



HAL
open science

Synthèse de sondes chémiluminescentes et profluorescentes pour des applications en imagerie in vivo

Virgile Grandclaude

► **To cite this version:**

Virgile Grandclaude. Synthèse de sondes chémiluminescentes et profluorescentes pour des applications en imagerie in vivo. Chimie organique. INSA de Rouen, 2011. Français. NNT : 2011ISAM0009 . tel-03510166

HAL Id: tel-03510166

<https://theses.hal.science/tel-03510166>

Submitted on 4 Jan 2022

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



Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'INSA DE ROUEN

Spécialité : Chimie Organique

Soutenue le 23 septembre 2011

Par

Virgile GRANDCLAUDE

**Synthèse de sondes chémiluminescentes et pro-
fluorescentes pour des applications en imagerie *in vivo***

Devant le jury composé de :

Pr. Jacqueline Marchand-Brynaert

Professeur, Université Catholique de Louvain

Dr. Gilles Ulrich

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

Dr. Andrey Klymchenko

Chargé de Recherche CNRS, Strasbourg

Pr. Laurent Bischoff

Professeur, Université de Rouen

Dr. Marc Massonneau

Directeur Scientifique, QUIDD

Pr. Pierre-Yves Renard

Professeur, Université de Rouen

Dr. Anthony Romieu

Maître de conférences, Université de Rouen



THESE DE
DOCTORAT



Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'INSA DE ROUEN

Spécialité : Chimie Organique

Soutenue le 23 septembre 2011

Par

Virgile GRANDCLAUDE

**Synthèse de sondes chémiluminescentes et pro-
fluorescentes pour des applications en imagerie *in vivo***

Devant le jury composé de :

Pr. Jacqueline Marchand-Brynaert

Professeur, Université Catholique de Louvain

Dr. Gilles Ulrich

Directeur de Recherche CNRS, Strasbourg

Dr. Andrey Klymchenko

Chargé de Recherche CNRS, Strasbourg

Pr. Laurent Bischoff

Professeur, Université de Rouen

Dr. Marc Massonneau

Directeur Scientifique, QUIDD

Pr. Pierre-Yves Renard

Professeur, Université de Rouen

Dr. Anthony Romieu

Maître de conférences, Université de Rouen

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé 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 l'ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) pour la participation au financement de la bourse CIFRE et la société QUIDD pour m'avoir employé pendant ces trois années.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le professeur Pierre-Yves Renard, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir fait confiance durant ces trois années. Nos échanges, toujours fructueux et sa force de proposition ont été pour moi des éléments déterminants dans la réussite de ce projet.

Je désire remercier très sincèrement et très chaleureusement mon co-directeur de thèse, le docteur Anthony Romieu. Sa disponibilité, qui n'est plus à démontrer, son savoir bibliographique légendaire, son dynamisme et sa réactivité m'ont permis de mener cette thèse dans de très bonnes conditions. Son esprit pratique et ses capacités pédagogiques en font un formateur inestimable.

Je remercie les membres du jury, Monsieur Laurent Bischoff, Professeur à l'Université de Rouen, Madame Jacqueline Marchand-Brynaert, Professeur à l'Université Catholique de Louvain, Monsieur Gilles Ulrich, Directeur de Recherche à Strasbourg, Monsieur Andrey Klymchenko, Chargé de Recherche à Strasbourg et Monsieur Marc Massonneau, Co-fondateur et Directeur Scientifique de Quidd pour avoir pris le temps de lire et analyser ce manuscrit.

Je tiens également à remercier les ex-quiddoux, partis vers d'autres horizons, Jean-Alexandre, qui restera pour moi un exemple, un mentor, Christophe et Manue à qui je souhaite le plus grand des bonheurs dans leur nouvelle vie, Freddy et Mathilde, mes globe-trotters préférés, Yves et Heidi envolés vers le soleil New-yorkais et Aude.

Je remercie mes collègues, quiddoux actuels, Bruno pour ses (toujours) bons conseils, Marina, pour avoir corrigé si méticuleusement ma thèse et pour toutes nos conversations passées et à venir, et puis sans oublier bien sûr Hélène, Albéric, Agathe, Pascal et Bin. Une pensée toute particulière pour Sophie, clé de voûte de Quidd, d'une bonne humeur communicative, qui a toujours été prévenante et disponible pendant la durée de ma thèse.

