4.77-4.87 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 5.15 (s, 2H, ArCH₂O), 6.78 (d, *J* = 8 Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.34 (s, 5H, 5ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.2 (6C), 17.5, 17.6, 23.6, 27.2, 30.6, 36.2, 49.4, 52.4, 63.4, 63.9, 67.6, 128.6-129.0 (3 peaks, 5C), 135.5, 170.4, 170.9, 171.4, 172.8, 173.3; *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 7:3, v/v); IR (KBr): 3290, 3092, 2955, 2899, 1733, 1643, 1557, 1456, 1425, 1385, 1352, 1304, 1250, 1179, 1164, 1060 cm⁻¹; [α]₄₃₆²¹ +5.5° (*c* 0.95, CHCl₃); MS (MALDI-TOF, positive mode, α-CHCA matrix): calcd for [C₂₈H₄₆N₂O₈Si₂Na]⁺ 617.27, found 617.63; Anal. Calcd for C₂₈H₄₆N₂O₈Si₂: C, 56.54; H, 7.79; N, 4.71. Found: C, 56.63; H, 7.65; N, 4.52.

2) Bn deprotection. Ac-D(TMSE)-E(TMSE)-Bn (608 mg, 1.03 mmol) was dissolved in AcOEt (50 mL). The solution was cooled to 0 °C and Pd/C catalyst (10%, 47 mg) was added. Then, the reaction mixture was set under an hydrogen atmosphere and stirred at room temperature for 16 h. The Pd/C catalyst was removed by filtration through a Celite[®] 545 pad, and the filtrate was concentrated under vacuum, yielding **31** as a colorless oil (515 mg, quant. yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.06 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.96-1.02 (m, 4H, 2CH₂Si), 1.96-2.10 (m, 4H, CH₃ + 0.5CH₂Glu), 2.15-2.30 (m, 1H, 0.5CH₂Glu), 2.32-2.51 (m, 2H, CH₂GluCO), 2.63 (dd, *J* = 6.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 2.98 (dd, *J* = 4.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 4.09-4.22 (m, 4H, 2OCH₂), 4.46-4.53 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 4.83-4.89 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 7.03 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Glu}); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.17 (6C), 17.5, 17.6, 23.5, 26.8, 30.9, 36.1, 49.6, 52.6, 63.5, 64.0, 171.3, 171.4, 172.7, 173.9, 174.0; IR (neat): 3308, 2954, 1733, 1656, 1536, 1389, 1250, 1173, 1063 cm⁻¹; [α]₃₆₅²¹ +32.1° (*c* 0.39, CHCl₃); *R*_f = 0.2 (100% AcOEt); MS (MALDI-TOF, positive mode, α-CHCA matrix): calcd for [C₂₁H₄₀N₂O₈Si₂Na]⁺ 527.22, found 527.58; Anal. Calcd for C₂₁H₄₀N₂O₈Si₂: C, 49.97; H, 7.99; N, 5.55. Found: C, 48.87; H, 7.84; N, 5.50; Anal. Calcd for C₂₁H₄₀N₂O₈Si₂, 0.14 CH₂Cl₂: C, 49.13; H, 7.86; N, 5.42. Found: C, 48.87; H, 7.84; N, 5.50.

H-D(TMSE)-Bn 32.

1) Side chain protection. Boc-D(TMSE)-Bn was synthesized as previously stated, see **28**.

2) Boc deprotection. Boc-D(TMSE)-Bn (2.45 g, 5.79 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (75 mL). The solution was cooled at 0 °C and TFA (8.5 mL, 115 mmol, 20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the mixture was cooled at 0 °C and a sat. solution of NaHCO_3 (120 mL) was added. The aqueous phase was extracted twice with CH_2Cl_2 (100 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (50 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording **32** as a pale yellow oil (1.59 g, 85%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.95 (t, $J = 7$ Hz, 2H, CH_2Si), 1.79 (s, 2H, NH_2), 2.70 (dd, $J = 7.0$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5 CH_2), 2.79 (dd, $J = 5.0$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5 CH_2), 3.82-3.86 (m, 1H, CH), 4.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, OCH_2), 5.16 (s, 2H, ArCH_2O), 7.35 (s, 5H, 5ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.2 (3C), 17.6, 39.3, 51.6, 63.4, 67.3, 128.6-128.9 (2 peaks, 5C), 135.8, 171.6, 174.5; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 1:1, v/v); IR (neat): 3196, 3065, 2954, 2897, 1735, 1681, 1498, 1455, 1250, 1172, 1042 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} -84.0^\circ$ (c 1.01, CHCl_3); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{Si}]^+$ 324.16, found 324.48; Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{Si}$: C, 59.41; H, 7.79; N, 4.33. Found: C, 59.34; H, 7.39; N, 4.23.

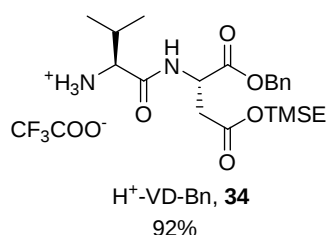
Boc-V-D(TMSE)-Bn 33.

32 (719 mg, 2.22 mmol) was dissolved in dry CH_3CN (12 mL) and **26** (487 mg, 2.24 mmol, 1.01 eq.), BOP (991 mg, 2.24 mmol, 1 eq.) and DIEA (1.16 mL, 6.66 mmol, 3 eq.) were sequentially added.

The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solvent and excess DIEA were removed under vacuum, the resulting oily residue was dissolved in CH_2Cl_2 (65 mL) and washed with a sat. solution of NaHCO_3 (30 mL). The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (35 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under

reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (95:5, v/v) as the mobile phase, affording **33** as a colorless oil (1.15 g, 99%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.83-0.93 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{Si} + 2\text{CH}_{3\text{Val}}$), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.03-2.10 (m, 1H, CHCH_3), 2.78 (dd, $J = 4.5$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH_2), 3.05 (dd, $J = 4.5$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH_2), 3.94-3.98 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Val}}$), 4.11 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H, OCH_2), 4.86-4.90 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 5.09-5.21 (m, 3H, $\text{ArCH}_2\text{O} + \text{NH}_{\text{Val}}$), 6.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.29 (s, 5H, 5ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.2 (3C), 17.6, 17.8, 19.4, 28.6 (3C), 31.7, 36.6, 48.7, 59.9, 63.9, 67.9, 80.1, 128.7-128.9 (2 peaks, 5C), 135.4, 156.0, 170.7, 171.5, 171.6; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 96:4, v/v); IR (neat): 3324, 2960, 2900, 1732, 1661, 1505, 1456, 1391, 1366, 1289, 1250, 1173, 1046 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} +27.1^\circ$ (c 0.99, CHCl_3); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7\text{SiNa}]^+$ 545.27, found 545.63; Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}$: C, 59.74; H, 8.10; N, 5.36. Found: C, 59.24; H, 8.07; N, 5.31.

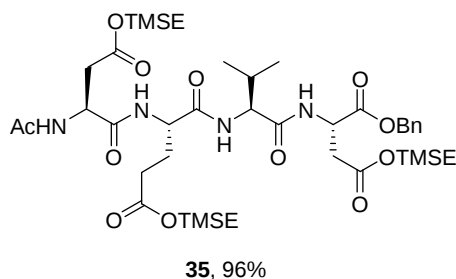
$\text{H}^+\text{-V-D(TMSE)-Bn}$ **34**.



33 (1.03 g, 1.98 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (24 mL). The solution was cooled to 0 °C and TFA (3 mL, 40 mmol, 20 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min. Then, the mixture was cooled to 0 °C and a solution of sat. NaHCO_3 (50 mL) was added. The aqueous phase was extracted twice with CH_2Cl_2 (25 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (30 mL), dried over Na_2SO_4 and filtered. TFA (175 μL , 2.38 mmol, 1.2 eq.) was added and the organic phase was concentrated under reduced pressure, affording **34** as a white solid (977 mg, 92%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.01 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.88-0.99 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{Si} + 2\text{CH}_{3\text{Val}}$), 2.13-2.19 (m, 1H, CHCH_3), 2.76 (dd, $J = 5.0$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH_2), 2.98 (dd, $J = 5.0$ and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH_2), 3.85 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Val}}$), 4.05-4.13 (m, 2H, OCH_2), 4.91-4.94 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 5.09 (ABd, $J = 12$ Hz, 1H, $0.5\text{ArCH}_2\text{O}$), 5.17 (ABd, $J = 12$ Hz, 1H, $0.5\text{ArCH}_2\text{O}$), 7.27-7.31 (m, 5H, 5ArH); 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 8.1 (s_{br} , 3H, NH_3^+); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.3 (3C), 17.4, 17.8, 18.0, 30.6, 35.9, 49.1, 59.0, 64.0, 68.1, 128.8-128.9 (2 peaks, 5C), 135.3, 168.3, 170.3, 171.7; IR (KBr): 3366, 2947, 1671, 1542, 1429, 1385, 1353, 1288, 1180, 1138, 1055 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} +38.7^\circ$ (c 0.97, CHCl_3); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}]^+$ 423.23,

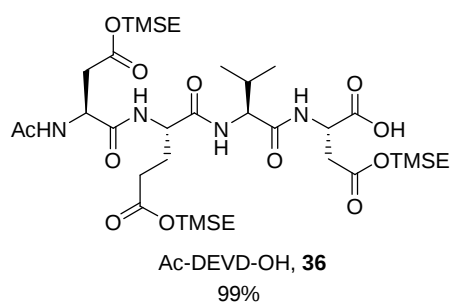
found 423.13; Anal Calcd for $C_{23}H_{35}F_3N_2O_7Si$: C, 51.48; H, 6.57; N, 5.22. Found: C, 51.51; H, 6.43; N, 5.17.

Ac-DEVD(3TMSE)-Bn 35.



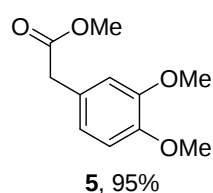
31 (175 mg, 0.35 mmol) and **34** (187 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) were dissolved in dry CH_3CN (4 mL). Then, BOP (155 mg, 0.35 mmol, 1 eq.) and DIEA (183 μ L, 1.05 mmol, 3 eq.) were added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent and excess DIEA were removed under vacuum,

then the resulting solid was dissolved in CH_2Cl_2 (15 mL) and washed with a sat. solution of $NaHCO_3$ (7 mL). The aqueous phase was extracted twice with CH_2Cl_2 (10 mL) and the combined organic phases were washed with deionized water (12 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of $CH_2Cl_2/AcOEt$ (1:1, v/v) as the mobile phase, affording **35** as a beige solid (304 mg, 96%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.01 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.02 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.82-1.01 (m, 12H, $3CH_2Si + 2CH_{3Val}$), 2.05-2.22 (m, 6H, $CHCH_3 + CH_{2Glu} + CH_3$), 2.42-2.49 (m, 2H, $CH_{2Glu}CO$), 2.70-3.15 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 4.02-4.19 (m, 6H, $3OCH_2$), 4.27-4.38 (m, 2H, $C^*H_{Val} + C^*H_{Glu}$), 4.72-4.76 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.87-4.95 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 5.11 (ABd, $J = 12$ Hz, 1H, $0.5ArCH_2O$), 5.19 (ABd, $J = 12$ Hz, 1H, $0.5ArCH_2O$), 6.91 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.07 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Val}), 7.32 (s, 5H, $5ArH$), 7.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ -1.2 (9C), 17.5-17.6 (2 peaks, 3C), 18.0, 19.5, 23.4, 26.6, 30.7, 31.1, 36.2, 36.6, 49.0, 49.9, 54.5, 58.9, 63.7, 63.9, 64.0, 67.9, 128.7-128.9 (3 peaks, 5C), 135.5, 170.9, 171.0, 171.1, 171.3, 171.4, 171.7, 172.5, 175.0; IR (KBr): 3276, 2955, 1737, 1634, 1544, 1454, 1385, 1250, 1167 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} -36.4^\circ$ (c 0.95, $CHCl_3$); $R_f = 0.5$ ($CH_2Cl_2/AcOEt$, 1:1, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[C_{42}H_{72}N_4O_{12}Si_3Na]^+$ 931.44, found 931.57; Anal Calcd for $C_{42}H_{72}N_4O_{12}Si_3$, 0.5 CH_2Cl_2 : C, 53.63; H, 7.73; N, 5.89. Found: C, 53.36; H, 7.40; N, 5.89.

Ac-DEVD(3TMSE)-OH 36.

35 (1.88 g, 2.07 mmol) was dissolved in AcOEt (40 mL). The solution was cooled to 0 °C and Pd/C catalyst (10%, 120 mg) was added. Then, the reaction mixture was set under an hydrogen atmosphere and stirred at room temperature for 16 h. The Pd/C catalyst was removed by filtration through a Celite[®] 545 pad, washed

with MeOH and the filtrate was concentrated under vacuum, yielding **36** as a gray solid (1.69 g, 99%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 0.08 (s, 27H, 3Si(CH₃)₃), 0.96-1.08 (m, 12H, 3CH₂Si + 2CH₃Val), 1.91-2.05 (m, 4H, 0.5CH₂Glu + CH₃), 2.12-2.24 (m, 2H, CHCH₃ + 0.5CH₂Glu), 2.38-2.50 (m, 2H, CH₂GluCO), 2.65-2.93 (m, 4H, 2CH₂Asp), 4.16-4.28 (m, 7H, C^{*}H_{Val} + 3OCH₂), 4.40-4.45 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 4.70-4.80 (m, 2H, 2C^{*}H_{Asp}), 7.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Val}), 8.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 8.41 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Glu}); ¹³C NMR (75.4 MHz, CD₃OD): δ - 0.6 (9C), 19.0 (3C), 19.6, 20.6, 23.4, 28.8, 32.3, 32.6, 37.8, 38.1, 51.2, 52.2, 55.0, 61.0, 64.7, 65.0, 65.2, 173.1, 173.3, 173.8, 173.9, 174.0, 174.2(0), 174.2(4), 175.7; IR (KBr): 3926, 2958, 1732, 1694, 1668, 1645, 1564, 1538, 1393, 1360, 1251, 1177, 1064 cm⁻¹; [α]_D²¹₃₆₅ +17.5° (*c* 0.94, CHCl₃); *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α-CHCA matrix): calcd for [C₃₅H₆₆N₄O₁₂Si₃Na]⁺ 841.39, found 841.57; Anal Calcd for C₃₅H₆₆N₄O₁₂Si₃, 1.2 CH₂Cl₂: C, 47.20; H, 7.48; N, 6.08. Found: C, 47.14; H, 7.22; N, 6.21.

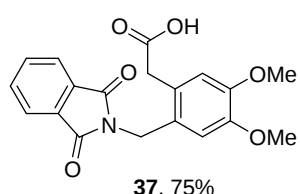
Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetate 5.

Carboxylic acid **20** (2.03 g, 12.1 mmol) was dissolved in dry CH₃CN (90 mL). Then, Me₂SO₄ (6.89 mL, 72.6 mmol, 6 eq.) and Cs₂CO₃ (23.65 g, 72.6 mmol, 6 eq.) were added and the reaction mixture was refluxed for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure, the resulting oil was

dissolved in CH₂Cl₂ (150 mL) and washed with deionized water (85 mL). The aqueous phase was extracted twice with CH₂Cl₂ (100 mL) and the combined organic phase were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (95:5, v/v) as the mobile phase, affording **5** as a yellow oil (2.42 g, 95%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.56 (s, 2H, CH₂), 3.68 (s, 3H, COOCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 6.81 (s, 3H,

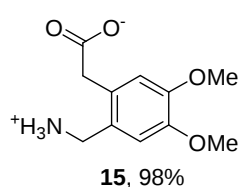
3ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 41.0, 52.4, 56.1, 56.2, 111.5, 112.6, 121.7, 126.7, 148.4, 149.1, 172.6; IR (neat): 3000, 2953, 2837, 1738, 1592, 1516, 1464, 1422, 1265, 1238, 1156, 1028 cm^{-1} ; R_f = 0.4 (100% CH_2Cl_2); Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 62.85; H, 6.71. Found: C, 62.51; H, 6.78.

2-(2-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)-4,5-dimethoxyphenyl)acetic acid **37**.



Ester **36** (1.42 g, 6.75 mmol) was dissolved in acetic acid (20 mL). Then, *N*-(hydroxymethyl)phthalimide (1.23 g, 6.94 mmol, 1.03 eq.) and H_2SO_4 (96%, 1.44 mL, 27.1 mmol, 4 eq.) were added and the solution was refluxed for 16 h. Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the resulting oil was dissolved in AcOEt (100 mL) and washed twice with brine (40 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by a filtration over a silica gel pad using a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3, v/v) as the mobile phase, affording **37** as a yellow powder (1.87 g, 75%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.99 (s, 2H, CH_2CO), 4.82 (s, 2H, CH_2N), 6.68 (s, 1H, ArH), 7.11 (s, 1H, ArH), 7.67-7.70 (m, 2H, 2ArH_{Phthal}), 7.78-7.81 (m, 2H, 2ArH_{Phthal}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 38.3, 39.2, 56.2, 56.3, 113.6, 114.3, 123.7 (2C), 125.0, 127.9, 132.3 (2C), 134.4 (2C), 148.7, 149.0, 168.7 (2C), 178.0; IR (KBr): 2939, 1770, 1714, 1610, 1521, 1467, 1394, 1334, 1265, 1225, 1110 cm^{-1} ; R_f = 0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NNaO}_6]^+$ 378.10, found 378.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_6$: C, 64.22; H, 4.82; N, 3.94. Found: C, 64.23; H, 4.79; N, 3.98.

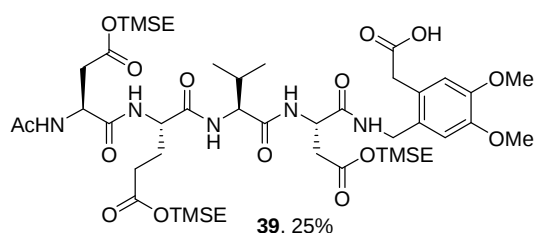
2-(2-(aminomethyl)-4,5-dimethoxyphenyl)acetic acid, inner salt **15**.



Acid **37** (165 mg, 0.46 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (5 mL, 1:1, v/v). Hydrazine monohydrate (68 μL , 1.39 mmol, 3 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature, allowing the formation of a white precipitate. The consumption of the reagent was followed by RP-HPLC (system A) and the reaction was stopped after 16 h. Then, the solution was concentrated and purified by flash-chromatography on a RP-C₁₈ silica gel column with a stepwise gradient of CH_3CN (0% to 3%) in aq. TFA as the mobile phase, to give after lyophilization **15** as a white powder (102 mg, 98%). ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 3.78 (s, 2H,

CH₂CO), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.14 (s, 2H, CH₂N), 6.97 (s, 1H, ArH), 7.07 (s, 1H, ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O): δ 37.8, 40.5, 56.0, 56.1, 113.8, 114.7, 124.5, 127.0, 148.0, 149.0, 176.8; IR (KBr): 3067, 1704, 1613, 1525, 1272, 1230, 1185, 1138 cm⁻¹; MS (ESI, positive mode): calcd for [C₁₃H₂₄NO₂]⁺ 226.18, found 226.00; HPLC (system A): t_R = 15.9 min (purity: 95%).

Synthesis of acid **39**.

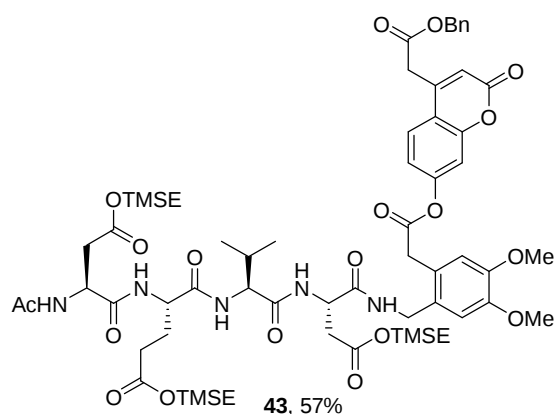


Peptide **36** (102 mg, 0.13 mmol) was dissolved in a mixture of dry CH₃CN (1.5 mL) and DIEA (23 μL, 0.13 mmol, 1 eq.). Peptide coupling reagent *N,N,N',N'*-Tetramethyl-O-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate (TSTU, 39 mg, 0.13 mmol, 1 eq.)

was added and the resulting reaction mixture was stirred for 30 min. Then, a solution containing **15** (35 mg, 0.14 mmol, 1.1 eq.), DIEA (50 μL, 0.29 mmol, 2.2 eq.) in a mixture of dry CH₃CN (1 mL) and DMF (500 μL) was added to this crude solution of active ester (i.e., *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester), allowing the solution to become yellow. The reaction was monitored by RP-HPLC and an analysis after 1 h showed the total consumption of the starting material. The reaction mixture was concentrated under vacuum, and CH₂Cl₂ (10 mL) was added. The resulting solution was washed with aq. citric acid (10%, w/v, 4 mL) and the aqueous phase was extracted twice with CH₂Cl₂ (5 mL each). The combined organic phases were washed with deionized water (6 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/MeOH (97:3, v/v) as the mobile phase, affording **39** as a single diastereomer and a pale yellow solid (33 mg, 25%). An optimization of the reaction conditions (reaction performed in dry DMF) led to a yield of 72% but with a mixture (1/1 ratio) of two epimers according to the RP-HPLC analysis. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 27H, 3Si(CH₃)₃), 0.77 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃Val), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃Val), 0.90-1.02 (m, 6H, 3CH₂Si), 1.79-1.85 (m, 2H, CH₂Glu), 2.03 (s, 3H, CH₃); 2.12-2.20 (m, 1H, CHCH₃), 2.38 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂GluCO), 2.59-2.72 (m, 2H, CH₂Asp), 2.93 (dd, *J* = 5.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 3.15 (dd, *J* = 5.0 and 17.0 Hz, 1H, 0.5CH₂Asp), 3.61 (q, *J* = 10.0 Hz, 2H, CH₂COOH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.10-4.22 (m, 7H, C^{*}H_{Val} + 3OCH₂), 4.35-4.45 (m, 3H, CH₂N + C^{*}H_{Glu}), 4.78-4.90 (m, 2H, 2C^{*}H_{Asp}), 6.69 (s, 1H, ArH),

6.80 (s, 1H, ArH), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.20 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH_{Val}), 7.63 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, CH_2NH), 8.41 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ - 1.2 (9C), 17.5 (3C), 18.0, 19.5, 23.4, 26.7, 30.2, 30.7, 35.8, 36.2, 38.1, 41.6, 49.7, 49.8, 53.5, 56.2, 56.3, 59.9, 63.6(5), 63.7, 64.0, 113.0, 113.9, 124.8, 129.4, 148.4, 148.6, 170.1, 171.3(6), 171.4, 171.6, 172.2, 172.4, 172.5, 174.8, 175.2; IR (KBr): 3299, 2955, 1732, 1645, 1520, 1251, 1218, 1173 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} -13.8^\circ$ (c 0.47, $CHCl_3$); $R_f = 0.5$ ($CH_2Cl_2/MeOH$, 95:5, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[C_{46}H_{79}KN_5O_{15}Si_3]^+$ 1064.45, found 1064.45; HPLC (system B): $t_R = 30.0$ min (purity > 97%); Anal Calcd for $C_{46}H_{79}N_5O_{15}Si_3$: C, 53.83; H, 7.76; N, 6.82. Found: C, 53.95; H, 7.58; N, 6.81.

Synthesis of peptide 43.

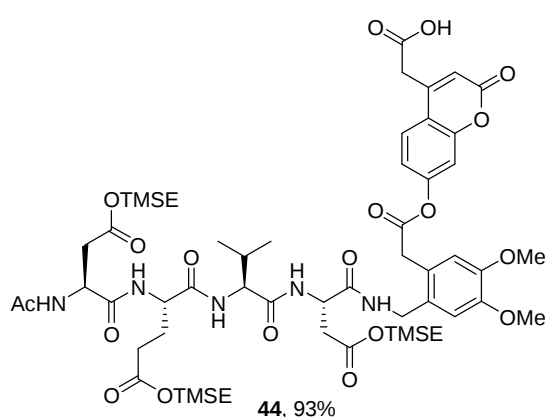


Acid **39** (30 mg, 0.029 mmol) and coumarin **8** (11 mg, 0.035 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in dry CH_3CN . BOP (14 mg, 0.032, 1.1 eq.) and TEA (14 μ L, 0.103 mmol, 3.5 eq.) were added, leading to the formation of a white precipitate. Dry CH_2Cl_2 (1.5 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. Thereafter, the reaction mixture was

concentrated under reduced pressure and purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of $CH_2Cl_2/AcOEt$ (3:7, v/v) as the mobile phase, affording **43** as a pale yellow solid (22 mg, 57%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.00 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.02 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.06 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, $2CH_{3Val}$), 0.90-1.02 (m, 6H, $3CH_2Si$), 1.82-2.04 (m, 5H, $CH_3 + CH_{2Glu}$), 2.15-2.22 (m, 1H, $CHCH_3$), 2.38-2.51 (m, 2H, $CH_{2Glu}CO$), 2.70-2.85 (m, 2H, CH_{2Asp}), 3.01 (dd, $J = 5.0$ and 9.0 Hz, 1H, $0.5CH_{2Asp}$), 3.07 (dd, $J = 5.0$ and 9.0 Hz, 1H, $0.5CH_{2Asp}$), 3.79 (s, 2H, CH_2COOBn), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 2H, $ArCH_2CO$), 3.95-3.99 (m, 1H, C^*H_{Val}), 4.05-4.21 (m, 7H, $3OCH_2 + C^*H_{Glu}$), 4.35 (dd, $J = 4.9$ and 14.7 Hz, 2H, CH_2N), 4.51-4.82 (m, 2H, $2C^*H_{Asp}$), 5.15 (s, 2H, $ArCH_2O$), 6.35 (s, 1H, ArH_{Coum}), 6.80 (s, 1H, ArH), 6.91 (s, 1H, ArH), 6.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.03 (dd, $J = 2.3$ and 8.7 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.15 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.25-7.35 (m, 7H, $5ArH + NH_{Asp} + NH_{Val}$), 7.42 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, CH_2NH), 7.52 (d, $J = 8.7$

Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ -1.2 (9C), 17.5 (3C), 18.7, 19.7, 23.2, 25.7, 29.1, 31.1, 35.9 (2C), 38.2, 38.4, 41.3, 49.7, 50.2, 54.9, 56.3, 56.4, 60.3, 63.7, 63.9, 64.1, 67.9, 111.0, 113.1, 113.9, 116.9, 118.7, 123.4, 125.9, 128.8-129.0 (2 peaks, 5C), 129.8, 135.2, 147.9, 148.5, 148.8, 153.6, 154.6, 160.3, 168.7, 170.5, 171.3, 171.5, 171.7, 172.0, 172.1, 172.2, 172.3, 172.4, 175.4; IR (KBr): 3436, 3292, 2956, 1730, 1639, 1548, 1330, 1391, 1263, 1172, 1131 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21}$ -41.7° (c 0.26, $CHCl_3$); $R_f = 0.5$ (CH_2Cl_2 /AcOEt, 3:7, v/v); MS (MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[C_{64}H_{91}N_5NaO_{19}Si_3]^+$ 1340.55, found 1340.55; HPLC (system B): $t_R = 33.9$ min (purity > 96%).

Synthesis of carboxylic acid **44**.



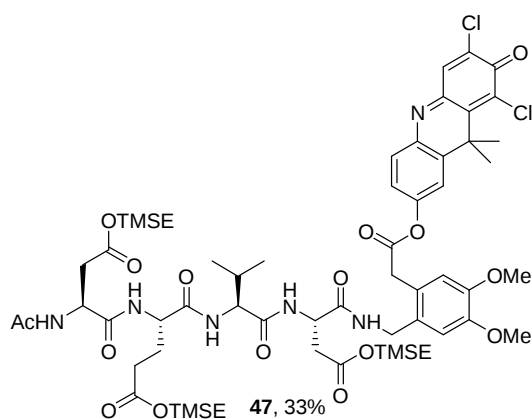
Benzyl ester **43** (18 mg, 0.014 mmol) was dissolved in a mixture of CH_2Cl_2 (1 mL) and AcOEt (500 μ L). The solution was cooled to 0 °C and Pd/C catalyst (10%, 7 mg) was added. Then, the reaction mixture was set under an hydrogen atmosphere and stirred at room temperature for 4 h. The Pd/C catalyst was removed by filtration through a Celite® 545 pad, washed with CH_2Cl_2

and the filtrate was concentrated under vacuum, yielding **44** as a yellow solid (16 mg, 93%).

1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 0.01 (s, 27H, 3Si(CH_3)₃), 0.80-0.94 (m, 12H, 3 CH_2 Si + 2 CH_3 _{Val}), 1.80-2.06 (m, 6H, $CHCH_3$ + CH_3 + CH_2 _{Glu}), 2.18-2.32 (m, 2H, CH_2 _{Glu}CO), 2.40-2.85 (m, 4H, 2 CH_2 _{Asp}), 3.76 (s, 6H, 2OCH₃), 3.90-4.15 (m, 11H, CH_2 COOH + $ArCH_2$ CO + 3OCH₂ + C* H_{Val}), 4.17-4.40 (m, 3H, CH_2 N + C* H_{Glu}), 4.55-4.73 (m, 2H, 2C* H_{Asp}), 6.42 (s, 1H, ArH_{Coum}), 6.94 (s, 2H, 2ArH), 7.22 (dd, $J = 1.9$ and 8.7 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.30 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.81-7.85 (m, 2H, ArH_{Coum} + NH_{Val}), 8.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 8.24-8.32 (m, 2H, CH_2NH + NH_{Asp}), 8.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $DMSO-d_6$): δ -0.6 (9C), 17.7 (3C), 19.2, 19.9, 23.4, 27.8, 30.9, 36.9 (2C), 38.0 (2C), 42.6, 50.3, 50.5, 52.7, 56.4, 56.6, 59.6, 62.8, 63.0, 63.1, 111.0, 113.3, 113.8, 114.7, 115.5, 118.9, 124.4, 127.4, 131.0, 148.4, 148.8, 153.9, 154.0, 154.5, 160.5, 170.5, 170.7(7), 170.8(1), 171.1, 171.2, 171.5, 171.8, 172.2, 172.5, 172.8, 173.4; IR (KBr): 3438, 3301, 2935, 2365, 1736, 1638, 1560, 1542, 1263, 1173, 1104 cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21}$ -22.0° (c 0.20, $CHCl_3$); MS

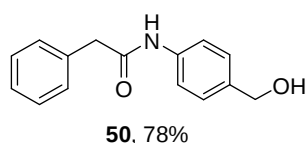
(MALDI-TOF, positive mode, α -CHCA matrix): calcd for $[\text{C}_{57}\text{H}_{85}\text{KN}_5\text{O}_{19}\text{Si}_3]^+$ 1266.48, found 1266.29; HPLC (system B): $t_R = 30.7$ min (purity > 90%).

Synthesis of protected probe **47**.

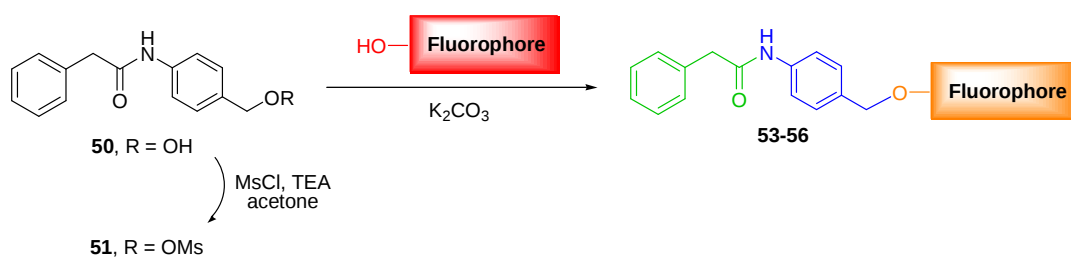


Carboxylic acid **39** (77 mg, 0.075 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1 mL). DDAO **46** (35 mg, 0.113 mmol, 1.5 eq.) in solution in CH_2Cl_2 (1.5 mL), BOP (43 mg, 0.098 mmol, 1.3 eq.) and TEA (37 μL , 0.264 mmol, 3.5 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the reaction mixture was concentrated and purified by chromatography

on a silica gel column using a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (3:7, v/v) as the mobile phase, affording **47** as an orange solid (33 mg, 33%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.00 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.80-1.00 (m, 12H, $3\text{CH}_2\text{Si} + 2\text{CH}_3\text{Val}$), 1.53 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{DDAO}$), 1.80-2.05 (m, 5H, $\text{CH}_3 + \text{CH}_2\text{Glu}$), 2.10-2.25 (m, 1H, CHCH_3), 2.28-2.48 (m, 2H, CH_2GluCO), 2.62-3.05 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{Asp}$), 3.80-3.92 (m, 9H, $\text{ArCH}_2\text{CO} + 2\text{OCH}_3 + \text{C}^*\text{H}_{\text{Glu}}$), 4.02-4.20 (m, 7H, $3\text{OCH}_2 + \text{C}^*\text{H}_{\text{Val}}$), 4.30-4.65 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{N} + \text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 4.80-4.93 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 6.80 (s, 1H, ArH), 6.85-6.94 (m, 3H, $2\text{ArH}_{\text{DDAO}} + \text{ArH}$), 7.07-7.18 (m, 2H, $\text{NH}_{\text{Val}} + \text{NH}_{\text{Asp}}$), 7.22-7.34 (m, 4H, $2\text{ArH}_{\text{DDAO}} + \text{NH}_{\text{Asp}} + \text{CH}_2\text{NH}$), 8.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.2 (9C), 17.5 (3C), 18.5, 19.6, 23.1, 25.4, 29.3, 31.1, 31.8, 32.0, 36.0, 36.7, 38.2, 41.6, 49.7, 50.1, 54.3, 56.2(8), 56.3(2), 60.5, 63.6, 63.8, 64.0, 72.3, 113.4, 113.6, 113.9, 118.2, 119.8, 122.5, 124.5, 129.3, 129.5, 148.3, 148.4, 148.5, 148.7, 150.2, 150.9, 151.0, 151.8, 170.3, 171.1, 171.3, 171.4, 171.5, 172.0, 172.3, 172.4, 175.1, 175.7; IR (KBr): 3286, 2959, 1737, 1634, 1522, 1250, 1175 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 3:7, v/v); HPLC (system B): $t_R = 42.1$ min (purity: 92%).

N-(4-(Hydroxymethyl)phenyl)-2-phenylacetamide 50.

p-aminobenzyl alcohol (PABA) **49** (322 mg, 2.61 mmol) was dissolved in a mixture of dry CH₂Cl₂/DMF (8:1, v/v, 9 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Dry pyridine (430 μL, 5.4 mmol, 2.1 eq.) and phenylacetyl chloride **48** (340 μL, 2.57 mmol) were sequentially added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Thereafter, the mixture was concentrated under reduced pressure, then CH₂Cl₂ (50 mL) was added and the organic phase was washed with aq. citric acid (10%, w/v, 30 mL) and deionized water (30 mL). The aqueous phase was extracted twice with CH₂Cl₂ (30 mL), the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The resulting residue was purified by chromatography on a silica gel column with a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, affording phenylacetamide **50** as a white solid (481 mg, 78%). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 3.69 (s, 2H, ArCH₂), 4.57 (s, 2H, CH₂OH), 7.30-7.37 (m, 7H, 2ArH_{PABA} + 5ArH), 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2ArH_{PABA}); ¹³C NMR (75.4 MHz, CD₃OD): δ 44.7, 64.8, 121.2 (2C), 127.9 (2C), 128.6 (2C), 129.6, 130.1 (2C), 136.8, 138.6, 139.0, 172.3; *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 7:3, v/v); IR (KBr): 3304, 3202, 3131, 1660, 1606, 1534, 1518, 1411, 1335, 1260, 1141, 1051 cm⁻¹; MS (ESI, positive mode): calcd for [C₁₅H₁₆NO₂]⁺ 242.12, found 242.27.

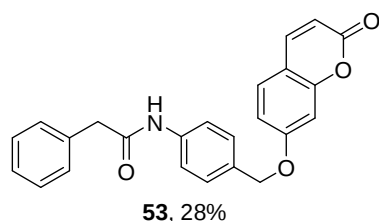
General procedure for the synthesis of the PGA fluorogenic probes 53-56.

1) Preparation of the methylsulfonate ester 51. Alcohol **50** (443 mg, 1.84 mmol) was dissolved in dry acetone (23 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. TEA (770 μL, 5.5 mmol, 3 eq.) and mesyl chloride (425 μL, 5.5 mmol, 3 eq.) were sequentially added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Thereafter, CH₂Cl₂ (20 mL) was added and the solution was poured onto a cold 2.0 N aq. HCl solution (15 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (30 mL), the combined organic phases were washed

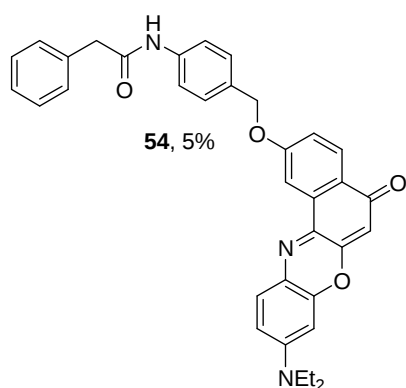
with deionized water (30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, yielding mesylate ester **51** as a white solid. The crude product was quite unstable and had to be used without purification in the next coupling step. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.62 (s, 3H, CH_3), 3.69 (s, 2H, ArCH_2), 4.49 (s, 2H, CH_2OH), 7.22-7.40 (m, 9H, 9 ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 44.7, 46.2, 52.8, 120.5 (2C), 127.8 (2C), 129.4 (2C), 129.6, 129.7 (2C), 133.8, 134.6, 138.0, 170.2.

2) Coupling reaction of 51 with the fluorescent phenol label. The phenol-based fluorophore was dissolved in dry CH_2Cl_2 (for 7-hydroxycoumarin **52**, 0.1 M final concentration) or in dry DMF (for 2-hydroxy Nile Red **157**, DDAO **46** and DAO **46'**, 0.1 M final concentration). Anhydrous K_2CO_3 (2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min. Then, mesylate **51** (1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B), and concentrated under reduced pressure. CH_2Cl_2 (10 mL) was added and the organic phase was washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system C1 for **53**, system D1 for **54**, **55** and **56**) to give after lyophilization the corresponding PGA probes **53-56** in a pure form.

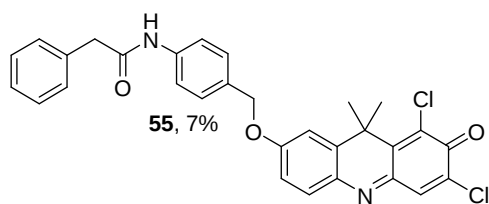
***N*-(4-((2-oxo-2H-chromen-7-yloxy)methyl)phenyl)-2-phenylacetamide 53.**



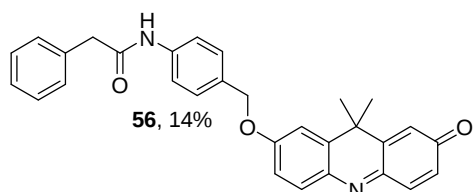
White amorphous powder, overall yield 28%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.66 (s, 2H, ArCH_2CO), 4.96 (s, 2H, CH_2O), 6.15 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{ArH}_{\text{Coulm}}$), 6.74-6.81 (m, 2H, 2 $\text{ArH}_{\text{Coulm}}$), 7.15-7.31 (m, 8H, 5 ArH + 2 ArH_{PABA} + $\text{ArH}_{\text{Coulm}}$), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, 2 ArH_{PABA}), 7.54 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $\text{ArH}_{\text{Coulm}}$); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 45.1, 70.4, 102.2, 113.5, 113.6, 120.3 (2C), 128.0, 128.7 (2C), 129.1, 129.6 (2C), 129.8 (2C), 132.0, 134.7, 138.1, 143.8, 156.0, 161.6, 162.1, 169.6; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 1:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{NO}_4]^+$ 386.33, found 386.14; HPLC (system B): $t_R = 29.4$ min (purity > 95%); UV (CH_3CN , 25 °C): $\lambda_{\text{max}} = 275$ nm.

***N*-(4-((9-(diethylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)methyl)phenyl)-2-****phenylacetamide 54.**

Red amorphous powder, overall yield 5%. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.20 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz, 2CH_3), 3.55 (q, 4H, $J = 7.0$ Hz, $2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.68 (s, 2H, ArCH_2CO), 5.29 (s, 2H, CH_2O), 6.25 (s, 1H, ArH), 6.72 (s, 1H, ArH), 6.84-6.90 (m, 1H, ArH), 7.20-7.42 (m, 6H, 6ArH), 7.50 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, 2ArH), 7.62-7.80 (m, 3H, 3ArH), 8.05-8.12 (m, 2H, ArH); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4]^+$ 558.27, found 558.24; HPLC (system B): $t_R = 31.7$ min (purity: 90%); UV-vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): $\lambda_{\text{max}} = 543$ nm.

***N*-(4-((6,8-dichloro-9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yloxy)methyl)phenyl)-2-****phenylacetamide 55.**

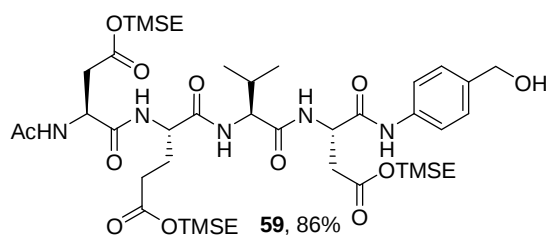
Orange amorphous powder, overall yield 7%. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.78 (s, 3H, CH_3), 1.85 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 2H, ArCH_2CO), 5.04 (s, 2H, CH_2O), 6.66-6.69 (m, 1H, ArH_{DDAO}), 7.13 (s, 1H, ArH_{DDAO}), 7.30-7.51 (m, 10H, $5\text{ArH} + 4\text{ArH}_{\text{PABA}} + \text{ArH}_{\text{DDAO}}$), 7.63 (s, 1H, ArH_{DDAO}), 7.75 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 29.1, 38.4, 45.2, 75.0, 114.1, 114.3, 120.0, 120.3, 128.1, 128.8, 128.9, 129.1, 129.6(6), 129.7, 129.9, 130.6, 132.5, 132.9, 133.7, 134.6, 138.3, 139.8, 140.4, 141.0, 141.3, 148.7, 153.0, 153.5, 169.5, 187.7; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 3:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{NaN}_2\text{O}_3]^+$ 553.33, found 553.11; HPLC (system B): $t_R = 36.8$ min (purity: 94%); UV-vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): $\lambda_{\text{max}} = 424$ nm ($15\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

***N*-(4-((9,9-dimethyl-7-oxo-7,9-dihydroacridin-2-yloxy)methyl)phenyl)-2-phenylacetamide 56.**

Orange amorphous powder, overall yield 14%. ^1H NMR (300 MHz, $\text{acetone}-d_6$): δ 1.57 (s, 6H, 2CH_3), 3.70 (s, 2H, ArCH_2CO), 5.20 (s, 2H, CH_2O), 6.55 (dd, $J = 2.0$ and 10.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 6.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.07 (dd, $J = 3.0$ and 9.0 Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.22-7.48 (m, 9H, $5\text{ArH} + 2\text{ArH}_{\text{PABA}} + 2\text{ArH}_{\text{DAO}}$), 7.60 (d, $J = 9.0$

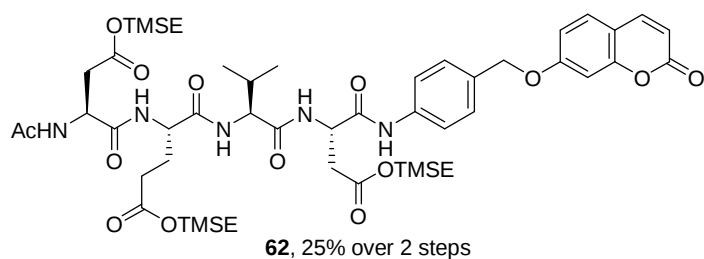
Hz, 1H, ArH_{DAO}), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2ArH_{PABA}$); ^{13}C NMR (75.4 MHz, acetone- d_6): δ 32.2 (2C), 37.7, 44.3, 70.3, 113.4, 114.4, 119.6 (2C), 127.1, 127.6, 128.8 (2C), 129.1 (2C), 129.7 (2C), 131.3, 132.1, 134.0, 136.4, 137.2, 139.9, 140.2, 142.0, 148.1, 150.8, 161.7, 169.4, 186.8; MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{30}H_{27}N_2O_3]^+$ 463.13, found 463.20; HPLC (system B): $t_R = 31.6$ min (purity: 95%); UV-vis (PB/acetone, 8:2, v/v, 25 °C): $\lambda_{max} = 458$ nm ($17\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$).

Ac-DEVD(3TMSE)-PABA-OH **59**.



Peptide **36** (598 mg, 0.73 mmol) was dissolved in dry DMF (7 mL) and cooled to 0 °C. Then, PABA **49** (90 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) and *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 154 mg, 0.80 mmol, 1.1

eq.) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solvent was removed under vacuum, the resulting solid was dissolved in CH_2Cl_2 (40 mL), washed with aq. citric acid (10%, 15 mL) and deionized water (20 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH_2Cl_2 /AcOEt (3:7, v/v) as the mobile phase, yielding **59** and **60** as a mixture of diastereomers (9/1 ratio) which were separated in the next step (yellow solid, 580 mg, 86%). For analytical purpose, the mixture was purified by semi-preparative RP-HPLC (system J). 1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 0.07 (s, 27H, $3Si(CH_3)_3$), 0.99-1.04 (m, 12H, $3CH_2Si + 2CH_3Val$), 1.95-2.10 (m, 4H, $0.5CH_2Glu + CH_3$), 2.10-2.18 (m, 2H, $CHCH_3 + 0.5CH_2Glu$), 2.41-2.48 (m, 2H, CH_2GluCO), 2.7-3.1 (m, 4H, $2CH_2Asp$), 4.05-4.25 (m, 7H, $C^*H_{Val} + 3OCH_2$), 4.36-4.42 (m, 1H, C^*H_{Glu}), 4.58 (s, 2H, $ArCH_2O$), 4.70-4.76 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.80-4.95 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2ArH$), 7.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2ArH$), 7.94 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, NH_{Val}), 8.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 8.42-8.47 (m, 2H, $NH_{Glu} + NH_{Asp}$), 9.48 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CD_3OD): δ -0.6 (9C), 19.1 (3C), 20.0, 20.5, 23.4, 28.4, 32.1, 32.3, 37.7, 37.9, 52.3, 53.1, 55.7, 62.2, 64.8, 65.1, 65.3, 65.7, 122.2 (2C), 129.4 (2C), 139.3, 139.7, 171.4, 173.0, 173.4, 174.2(6), 174.3(4), 174.4, 175.2, 175.7; IR (KBr): 3286, 2957, 1738, 1634, 1539, 1251, 1172, cm^{-1} ; $[\alpha]_{365}^{21} -125.5^\circ$ (c 1.1, $CHCl_3$); $R_f = 0.5$ (CH_2Cl_2 /AcOEt, 3:7, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{42}H_{73}N_5O_{12}Si_3Na]^+$ 946.45, found 946.40.