Je remercie Annick Le Boisselier, Elisabeth Roger, Françoise Ringot et Françoise Cerveau pour l'aide précieuse qu'elles ont apportée de diverses façons.

Je n'oublierai pas mes collègues du laboratoire présents et passés : Agathe, Arnaud, Cyril, Emilie, Emilia, Guillaume, Julien, Lucie, Nico, Philippe, Sébastien (et sa culture cinématographique et sportive), Sophie, Thomas, Tristan. Un clin d'œil spécial à Cédrik, mon loveur préféré, qui a très fortement contribué à très bonne ambiance du laboratoire.

Enfin, je remercie Gaëlle qui a toujours été présente à mes côtés, pour son soutien, son réconfort et son amour. Elle a grandement contribué à sa manière, à la réalisation de ce manuscrit.

Liste des abréviations

A	Analyte
A	Alanine
Abs.	Absorption
Ac	Acétyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
aq.	Aqueux
Ar	Aryle
Asp (D)	Acide Aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Back Electron Transfer
BIT	Base-Induced Decomposition
Bn	Benzyle
BODIPY	4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacène
BPO	Benzophénoxazine
br	Large (pour broad)
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA	Bovine Serum Albumin
But	Butyle
BuOH	Butanol
CCD	Charged-Coupled Device
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI	Conversion Interne
CIEEL	Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence
CRET	Chemiluminescence Resonance Energy Transfer
CT	Computed Tomography (ou Tomodensitométrie)
CTAB	Bromure de cetyltriméthylammonium

CTID	Charge Transfer Induced Decomposition
Cy	Cyanine
d	Doublet
D	Acide Aspartique
DAO	7-hydroxy-9H-(9,9-diméthylacridin-2-one)
DDAO	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one)
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIBAL-H	Hydrure de diisobutylaluminium
DIEA / DIPA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTE	Dithioerythritol
E	Acide Glutamique
EDTA	Acide Ethylènediaminetétraacétique
Em.	Emission
ESI	Electrospray ionization
Et	Ethyle
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FMT	Fluorescence-mediated Molecular Tomography
FRET	Fluorescence (ou Förster) Resonance Energy Transfer
FRI	Fluorescence Reflectance Imaging
G/Gly	Glycine
GE	General Electric Company
GFP	Green Fluorescent Protein
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance liquid Chromatography
HPQ	2-hydroxyaryl 4-(3H)-quinazolinone
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IBL	Imagerie par Bioluminescence

IBX	Acide 2-iodoxybenzoïque
ICG	Indocyanine Green
ICT	Internal Charge Transfer
ie	id est
IFR	Imagerie de Fluorescence par Réflexion
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K	Lysine
LDA	Diisopropylamidure de lithium
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MOM	Méthoxyméthyle
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
nm	Nanomètres
NMO	<i>N</i> -méthylmorpholine- <i>N</i> -oxyde
P/Pro	Proline
PABA	Acide para-amino-benzoïque
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCC	Chlorochromate de pyridinium
PET	Positron Emission Tomography
PeT	Photoinduced Electron Transfer
PFB	Protéine fluorescente bleue
Ph	Phényle
pH	Potentiel hydrogène
<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -propyle
QD	Quantum Dot
QOS	Quidd Optical System
quant	quantitatif

R6G	Rhodamine 6G
Rh 110	Rhodamine 110
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
RX	Rayons X
s	singulet
sat	saturé
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
t	triplet
ta	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tetrabutylammonium
TBDMS	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBET	Through-Bond Electron Transfer
TCEP	<i>tris</i> (2-carboxyethyl)phosphine
TEA	Triéthylamine
TEAB	Bicarbonate de triéthylammonium
TeP	Transfert d'électron Photoinduit
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TEMP	Tomographie par Emission monophotonique
Tf	Triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Triméthylsilyle
TPAP	Tétrapropylammonium perruthénate
TPP	Tétraphénylporphyrine
Tris	<i>tris</i> (hydroxyméthyl)aminométhane
UA	Unité arbitraire
UV	Ultra-violet
V	Valine