Fully-protected caspase-3 latent blue fluorophore 62.**1) Preparation of the methylsulfonate ester 61.**

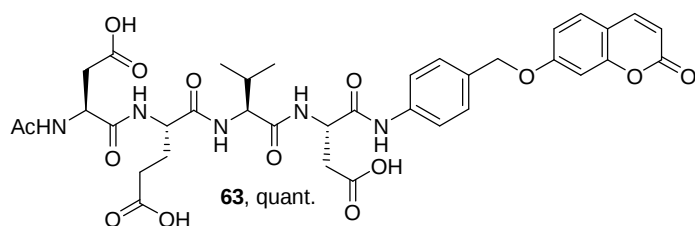
Benzyl alcohol **59** (152 mg, 0.16 mmol) was dissolved in dry acetone (2 mL) and the resulting solution was cooled to 0 °C. Then, TEA (67 µL, 0.48 mmol, 3 eq.) and mesyl chloride

(37 µL, 0.48 mmol, 3 eq.) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. Thereafter, the reaction was diluted with CH₂Cl₂ (5 mL) and poured onto a cold 2.0 N aq. HCl solution (5 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 10 mL). The combined organic phases were washed with deionized water (10 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness, affording the mesylate ester **61** as a yellow solid. The crude product was used without purification in the next step.

2) Introduction of fluorophore 52. 7-Hydroxycoumarin **52** (29 mg, 0.18 mmol, 1.1 eq. based on the former step) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (2 mL). Anhydrous K₂CO₃ (44 mg, 0.32 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was stirred for 20 min, allowing the solution to become yellow colored. Then, the crude mesylate ester **61** in solution in dry CH₂Cl₂ (2 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Thereafter, CH₂Cl₂ (10 mL) was added and the resulting solution was washed with deionized water (10 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system C2), to give after lyophilization the corresponding full-protected caspase-3 pro-fluorophore **62** as a white amorphous powder (32 mg, 25% over 2 steps). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.03 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.05 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.96-1.02 (m, 12H, 3CH₂Si + 2CH₃Val), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.10-2.20 (m, 2H, CH₂Glu), 2.32-2.39 (m, 1H, CHCH₃), 2.51-2.62 (m, 2H, CH₂GluCO), 2.85-3.12 (m, 4H, 2CH₂Asp), 4.02-4.28 (m, 8H, C^{*}H_{Val} + C^{*}H_{Glu} + 3OCH₂), 4.67-4.73 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 4.95-5.12 (m, 3H, ArCH₂O + C^{*}H_{Asp}), 6.24 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 6.84-6.92 (m, 2H, 2ArH_{Coum}), 7.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, NH_{Val}), 7.34-7.37 (m, 3H, 2ArH_{PABA} + ArH_{Coum}), 7.58-7.64 (m, 2H, ArH_{Coum} + NH_{Asp}), 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ArH_{PABA}), 8.47 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, NH_{Glu}), 8.67 (s, 1H, NH_{PABA}); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.2 (9C), 17.6 (3C), 18.1, 19.6, 23.3, 25.3, 29.3, 31.6, 36.0, 36.8, 50.3, 51.1, 56.9, 60.7, 63.6, 64.3, 64.4,

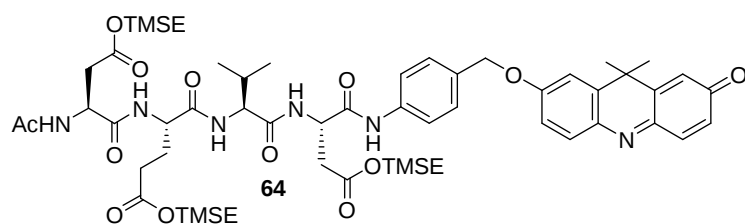
70.6, 102.3, 113.0, 113.5, 113.6, 120.6 (2C), 128.6 (2C), 129.0, 131.5, 138.7, 143.8, 156.1, 161.6, 162.2, 169.0, 171.3, 171.4, 171.9, 172.5, 172.8, 172.9, 176.0; MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{51}H_{78}N_5O_{14}Si_3]^+$ 1068.40, found 1068.49; HPLC (system A): t_R = 42.0 min (purity > 98%).

Caspase-3 latent blue fluorophore **63**.



Fully-protected pro-fluorophore **62** (12 mg, 11.2 μ mol) was dissolved in dry NMP and anhydrous CsF salt (31 mg, 210 μ mol) was added. The resulting reaction mixture was stirred

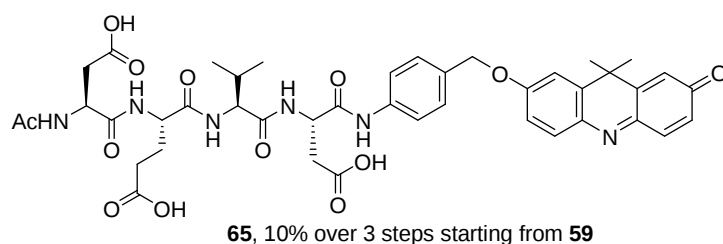
at room temperature and checked for completion by RP-HPLC (system A). Further amounts of CsF (80 eq. and 100 eq.) were added after 16 h and 30 h. Full-protected peptide starting material **62** and partially deprotected intermediates were completely consumed after 40 h. The reaction mixture was quenched by dilution with 0.1% aq. TFA (3 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC (system E). The product-containing fractions were lyophilized to give the caspase-3 pro-fluorophore **63** as a pale yellow amorphous powder (8.0 mg, quant. yield). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 0.84-0.89 (m, 6H, $2CH_{3Val}$), 1.70-2.10 (m, 6H, $CHCH_3 + CH_{2Glu} + CH_3$), 2.25-2.31 (m, 2H, $CH_{2Glu}CO$), 2.52-2.80 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 4.15-4.21 (m, 1H, C^*H_{Val}), 4.35-4.41 (m, 1H, C^*H_{Glu}), 4.50-4.54 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.67-4.73 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 5.18 (s, 2H, $ArCH_2O$), 6.33 (d, J = 9.4 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.03 (d, J = 8.7 Hz, 1H, ArH_{Coum}), 7.11 (s, 1H, ArH_{Coum}), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 2H, $2ArH_{PABA}$), 7.66 (m, 3H, $ArH_{Coum} + 2ArH_{PABA}$), 7.85 (d, J = 7.5 Hz, 1H, NH_{Val}), 8.01-8.15 (m, 3H, $ArH_{Coum} + NH_{Glu} + NH_{Asp}$), 8.42 (d, J = 6.8 Hz, 1H, NH_{Asp}), 10.00 (s, 1H, NH_{PABA}), 12.2-12.5 (s_{br} , 3H, $3COOH$); IR (KBr): 3278, 2971, 2883, 1742, 1686, 1664, 1618, 1542, 1490, 1384, 1197, 1140 cm^{-1} ; MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{36}H_{42}N_5O_{14}]^+$ 768.20, found 768.27; HPLC (system A): t_R = 23.6 min (purity: 95%); UV (caspase-3 buffer, 37 $^{\circ}C$): λ_{max} = 250 and 320 nm (20 700 and 17 000 $M^{-1} cm^{-1}$).

Fully-protected caspase-3 latent far-red fluorophore 64.

DAO **46** (10 mg, 42 μmol , 1.2 eq.) was dissolved in dry DMF (800 μL). Anhydrous K_2CO_3 (12 mg, 84 μmol , 2 eq.) was added and the resulting reaction mixture

was stirred at room temperature for 20 min, allowing the solution to become blue colored. Then, mesylate ester **61** (35 mg, 35 μmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system B). Thereafter, CH_2Cl_2 (15 mL) was added and the organic phase was washed with deionized water (7 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system D1), to give after lyophilization the corresponding fully-protected caspase-3 pro-fluorophore **64** as an orange amorphous powder (4 mg, 13%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.78-1.02 (m, 12H, $3\text{CH}_2\text{Si} + 2\text{CH}_3\text{Val}$), 1.19 (s, 3H, CH_3DAO), 1.25 (s, 3H, CH_3DAO), 1.95-2.20 (m, 5H, $\text{CH}_2\text{Glu} + \text{CH}_3$), 2.25-2.39 (m, 1H, CHCH_3), 2.45-2.62 (m, 2H, CH_2GluCO), 2.80-3.12 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{Asp}$), 3.95-4.22 (m, 8H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Val}} + \text{C}^*\text{H}_{\text{Glu}} + 3\text{OCH}_2$), 4.65-4.72 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 4.95-5.09 (m, 3H, $\text{ArCH}_2\text{O} + \text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 6.58-6.66 (m, 3H, 3ArH_{DAO}), 6.93-6.97 (m, 1H, ArH_{DAO}), 7.08-7.12 (m, 2H, $\text{NH}_{\text{Val}} + \text{NH}_{\text{Asp}}$), 7.35-7.41 (m, 3H, $\text{ArH}_{\text{DAO}} + 2\text{ArH}_{\text{PABA}}$), 7.58-7.63 (m, 2H, $\text{NH}_{\text{Asp}} + \text{ArH}_{\text{DAO}}$), 7.77-7.80 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $2\text{ArH}_{\text{PABA}}$), 8.47 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, NH_{Glu}), 8.67 (s, 1H, NH_{PABA}); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{57}\text{H}_{85}\text{N}_6\text{O}_{13}\text{Si}_3]^+$ 1145.33, found 1145.55; HPLC (system A): $t_R = 39.5$ min (purity: 90%); UV (caspase-3 buffer, 37 $^\circ\text{C}$): $\lambda_{\text{max}} = 250$ and 455 nm (9 400 and 6 500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

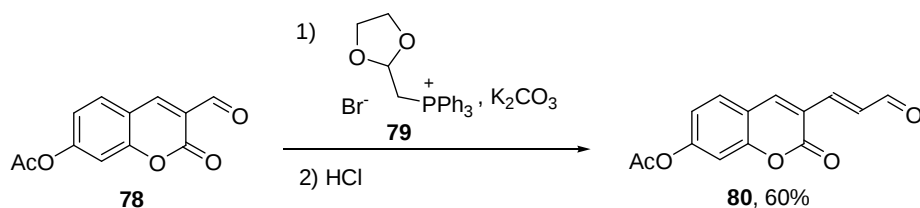
Caspase-3 latent far-red fluorophore 65.



Full-protected peptide **64** (3.0 mg, 2.6 μ mol) was dissolved in dry NMP. A large excess of anhydrous CsF salt (79.0 mg, 520 μ mol) was added and the deprotection

reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A). The reaction mixture was quenched by dilution with 0.1% aq. TFA (3 mL) and purified by semi-preparative RP-HPLC (system F). The product-containing fractions were lyophilized to give the caspase-3 pro-fluorophore **65** as an orange amorphous powder. This fluorogenic caspase-3 substrate was water-solubilized through its conversion into the tris-NH₄⁺ salt by brief treatment with 5 μL of 3% aq. NH₄OH followed by lyophilization. Quantification was achieved in caspase-3 buffer at $\lambda_{\text{max}} = 457 \text{ nm}$ using the ϵ value $6\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ found for **64**. MS (ESI, negative mode): calcd for [C₄₂H₄₇N₆O₁₃][−] 843.33, found 843.32; HPLC (system A): $t_{\text{R}} = 25.8 \text{ min}$ (purity: 91%).

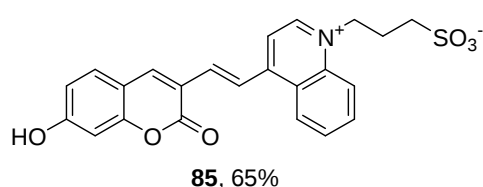
(E)-7-Acetoxy-3-cinnamylcoumarin 80.



7-Acetoxy-3-formylcoumarin **78** (30 mg, 0.13 mmol) and commercial phosphonium salt (1,3-dioxolan-2-yl-methyl)-triphenylphosphonium bromide **79** (61 mg, 0.14 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (1.5 mL). Crown ether 18-[C]-6 (3 mg, 0.013 mmol, 0.1 eq.) and anhydrous K₂CO₃ (19 mg, 1.1 eq.) were added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. From colorless, the solution slowly became green, and finally, brown. Deionized water and CH₂Cl₂ (10 mL) were added, the phases were separated and the organic phase was stirred in aq. HCl (10%, 5 mL) for 12 h. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column with a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (9/1, v/v) as the

mobile phase, affording **80** as a yellow solid (20 mg, 60%). ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 2.37 (s, 3H, CH_3CO), 7.18-7.29 (m, 3H, 3ArH), 7.65 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, ArH), 7.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 8.52 (s, 1H, ArH), 9.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CHO); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 21.4, 110.6, 116.8, 119.4, 121.7, 130.0, 132.5, 143.0, 145.0, 154.7, 154.8, 168.7, 193.9; IR (KBr): 1769, 1732, 1621, 1371, 1259, 1201, 1124, 1011 cm^{-1} ; HPLC (system A): $t_R = 24.1$ min (purity: 92%); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_5]^+$ 259.13, found 259.06.

(E)-3-(4-(2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)quinolinium-1-yl)propane-1-sulfonate **85.**



7-Acetoxy-3-formylcoumarin **78** (40 mg, 0.17 mmol) was suspended in absolute ethanol (1.5 mL). Quinoline **81** (59 mg, 0.22 mmol, 1.3 eq.) and pyrrolidine (29 μL , 0.34 mmol, 2 eq.) were added and

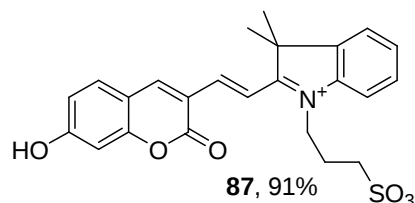
the reaction medium became instantaneously green. After 2 h at room temperature, the reaction medium was concentrated and purified by chromatography on a silica gel column (silica gel 60A, CC, 70-200 μm , Chromagel, SdS) using a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (gradient from 95:5 to 50:50, v/v) as the mobile phase, affording **85** as a blue solid (48 mg, 65%). ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 2.21-2.26 (m, 2H, CH_2), 2.55-2.61 (m, 2H, CH_2S), 4.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, NCH_2), 5.88 (s, 1H, ArH), 6.19 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, ArH), 7.23 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, ArH), 8.10-8.15 (m, 4H, 4ArH), 8.22 (s, 1H, ArH), 8.47 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 8.91 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ 26.7, 48.5, 55.2, 104.9, 106.4, 108.9, 112.1, 113.3, 119.6, 123.9, 126.5, 126.7, 129.0, 132.4, 135.3, 138.9, 143.0, 144.6, 146.1, 153.9, 160.0, 161.7, 182.3; HPLC (system A): $t_R = 21.4$ min (purity: 93%); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{S}]^-$ 436.09, found 436.13.

General procedure for the synthesis of 7-Hydroxycoumarin-hemicyanine hybrids **87-91.**

7-Acetoxy-3-formylcoumarin **78** (50 mg, 0.22 mmol) or (*E*)-7-acetoxy-3-cinnamylcoumarin **80** (30 mg, 0.12 mmol) was suspended in absolute ethanol (final concentration: 0.1 M) and mixed with the corresponding sulfonated indole **82**, **83** or **84** (1.3 eq.). Then, pyrrolidine (2 eq.) was added, causing an instantaneous homogenization of the reaction mixture and a

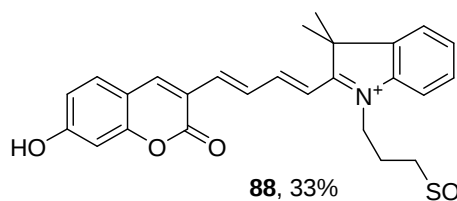
change of its color (turn to green for **87** and red for **88-91**). The reaction was checked for completion by RP-HPLC (system A) and the mixture was evaporated to dryness. The resulting residue was dissolved with a mixture of aq. TFA (0.1%) and CH₃CN and purified by semi-preparative RP-HPLC (system G) except for compound **87** (see below).

(E)-3-(2-(2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)-3,3-dimethyl-3H-indolium-1-yl)propane-1-sulfonate 87.



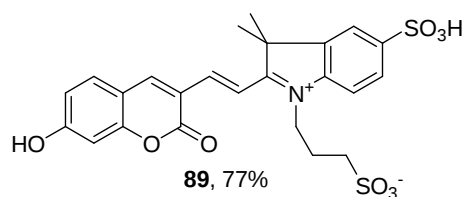
Fluorescent phenol dye **87** was purified by flash-chromatography on a silica gel column (silica gel 60A, CC, 70-200 μ m, Chromagel, SdS) using a mixture of CH₂Cl₂/EtOH (1:1, v/v) as the mobile phase (blue solid, 91%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.81 (s, 6H, 2CH₃), 2.28-2.32 (m, 2H, CH₂), 2.70-2.76 (m, 2H, CH₂S), 4.80-4.85 (m, 2H, NCH₂), 7.00 (*s_{br}*, 1H, ArH), 7.18 (*s_{br}*, 1H, ArH), 7.35 (*s_{br}*, 1H, ArH), 7.65-7.82 (m, 4H, 4ArH), 7.90-7.95 (m, 1H, ArH), 8.05-8.15 (m, 1H, ArH), 8.28-8.34 (m, 1H, ArH), 9.27 (s, 1H, OH); IR (KBr): 3440, 3080, 1705, 1615, 1580, 1551, 1513, 1464, 1152, 1037 cm⁻¹; HPLC (system A): *t_R* = 22.1 min (purity > 95%); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₂₄H₂₄NO₆S]⁺ 454.20, found 454.13.

3-(2-((1E,3E)-4-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)buta-1,3-dienyl)-3,3-dimethyl-3H-indolium-1-yl)propane-1-sulfonate 88.



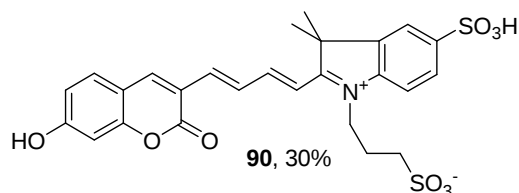
Fluorescent phenol dye **88** was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G) and obtained as a red solid after lyophilization (33% + 28% **87**). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.78 (s, 6H, 2CH₃), 2.10-2.16 (m, 2H, CH₂), 2.64-2.67 (m, 2H, CH₂S), 4.68-4.73 (m, 2H, NCH₂), 6.82 (s, 1H, ArH), 6.90-6.97 (m, 2H, 2ArH), 7.14 (s, 1H, ArH), 7.31 (s, 1H, ArH), 7.48 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, ArH), 7.60-7.88 (m, 4H, 4ArH), 8.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 8.36 (s, 1H, ArH); IR (KBr): 3441, 3081, 1728, 1682, 1615, 1567, 1523, 1506, 1456, 1332, 1312, 1194, 1147, 1126 cm⁻¹; HPLC (system A): *t_R* = 24.1 min (purity: 92%); MS (ESI, negative mode): calcd for [C₂₆H₂₄NO₆S]⁻ 478.20, found 478.13.

(E)-3-(2-(2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium-1-yl)propane-1-sulfonate **89.**



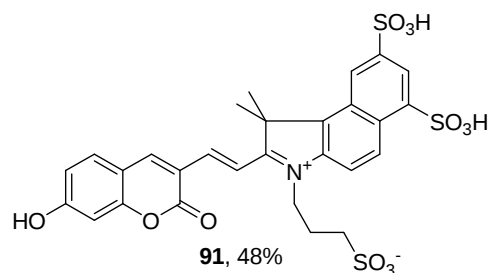
Fluorescent phenol dye **89** was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G) and obtained as a red solid after lyophilization (77%). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.81 (s, 6H, 2CH_3), 2.22-2.32 (m, 2H, CH_2), 2.71 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2S), 4.81 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, NCH_2), 6.86 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, ArH), 6.98 (dd, $J = 2.0$ and 8.6 Hz, 1H, ArH), 7.73 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, ArH), 7.86 (dd, $J = 1.5$ and 8.3 Hz, 1H, ArH), 8.00-8.10 (m, 3H, 3ArH), 8.30 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, ArH), 9.27 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, DMSO- d_6): δ 25.5, 26.8 (2C), 46.9, 48.4, 53.1, 103.4, 113.1, 114.1, 115.7, 115.9, 117.8, 121.3, 127.6, 133.5, 141.9, 144.4, 148.5, 149.6, 150.4, 157.8, 160.4, 166.0, 182.8; IR (KBr): 3076, 1728, 1616, 1564, 1520, 1426, 1418, 1309, 1200, 1158, 1121, 1031 cm^{-1} ; HPLC (system A): $t_R = 17.6$ min (purity > 95%); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{NO}_9\text{S}_2]^+$ 534.13, found 534.09.

3-(2-((1E,3E)-4-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)buta-1,3-dienyl)-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium-1-yl)propane-1-sulfonate **90.**



Fluorescent phenol dye **90** was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G) and obtained as a red solid after lyophilization (30% + 30% **89**). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1.79 (s, 6H, 2CH_3), 2.12-2.18 (m, 2H, CH_2), 2.69 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2S), 4.68-4.72 (m, 2H, NCH_2), 6.83 (s, 1H, ArH), 6.91 (dd, $J = 2.0$ and 8.5 Hz, 1H, ArH), 6.96 (s, 1H, ArH), 7.45 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, ArH), 7.75-7.85 (m, 3H, 3ArH), 7.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, ArH), 8.07 (s, 1H, ArH), 8.36-8.46 (m, 2H, 2ArH); HPLC (system A): $t_R = 19.5$ min (purity: 92%); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_9\text{S}_2]^+$ 560.13, found 560.10.

(E)-3-(2-(2-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)-1,1-dimethyl-6,8-disulfo-1H-benzo[e]indolium-3-yl)propane-1-sulfonate **91.**

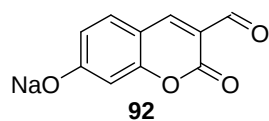


Fluorescent phenol dye **91** was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G) and obtained as a red solid after lyophilization (48%). ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 2.02 (s, 6H, 2CH_3), 2.32-2.38 (m, 2H, CH_2), 2.76-2.82 (m, 2H, CH_2S), 4.68-4.74 (m, 2H, NCH_2), 6.88 (s, 1H, ArH), 7.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, ArH), 7.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 8.13 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, ArH), 8.30-8.43 (m, 3H, 3ArH), 8.53 (s, 1H, ArH), 9.23 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 25.6, 26.9 (2C), 46.7, 48.5, 54.7, 103.4, 113.1, 113.6, 114.4, 115.9, 117.8, 120.5, 124.7, 127.9, 130.0, 131.3, 133.4, 139.5, 139.9, 146.9, 147.1, 147.8, 149.8, 157.7, 160.4, 166.0, 182.9; IR (KBr): 3402, 1718, 1617, 1587, 1561, 1515, 1452, 1308, 1199, 1064, 1037 cm^{-1} ; HPLC (system A): $t_R = 16.6$ min (purity > 95%); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{NO}_{12}\text{S}_3]^-$ 662.13, found 662.05.

Stability studies of hemicyanine-coumarin hybrids in the presence of thiols.

Stock solutions of fluorescent phenol dyes **87-91** in DMSO were prepared (final concentration: 2.4 mM). Aliquots of the solution (10 nmol) were dissolved in PBS (100 mM phosphate buffer + 150 mM NaCl, pH 7.5) and incubated with different amounts (corresponding to 10, 25, 50, 75 and 100 eq. of thiol) of a 10 mM solution of 1,4-dithioerythritol (DTE) in PBS (final volume: 100 μL). The resulting reaction mixtures were stored at room temperature and periodically vortexed for 30 min. Thereafter, 100 μL of aq. formic acid (FA, 0.1%) was added and 20 μL of each solution was injected into the LC-MS apparatus (system H). The same analyses were also performed with the fluorescent phenol dyes incubated only in PBS (final volume: 100 μL).