Sommaire

Chapitre 1 : Imagerie moléculaire, Fluorescence et Chémiluminescence

I. L'imagerie moléculaire	3
1 Introduction à l'imagerie moléculaire	3
2 Les différents types d'imagerie moléculaire	4
2.1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)	5
2.2. La tomographie d'émission monophotonique (TEMP)	6
2.3. La tomographie d'émission de positons (TEP)	7
2.4. Les techniques de multi-modalité	9
3 L'imagerie optique.....	11
3.1. Introduction à l'imagerie optique	11
3.2. Cahier des charges de l'imagerie optique	11
3.3. Exemples de développement de l'imagerie optique au stade préclinique	15
3.4. Conclusion	18
II. La fluorescence et la spectroscopie de fluorescence	19
1 Généralités	19
1.1. Historique et rappels	19
1.2. Les caractéristiques de la fluorescence	21
1.2.1 Le diagramme de Perrin-Jablonski	21
1.2.2 Coefficient d'absorption, rendement quantique et brillance	22
1.2.3 Déplacement de Stokes	25
1.2.4 Spectre d'excitation.....	26
1.3. Effets environnementaux et principaux mécanismes	26
1.3.1 Paramètres influençant la fluorescence.....	26
1.3.2 Le transfert de charge intramoléculaire.....	27
1.3.3 Le transfert d'électron photoinduit.....	29
1.3.4 Le FRET	30
2 Les fluorophores.....	34
2.1. Généralités	34
2.2. La famille des cyanines.....	36
2.3. La famille des BODIPYs	39

2.4. La famille des coumarines	40
2.5. Les fluorophores de type oxazine.....	44
3 Exemples d'utilisation de la spectroscopie de fluorescence	47
3.1. Les capteurs chimiques ou sondes ratiométriques.....	47
3.2. Les sondes activées	50
3.3. Les sondes activables	52
3.4. Les cassettes fluorescentes	54
III. La chémiluminescence	56
1 La bioluminescence	56
1.1. Historique de la bioluminescence	56
1.2. Mécanismes de la bioluminescence.....	58
1.3. Exemples d'applications de la bioluminescence	59
2 Introduction à la chémiluminescence	62
2.1. Aspects historiques	62
2.2. Exemples d'utilisation	62
2.3. Mécanismes de la chémiluminescence	64
2.3.1 Mécanisme CIEEL.....	64
2.3.2 Mécanisme CTID.....	65
3 Les sondes chémiluminescentes	67
3.1. Kit de détection d'enzymes hydrolytiques.....	67
3.2. Sonde chémiluminescente pour les protéases.....	68
3.3. Exemples d'utilisation de la chémiluminescence dans un contexte <i>in vivo</i>	70

Chapitre 2 : Synthèse et modification de nouveaux pro-fluorophores

I. Introduction à la pro-fluorescence	77
1 Principe de la pro-fluorescence.....	77
1.1. Introduction à la pro-fluorescence.....	77
1.2. Exemples de pro-fluorophores.....	79
1.3. Les pro-fluorophores à phénol	84
2 Exemples de sondes pro-fluorescentes pour la détection de la caspase-3	87
2.1. Revue de la littérature et sondes commerciales.....	87
2.2. Sondes pro-fluorescentes précédemment développées au laboratoire.	89
II. Synthèse de pro-fluorophores à phénol de type bis-coumarine.....	92
1 Travaux antérieurs.....	92
2 Synthèse et évaluation de pro-fluorophores coumarine-coumarine.....	95
2.1. Synthèse	95
2.1.1 Synthèse de l'intermédiaire clé.....	95
2.1.2 Essais de synthèse de l'hybride contenant un motif triazole.....	96
2.1.3 Synthèse du pro-fluorophore 2	97
2.1.4 Essais de synthèse du pro-fluorophore 3	102
2.2. Evaluation des propriétés spectroscopiques.....	106
3 Conclusion	108
III. Hydrosolubilisation de pro-fluorophores à phénol	109
1 Pro-fluorophore de type benzothiazocyanocoumarine.....	109
1.1. Synthèse	111
1.2. Propriétés spectroscopiques	112
2 Hydrosolubilisation du pro-fluorophore 44	113
2.1. Stratégie	113
2.2. Essais d'hydrosolubilisation directs.....	115
2.3. Essais d'hydrosolubilisation indirects.....	118
2.4. Perspectives.....	119
3 Synthèse d'un bras hydrosolubilisant compatible avec des réactions de type Mannich	120
3.1. Contexte	120
3.2. Essais de synthèse	121
3.3. Perspectives.....	123

Chapitre 3 : Synthèse de nouveaux chémiluminophores

I. Revue de la littérature.....	127
1 Les chémiluminophores de type 1,2-dioxétane	127
1.1. Choix du déclencheur	128
1.2. Choix des groupements stabilisants.....	129
1.3. Choix du chromophore.....	131
2 Les chémiluminophores conjugués à des fluorophores organiques.....	133
2.1. Transfert d'énergie à travers l'espace	133
2.2. Transfert d'énergie à travers les liaisons.....	135
II. Synthèse de nouveaux chémiluminophores	138
1 Synthèse et évaluation d'un hybride dioxétane-coumarine	138
1.1. Rappel du contexte.....	138
1.2. Synthèse	139
1.3. Evaluation des propriétés de chémiluminescence.....	150
1.3.1 Tests de chémiluminescence en milieu aqueux.....	150
1.3.2 Tests de chémiluminescence en milieu organique	151
1.4. Conclusion	155
2 Synthèse d'un dioxétane thiophénolique	156
2.1. Intérêt d'un déclenchement thiophénolique.....	156
2.2. Synthèse	157
2.3. Résultats et discussions.....	160
III. Synthèse de chémiluminophores de type « TBET ».....	162
1 Synthèse et évaluation d'une cassette chémiluminescente soluble uniquement en milieu organique	162
1.1. Objectifs.....	162
1.2. Travaux antérieurs.....	163
1.3. Stratégie choisie	164
1.4. Synthèse	166
1.5. Propriétés spectrales.....	173
1.6. Conclusion	176
2 Synthèse et évaluation d'une cassette chémiluminescente hydrosoluble	177
2.1. Stratégie choisie	177

2.2. Synthèse	179
2.3. Résultats et discussions.....	183
3 Synthèse et évaluation de dioxétane dimérique.....	183
3.1. Synthèse	183
3.2. Résultats spectroscopiques	185
4 Conclusions et discussions	189

Chapitre 4 : Conclusions et Perspectives

I. Conclusion générale	193
1 Les pro-fluorophores	193
2 Les chémiluminophores	195
II. Perspectives	199

Chapitre 5 : Experimental section

I. General procedures.....	205
II. Synthesis of pro-fluorophores	208
III. Synthesis of chemiluminophores.....	223

Chapitre 1

Imagerie moléculaire, Fluorescence et Chémiluminescence

I. L'imagerie moléculaire

1 Introduction à l'imagerie moléculaire

Depuis 1996, le nombre de médicaments approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) n'a cessé de diminuer. Cependant, l'avènement des nouvelles technologies comme la génomique, le criblage haut-débit ou la chimie combinatoire devrait permettre d'augmenter le nombre de molécules potentiellement intéressantes et donc le nombre de médicaments. Le paradoxe vient tout d'abord du fait que l'amélioration des modèles biologiques, en particulier des tests *in vivo*, n'a pas subi le même essor que le « drug discovery ». De plus, une plus grande exigence est nécessaire quant à la connaissance du mode d'action précis d'un principe actif, de ses effets secondaires et donc *in fine* du rapport bénéfice/risque pour la mise sur le marché des médicaments. L'aspirine ou le paracétamol par exemple, n'auraient que peu de chance d'obtenir une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) ou une approbation par la FDA en 2011. Il est toujours aussi compliqué d'établir un modèle biologique fiable, reproductible et statistiquement significatif pour un grand nombre de pathologies. Le nombre élevé de cobayes animaux, que ce soit au stade préclinique ou clinique, nécessaires pour rendre le modèle opérationnel augmente drastiquement le coût de développement. Ceci nuit donc énormément à la production de nouveaux médicaments, sans parler des distorsions existant entre le modèle animal et le modèle humain. L'imagerie moléculaire peut être une alternative à cette impasse en réduisant de manière importante le nombre de cobayes animaux nécessaires pour établir et valider un modèle. En effet, la prise en compte de plusieurs points de mesures au fur et à mesure du temps, voire d'un suivi en temps réel de l'animal par l'utilisation de méthodes de détection non-invasives telle que l'imagerie, permet d'avoir une compréhension plus globale de la pathologie étudiée sans pour autant augmenter le nombre d'animaux nécessaires.¹