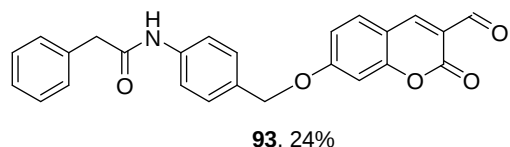
Sodium 3-formyl-2-oxo-2H-chromen-7-olate **92.**



Aq. ammonia (NH_4OH , 23%, 16 mL) was added to **78** (200 mg, 0.86 mmol), causing the partial solubilization of this 3-formylcoumarin derivative and the apparition of a fluorescent yellow color. CH_3CN was added until complete homogenization and the obtention of a dark yellow solution.

Thereafter, the aq. solution was lyophilized, leading to a yellow solid. (HPLC purity > 95%). NaOH (32 mg, 0.80 mmol, 1.03 eq) and deionized water were added until the complete solubilization of the coumarin. The resulting solution was again lyophilized, affording sodium salt **92** which was used in the next step without further purification.

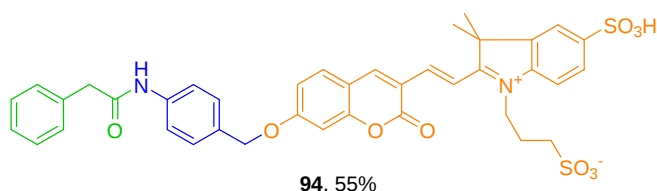
***N*-(4-((3-formyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yloxy)methyl)phenyl)-2-phenylacetamide **93**.**



Mesylate ester **51** (0.52 mmol, 1.4 eq.) in solution in dry DMF (4 mL) was added to **92** (77 mg, 0.36 mmol, 1 eq.). Crown ether 15-[C]-5 (10 μ L, 0.052 mmol, 0.14 eq.) was added and the reaction mixture

was heated at 80 °C for 16 h. Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. AcOEt was added and the resulting solution was washed with deionized water. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated in vacuo. The resulting solid was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, to give ether **93** as a yellow solid (36 mg, overall yield for the two steps from **51**: 24%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.66 (s, 2H, CH₂CO), 5.01 (s, 2H, CH₂O), 6.78 (s, 1H, ArH), 6.85 (dd, *J* = 2.0 and 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.08 (s, 1H, ArH), 7.17 (s, 1H, ArH), 7.23-7.34 (m, 5H, 5ArH), 7.08 (s, 1H, ArH), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, ArH), 7.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 8.27 (s, 1H, ArH), 10.10 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 45.2, 70.8, 102.2, 112.5, 115.1, 118.8, 120.3 (2C), 128.1, 128.8 (2C), 129.7 (2C), 129.9 (2C), 131.3, 132.5, 134.5, 138.3, 146.0, 158.2, 160.9, 165.0, 169.5, 188.2; IR (KBr): 3293, 1737, 1662, 1616, 1600, 1557, 1528, 1503, 1410, 1361, 1284, 1247, 1154 cm⁻¹; *R*_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v); HPLC (system A): *t*_R = 30.5 min (purity: 95%); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₂₅H₂₀NO₅]⁺ 413.87, found 414.13.

PGA sensitive pro-fluorescent probe **94.**



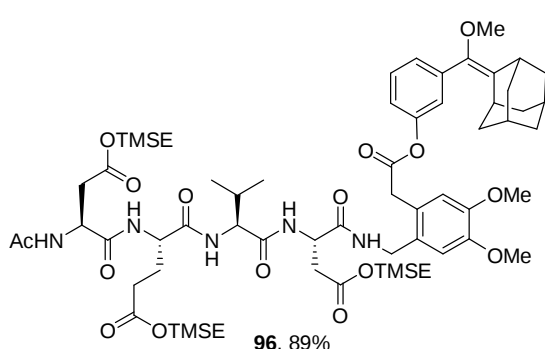
3-Formyl coumarin **93** (13 mg, 0.031 mmol) was dissolved in dry DMF (1 mL). Sulfonated indole **83** (25 mg, 0.062 mmol, 2 eq.) and anhydrous K₂CO₃ (8

mg, 0.056 mmol, 1.8 eq.) were added and the resulting reaction mixture was heated at 70 °C until total consumption of the starting material (checked by RP-HPLC, system A). After 4

days, the mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system G), to give after lyophilization PGA latent far-red fluorophore **94** as an orange solid (13 mg, 55%). HPLC (system A): t_R = 26.8 min (purity: 85%); MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{39}H_{37}N_2O_{10}S_2]^+$ 757.00, found 757.19.

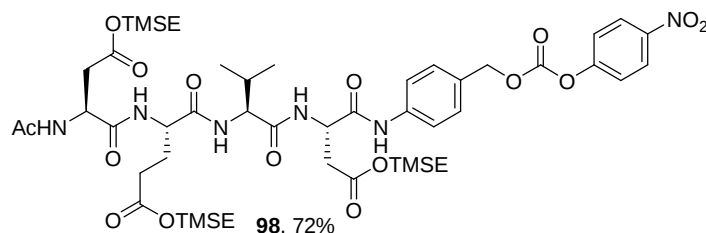
III SYNTHESIS OF CHEMILUMINESCENT PROBES

Enol ether **96**.



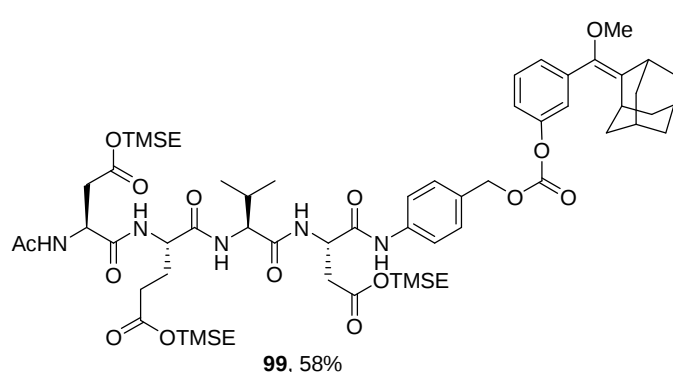
Peptide **39** (89 mg, 0.087 mmol) and enol ether **95** (43 mg, 0.16 mmol, 1.8 eq.) were dissolved in dry CH_2Cl_2 . BOP (58 mg, 0.131 mmol, 1.5 eq.) and TEA (42 μ L, 0.305 mmol, 3.5 eq.) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 45 min. Then, the reaction mixture was concentrated and purified by

chromatography on a silica gel column using a mixture of CH_2Cl_2 /AcOEt (1:1, v/v) as the mobile phase, to give enol ether **96** as white solid (99 mg, 89%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.00 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.02 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$), 0.82-1.01 (m, 12H, $3CH_2Si + 2CH_{3Val}$), 1.75-2.06 (m, 17H, $5CH_{2Adam.} + 2CH_{Adam.} + CH_3 + CH_{2Glu}$), 2.12-2.24 (m, 1H, $CHCH_3$), 2.32-2.50 (m, 2H, CH_{2GluCO}), 2.58 (s, 1H, $CH_{Adam.}$), 2.72-2.95 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 3.21 (s, 1H, $CH_{Adam.}$), 3.25 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 2H, $ArCH_2CO$), 3.98-4.20 (m, 7H, $3OCH_2 + C^*H_{Val}$), 4.30-4.53 (m, 3H, $CH_2N + C^*H_{Glu}$), 4.55-4.90 (m, 2H, $2C^*H_{Asp}$), 6.78 (s, 1H, ArH), 6.90 (s, 1H, ArH), 6.95-7.32 (m, 7H, $4ArH + CH_2NH + 2NH_{Asp}$), 7.88 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz, NH_{Val}), 8.46 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, NH_{Glu}); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ -1.3 (9C), 17.5 (3C), 18.5, 19.6, 23.0, 25.5, 28.5, 29.4, 30.5, 31.2, 32.4, 35.8, 36.8, 37.4, 37.5, 37.7 (2C), 38.2, 39.3 (2C), 39.4, 41.2, 49.8, 50.3, 53.6, 56.1, 56.3, 60.6, 63.5, 63.8, 64.1, 113.2, 113.5, 120.8, 122.3, 124.3, 127.1, 129.1, 129.6, 132.9, 137.3, 142.8, 148.3, 148.5, 150.8, 170.3, 170.8, 171.1, 171.4, 171.8, 172.2, 172.6, 175.2, 175.6; IR (KBr): 3288, 2956, 2908, 1736, 1635, 1522, 1250, 1172 cm^{-1} ; MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{64}H_{99}N_5NaO_{16}Si_3]^+$ 1300.63, found 1300.80; HPLC (system K): t_R = 29.3 min (purity > 90%).

Carbonate 98.

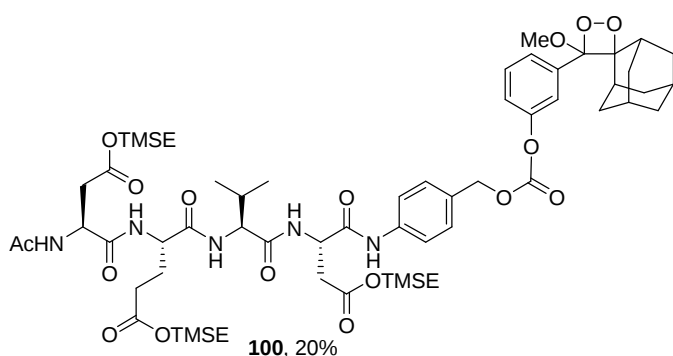
para-Nitrophenyl chloroformate (87 mg, 0.44 mmol, 4 eq.) and dry pyridine (44 μ L, 0.54 mmol, 5 eq.) were mixed in dry CH_2Cl_2 and a white precipitate was formed.

Alcohol **59** (100 mg, 0.11 mmol) was added and the reaction medium turned slowly to yellow and became homogenous. After 16 h at room temperature, CH_2Cl_2 was added and the solution was washed with aq. citric acid (10%) and deionized water. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting solid was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (6:4, v/v) as the mobile phase, affording **98** as a yellow solid (86 mg, 72%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.80-1.05 (m, 12H, $3\text{CH}_2\text{Si} + 2\text{CH}_{3\text{Val}}$), 2.02-2.20 (m, 5H, $\text{CH}_{2\text{Glu}} + \text{CH}_3$), 2.28-2.42 (m, 1H, CHCH_3), 2.45-2.70 (m, 2H, $\text{CH}_{2\text{GluCO}}$), 2.82-3.14 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{Asp}}$), 4.02-4.28 (m, 8H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Val}} + \text{C}^*\text{H}_{\text{Glu}} + 3\text{OCH}_2$), 4.66-4.74 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 4.92-5.08 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Asp}}$), 5.23 (s, 2H, ArCH_2O), 7.09 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, NH_{Val}), 7.21 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.32-7.40 (m, 4H, 4ArH), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, NH_{Asp}), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2ArH), 8.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, 2ArH), 8.50 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH_{Glu}), 8.71 (s, 1H, ArNHCO); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -1.23 (9C), 17.6 (3C), 19.5 (2C), 23.3, 25.4, 29.4, 30.0, 31.5, 36.0, 36.8, 50.2, 51.0, 56.8, 60.6, 63.6, 64.0, 64.3, 71.1, 120.5, 122.2, 125.6, 129.9, 139.3, 145.6, 152.7, 155.9, 169.1, 171.3, 171.4, 171.8, 172.0, 172.3, 172.7, 172.9, 175.9; $R_f = 0.5$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 6:4, v/v); HPLC (system B) : $t_R = 34.5$ min (purity > 90%).

Enol ether 99.

Enol ether **95**²⁷⁸ (19 mg, 0.070 mmol, 1.5 eq.) and K₂CO₃ (13 mg, 0.094 mmol, 2 eq.) were mixed in dry CH₃CN (400 μ L) and the reaction medium was stirred at room temperature for 20 min. Then, carbonate **98** (51 mg, 0.047 mmol)

was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solution was concentrated and CH₂Cl₂ (10 mL) was added. The organic phase was washed with deionized water (5 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting solid was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (1:1, v/v) as the mobile phase, affording **99** as a white solid (33 mg, 58%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 27H, 3Si(CH₃)₃), 0.90-1.05 (m, 12H, 3CH₂Si + 2CH₃Val), 1.55-2.00 (m, 17H, 5CH₂Adam. + 2CH₂Adam. + CH₃ + CH₂Glu), 2.20-2.45 (m, 1H, CHCH₃), 2.45-2.70 (m, 3H, CH₂Adam. + CH₂GluCO), 2.80-3.02 (m, 4H, 2CH₂Asp), 3.22 (s, 1H, CH₂Adam.), 3.28 (s, 3H, OCH₃), 4.05-4.25 (m, 8H, C^{*}H_{Val} + C^{*}H_{Glu} + 3OCH₂), 4.68-4.82 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 4.92-5.05 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 5.20 (s, 2H, ArCH₂O), 7.05-7.38 (m, 6H, 4ArH + 2ArH_{PABA}), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2ArH_{PABA}), 8.65 (s, 1H, ArNHCO); *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 1:1, v/v); HPLC (system K) : *t*_R = 27.8 min (purity > 90%).

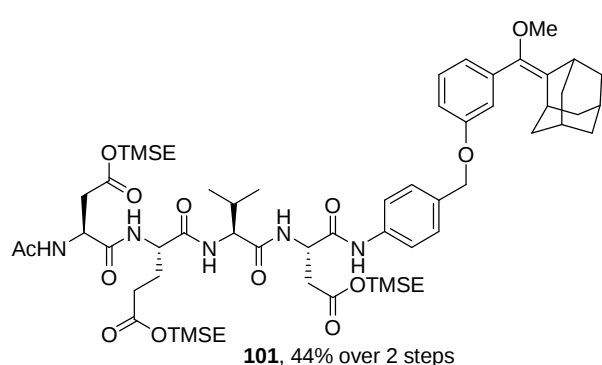
1,2-dioxetane 100.

P(OPh)₃ (20 μ L, 0.076 mmol, 2.7 eq.) was introduced in a 2-neck round bottom flask (25 mL) containing 2 mL of dry CH₂Cl₂. The solution was cooled to -78 °C and ozone (O₃) was bubbled until a blue color (excess of O₃) appeared. Then, the reaction

medium was purged with argon until the solution became colorless. Enol ether **99** (34 mg, 0.028 mmol) in solution in dry CH₂Cl₂ (2 mL) was added and the resulting reaction mixture was allowed to warm at room temperature. After 1 h, the formation of the 1,2-dioxetane was

checked by RP-HPLC (system K): the RP-HPLC elution profile showed ~50% conversion of the starting enol ether. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting solid was purified by semi-preparative RP-HPLC (system L), allowing the isolation of the 1,2-dioxetane as a white solid (7 mg, 20%). MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{56}\text{H}_{79}\text{N}_5\text{NaO}_{16}\text{Si}_2]^+$ 1156.50, found 1156.30; HPLC (system K) : t_{R} = 26.3 min (purity > 90%).

Enol ether 101.



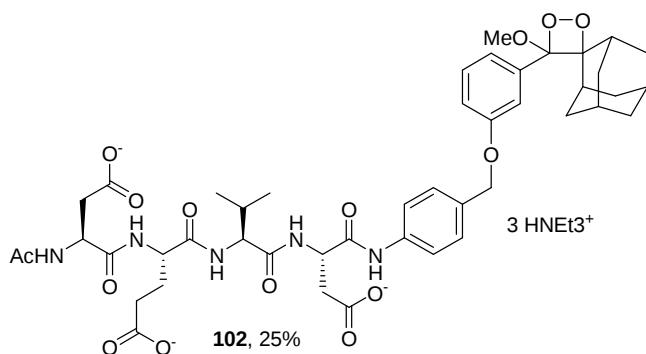
Enol ether **95** (46 mg, 0.17 mmol, 1 eq. based on **59**) was dissolved in dry acetone (1 mL). K₂CO₃ (47 mg, 0.34 mmol, 2 eq.) was added and the mixture was stirred for 20 min. Then, mesylate **61** in solution in dry acetone (1.5 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The

reaction was checked to completion by TLC and the reaction mixture was diluted with CH₂Cl₂ (15 mL) and washed with deionized water (7 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of CH₂Cl₂/AcOEt (1:1, v/v) as the mobile phase, affording **101** as a pale yellow oil (88 mg, 44% over 2 steps from **59**). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.02 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.04 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.06 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0.92-0.98 (m, 12H, 3CH₂Si + 2CH₃_{Val}), 1.77-1.94 (m, 15H, 2CH_{Adam} + 5CH_{2Adam} + CH₃), 2.31-2.42 (m, 3H, CHCH₃ + CH_{2Glu}), 2.50-2.63 (m, 3H, CH_{Adam} + CH_{2Glu}CO), 2.83-2.95 (m, 4H, 2CH_{2Asp}), 3.22 (s, 1H, CH_{Adam}), 3.27 (s, 3H, OCH₃), 3.84-3.89 (m, 1H, C^{*}H_{Asp}), 4.05-4.20 (m, 7H, C^{*}H_{Val} + 3OCH₂), 4.69-4.75 (m, 1H, C^{*}H_{Glu}), 4.98 (s_{br}, 3H, ArCH₂O + C^{*}H_{Asp}), 6.82-6.92 (m, 3H, 3ArH), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH_{Glu}), 7.19-7.25 (m, 2H, NH_{Asp} + ArH), 7.37 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, 2ArH_{PABA} + NH_{Asp} + NH_{Val}), 7.68 (s, 2H, 2ArH_{PABA}), 8.62 (s, 1H, ArNH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -1.2 (9C), 17.6 (3C), 18.3, 19.5, 23.3, 26.7, 28.6 (2C), 29.8, 30.0, 30.5, 31.4, 32.5, 35.6, 36.0, 37.5, 39.4 (2C), 39.5 (2C), 49.8, 50.5, 54.1, 58.2, 63.4 (2C), 63.8, 70.0, 114.4, 115.8, 120.3 (2C), 122.5, 128.7 (2C), 129.2, 132.2, 133.1, 137.2, 138.1, 138.2, 143.6, 168.8, 170.2, 171.3, 171.7, 172.0, 173.3, 174.5, 175.8; IR (KBr): 3322, 2925, 1720, 1655, 1536 cm⁻¹; [α]₃₆₅²¹ -23.7° (c 0.95, CHCl₃); *R*_f = 0.5 (CH₂Cl₂/AcOEt, 1:1, v/v);

MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{60}H_{93}N_5O_{13}Si_3Na]^+$ 1198.60, found 1198.53; HPLC (system I) : t_R = 39.6 min (purity > 98%).

Caspase-3 chemiluminescent probe 102.

1) [2+2] cycloaddition.



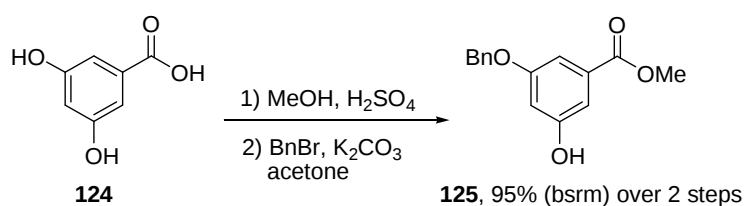
$P(OPh)_3$ (22 μ L, 0.085 mmol, 2.7 eq.) was introduced in a 2-neck round bottom flask (25 mL) containing 2 mL of dry CH_2Cl_2 . The solution was cooled to $-78^\circ C$ and ozone (O_3) was bubbled until a blue color (excess of O_3) appeared. Then, the reaction medium was purged with

argon until the solution became colorless. Enol ether **101** (37 mg, 0.031 mmol) in solution in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was added and the resulting reaction mixture was allowed to warm at room temperature. After 1 h, the formation of the 1,2-dioxetane was checked by RP-HPLC (system K): the RP-HPLC elution profile showed ~50% conversion of the starting material. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting solid was purified by semi-preparative RP-HPLC (system L), allowing the isolation of the 1,2-dioxetane as a white amorphous powder (10 mg, 25%, 50% bsrn). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.03 (s, 27H, $3Si(CH_3)_3$), 0.94-1.02 (m, 12H, $3CH_2Si + 2CH_{3Val}$), 1.43-1.78 (m, 12H, $2CH_{Adam.} + 5CH_{2Adam.}$), 1.98 (s, 3H, CH_3), 2.22-2.52 (m, 6H, $CHCH_3 + CH_{Adam.} + CH_2CO_{Glu} + CH_{2Glu}$), 2.78-3.02 (m, 4H, $2CH_{2Asp}$), 3.20 (s, 1H, $CH_{Adam.}$), 3.21 (s, 3H, OCH_3), 3.80-3.92 (m, 1H, C^*H_{Asp}), 4.08-4.22 (m, 7H, $C^*H_{Val} + 3OCH_2$), 4.75-4.82 (m, 1H, C^*H_{Glu}), 5.05 (s_{br}, 3H, $ArCH_2O + C^*H_{Asp}$), 6.36-6.40 (m, 1H, ArH), 6.99 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, ArH), 7.30-7.38 (m, 4H, $2ArH_{PABA} + 2ArH$), 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, $2ArH_{PABA}$), 8.54-8.60 (m, 1H, $NHAc$); IR (KBr): 3310, 2917, 1719, 1655, 1542, 1389, 1250, 1165 cm^{-1} ; MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{66}H_{109}N_6O_{15}Si_3]^+$ 1309.73, found 1309.53; HPLC (system B) : t_R = 37.8 min (purity > 98%).

2) TMSE deprotection. The latter fully protected 1,2-dioxetane (2 mg, 1.53 μ mol) was dissolved in dry DMSO (200 μ L). TBAF (1.0 M in THF, 31 μ L, 31 μ mol, 20 eq.) was added to the solution, allowing the quantitative removal of the TMSE groups (followed by RP-HPLC analysis after 5 min of reaction, system I). The mixture was diluted with TEAB buffer

(50 mM, pH 7.5) and purified by semi-preparative RP-HPLC (system M). The product-containing fractions were lyophilized to give the target dioxetane **102** as a colorless oil. A stock solution of this chemiluminescent probe was prepared in DMSO and quantification was achieved by UV-visible absorption measurements in deionized water at $\lambda_{max} = 250$ nm (yield after RP-HPLC purification: 50%). HPLC (system I): $t_R = 27.1$ min (purity > 90%); UV-vis (water, 25 °C): $\lambda_{max} = 250$ nm ($19\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{45}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_{15}]^-$ 906.38, found 906.33.

Methyl 3-(benzyloxy)-5-hydroxybenzoate **125**.

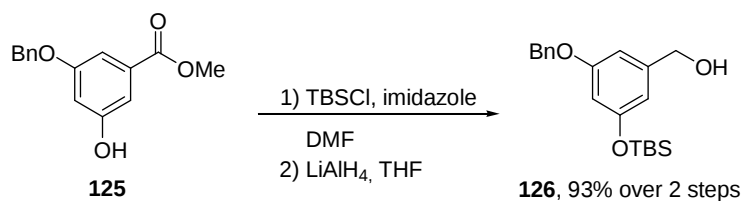


1) Fischer esterification. 3,5-Dihydroxybenzoic acid **124** (55 g, 357 mmol) was dissolved in MeOH (700 mL). Then, H_2SO_4 (96%, 12 mL) was added and the mixture was stirred at reflux for 24 h. The solution was concentrated under reduced pressure. The resulting oil was dissolved in AcOEt (750 mL) and washed with aq. Na_2CO_3 (10%, 200 mL) and deionized water (200 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, yielding methyl 3,5-dihydroxybenzoate as a white solid (59.6 g, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ 3.87 (s, 3H, OCH_3), 6.62 (s, 1H, ArH), 7.04, (s, 2H, 2ArH), 8.63 (s, 2H, OH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, acetone- d_6): δ 53.1, 108.8, 109.4 (2C), 133.9, 160.3 (2C), 167.9; IR (KBr): 3246, 1693, 1602, 1488, 1444, 1350, 1264, 1164, 1103, 998 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_4]^-$ 167.03, found 167.33.

2) Monoprotection. Methyl 3,5-dihydroxybenzoate (57.7 g, 343 mmol, 2 eq.) was dissolved in acetone. Then, K_2CO_3 (26 g, 189 mmol, 1.1 eq.) and benzyl bromide (20.4 mL, 172 mmol, 1 eq.) were added and the mixture was heated at reflux for 24 h. The reaction medium was concentrated under reduced pressure; the resulting oil was dissolved in AcOEt (750 mL) and washed with deionized water (200 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt (250 mL), the combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The mixture of mono benzylated product and starting material were purified by chromatography

on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, affording methyl 3-(benzyloxy)-5-hydroxybenzoate **125** (22.7 g, 26%, 95% bsm) and methyl 3,5-dihydroxybenzoate **124** (39.7 g, 69% of the starting material) as white solids. This procedure was repeated once, affording 40.5 g (157 mmol) of **125**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.90 (s, 3H, OCH_3), 5.07 (s, 2H, ArCH_2O), 5.16, (s, 1H, OH), 6.68 (s, 1H, ArH), 7.15 (s, 1H, ArH), 7.26 (s, 1H, ArH), 7.33-7.44 (m, 5H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 52.8, 70.6, 107.9, 108.2, 109.9, 127.9 (2C), 128.4, 128.9 (2C), 132.1, 136.7, 157.3, 160.3, 167.7; IR (neat): 3431, 3326, 1705, 1598, 1491, 1449, 1435, 1386, 1325, 1256, 1167, 1098, 1040, 1011 cm^{-1} ; R_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_4]^-$ 257.08, found 257.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 69.76; H, 5.46. Found: C, 69.74; H, 5.43.

3-(Benzyloxy)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzylic alcohol **126**.

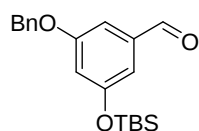


1) Silyl protection. Phenol **125** (40.5 g, 157 mmol, 1 eq.) and imidazole (25.9 g, 377 mmol, 2.4 eq.) were dissolved in dry DMF (80 mL). The solution was cooled to 0 °C, *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) (28.3 g, 188 mmol, 1.2 eq.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction medium was concentrated under reduced pressure, the resulting oil was diluted with AcOEt (750 mL) and washed with deionized water (200 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt (250 mL), the combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude product was purified by filtration over a silica gel pad using a mixture of cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v), affording methyl 3-(benzyloxy)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzoate as a colorless oil (58 g, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.19 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.97 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 5.07 (s, 2H, ArCH_2O), 6.65 (s, 1H, ArH), 7.13 (s, 1H, ArH), 7.29-7.42 (s, 6H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -4.1 (2C), 18.5, 26.0 (3C), 52.6, 70.6, 108.7, 112.6, 114.6, 127.9 (2C), 128.4, 129.0 (2C), 132.2, 136.9, 157.0, 160.0, 167.1; IR (neat): 3411, 2952, 2931, 2859, 1725, 1593, 1445, 1382, 1339, 1306, 1252, 1163,

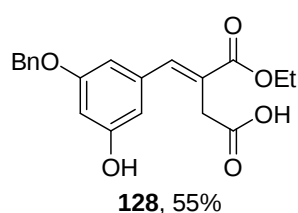
1046, 1028 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{Si}$: C, 67.71; H, 7.58. Found: C, 67.68; H, 7.57.

2) Reduction. LiAlH_4 (4.14 g, 109 mmol, 0.7 eq.) and dry THF (100 mL) were introduced in a round-bottom flask. The solution was cooled at 0 °C and methyl 3-(benzyloxy)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzoate (58 g, 157 mmol, 1 eq.) in solution in dry THF (85 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 4 h. Thereafter, the reaction mixture was again cooled to 0 °C and AcOEt (120 mL) and deionized water were added and the solution was filtered over a Celite[®] 545 pad. The filtrate was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording **126** as a colorless oil (50.3 g, 93%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.18 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.97 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.60 (s, 2H, ArCH_2OH), 5.03 (s, 2H, ArCH_2OAr), 6.39 (s, 1H, ArH), 6.47 (s, 1H, ArH), 6.63 (s, 1H, ArH), 7.32-7.44 (m, 5H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -4.1 (2C), 18.5, 26.0 (3C), 65.5, 70.3, 106.4, 106.6, 111.6, 127.8 (2C), 128.3, 128.9 (2C), 137.2, 143.6, 157.2, 160.3; IR (neat): 3348, 2940, 2859, 1592, 1451, 1383, 1329, 1252, 1157, 1039, 1003 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{Si}]^+$ 345.19, found 345.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Si}$: C, 69.72; H, 8.19. Found: C, 69.68; H, 7.85.

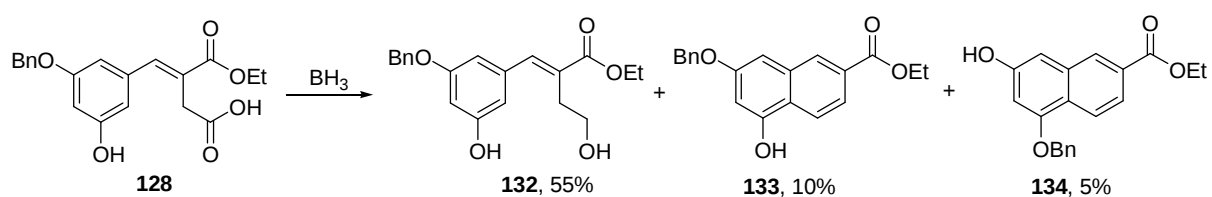
3-(Benzyloxy)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzaldehyde **127**.



127, quant. Alcohol **126** (6.5 g, 18.9 mmol) was dissolved in AcOEt (80 mL). Then, activated MnO_2 (58% from Alfa Aesar, 48 g, 552 mmol, 29 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The solution was filtered over a Celite[®] 545 pad and the filtrate was concentrated under vacuum, leading to **127** as a pale yellow oil (6.45 g, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.20 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 5.09 (s, 2H, ArOCH_2), 6.72 (s, 1H, ArH), 6.96 (s, 1H, ArH), 7.11 (s, 1H, ArH), 7.38-7.42 (m, 5H, ArH), 9.88 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ -4.1 (2C), 18.5, 25.9 (3C), 70.7, 108.0, 114.2, 115.0, 127.9 (2C), 128.6, 129.0 (2C), 136.6, 138.7, 157.7, 160.6, 192.2; IR (neat): 3416, 2931, 2859, 1703, 1590, 1462, 1387, 1336, 1306, 1255, 1165, 1046 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{Si}]^-$ 357.15, found 357.33 (carboxylic acid formed during ionization); Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$: C, 70.13; H, 7.65. Found: C, 69.78; H, 8.08.

(E)-4-(3-(Benzyloxy)-5-hydroxyphenyl)-3-(ethoxycarbonyl)but-3-enoic acid **128.**

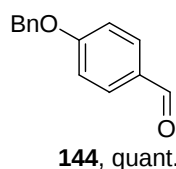
Dry ethanol (25 mL) was introduced in a 2-neck round bottom flask and sodium metal (1.63 g, 70.9 mmol, 3.8 eq.) was carefully dissolved. A mixture of aldehyde **127** (6.4 g, 18.6 mmol) and diethyl succinate **122** (4.08 mL, 24.5 mmol, 1.3 eq.) in solution in dry ethanol (20 mL) was added and the resulting reaction mixture was refluxed for 20 h. Deionized water (70 mL) was added and EtOH was removed under reduced pressure. AcOEt (150 mL) and a sat. solution of NH₄Cl (100 mL) were added, the phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with AcOEt (200 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting oil was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (gradient from 7:3 to 2:8, v/v) as the mobile phase, affording carboxylic acid **128** as a brown foam (3.62 g, 55%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.32 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 3.53 (s, 2H, CH₂COOH), 4.29 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4.60 (s, 1H, OH), 5.02 (s, 2H, ArOCH₂), 6.51 (s, 3H, 3ArH), 7.28-7.42 (m, 5H, 5ArH_{Bn}), 7.79 (s, 1H, CH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 34.2, 62.1, 70.4, 103.8, 108.4, 108.7, 125.8, 127.8 (2C), 128.4, 128.9 (2C), 136.8, 136.9, 143.2, 157.6, 160.4, 168.4, 176.4; IR (neat): 3382, 1711, 1593, 1443, 1378, 1287, 1157 cm⁻¹; *R*_f = 0.4 (cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₂₀H₂₂O₇]⁺ 374.14, found 374.33; Anal. Calcd for C₂₀H₂₀O₆: C, 67.41; H, 5.66. Found: C, 67.33; H, 5.91.

Reduction of **128.**

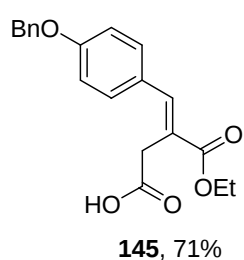
Carboxylic acid **128** (241 mg, 0.68 mmol) was dissolved in dry THF (2.5 mL) and the solution was cooled at 0 °C. Then, borane-dimethyl sulfide complex (400 μL, 2.03 mmol, 3 eq.) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. EtOH was slowly added until no more gas evolution occurred, and the reaction medium was concentrated. AcOEt (25 mL) was added and the solution was washed with deionized water (15 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced

pressure. The three products **132**, **133** and **134** were then separated by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (gradient from 95:5 to 7:3, v/v) as the mobile phase. **132** (orange oil, 128 mg, 55%): $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[C_{20}H_{23}O_5]^+$ 343.15, found 343.07; **133** (beige solid, 22 mg, 10%): 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.44 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 5.16 (s, 2H, $ArOCH_2$), 5.50 (s, 1H, OH), 6.69 (s, 1H, ArH), 6.95 (s, 1H, ArH), 7.35-7.50 (m, 5H, $5ArH_{Bn}$), 7.91 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.44 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ 14.7, 61.7, 70.4, 101.4, 104.3, 122.6, 123.3, 127.8, 127.9 (2C), 128.4, 128.8, 129.0 (2C), 129.9, 134.9, 136.9, 153.2, 157.8, 167.8; IR (KBr): 3336, 2963, 1716, 1687, 1628, 1602, 1581, 1522, 1456, 1417, 1394, 1368, 1264, 1238, 1196, 1165, 1153, 1107, 1082, 1016 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); MS (negative mode): calcd for $[C_{20}H_{17}O_4]^-$ 321.11, found 321.40. **134** (beige solid, 10 mg, 5%): 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.44 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 5.23 (s, 2H, $ArOCH_2$), 6.66 (s, 1H, ArH), 6.84 (s, 1H, ArH), 7.30-7.55 (m, 5H, $5ArH_{Bn}$), 7.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.25 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.37 (s, 1H, ArH); IR (KBr): 3398, 2982, 2939, 1718, 1691, 1652, 1630, 1607, 1514, 1498, 1455, 1444, 1394, 1367, 1236, 1199, 1147, 1108, 1027 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v).

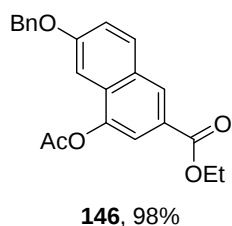
4-(Benzyloxy)benzaldehyde **144**.



Phenol **143** (15 g, 123 mmol) was dissolved in acetone. K_2CO_3 (19.9 g, 144 mmol, 1.2 eq.) and benzyl bromide (16 mL, 140 mmol, 1.1 eq.) were added and the reaction mixture was refluxed for 4 h 30. Then, the reaction medium was concentrated under reduced pressure. AcOEt (700 mL) was added and the solution was washed with deionized water (200 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, yielding **144** as a pale yellow solid (26 g, quant. yield). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 5.15 (s, 2H, OCH_2Ar), 7.10 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $2ArH$), 7.34-7.45 (m, 5H, $5ArH_{Bn}$), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, ArH), 9.89 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ 70.6, 115.4 (2C), 127.8 (2C), 128.6, 129.0 (2C), 130.4, 132.3, 136.2 (2C), 164.0, 191.1; IR (KBr): 1688, 1604, 1574, 1510, 1262, 1165, 1019 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v).

(E)-4-(4-(Benzyloxy)phenyl)-3-(ethoxycarbonyl)but-3-enoic acid **145.**

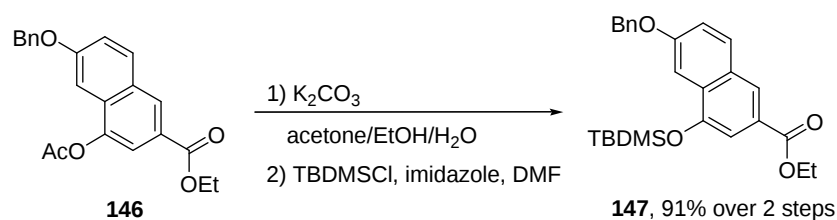
Sodium metal (8.07 g, 351 mmol, 3 eq.) was carefully dissolved in dry EtOH (200 mL). Diethylsuccinate **122** (25.3 mL, 152 mmol, 1.3 eq.) and aldehyde **144** (24.8 g, 117 mmol) in solution in dry EtOH (100 mL) were added and the reaction mixture was refluxed for 1 h 30. The solvent was removed under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in AcOEt (1 L) and the solution was washed with a sat. solution of NH₄Cl (300 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt (200 mL) then the combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (3:7, v/v), to give **145** as a yellow solid (28.2 g, 71%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.61 (s, 2H, CH₂COOH), 4.29 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 5.10 (s, 2H, OCH₂Ar), 7.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, ArH), 7.35-7.45 (m, 7H, 5ArH_{Bn} + 2ArH), 7.87 (s, 1H, CH), 10.43 (s_{br}, 1H, COOH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 14.6, 34.1, 61.7, 70.4, 115.4 (2C), 123.6, 127.7, 127.8 (2C), 128.5, 129.0 (2C), 131.4 (2C), 136.8, 142.5, 159.9, 168.3, 177.0; IR (KBr): 2982, 1714, 1695, 1600, 1512, 1428, 1284, 1254, 1199, 1180, 1102, 1007 cm⁻¹; *R*_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 3:7, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for [C₄₀H₃₉O₁₀]⁻ 679.25, found 679.00; Anal. Calcd for C₂₀H₂₀O₅: C, 70.57; H, 5.92. Found: C, 70.58; H, 6.14.

Ethyl 4-acetoxy-6-(benzyloxy)-2-naphthoate **146.**

Carboxylic acid **145** (26 g, 76.4 mmol) was dissolved in acetic anhydride (500 mL) and heated at 110 °C for 20 h. The reaction mixture was concentrated and AcOEt (1 L) was added. The resulting solution was washed with aq. Na₂CO₃ (10%, 300 mL) and deionized water (200 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure, affording **146** as a yellow solid which was pure enough to be used without purification in the next step (27.3 g, 98%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.42 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, COCH₃), 4.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 5.20 (s, 2H, ArOCH₂), 7.18 (s, 1H, ArH), 7.26-7.42 (m, 6H, 5ArH_{Bn} + ArH), 7.80 (s, 1H, ArH), 7.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, ArH), 8.44 (s, 1H, ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 14.7, 21.3, 61.5, 70.6, 101.5, 118.6, 120.5, 125.7, 127.9 (2C), 128.6, 128.9, 129.0 (2C), 129.5, 130.8, 131.6, 136.6, 145.9,

159.4, 166.3, 169.5; IR (KBr): 2976, 1744, 1711, 1634, 1610, 1475, 1451, 1424, 1386, 1369, 1291, 1217, 1101, 1050, 1021 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6]^+$ 382.14, found 382.00; Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_5$: C, 72.51; H, 5.53. Found: C, 72.44; H, 5.69.

Ethyl 6-(benzyloxy)-4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-2-naphthoate **147**.

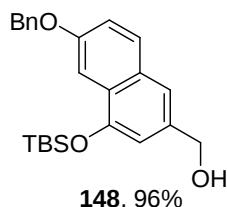


1) Phenol deprotection. Acetate **146** (26.2 g, 72 mmol) was dissolved in a 1/1 mixture of EtOH and acetone (200 mL each). Then, K_2CO_3 (24.9 g, 180 mmol, 2.5 eq.) in solution in deionized water (200 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure, the resulting solid was dissolved in AcOEt (1 L) and washed with deionized water (300 mL). The aqueous phase was extracted with AcOEt (250 mL) and the combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording ethyl 6-(benzyloxy)-4-hydroxy-2-naphthoate as a brown solid which was used without purification in the next step (21.1 g, 91%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.30 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 5.10 (s, 2H, ArOCH_2), 7.25-7.50 (m, 7H, $5\text{ArH}_{\text{Bn}} + 2\text{ArH}$), 7.62 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, ArH), 7.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 8.04 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 14.7, 19.3, 61.6, 70.4, 101.8, 108.6, 120.6, 123.6, 125.6, 127.8, 128.1, 128.5, 128.6, 128.9, 129.5, 131.1, 136.9, 151.5, 158.7, 167.9; IR (KBr): 2981, 2929, 1714, 1695, 1513, 1428, 1283, 1253, 1199, 1180, 1102, 1007 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_4]^+$ 323.13, found 323.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_4$: C, 74.52; H, 5.63. Found: C, 74.49; H, 5.99.

2) Protection as silyl ether. Ethyl 6-(benzyloxy)-4-hydroxy-2-naphthoate (442 mg, 1.37 mmol) and imidazole (226 mg, 3.29 mmol, 2.4 eq.) were dissolved in dry DMF (2 mL). The solution was cooled at 0 $^\circ\text{C}$, TBDMSCl (248 mg, 1.64 mmol, 1.2 eq.) was added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. Thereafter, the mixture was concentrated under reduced pressure. Then, AcOEt (20 mL) was added and the solution was

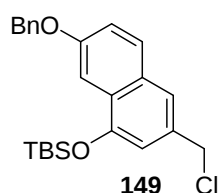
whashed with deionized water (10 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude product was purified by a filtration over a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (9/1, v/v) as the mobile phase, leading to **147** as a yellow oil (598 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.20 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.99 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4.41 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 5.11 (s, 2H, ArCH_2O), 7.17 (dd, $J = 2.6, 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.22-7.41 (m, 6H, $5\text{ArH}_{\text{Bn}} + \text{ArH}$), 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH), 7.72 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.09 (s, 1H, ArH); R_f 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 9/1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{Si}]^+$ 437.21, found 437.20.

(6-(Benzyloxy)-4-(tert-butyltrimethylsilyloxy)naphthalen-2-yl)methanol **148.**



LiAlH_4 (69 mg, 1.82 mmol, 2 eq.) was introduced in dry THF (3 mL). The reaction medium was cooled at 0°C , ester **147** (406 mg, 0.93 mmol) in solution in dry THF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. AcOEt was added until no more gas evolution and the solution was filtered over a Celite[®] 545 pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure, affording **148** as a pale green solid which was pure enough to be used without purification in the next step (354 mg, 96%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.26 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.08 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.75 (s, 2H, OCH_2), 5.18 (s, 2H, ArCH_2O), 6.86 (s, 1H, ArH), 7.22-7.52 (m, 8H, $5\text{ArH}_{\text{Bn}} + 3\text{ArH}$), 7.70 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH); $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{Si}]^+$ 377.19, found 377.20.

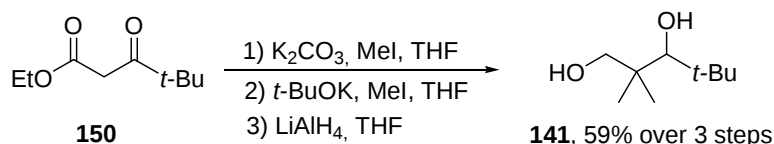
(7-(Benzyloxy)-3-(chloromethyl)naphthalen-1-yloxy)(tert-butyl)dimethylsilane **149.**



Alcohol **148** (195 mg, 0.49 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1.5 mL) and the solution was cooled to 0°C . Then, SOCl_2 (71 μL , 0.98 mmol, 2 eq.) was added and the solution was stirred at room temperature for 1 h. After cooling to 0°C , deionized water and CH_2Cl_2 were added. The phases were separated, the organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated, affording **149** as a brown oil which was immediately used in the next step (202 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.27 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.08 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.67 (s, 2H, CH_2Cl), 5.18 (s, 2H, ArCH_2O), 6.86 (s, 1H, ArH), 7.21-

7.26 (dd, $J = 2.3, 9.1$ Hz, 1H, ArH), 7.33-7.52 (m, 7H, 5ArH_{Bn} + 2ArH), 7.70 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -3.9, (2C), 18.7 (3C), 25.9, 47.4, 70.2, 102.6, 113.8, 120.2, 120.8, 127.8 (2C), 128.4, 129.0 (2C), 129.1, 129.8, 130.3, 133.1, 137.1, 151.5, 157.3; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v).

2,2,4,4-Tetramethylpentane-1,3-diol **141**.



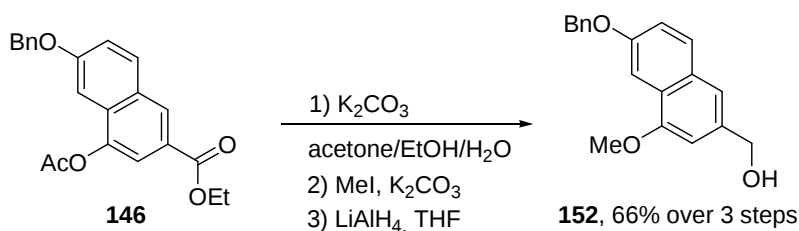
1) Mono-methylation. Ethyl pivaloylacetate **150** (20 mL, 110 mmol) was dissolved in dry THF (100 mL). K₂CO₃ (23.3 g, 168 mmol, 1.5 eq.) and MeI (10.5 mL, 168 mmol, 1.5 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature for 48 h. The reaction medium was concentrated under reduced pressure, AcOEt (500 mL) was added and the solution was washed with deionized water (200 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated, affording ethyl 2,4,4-trimethyl-3-oxopentanoate as a yellow oil (20.05 g, 98%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.18 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.31 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CHCH₃), 3.97 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, CHCH₃), 4.13 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 15.1, 26.5 (3C), 45.6, 46.5, 61.5, 171.0, 211.9; IR (neat): 3440, 2919, 2850, 1732, 1463, 1261, 1023 cm⁻¹; $R_f = 0.6$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); Anal. Calcd for C₁₀H₁₈O₃: C, 64.49; H, 9.74. Found: C, 64.42; H, 9.67.

2) Bis-methylation. Ethyl 2,4,4-trimethyl-3-oxopentanoate (19 g, 102 mmol) was introduced in dry THF (120 mL). *t*-BuOK (17.1 g, 153 mmol, 1.5 eq.) and MeI (9.5 mL, 153 mmol, 1.5 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature for 48 h. The reaction medium was concentrated under reduced pressure, AcOEt (500 mL) was added and the solution was washed with deionized water (200 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated, affording ethyl 2,2,4,4-tetramethyl-3-oxopentanoate as a yellow oil (19.6 g, 96%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.19 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.38 (s, 6H, 2CH₃), 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₃); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 23.8 (2C), 28.8 (3C), 45.7, 54.9, 61.5, 174.5, 212.8; IR (neat): 3444, 2975, 1786, 1744, 1655, 1458, 1370, 1256, 1198, 1165, 1116 cm⁻¹; $R_f = 0.6$

(cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); Anal. Calcd for $C_{11}H_{20}O_3$: C, 65.97; H, 10.07. Found: C, 65.92; H, 10.12.