En plus de son introduction récente dans le développement préclinique, l'imagerie moléculaire intervient de manière importante dans la détection et l'évaluation de tumeurs en oncologie² ainsi que dans l'étude de mécanismes biologiques visant à une meilleure compréhension générale et individuelle des interactions biologiques. Longtemps cantonné aux rayons X et à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), elle connaît depuis 15 ans un rapide développement du fait de l'avènement de nouvelles techniques telles que la tomographie d'émission de positons (TEP), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP), la bioluminescence ou l'imagerie optique par fluorescence. Ce développement doit maintenant répondre à un double objectif : gagner en

¹ Contag, P. R., *Drug Discovery Today*, **2002**, *10*, 555.

² Mahmood, U. and Weissleder, R., *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, *5*, 489.

sensibilité par le développement d'imageurs toujours plus innovants et développer de nouveaux agents chimiques d'imagerie (agents de contraste, sondes, etc) plus spécifiques et adaptés à une utilisation *in-vivo*.³ Nous nous proposons dans la suite de cette partie introductive de décrire brièvement quelques techniques d'imagerie moléculaire parmi celles ayant connu les avancées les plus significatives ces dernières années, en nous focalisant sur l'imagerie de fluorescence, domaine phare en plein essor et finalité principale de nos travaux.

2 Les différents types d'imagerie moléculaire

Les techniques d'imagerie moléculaire sont classées de manière intuitive en deux catégories : les techniques dites macroscopiques comme l'IRM, les rayons X ou la tomodensitométrie (ou CT pour X-ray Computed Tomography) qui s'attachent à fournir une information de type structurale et les techniques dites microscopiques comme la TEP, l'IRM, la TEMP, la bioluminescence (IBL) et la fluorescence (IFR) fournissant une information à l'échelle de la cellule ou de la molécule.⁴ Il faut distinguer les techniques bien implantées, déjà présentes depuis longtemps pour le diagnostic ou le traitement des patients comme l'IRM ou les rayons X, des techniques comme la TEP ou l'IFR qui connaissent un réel développement technologique ces dix dernières années. Au-delà de l'aspect concurrentiel de ces techniques représenté par les imageurs commerciaux et les agents de contraste présents sur le marché, il y a bien une complémentarité entre celles-ci. L'apparition au cours de ces dernières années d'imageurs couplant plusieurs techniques comme un TEP-CT ainsi que le développement de sondes multimodales en est un signe fort.⁵ En effet, le couplage de plusieurs techniques aussi bien d'un point de vue imageur que d'un point de vue sondes chimiques permet d'obtenir une information de type « structurale-fonctionnelle » (TEP-CT) ou même « fonctionnelle-fonctionnelle » (TEP-IFR) en ciblant différents biomarqueurs (i.e. récepteurs) d'une même pathologie. Le Tableau 1 - 1 présente un récapitulatif des principales techniques d'imagerie. Il permet d'avoir une vision globale des avantages et des inconvénients de chaque technique et de souligner les complémentarités potentielles entre ces dernières.

³ Blow, N., *Nat. Methods*, **2009**, 6, 465.

⁴ Weissleder, R. and Pittet, M. J., *Nature*, **2008**, 7187, 580.

⁵ Devaraj, N. K., Keliher, E. J., Thurber, G. M., Nahrendorf, M. and Weissleder, R., *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 2, 397.

Technique	Résolution	Profondeur	Cible	Coût	Utilisation principale
IRM	10-100 μm	Pas de limite	Anatomique, physiologique, moléculaire	€€€	Utilisation polyvalente pour l'imagerie des tissus mous
CT	50 μm	Pas de limite	Anatomique, physiologique	€€	Imagerie des poumons et des os
TEMP	1-2 mm	Pas de limite	Physiologique, moléculaire	€€	Imagerie des anticorps, protéines et peptides marqués
TEP	1-2 mm	Pas de limite	Physiologique, moléculaire	€€€	Utilisation polyvalente en fonction des traceurs utilisés
IBL	\approx 5 mm	Quelques cm	Moléculaire	€€	Imagerie de l'expression des gènes et le suivi des cellules et des bactéries
IFR	2-3 mm	< 1 cm	Physiologique, moléculaire	€	Identification et suivi des protéines et des molécules intervenant dans les pathologies