3) Reduction. Ethyl 2,2,4,4-tetramethyl-3-oxopentanoate (17.43 g, 87 mmol) was dissolved in dry THF (100 mL). At 0 °C, this solution added to $LiAlH_4$ (5.6 g, 148 mmol, 1.7 eq.) in suspension in dry THF (100 mL) and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. AcOEt was added and the solution was filtered over a Celite® 545 pad. The filtrate was concentrated and the resulting solid residue was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (1:1, v/v) as the mobile phase, affording **141** as a colorless oil (8.75 g, 63%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.01-103 (s, 15H, $2CH_3 + C(CH_3)_3$), 2.78 (s_{br}, 1H, OH), 3.06 (s_{br}, 1H, OH), 3.29 (s, 1H, $CHOH$), 3.47 (dd, $J = 10.5, 25.6$ Hz, 2H, CH_2OH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ 20.9 (2C), 28.8 (3C), 37.6, 40.8, 75.3, 85.9; IR (neat): 2268, 2956, 2875, 1478, 1394, 1368, 1050 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); Anal. Calcd for $C_9H_{20}O_2$: C, 67.45; H, 12.58. Found: C, 66.95; H, 12.63.

(6-(Benzyloxy)-4-methoxynaphthalen-2-yl)methanol **152.**



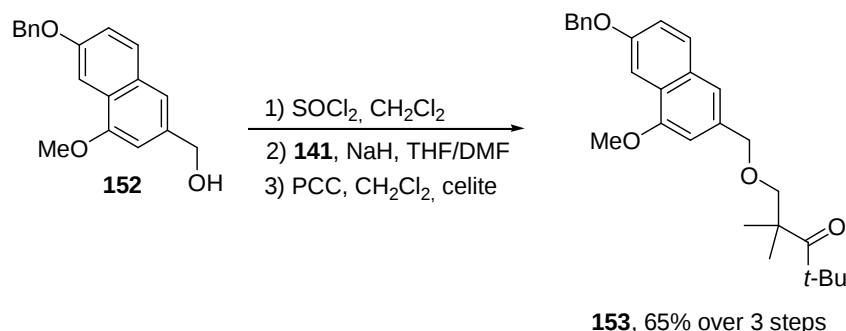
1) Phenol deprotection. The acetate group of **146** was removed as already stated (see **147**).

2) Methylation. The resulting phenol (19 g, 60 mmol) was dissolved in acetone. K_2CO_3 (12.1 g, 88 mmol, 1.5 eq.) and MeI (5.5 mL, 88 mmol, 1.5 eq.) were added dropwise and the reaction mixture was refluxed for 22 h. Then, the solvent and excess MeI were removed under reduced pressure, dissolved in AcOEt (800 mL) and washed with deionized water (250 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, affording ethyl 6-(benzyloxy)-4-methoxy-2-naphthoate as a yellow solid (18.8 g, 93%). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.45 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.06 (s, 3H, OCH_3), 4.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 5.21 (s, 2H, $ArOCH_2$), 7.25-7.55 (m, 7H, $5ArH_{Bn} + 2ArH$), 7.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, ArH), 8.17 (s, 1H,

ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 14.8, 56.0, 61.3, 70.4, 101.9, 103.8, 120.4, 123.7, 125.9, 128.1 (2C), 128.4, 128.9 (2C), 129.0, 129.4, 131.0, 136.9, 154.7, 158.8, 167.4; IR (KBr): 2942, 1706, 1622, 1600, 1509, 1461, 1416, 1385, 1294, 1232, 1194, 1094, 1029, 998, 951 cm^{-1} ; R_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (APCI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_4]^+$ 337.14, found 337.07; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_4$: C, 74.98; H, 5.99. Found: C, 74.95; H, 6.31.

3) Reduction. A suspension of LiAlH_4 (3.95 g, 104 mmol, 2 eq.) in dry THF (100 mL) was cooled to 0 °C. Then, a solution of ethyl 6-(benzyloxy)-4-methoxy-2-naphthoate (17.5 g, 52 mmol) in dry THF (150 mL) was added dropwise and the reaction mixture was allowed to warm at room temperature and stirred for 5 h. After cooling to 0 °C, AcOEt was carefully added until no more gas evolution occurred. The resulting solution was filtered over a Celite[®] 545 pad and washed with AcOEt. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (1:1, v/v) as the mobile phase, affording **152** as a beige solid (11.9 g, 78%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.99 (s, 3H, OCH_3), 4.75 (s, 2H, CH_2OH), 5.18 (s, 2H, ArOCH_2), 6.82 (s, 1H, ArH), 7.25 (dd, J = 2.6 and J = 9 Hz, 1H, ArH), 7.28 (s, 1H, ArH), 7.30-7.52 (m, 5H, 5ArH_{Bn}), 7.64 (d, 1H, J = 2.6 Hz, 1H, ArH), 7.68 (d, J = 9 Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 55.7, 65.9, 70.2, 101.9, 103.9, 117.9, 119.8, 126.2, 128.0 (2C), 128.2, 128.8 (2C), 129.4, 129.9, 136.6, 137.1, 155.0, 156.9; IR (KBr): 3345, 2947, 2867, 1607, 1583, 1508, 1468, 1420, 1406, 1381, 1355, 1329, 1285, 1250, 1228, 1206, 1187, 1165, 1133, 1100, 1028, 1009 cm^{-1} ; R_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_2]^+$ 277.12, found 277.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$: C, 77.53; H, 6.16. Found: C, 77.46; H, 6.29.

1-((6-(Benzyloxy)-4-methoxynaphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one
153.

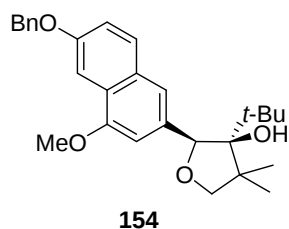


1) Conversion into chlorinated derivative. Alcohol **152** (11.9 g, 40 mmol) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (250 mL). The solution was cooled to 0 °C and SOCl_2 (4.4 mL, 60 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise. The reaction medium was allowed to warm at room temperature and was stirred for 5 h. After cooling to 0 °C, deionized water (100 mL) was carefully added, the phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording 7-(benzyloxy)-3-(chloromethyl)-1-methoxynaphthalene as a dark oil, which was directly used without further purification. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 4.03 (s, 3H, OCH_3), 4.73 (s, 2H, CH_2Cl), 5.19 (s, 2H, OCH_2Ar), 6.83 (s, 1H, ArH), 7.27 (dd, $J = 2.6$ and 9 Hz, 1H, ArH), 7.34-7.52 (m, 6H, $5\text{ArH}_{\text{Bn}} + 1\text{ArH}$), 7.63 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, $J = 9$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 47.7, 55.9, 70.3, 102.0, 104.9, 120.1(6), 120.1(8), 126.7, 128.0 (2C), 128.3, 128.9, 129.6 (2C), 129.7, 132.9, 137.1, 155.3, 157.4.

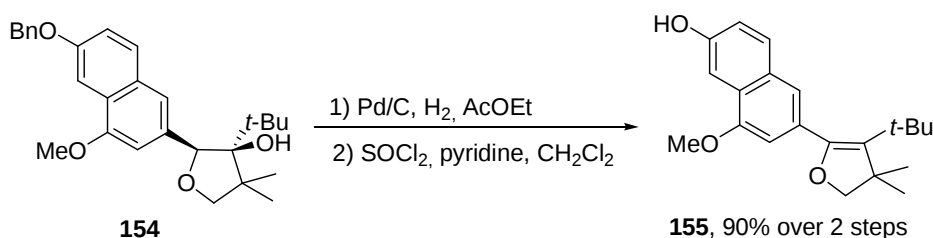
2) Nucleophilic substitution. A mixture of dry DMF (230 mL) and THF (275 mL) was introduced in a flask containing solid NaH (95%, 1.21 g, 48 mmol, 1.2 eq.). At 0 °C, diol **141** (7.05 g, 44 mmol, 1.1 eq.) in solution in dry THF (55 mL) was added and the resulting solution was stirred for 15 min. Then, 7-(benzyloxy)-3-(chloromethyl)-1-methoxynaphthalene (40 mmol) in solution in dry THF (185 mL) was added and the solution was stirred at room temperature for 7 h. A sat. solution of NH_4Cl (400 mL) was slowly added and the aqueous phase was extracted vigorously with AcOEt (3 x 700 mL). The combined organic phases were dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording 1-((6-(benzyloxy)-4-methoxynaphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol as an orange oil which was pure enough to be used without purification in the next step. For analytical purpose, a small amount of the product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/ AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase. ^1H NMR

(300 MHz, CDCl_3): δ 1.03-1.07 (s, 15H, $2\text{CH}_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.25 (m, 2H, OCH_2), 3.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, CHOH), 4.01 (s, 3H, OCH_3), 4.61 (s, 2H, ArCH_2O), 5.19 (s, 2H, ArOCH_2), 6.82 (s, 1H, ArH), 7.22-7.25 (m, 2H, 2ArH), 7.31-7.54 (m, 5H, 5ArH_{Bn}), 7.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 22.2, 26.1, 29.0 (3C), 37.6, 40.9, 55.8, 70.3, 74.2, 82.1, 85.1, 102.0, 104.2, 119.2, 119.9, 126.4, 128.0 (2C), 128.3, 128.9, 129.4 (2C), 129.8, 133.5, 137.2, 155.2, 157.0; IR (KBr): 3478, 2954, 1720, 1607, 1508, 1476, 1460, 1389, 1284, 1250, 1224, 1207, 1098, 1026 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{56}\text{H}_{72}\text{NaO}_8]^+$ 895.51, found 895.20; Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4$: C, 77.03; H, 8.31. Found: C, 77.01; H, 8.33.

3) Oxidation. The latter secondary alcohol was dissolved in dry CH_2Cl_2 (300 mL). Pyridinium chlorochromate (PCC) (20 g, 93 mmol, 2.3 eq. based on alcohol **152**) and Celite[®] 545 (25 g) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 36 h. Then, isopropanol (25 mL) was added and the solution was stirred for further 30 min. Diethyl ether was added, allowing the formation of a precipitate (i.e., chromium salts). The filtrate was filtered thrice over three Celite[®] 545 pads to completely remove the salts and was concentrated. The resulting oil was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v) as the mobile phase, to give **153** as an orange oil (11.3 g, 65% over 3 steps). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.18-1.35 (m, 15H, $2\text{CH}_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.52 (s, 2H, OCH_2), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 4.59 (s, 2H, ArCH_2O), 5.19 (s, 2H, ArOCH_2Ar), 6.80 (s, 1H, ArH), 7.24-7.26 (m, 1H, ArH), 7.31-7.52 (m, 6H, $\text{ArH} + 5\text{ArH}_{\text{Bn}}$), 7.62 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH), 7.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 24.4 (2C), 28.4 (3C), 46.0, 50.5, 55.8, 70.3, 73.9, 78.7, 101.9, 104.4, 118.8, 119.8, 126.3, 128.0 (2C), 128.3, 128.9 (2C), 129.4, 129.8, 134.2, 137.3, 155.0, 156.9, 217.7; IR (KBr): 3415, 2958, 1685, 1607, 1508, 1462, 1384, 1284, 1249, 1207, 1098, 1027 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_5]^+$ 452.26, found 452.13; Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$: C, 77.39; H, 7.89. Found: C, 77.44; H, 7.65.

2-(6-(Benzyloxy)-4-methoxynaphthalen-2-yl)-3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-tetrahydrofuran-3-ol 154.

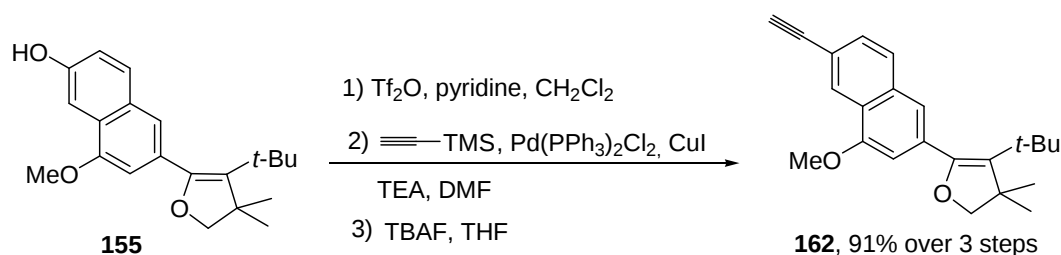
Ketone **153** (6.83g, 15.7 mmol) in solution in dry DMSO (30 mL) was mixed with a suspension of anhydrous *t*BuOK (4.40 g, 39.3 mmol, 2.5 eq.) in dry DMSO (20 mL) (i.e., a solution of dimethylpotassium) and stirred at room temperature for 24 h. Then, a saturated solution of NH₄Cl (20 mL) was carefully added to the reaction medium and the aqueous phase was extracted twice with AcOEt (50 mL). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was filtered over a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, affording **154** as a white solid and a single diastereoisomer (5.53 g, 81%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.99 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.20 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 3H, CH₃), 3.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, 0.5OCH₂), 4.03 (s, 3H, OCH₃), 4.20 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, 0.5OCH₂), 5.19 (s, 2H, ArCH₂O), 5.54 (s, 1H, ArCH), 6.96 (s, 1H, ArH), 7.22-7.28 (m, 1H, ArH), 7.33-7.53 (m, 6H, ArH + 5ArH_{Bn}), 7.64 (s, 1H, ArH), 7.72 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 20.5, 27.2 (2C), 28.3 (3C), 38.3, 48.4, 55.9, 70.4, 82.3, 84.7, 85.3, 101.8, 105.5, 120.0, 121.0, 126.6, 128.0 (2C), 128.3, 128.9 (2C), 129.7, 135.8, 137.2, 154.9, 157.2; IR (KBr): 3595, 2963, 2873, 1631, 1606, 1584, 1503, 1461, 1382, 1314, 1281, 1232, 1162, 1104, 1083, 1010 cm⁻¹; *R*_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₂₈H₃₅O₄]⁺ 435.25, found 435.20; Anal. Calcd for C₂₈H₃₄O₄: C, 77.39; H, 7.89. Found: C, 77.22; H, 7.68.

6-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-8-methoxynaphthalen-2-ol 155.

1) Bn deprotection. **154** (1.0 g, 2.3 mmol) was dissolved in AcOEt (25 mL). At 0 °C, Pd/C (10%, 600 mg) was added, the reaction medium was flushed with H₂ and stirred at room temperature for 16 h. The reaction mixture was filtered over a Celite[®] 545 pad and washed with AcOEt. The filtrate was concentrated, affording 3-*tert*-butyl-2-(6-hydroxy-4-

methoxynaphthalen-2-yl)-4,4-dimethyl-tetrahydrofuran-3-ol as a white solid (790 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 1.01 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.22 (s, 3H, CH_3), 1.47 (s, 3H, CH_3), 3.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 0.5OCH_2), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 4.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, 0.5OCH_2), 5.47 (s, 1H, ArCH), 7.06 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.14 (s, 1H, ArH), 7.43 (s, 1H, ArH), 7.47 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CD_3OD): δ 21.8, 28.3, 29.4 (3C), 39.7, 50.3, 56.8, 83.3, 86.9, 87.4, 105.6, 107.8, 120.3, 123.3, 129.1, 130.9, 131.2, 136.7, 156.0, 157.2; IR (KBr): 3534, 3152, 2971, 1634, 1607, 1588, 1527, 1469, 1406, 1372, 1333, 1281, 1245, 1213, 1188, 1170, 1096, 1051, 1006 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_4]^+$ 345.21, found 345.10; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$: C, 73.23; H, 8.19. Found: C, 72.89; H, 8.02.

2) Enol ether formation. The latter diol (100 mg, 0.29 mmol) was suspended in dry CH_2Cl_2 (3 mL) and cooled to 0 °C. Then, dry pyridine (117 μL , 1.45 mmol, 5 eq.) and SOCl_2 (421 μL , 5.81 mmol, 20 eq.) were added and the reaction medium was stirred at room temperature for 16 h. After cooling to 0 °C, the solution was diluted with CH_2Cl_2 and deionized water was carefully added. The organic phase was dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, affording **155** as a red solid (86 mg, 90%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.08 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (s, 6H, 2CH_3), 3.92 (s, 2H, OCH_2), 3.97 (s, 3H, OCH_3), 5.09 (s, 1H, OH), 6.69 (s, 1H, ArH), 7.07 (dd, $J = 2.6$ and 8.8 Hz, 1H, ArH), 7.30 (s, 1H, ArH), 7.47 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 27.2, 27.8 (2C), 32.8 (3C), 47.6, 55.8, 83.4, 104.6, 106.5, 118.5, 122.0, 126.3, 126.6, 129.4, 129.9, 131.1, 150.6, 153.9, 154.2; IR (KBr): 3308, 2960, 2871, 1600, 1524, 1474, 1392, 1362, 1298, 1268, 1236, 1213, 1169, 1095, 1029, 1006 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{O}_3]^+$ 327.20, found 327.23; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_3$: C, 77.27; H, 8.03. Found: C, 77.12; H, 7.87.

4-tert-butyl-5-(6-ethynyl-4-methoxynaphthalen-2-yl)-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran 162.

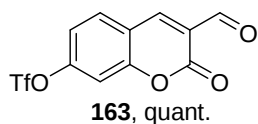
1) Conversion into trifluoromethylsulphonate derivative. Phenol **155** (536 mg, 1.64 mmol) was suspended in dry CH_2Cl_2 (16 mL) and the reaction medium was cooled to 0 °C. Dry pyridine (330 μL , 4.1 mmol, 2.5 eq.) and trifluoromethanesulfonic anhydride (i.e., triflic anhydride) (544 μL , 3.28 mmol, 2 eq.) were added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. After cooling to 0 °C, aq. HCl (10%) was added and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording the triflate derivative as an orange oil (750 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.08 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 6H, 2CH_3), 3.93 (s, 2H, OCH_2), 4.02 (s, 3H, OCH_3), 6.81 (s, 1H, ArH), 7.36 (dd, $J = 2.6, 9.0$ Hz, 1H, ArH), 7.41 (s, 1H, ArH), 7.84 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, ArH), 8.12 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 27.8 (2C), 32.9 (3C), 47.7, 56.1, 83.7, 107.5, 114.6, 120.7, 121.6, 125.6, 126.9, 130.6, 133.1, 135.8, 147.4, 149.8, 155.3 (CF_3 is missing); ^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -72.8; IR (neat): 2964, 2866, 1656, 1596, 1502, 1459, 1427, 1366, 1308, 1252, 1213, 1142, 1095, 1056 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v).

2) Sonogashira coupling. The triflate derivative (878 mg, 1.91 mmol) was dissolved in dry DMF (20 mL). (Trimethylsilyl)acetylene (2.73 mL, 19 mmol, 10 eq.), TEA (2.65 mL, 19 mmol, 10 eq.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (133 mg, 0.19 mmol, 0.1 eq.) and CuI (72 mg, 0.38 mmol, 0.2 eq.) were sequentially added and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h. The reaction medium was concentrated under reduced pressure and purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v) as the mobile phase, leading to the protected alkyne as a dark oil.

3) TMS deprotection. The latter compound was immediately dissolved in THF (20 mL) and TBAF solution (1.0 M in THF, 2.5 mL, 2.5 mmol, 1.3 eq.) was added. After 2 h at room temperature, the solution was concentrated under reduced pressure and the resulting oil was

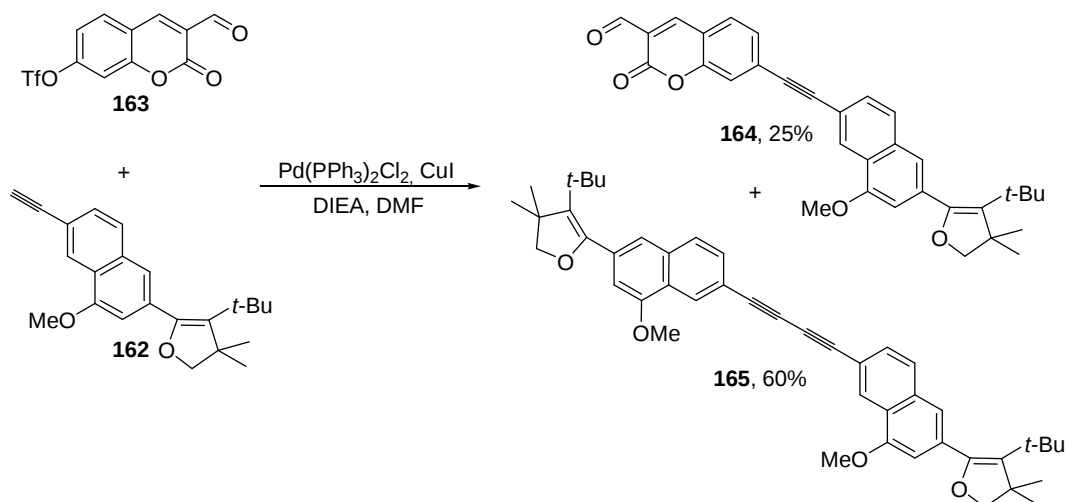
purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (9:1, v/v) as the mobile phase, to give **162** as an orange oil (582 mg, 91% over 2 steps). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.08 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 6H, 2CH_3), 3.13 (s, 1H, ArCCH), 3.93 (s, 2H, OCH_2), 4.01 (s, 3H, OCH_3), 6.74 (s, 1H, ArH), 7.35 (s, 1H, ArH), 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, ArH), 8.42 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 27.2, 27.8 (2C), 32.9 (3C), 47.6, 56.0, 77.5, 83.6, 84.6, 106.7, 119.3, 121.8, 125.0, 126.5, 127.0, 128.1, 129.7, 133.7, 135.3, 150.2, 155.0; IR (KBr): 3297, 2958, 2867, 1717, 1687, 1626, 1594, 1572, 1460, 1396, 1291, 1236, 1196, 1172, 1103, 1052, 1014 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{O}_2]^+$ 335.20, found 335.20; Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_2$: C, 82.60; H, 7.84. Found: C, 82.84; H, 7.67.

3-Formyl-7-(trifluoromethanesulfonyloxy)-coumarin **163**.

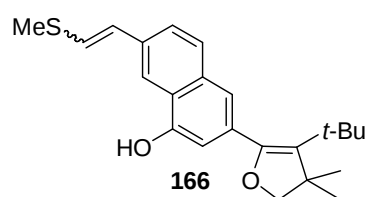


3-Formyl-7-hydroxycoumarin (163 mg, 0.86 mmol, prepared in the same manner than in the synthesis of **92**) was suspended in dry CH_2Cl_2 (12 mL). At 0 °C, dry pyridine (168 μL , 2.08 mmol, 2 eq.) and triflic anhydride (208 μL , 1.24 mmol, 1.2 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature for 16 h. After cooling to 0 °C, aq. HCl (10%) was added and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording **163** as a grey solid (275 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.29-7.35 (m, 2H, ArH), 7.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, ArH), 8.53 (s, 1H, ArH), 10.23 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 111.1, 116.8/121.0 ($-\text{CF}_3$ coupling, q, $J = 317$ Hz), 118.3, 119.0, 122.6, 132.9, 144.5, 153.1, 156.3, 159.2, 187.4; ^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -73.0; IR (KBr): 3054, 2884, 1738, 1703, 1616, 1572, 1492, 1422, 1355, 1275, 1252, 1248, 1220, 1210, 1181, 1136, 1111, 1033 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 7:3, v/v).