Tableau 1 - 1 : Tableau comparatif des différentes techniques d'imagerie

2.1. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique (ou MRI pour Magnetic Resonance Imaging) est une technique qui permet d'obtenir des images en trois dimensions de spécimens vivants avec une très bonne résolution anatomique. Développée dans les années 70 et longtemps cantonnée à de l'imagerie structurale d'organes, elle a depuis connu un bond technologique puisqu'elle est maintenant utilisée aussi bien pour de l'imagerie en temps réel (cerveau, cœur) qu'au niveau moléculaire avec l'avènement d'agents de contraste spécifiques. L'IRM se base sur les mêmes principes théoriques que la résonance magnétique nucléaire (RMN), c'est-à-dire le couplage entre le moment magnétique du noyau des atomes et un champ magnétique externe. Pour se faire, le spécimen ou l'organe étudié est placé dans un champ magnétique permanent. Ce dernier permet l'alignement des spins des noyaux. Une impulsion est alors donnée qui permet aux atomes de passer à un état d'énergie supérieur. Les noyaux retournent ensuite à leur état fondamental, cette désexcitation est appelée relaxation. L'étude de cette relaxation, au moyen d'équations mathématiques complexes, permet d'obtenir une information sur l'atome visé. En raison de son abondance dans le corps humain, l'IRM médicale se base essentiellement sur la relaxation des molécules d'eau. L'environnement de ces molécules influence directement la durée de relaxation et permet de différencier après reconstruction informatique les organes d'un spécimen étudié.⁶ Des images par « tranches » successives d'une épaisseur bien définie de l'organe ou du corps étudié sont obtenues et peuvent

⁶ Que, E. L. and Chang, C. J., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *1*, 51.

être ensuite rassemblées afin d'obtenir une image en trois dimensions. Afin d'améliorer la faible sensibilité de cette technique et la différenciation des zones structurales, de nombreux agents de contraste ont été développés ces dernières années.⁷ Souvent à base de chélates de gadolinium thermodynamiquement très stables⁸ (afin d'éviter le relargage d'ions gadolinium toxiques notamment pour l'homme), ces agents utilisent la coordination des molécules d'eau au lanthanide pour modifier la relaxation des atomes d'hydrogène et augmenter ainsi le contraste. Le principal inconvénient de cette technique reste actuellement les quantités très importantes de produit de contraste injecté (de l'ordre du millimolaire). En effet, celles-ci posent des problèmes de toxicité (le gadolinium libéré dans l'organisme entre en compétition avec le calcium), d'élimination et de choc anaphylactique. Les tendances actuelles de l'IRM se dirigent dans deux directions, d'une part l'utilisation d'agents de contraste offrant des solutions alternatives au gadolinium (par exemple avec des complexes de fer)⁹, et d'autre part l'évolution des agents de contraste non spécifiques en sondes « intelligentes » c'est-à-dire des agents de contraste activés uniquement en présence du récepteur.¹⁰ La recherche dans ce domaine est très active et devrait permettre de faire émerger, dans ces prochaines années, des produits permettant de travailler à des concentrations « efficaces » beaucoup plus faibles.¹¹

2.2. La tomographie d'émission monophotonique (TEMP)

La tomographie d'émission monophotonique (ou SPECT pour Single-Photon Emission Computed Tomography) est une technique d'imagerie basée sur l'émission d'un rayonnement gamma en provenance d'un radio-isotope et collecté au moyen d'un détecteur circulaire. Ce dernier est en général en rotation ce qui permet d'améliorer la résolution par triangulation du signal. Un collimateur est souvent adjoint au détecteur afin de minimiser les effets de dispersion. Malheureusement, cela réduit aussi considérablement le nombre de radiations efficaces, ce qui réduit la sensibilité (1% seulement des radiations atteignent le capteur). De nombreux radio-marqueurs ont été développés, ils sont en général basés sur les éléments suivants : ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I , etc. qui possèdent des périodes de décroissance lentes ce qui permet leur utilisation aisée dans le domaine clinique.¹² La déclinaison 2D de la TEMP est la technique bien connue et largement utilisée de la scintigraphie. Une des applications les plus courantes est la scintigraphie du squelette au

⁷ De Leon-Rodriguez, L. M., Lubag, A. J. M., Malloy, C. R., Martinez, G. V., Gillies, R. J. and Sherry, A. D., *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 7, 948.