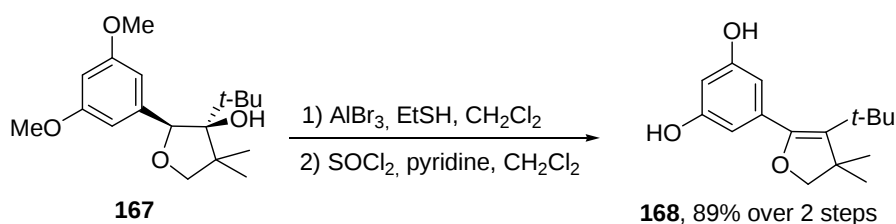
7-(2-(6-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-8-methoxynaphthalen-2-yl)ethynyl)-2-oxo-2*H*-chromene-3-carbaldehyde **164.**



Alkyne **162** (50 mg, 0.15 mmol) and triflate **163** (60 mg, 0.19 mmol, 1.25 eq.) were dissolved in dry DMF (2 mL). DIEA (78 μ L, 0.45 mmol, 3 eq.), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (11 mg, 0.015 mmol, 0.1 eq.) and CuI (6 mg, 0.032 mmol, 0.2 eq.) were sequentially added, allowing the reaction mixture to become instantaneously dark. The reaction medium was then degassed three times *via* the freeze-thaw method and was heated at 80 °C for 1 h. Two new intense spots appeared according to the TLC analysis (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v). DMF was thus removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (95:5, v/v) as the mobile phase, to give the desired coupling product **164** and **165** identified as a Glaser-type homocoupling product. **164** (yellow oil, 19 mg, 25%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.32 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 3.93 (s, 2H, OCH₂), 4.04 (s, 3H, OCH₃), 6.77 (s, 1H, ArH), 7.35 (s, 1H, ArH), 7.48-7.70 (m, 4H, ArH), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, ArH), 8.39 (s, 1H, ArH), 8.50 (s, 1H, ArH), 10.26 (s, 1H, CHO); *R*_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for [C₃₃H₃₁O₅]⁺ 507.22, found 507.27. **165** (yellow oil, 60 mg, 60%): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.09 (s, 18H, 2C(CH₃)₃), 1.39 (s, 12H, 4CH₃), 3.94 (s, 4H, 2OCH₂), 4.02 (s, 6H, 2OCH₃), 6.76 (s, 2H, 2ArH), 7.32-7.40 (m, 2H, 2ArH), 7.56 (dd, *J* = 1.5, 8.5 Hz, 2H, 2ArH), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 2ArH), 8.49 (s, 2H, 2ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ 27.3 (4C), 27.8, 32.9 (6C), 47.7 (2C), 56.1 (2C), 74.7 (2C), 82.9 (2C), 83.6 (2C), 106.9 (2C), 119.0 (2C), 121.8 (2C), 125.1 (2C), 126.6 (2C), 127.8 (2C), 128.3 (2C), 129.6 (2C), 133.9 (2C), 135.5, 135.7, 150.1 (2C), 155.1 (2C); *R*_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 95:5, v/v).

3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-(2-(methylthio)vinyl)naphthalen-1-ol 166.

Alkyne **162** (125 mg, 0.37 mmol) was dissolved in dry DMF (2 mL). Sodium thiomethoxide (524 mg, 7.47 mmol, 20 eq.) was added and the reaction medium was heated at reflux for 2 h. AcOEt (10 mL) and a sat. solution of NH_4Cl (5 mL) were added and the aqueous phase was extracted with AcOEt. The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, affording **166** as an orange oil (mixture Z/E (2/1) of isomers, 52 mg, 37%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35 (s, 6H, 2CH_3), 2.38 (s, 1H, 0.33SCH_3), 2.41 (s, 2H, 0.67SCH_3), 3.91 (s, 2H, OCH_2), 6.26 (d, $J = 11.0$ Hz, 0.67H, $0.67\text{CH}_3\text{SCH}$), 6.43 (d, $J = 15.5$ Hz, 0.33H, 0.33ArCH), 6.55 (d, $J = 11.0$ Hz, 0.67H, 0.67ArCH), 6.72 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, ArH), 6.88 (d, $J = 15.5$ Hz, 0.33H, $0.33\text{CH}_3\text{SCH}$), 7.24-7.31 (m, 1H, ArH), 7.57-7.72 (m, 2H, 2ArH), 8.17 (s, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 19.3, 27.2, 27.7 (2C), 32.8 (3C), 47.5, 83.4, 111.1, 111.3, 118.8, 121.6, 121.9, 122.0, 124.0, 124.4, 124.8, 125.3, 125.7, 126.3, 126.6, 127.8, 128.0, 128.5, 129.7, 133.0, 133.3, 133.4, 133.7, 134.5, 150.0, 151.6; IR (KBr): 2958, 2922, 2869, 1656, 1626, 1600, 1570, 1482, 1398, 1364, 1315, 1274, 1212, 1169, 1051, 1014 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{S}]^+$ 369.19, found 369.13.

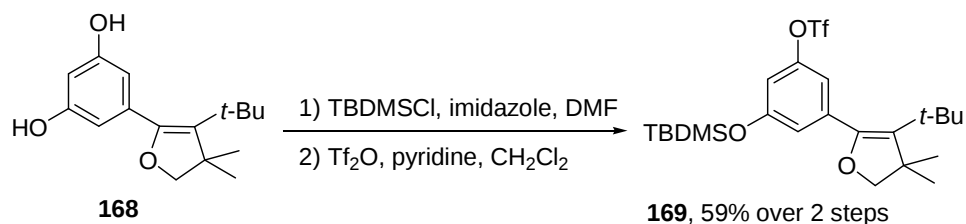
5-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)benzene-1,3-diol 168.

1) Deprotection. Aluminium powder (2.6 g, 97 mmol, 10 eq.) was suspended in dry CH_2Cl_2 (100 mL). Bromine (5 mL, 97 mmol, 10 eq.) was added and the reaction medium was heated at reflux until a white solid was formed and the initial red color disappeared (~ 45 min). Then, the flask was cooled at room temperature, a mixture of tertiary alcohol **167** (3.0 g, 9.7 mmol)

and ethanethiol (13 mL, 180 mmol, 18.5 eq.) in solution in dry CH_2Cl_2 (70 mL) was added and the reaction was stirred for 30 min. After cooling to 0 °C, a 1.0 M aq. HCl solution was carefully added and the aqueous phase was extracted with AcOEt. The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure, affording the bisphenol as a pale green solid which was pure enough to be used directly in the next step. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.02 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.38 (s, 3H, CH_3), 3.38 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 0.5OCH_2), 4.01 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, 0.5OCH_2), 5.24 (s, 1H, ArCH), 6.33 (s, 1H, ArH), 6.52 (s, 2H, 2ArH), 8.20 (s, 2H, 2OH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, acetone- d_6): δ 21.4, 27.6, 29.1 (3C), 39.3, 49.5, 82.9, 85.3, 86.2, 103.7, 109.5 (2C), 144.7, 159.8 (2C); IR (KBr): 3600, 3360, 3079, 2989, 2967, 1630, 1610, 1597, 1511, 1490, 1393, 1370, 1353, 1328, 1290, 1208, 1171, 1088, 1071, 1012 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 1:1, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4]^-$ 279.16, found 279.53; Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_4$: C, 68.54; H, 8.63. Found: C, 68.40; H, 8.47.

2) Enol ether formation. The latter alcohol was suspended in dry CH_2Cl_2 (100 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Then, dry pyridine (3.9 mL, 48.5 mmol, 5 eq.) and SOCl_2 (14 mL, 194 mmol, 20 eq.) were added and the solution was stirred at room temperature for 16 h. After cooling to 0 °C, deionized water was carefully added and the aqueous phase was extracted by CH_2Cl_2 . The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (7:3, v/v) as the mobile phase, affording **168** as a beige solid (2.27 g, 89% over 2 steps). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.07 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.31 (s, 6H, 2CH_3), 3.86 (s, 2H, OCH_2), 5.09 (s, 2H, 2OH), 6.25 (s, 1H, ArH), 6.35 (s, 2H, 2ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, acetone- d_6): δ 28.4 (2C), 33.5 (3C), 48.3, 84.1, 103.8, 110.2 (2C), 125.7, 139.9, 152.4, 159.5 (2C); IR (KBr): 3391, 2991, 2961, 2870, 1662, 1618, 1598, 1507, 1471, 1365, 1339, 1302, 1199, 1163, 1153, 1087, 1048, 1031 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 6:4, v/v); MS (ESI, positive mode): calcd for $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_3]^+$ 263.16, found 263.27; Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_3$: C, 73.25; H, 8.45. Found: C, 72.93; H, 8.21.

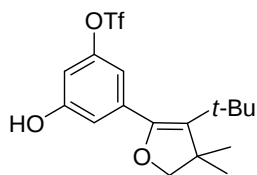
3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-5-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)phenyl trifluoromethanesulfonate **169.**



1) Mono-protection. Phenol **168** (2.15 g, 8.20 mmol) was dissolved in dry DMF (15 mL). At 0 °C, imidazole (676 mg, 9.84 mmol, 1.2 eq.) and TBDMSCl (618 mg, 4.1 mmol, 0.5 eq.) were added and the reaction medium was stirred at room temperature for 2 h. Then, the reaction medium was concentrated, CH₂Cl₂ was added and the solution was washed with deionized water. The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (gradient from 9/1 to 6:4, v/v) as the mobile phase, affording mono-protected product along with recovery of starting material **168** and the bis-silyl protected product and which were both recycled (59% brsm). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.18 (s, 6H, 2SiCH₃), 0.96 (s, 9H, C(CH₃)₃TBDMS), 1.07 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.31 (s, 6H, 2CH₃), 3.85 (s, 2H, OCH₂), 4.78 (s, 1H, OH), 6.28-6.30 (m, 1H, ArH), 6.34-6.38 (m, 2H, 2ArH); R_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 8:2, v/v).

2) Conversion into trifluoromethanesulfonate derivative. Mono-protected phenol (450 mg, 1.19 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (12 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Then, dry pyridine (192 μL, 2.38 mmol, 2 eq.) and triflic anhydride (297 μL, 1.79 mmol, 1.5 eq.) were sequentially added and the reaction medium was stirred at room temperature for 2 h. Aq. HCl (10%) was added and the aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were washed with deionized water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure, affording **169** which was directly used in the next step. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.21 (s, 6H, 2SiCH₃), 0.98 (s, 9H, C(CH₃)₃TBDMS), 1.04 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.32 (s, 6H, 2CH₃), 3.87 (s, 2H, OCH₂), 6.68-6.73 (m, 1H, ArH), 6.78 (s, 1H, ArH), 6.84 (s, 1H, ArH); ¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ -4.0 (2C), 18.5, 25.9 (3C), 27.6 (2C), 32.7 (3C), 47.6, 83.6, 113.4, 116.2, 122.2, 127.3, 128.8, 132.6, 139.3, 148.0, 149.6, 156.8; ¹⁹F NMR (282.5 MHz, CDCl₃): δ -72.7; R_f = 0.5 (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v).

3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-5-hydroxyphenyl trifluoromethanesulfonate **171.**



171, quant. yield

169 (201 mg, 0.40 mmol) was dissolved in THF. TBAF solution (1.0 M in THF, 600 μ L, 0.60 mmol, 1.5 eq.) was added and the solution was stirred for 5 min at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure and the product was purified by chromatography on a silica gel column using a mixture of cyclohexane/AcOEt (8:2, v/v) as the mobile phase, affording **171** as an orange oil (155 mg, quant. yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.05 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 6H, 2CH_3), 3.88 (s, 2H, OCH_2), 6.70-6.83 (m, 3H, 3ArH); ^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ 25.2, 27.5 (2C), 32.7 (3C), 47.6, 83.5, 109.0, 114.9, 116.7/120.9 ($-\text{CF}_3$ coupling, q, $J = 317$ Hz), 117.7, 127.5, 139.1, 147.8, 149.8, 157.6; ^{19}F NMR (282.5 MHz, CDCl_3): δ -72.8; IR (KBr): 2959, 1601, 1583, 1424, 1361, 1329, 1243, 1207, 1138, 1104, 1046 cm^{-1} ; $R_f = 0.5$ (cyclohexane/AcOEt, 9:1, v/v); MS (ESI, negative mode): calcd for $[\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{F}_6\text{O}_{10}\text{S}_2]^-$ 787.20, found 787.33.

IV ENZYMATIC KINETICS

1 Fluorogenic probes

General procedure for the *in vitro* cleavage PGA fluorogenic probes by immobilized penicillin amidase.

1) Fluorescence assay. A solution of PGA fluorogenic probe (final concentration: 2.6 μ M for **53** and 2.2 μ M for **56**) was prepared with a mixture of phosphate buffer (PB, 50 mM, pH 7.4) and acetone (PB/acetone, 8:2, v/v). 1.25 mL of this solution was transferred into a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma[®], 104F-QS, 10 x 4 mm, 1400 μ L) and immobilized penicillin amidase (6.4 U, 64 mg) was added. The resulting mixture was incubated at 37 °C. Fluorescence emission of the enzymatically released phenol-based fluorophore (*i.e.*, 7-hydroxycoumarin **52** at λ = 460 nm or DAO **46'** at λ = 651 nm) was monitored over time with measurements every 6 s, after excitation at λ = 360 nm (for **53**) or 638 nm (for **56**). The same conditions were applied to the control sample without adding the enzyme and no significant fluorescence signal was detected.

2) Characterization of cleavage by RP-HPLC. PGA fluorogenic probe was dissolved (final concentration: 1.65 mM for **53** and 1.2 mM for **56**) in a mixture of phosphate buffer and acetone (PB/acetone 8:2, v/v, 2 mL). For the fluorogenic probe **56**, 2,6-di-*O*-methyl- β -cyclodextrin (46 mg, 35 μ mol) was added to improve the solubility in the aq. buffer. Immobilized penicillin amidase (16.7 U, 167 mg for **53** or 15.0 U, 150 mg for **56**) was added and the resulting suspension was stirred at 37 °C for 24 h. Periodically, 100 μ L of the crude enzymatic mixture were sampled (the biocatalyst was filtered off), dissolved with 300 μ L of triethylammonium acetate buffer (TEAA, 100 mM, pH 7.0) and analyzed by RP-HPLC (system A, injection volume: 10 μ L). Quantification of **52/53** (or **46'/56**) was achieved by measurement of the corresponding peak areas at t_R = 15.6 and 29.3 min (or t_R = 21.2 and 31.5 min).

General procedure for the *in vitro* cleavage of latent blue and far-red fluorophores 63 and 65 by recombinant human caspase-3.

1) Fluorescence assay. A solution of latent fluorophore (final concentration : 3.0 μM for **63** and 23.0 μM for **65**) was prepared with the following caspase-3 buffer: 100 mM NaCl, 40 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose and 0.1% (w/v) CHAPS, pH 7.4. 50 μL of this solution were transferred into an ultra-micro fluorescence cell (Hellma[®], 105.51-QS, 3 x 3 mm, 45 μL), human recombinant caspase-3 (1 μL , $1.6 \cdot 10^3$ U for **63** and 2 μL , $3.2 \cdot 10^3$ U for **65**) was added and the resulting mixture was incubated at 37 °C. Fluorescence emission of the enzymatically released phenol-based fluorophore (*i.e.*, 7-hydroxycoumarin **52** at $\lambda = 460$ nm or DAO **46'** at $\lambda = 651$ nm) was monitored over time with measurements every 5 s, after excitation at $\lambda = 360$ nm (for **52**) or 638 nm (for **46'**). The same conditions were applied to the control sample solution without adding enzyme. No significant fluorescence signal was detected.

2) Determination of the kinetic parameters for the caspase-3 hydrolysis of 63. Probe **63** was diluted in caspase-3 buffer at the following concentrations 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.125 μM and introduced into a black clear-bottom 96-multiwell plate. Then 1 pmol of recombinant human caspase-3 pre-heated during 15 min at 37 °C was added (final concentration 20 nM). The reaction was monitored with FlexStation for 2 h with measurements every 30 s ($\lambda_{\text{Ex./Em.}} = 370/460$ nm, 37 °C, cut-off filter $\lambda = 455$ nm). A calibration curve using **52** was used to convert relative fluorescence unit in mole of transformed product. Initial velocity V_0 was measured for each substrate concentration and K_M , V_{max} , k_{cat} and k_{cat}/K_M values were determined with the double-inverse Lineweaver-Burk relationship. The determination of the kinetic parameters was performed in triplicate; the kinetic constants presented are an average of the values found (Figure 4-1).

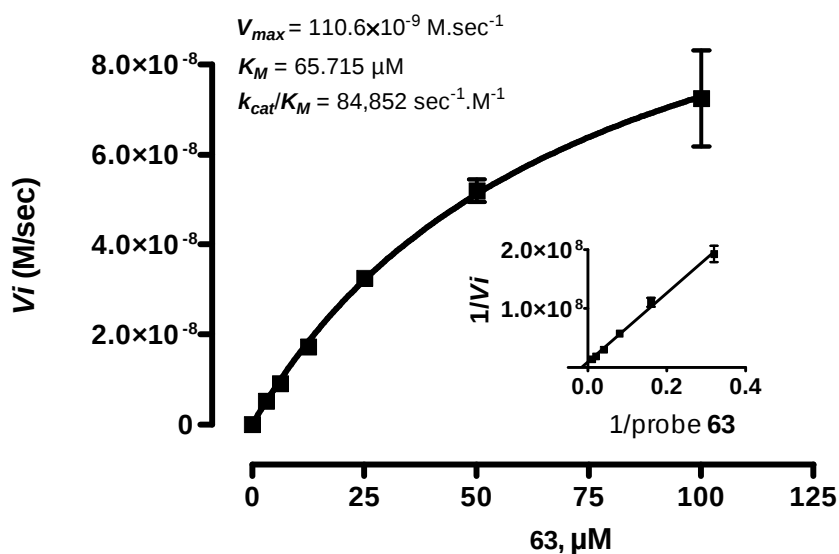


Figure 4-1. Michaelis-Menten plot for the hydrolysis of pro-fluorophore **63** (100 μM $\rightarrow$ 3.12 μM) by caspase-3.

Procedure for the *in vitro* cleavage PGA fluorogenic probe **94** by penicillin amidase.

Fluorescence assay: A solution of PGA fluorogenic probe **94** (final concentration: 3.7 μM) was prepared in phosphate buffer (PB, 50 mM, pH 7.5). 3 mL of this solution was transferred into a quartz fluorescence cell (Varian Fluorescence Cell Open Top, 10 mm) and 10 μL of a solution of PGA in phosphate buffer (5.0 mg of PGA (0.63 U/mg) in 3 mL of PB) was added. The resulting mixture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. Fluorescence emission of the enzymatically released phenol-based fluorophore **89** was monitored at $\lambda = 632 \text{ nm}$ (emission slit = 5 nm) over time with measurements recorded every 30 s, after excitation at $\lambda = 560 \text{ nm}$ (excitation slit = 5 nm). The same conditions were applied to the control sample without adding the enzyme and no significant fluorescence signal was detected.

2 Chemiluminescent probes

In vitro cleavage of chemiluminescent probe **102** by recombinant human caspase-3.

1) Enzymatic assay. Dioxetane **102** was dissolved in caspase-3 buffer (200 μL , 10% (w/v) sucrose, 50 mM PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) CHAPS, pH 7.4). 1 μL of recombinant human caspase-3 ($1.6 \cdot 10^{-3}$ U) was added and the enzymatic reaction mixture was incubated for an overall time of 120 min. Every 15 min, an aliquot (20 μL) was sampled and added onto an alkaline caspase-3 buffer (30 μL , same caspase-3 buffer

at pH 12.3, final concentration 30 μ M) containing the enhancers (CTAB, 2 mM, 5-(stearyl amino)fluorescein 0.18 mM). Luminescence measurements were recorded (into an ultra-micro fluorescence cell Hellma[®], 105.51-QS, 3 x 3 mm, 45 μ L) for each aliquot between 490 and 570 nm during 10 min. A detection of light at 530 nm corresponding to the emission wavelength of the fluorescein was observed, highlighting the efficient energy transfer between the dioxetane (whose normal emission wavelength is 460 nm) and the fluorophore. A control experiment was performed without adding caspase-3 enzyme and as expected, no light could be detected during the 2 h of this experiment.

2) Caspase-3 detection limit. In order to determine the detection limit of the chemiluminescent probe **102**, a decreasing amount of caspase-3 enzyme was incubated during 60 min with a solution of **102** (30 μ M). The total light emission was recorded between 490 and 570 nm during 10 min and reported as a function of the enzyme concentration. A detection limit of around 1 pmol was observed (Figure 4-2).

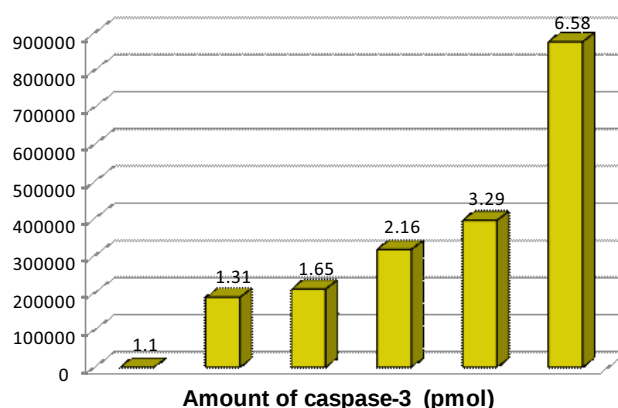


Figure 4-2. Caspase-3 detection limit by probe **102**.

3) Representative control experiments with other peptidases. In order to demonstrate the specificity of the cleavage by caspase-3 enzyme, the chemiluminescent probe **102** was incubated with human recombinant caspase-9 (1 μ L, 2.38 U in a caspase-9 buffer: 0.1 M MES, 10% PEG, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, pH 6.5) and *A. faecalis* recombinant PGA (1.2 mg, 1.9 U in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5) for 60 min. Then, the enzymatic reaction mixture was added onto the alkaline caspase-3 buffer (pH 12.3, final concentration of **102** 30 μ M) containing the enhancers (CTAB, 2 mM, 5-(stearyl amino)fluorescein 0.18 mM) and light emission was recorded (into an ultra-micro fluorescence cell Hellma[®], 105.51-QS, 3 x 3 mm, 45 μ L) between 490 and 570 nm. No light could be detected for both enzymes.

Chapitre 5

Conclusions - Perspectives

Conclusions - Perspectives

I CONCLUSIONS

L'imagerie optique est une méthode d'imagerie moléculaire non invasive extrêmement sensible et capable de visualiser la dynamique biologique des organismes vivants à un coût moindre par rapport aux méthodes IRM et radiochimiques actuellement utilisées. Son émergence depuis quelques années est en train de révolutionner le diagnostic pré-clinique et le développement des médicaments. Dans ce contexte, un aspect fondamental de ce domaine est la capacité à disposer d'outils spécifiques capables de mettre en évidence un processus biologique ciblé, ou son dérèglement.

Ainsi, le travail effectué pendant cette thèse a consisté en la mise au point d'une méthode générale pour la synthèse de sondes intelligentes activables visant à la détection de peptidases. Le principe de ces sondes réside en la libération dans le milieu d'une espèce phénolique qui émet de la lumière suite au clivage par la peptidase cible.

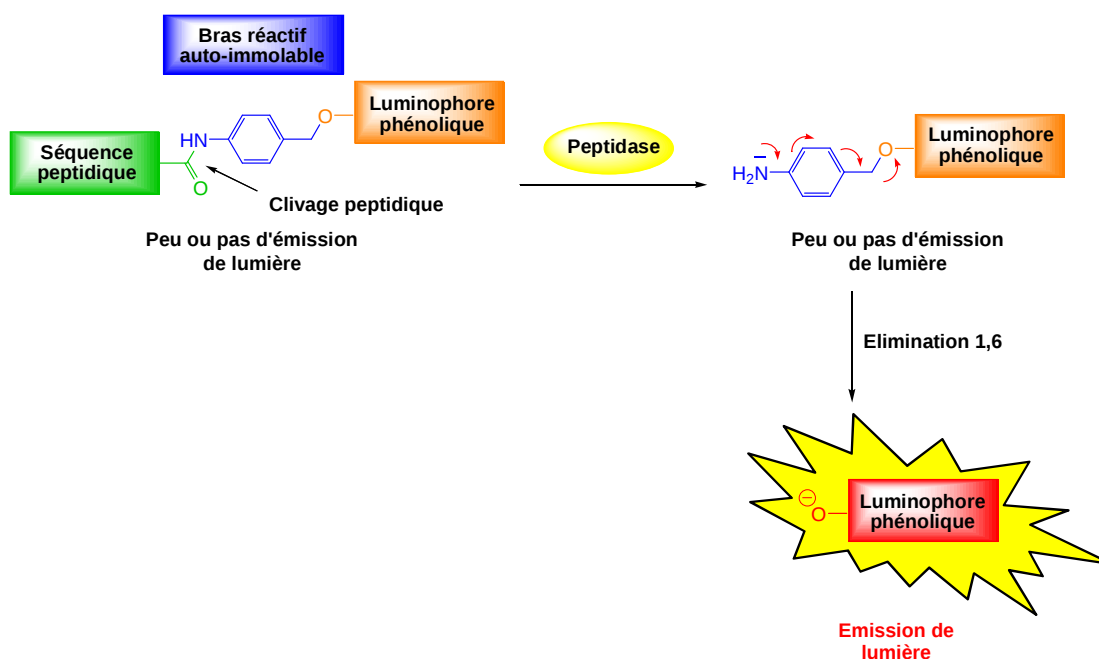


Schéma 5-1. Principe du bras réactif auto-immolable pour la détection de peptidases.

Pour cela, une stratégie impliquant un bras réactif auto-immolable a été utilisée afin de transformer l'apparition d'une amine aliphatique (issue de la coupure de la liaison peptidique) en la libération d'un phénol luminescent (Schéma 5-1).

Dans une première partie de la thèse, deux classes de sondes intelligentes activables ont été développées. Pour cela, deux types de phénols ont été utilisés :

- Tout d'abord, des fluorophores à phénol ont été utilisés. Ces fluorophores ont la particularité d'avoir une émission de fluorescence fortement diminuée lorsque le fluorophore est relié au bras réactif *via* le phénol, alors qu'en présence de la peptidase cible, le phénol est libéré et le fluorophore retrouve l'intégralité de son émission.
- Cette stratégie a ensuite été étendue avec succès à la synthèse de sondes chimiluminescentes. Dans ce cas, un motif 1,2-dioxétane dont la chimiluminescence est déclenchée lorsqu'il est greffé à proximité d'une fonction phénol libre, a été utilisé. Le même bras réactif sert à masquer le phénol et le clivage enzymatique libère celui-ci, ce qui engendre une espèce chimique à l'état excité. Son retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission de lumière (Schéma 5-2).

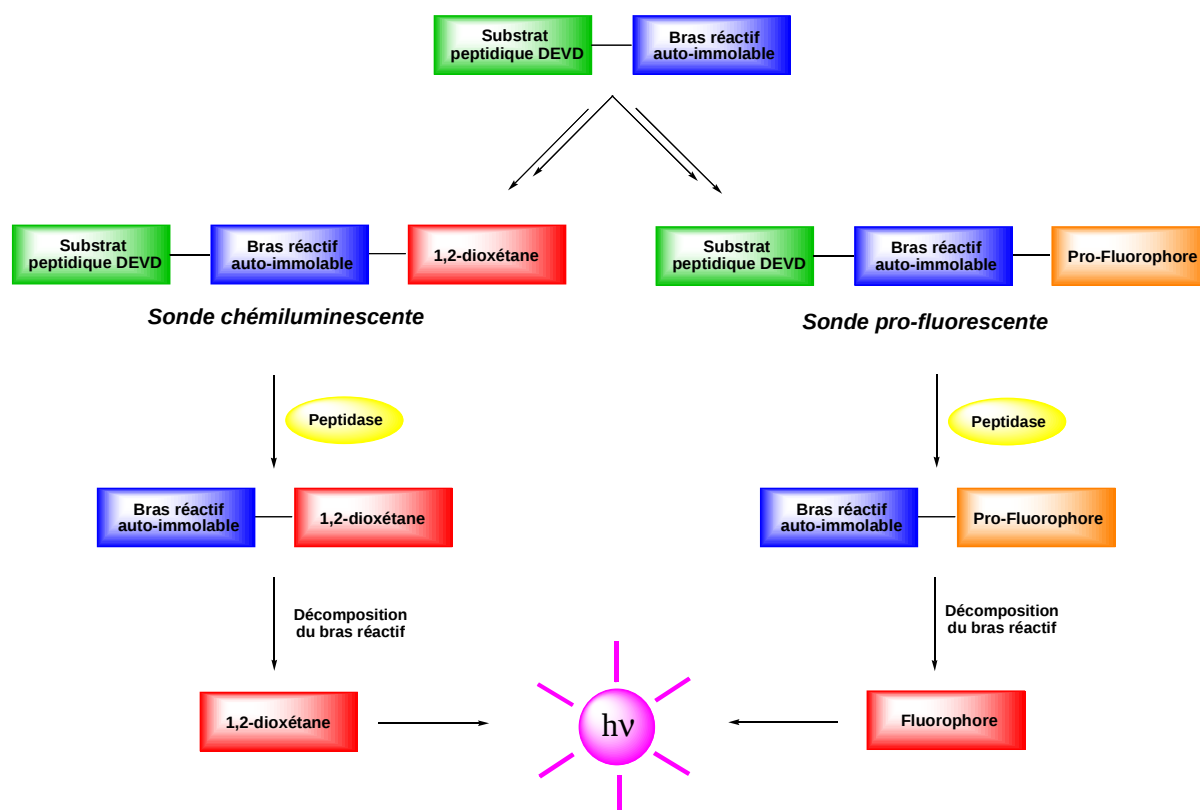


Schéma 5-2. Stratégie générale permettant la détection de peptidases.

La détection d'une peptidase, la caspase-3, a particulièrement attiré notre attention. Son substrat, le térapeptide DEVD, a été préparé et le composé **36** possédant ses chaînes latérales protégées par des groupements TMSE a été synthétisé. Ce térapeptide a servi d'intermédiaire commun pour la mise au point de sondes pro-fluorescentes et chémiluminescente. Deux aspects décisifs concernant le développement de ces sondes sont l'utilisation du bras réactif PABA et sa connexion au phénol *via* une liaison éther afin d'obtenir des sondes stables en milieu aqueux et lors des conditions de synthèse.

Ainsi, deux sondes pro-fluorescentes **63** et **65**, émettant respectivement dans le bleu et le rouge, et une sonde chémiluminescente **102** émettant dans le bleu ont été synthétisées (Schéma 5-3).

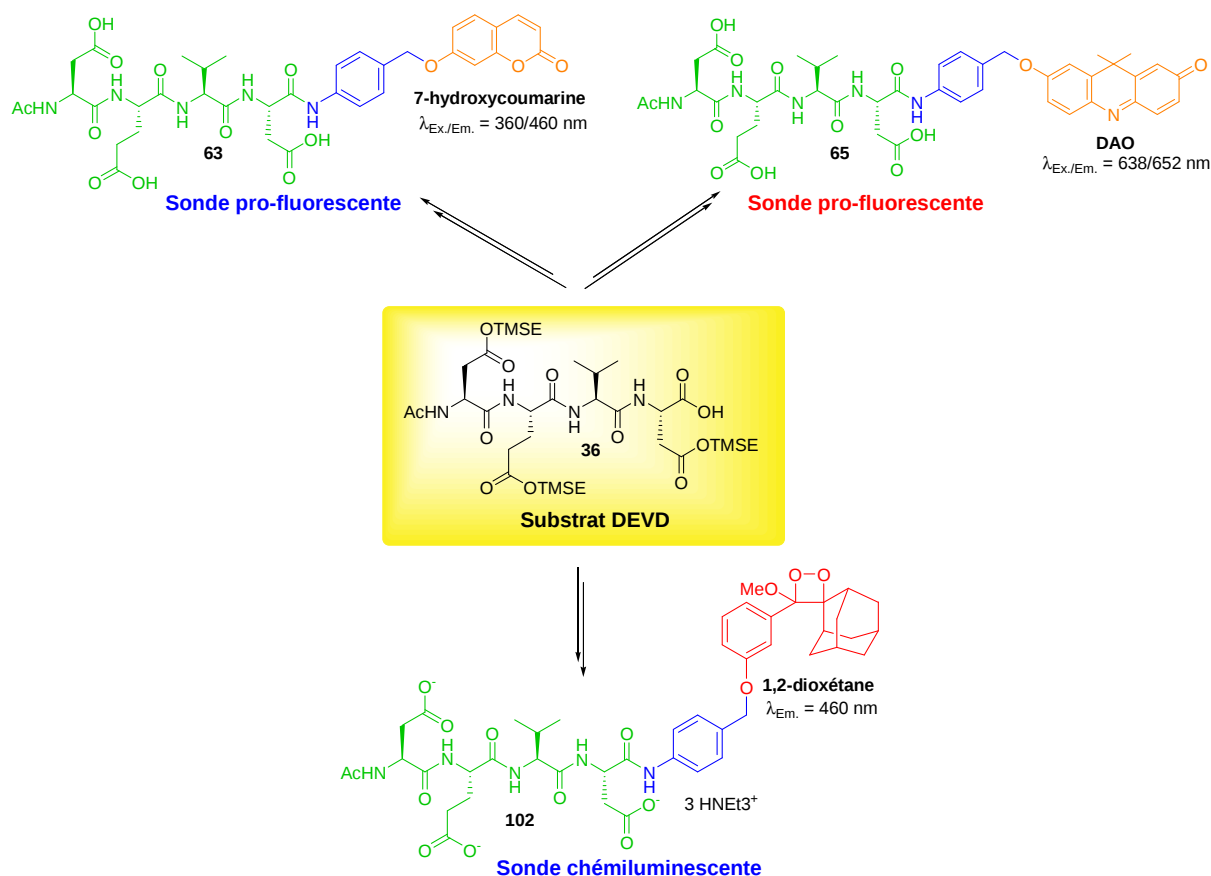


Schéma 5-3. Sondes pro-fluorescentes et chémiluminescente pour la détection de la caspase-3, synthétisées à partir du térapeptide commun **36**.

Il a été montré que la sonde pro-fluorescente **63** était efficacement clivée par la caspase-3, ce qui a permis de valider le principe de nos sondes pour la détection de cette enzyme. La sonde pro-fluorescente **65**, portant le fluorophore DAO qui émet dans le rouge, a ensuite été synthétisée afin d'étendre la détection de la caspase-3 à l'imagerie *in vivo*. Malheureusement,

l'émission de ce fluorophore s'est avérée fortement diminuée par la présence de thiols dans le milieu. L'utilisation de cette sonde en milieu biologique n'a donc pas été possible.

Le clivage de la sonde chémiluminescente **102** a également été effectué en présence de caspase-3. L'observation alors d'une émission de lumière spontanée (sans la nécessité d'exciter la molécule de façon photonique) a permis de valider l'efficacité de notre stratégie pour la détection de peptidases par chémiluminescence. Cependant, la visualisation de l'émission n'a été possible qu'en présence d'additifs (tensio-actif et fluorescéine) afin d'amplifier le signal, ce qui limite pour l'instant l'utilisation de cette sonde.

Une deuxième partie de la thèse a ensuite consisté en l'extension de l'utilisation de ces sondes à l'imagerie *in vivo*. Pour cela, des nouveaux pro-fluorophores et des 1,2-dioxétanes originaux ont été développés. Afin de remplir les pré-requis nécessaires à l'imagerie *in vivo*, des pro-fluorophores hydrosolubles émettant entre 620 et 720 nm et possédant un large déplacement de Stokes (60 - 140 nm) ont été synthétisés. Leur structure consiste en des hybrides hémicyanine-coumarine et contrairement à DAO, ils ont montré une insensibilité à la présence de thiols dans le milieu (Figure 5-1 a). Leur caractère pro-fluorescent a été mis en évidence par la synthèse d'une sonde pour la détection d'une peptidase modèle, la PGA (Figure 5-1 b).

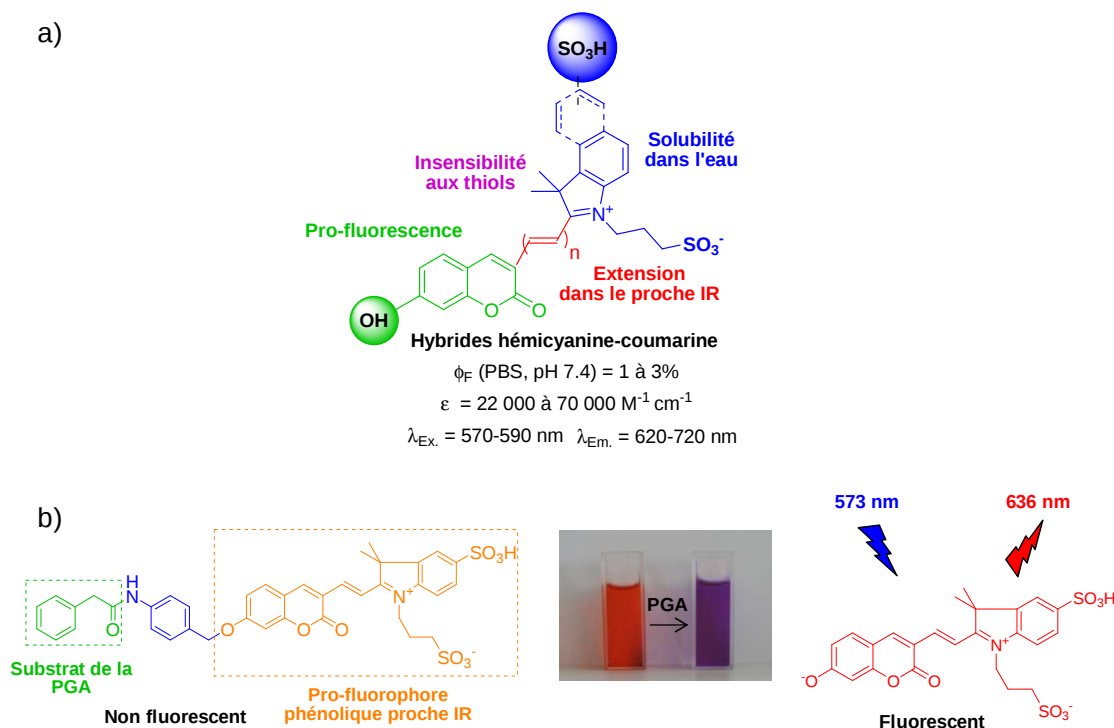


Figure 5-1. a) Pro-fluorophores à phénol hydrosolubles émettant dans le rouge et insensibles aux thiols ; b) Sonde pour la détection de la PGA mettant en évidence la pro-fluorescence des hybrides hémicyanine-coumarine.

Toutefois, les rendements quantiques de ces structures se sont avérés assez modestes (1 - 3%) et des modulations de la structure seront nécessaires afin d'en améliorer l'efficacité d'émission en particulier en conditions physiologiques.

Parallèlement, des efforts ont été dirigés vers la modification de la structure des 1,2-dioxétanes afin : 1) d'augmenter leur stabilité ; 2) de déplacer leur longueur d'onde d'émission dans le rouge ; 3) d'améliorer leur émission en milieu aqueux pour s'affranchir de l'ajout d'additifs.

Ainsi, il a été envisagé de greffer un fluorophore sur la structure du 1,2-dioxétane par l'intermédiaire d'une triple liaison. L'objectif est d'obtenir une émission de lumière accrue grâce à un transfert d'énergie à travers la triple liaison entre la source d'énergie (le 1,2-dioxétane) et l'amplificateur de l'émission (le fluorophore ; **138**, figure 5-2).

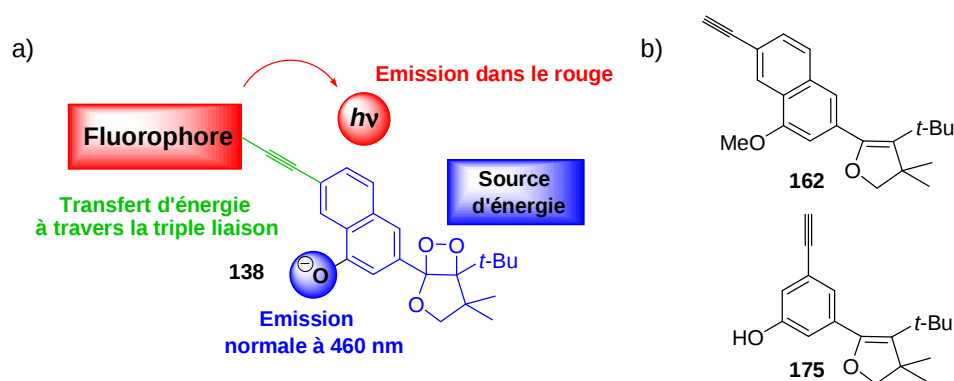


Figure 5-2. a) Principe des nouveaux 1,2-dioxétanes utilisant un transfert d'énergie à travers les liaisons ; b) Structures synthétisées ou en cours de synthèse pour obtenir ceux-ci.

Pour parvenir à cet objectif, le composé **162** possédant la triple liaison désirée et l'éther d'énol précurseur du 1,2-dioxétane a été synthétisé. Malheureusement, le groupement méthoxy protégeant le phénol déclencheur de la chimiluminescence n'a pas pu être retiré de la structure. Toutefois, des premiers essais d'introduction de fluorophores sur ce composé (*i.e.*, un anthracène ou une coumarine) ont montré des résultats prometteurs. A titre de comparaison, un travail similaire a été effectué sur une structure phénolique plus simple. Le précurseur du composé cible **175** a pu être synthétisé mais l'introduction de la triple liaison par couplage pallado-catalysé n'a pas encore pu être effectuée à cause d'un manque de réactivité.

correspondants et la longueur d'onde d'émission ainsi que l'efficacité de l'émission de lumière pourront être déterminés. Afin de comparer ces résultats avec une structure plus simple, le composé **175** pourra être également synthétisé et les 1,2-dioxétanes obtenus pourront être comparés avec les molécules précédentes (Figure 5-4).

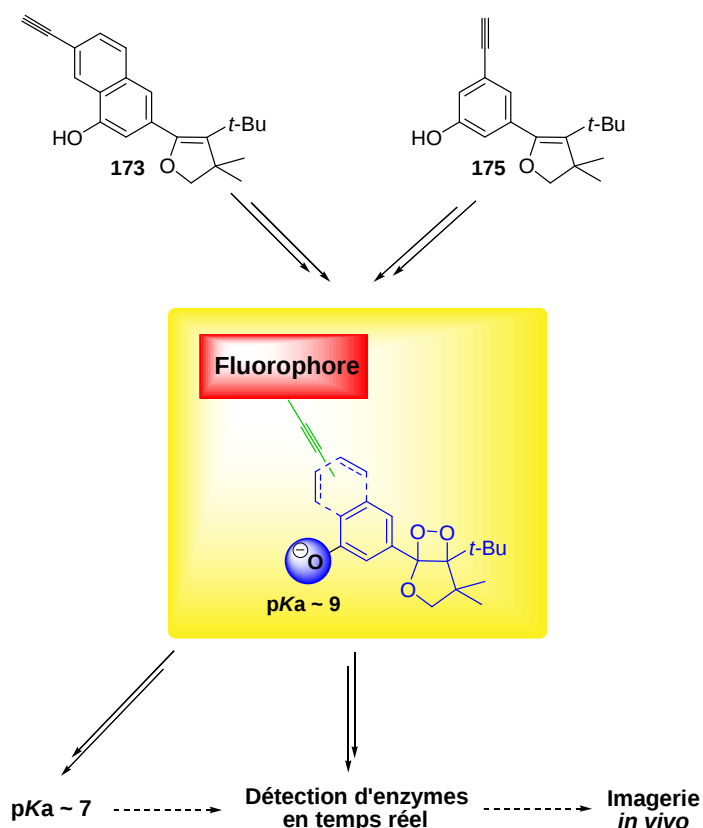


Figure 5-4. Synthèse, applications et perspectives pour les 1,2-dioxétanes.

Les espèces les plus intéressantes pourront ensuite être utilisées pour la détection d'enzymes en temps réel. L'application la plus immédiate serait d'introduire un groupement phosphate sur le phénol déclencheur afin de détecter la phosphatase alcaline dont le pH d'activité optimal se situe autour de 10.0. Pour des enzymes opérant à un pH inférieur (pH ~ 7.0), une modulation de la structure du noyau aromatique sera nécessaire afin de diminuer le pKa du phénol déclencheur. Parmi les différentes possibilités, des groupements électroattracteurs (*e.g.*, F, Cl, CF₃, ...) pourraient être introduits sur la structure ; un thiophénol dont le pKa se situe autour de 7.0 pourrait être utilisé ; un 1,2-dioxétane pourrait également être introduit sur un cycle aromatique possédant un phénol dont le pKa est naturellement inférieur à celui d'un phénol classique (*e.g.*, la plupart des pro-fluorophores à phénol). Ces modulations de pKa devraient permettre d'étendre la gamme des enzymes potentiellement détectables (notamment les peptidases) et d'envisager l'utilisation de ces sondes chémiluminescentes *in vivo*.

L'imagerie optique est actuellement en train de révolutionner le diagnostic pré-clinique et le développement des médicaments. Dans ce contexte, la société QUIDD développe des sondes intelligentes capables de mettre en évidence des processus biologiques impliqués dans les maladies. Ainsi, cette thèse a pour objectif le développement d'une méthode générale pour la synthèse de sondes luminescentes visant la détection de peptidases. Pour cela, des sondes composées d'un substrat peptidique et d'une espèce luminescente phénolique reliés entre eux par un bras réactif auto-immolables ont été développées. Deux approches ont été envisagées : une stratégie utilisant des pro-fluorophores à phénol dont l'émission de fluorescence est éteinte lorsque leur fonction phénol est substituée. Une autre stratégie a consisté en l'utilisation de 1,2-dioxétanes dont la libération dans le milieu engendre une émission spontanée de lumière. Cette thèse présente tout d'abord la validation de cette stratégie, notamment pour la détection de la caspase-3, une enzyme fortement impliquée dans le processus apoptotique. La deuxième partie de ce travail relate les efforts effectués afin de permettre l'utilisation de ces sondes en imagerie *in vivo*.

Mots clés :

Pro-fluorescence - Chémiluminescence
Bras réactif auto-immolable

Sondes intelligentes - Apoptose
Imagerie optique - Imagerie *in vivo*

Optical imaging is currently revolutionizing pre-clinic diagnosis and drug development. In that context, QUIDD develops smart probes able to follow biological events involved in biological disorders. The aim of this PhD work was to provide a general method for the synthesis of luminescent probes able to detect proteases. For that purpose, probes composed of a peptide substrate and a phenolic luminescent moiety connected by a self-immolative linker were developed. Two strategies were investigated: a first strategy involved phenolic pro-fluorophores, whose fluorescence is quenched when their phenol functionality is substituted. A second strategy took advantage of 1,2-dioxetanes whose liberation in the medium results in a spontaneous light emission. The first objective of this work was to provide a proof of concept of these strategies, especially for the detection of caspase-3, a key enzyme involved in the apoptotic process. The second part of this work was devoted to the extension of the strategy to *in vivo* imaging.

Key words:

Pro-fluorescence - Chemiluminescence
Self-immolative linker

Smart probes - Apoptosis
Optical imaging - *In vivo* imaging