⁸ Pour une revue générale sur les agents de contraste au gadolinium : Caravan, P., *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 7, 851.

⁹ Liu, F., Laurent, S., Fattahi, H., Elst, L. V. and Muller, R. N., *Nanomedicine*, **2011**, 3, 519.

¹⁰ Persigehl, T., Heindel, W. and Bremer, C., *Abdom. Imaging*, **2005**, 3, 343.

¹¹ Stavila, V., Allali, M., Canaple, L., Stortz, Y., Franc, C., Maurin, P., Beuf, O., Dufay, O., Samarut, J., Janier, M. and Hasserodt, J., *New J. Chem.*, **2008**, 3, 428.

¹² Parrott, M. C., Benhabbour, S. R., Saab, C., Lemon, J. A., Parker, S., Valliant, J. F. and Adronov, A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 8, 2906.

moyen de marqueurs comme le diphosphonate de technétium qui à l'avantage de s'absorber en quelques heures dans l'os (Figure 1 - 1). Cette technique largement présente dans les établissements médicaux et utilisée en routine ne connaît plus actuellement de grandes innovations. Ces dernières concernent plutôt la tomographie par émission de positons, l'autre grande technique de radio-marquage.

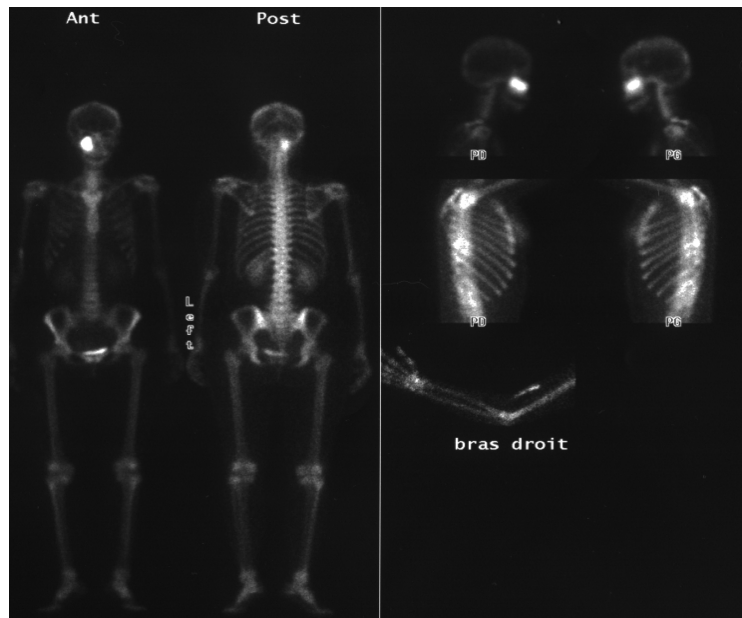


Figure 1 - 1 : Exemple de scintigraphie osseuse révélant une lésion sur le bord inférieur droit de l'orbite¹³

2.3. La tomographie d'émission de positons (TEP)

La tomographie par émission de positons (ou PET pour Positron Emission Tomography) est basée sur le même principe que la TEMP, la différence principale réside dans le fait que l'émission du rayonnement gamma provient de l'annihilation d'un positon avec un électron. Ceci permet l'émission simultanée de deux rayonnements dans des directions opposées ce qui améliore la localisation de l'émission et permet donc de se passer du collimateur. Comme pour la TEMP, l'image est ensuite reconstruite par tomographie en trois dimensions. Cette technique de développement plus récente que la TEMP est aussi plus sensible et permet de descendre à des concentrations injectées submicromolaires, réduisant de ce fait les effets secondaires sur les organismes.

¹³ Source de l'image : Wikimedia Commons

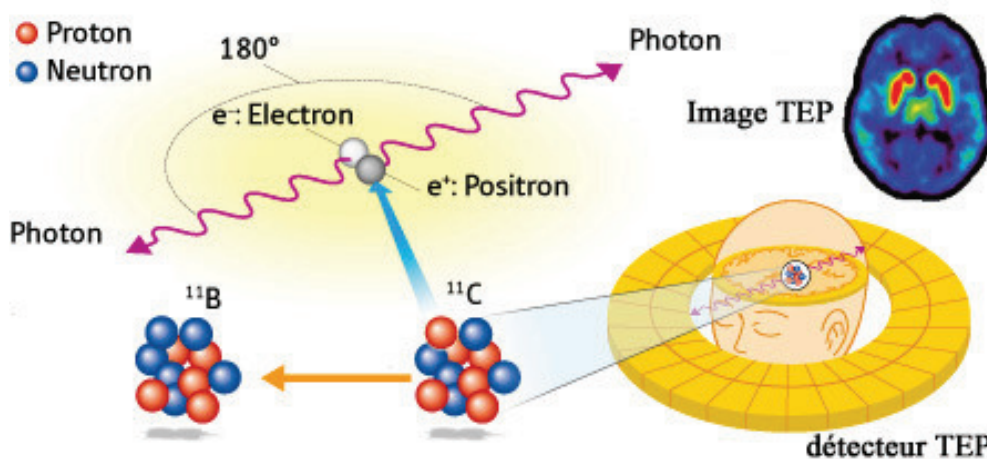


Figure 1 - 2 : Schéma de principe de la TEP

Les radio-isotopes utilisés en TEP sont principalement le fluor-18 (période radioactive de 110 min) et le carbone-11 (période radioactive de 21 min). La limitation est la forte radioactivité induite par ces émetteurs de positons, et la nécessité de les produire à proximité de l'appareillage d'imagerie. Le développement, lors de ces dix dernières années de cyclotrons de taille et de coût réduits, a permis de rapprocher les sources de production de radio-marqueurs des centres d'utilisation (services hospitaliers, laboratoires de recherche académiques, etc). Le principal radio-marqueur utilisé reste le FDG (18-fluoro déoxyglucose), qui s'accumule aux sites de consommation élevée du glucose. C'est en particulier ce produit (18-FDG) qui a fortement stimulé la demande et donc la synthèse d'un nombre croissant de composés radio-marqués. Nous pouvons par exemple citer les efforts consentis pour synthétiser des composés ciblant spécifiquement les plaques de β -amyloïde qui sont impliquées dans le développement de la maladie d'Alzheimer.^{14,15} Basée sur le marquage de substrats déjà bien décrits dans la littérature par l'utilisation de groupements prosthétiques^{16,17}, la TEP est souvent très spécifique et présente la sensibilité la plus élevée des techniques d'imagerie. Ces inconvénients restent bien entendu la manipulation de matériaux fissiles et le coût élevé des installations et des produits. Malgré cela, cette technique est actuellement en plein essor que ce soit au niveau du diagnostic clinique ou à des fins de recherche fondamentale.

¹⁴ Ono, M., *Chem. Pharm. Bull.*, **2009**, *10*, 1029.

¹⁵ Serdons, K., Verduyck, T., Vanderghinste, D., Borghraef, P., Cleynhens, J., Van Leuven, F., Kung, H., Bormans, G. and Verbruggen, A., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *4*, 1415.

¹⁶ Miller, P. W., Long, N. J., Vilar, R. and Gee, A. D., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8998.

¹⁷ Li, L., Hopkinson, M. N., Yona, R. L., Bejot, R., Gee, A. D. and Gouverneur, V., *Chemical Science*, **2011**, *1*, 123.

2.4. Les techniques de multi-modalité

Les techniques d'imagerie dites moléculaires ont rattrapé d'un point de vue technique les méthodes d'imagerie structurale. La suite logique est donc la mise au point d'appareil incluant deux modalités : le plus souvent, une modalité structurale et l'autre fonctionnelle. Des imageurs TEP-CT ou bien des TEP-IRM ont donc vu le jour. Des sondes bimodales ont aussi été développées.¹⁸ Cependant, le problème principal dans l'utilisation de ces sondes est surtout la différence de sensibilité qu'il existe entre les techniques. Une sonde IRM-TEP devrait comporter idéalement un groupement radio-marqué fluor-18 pour 100 voire 1000 chélates de gadolinium. L'utilisation de nanoparticules peut être une option pour le développement de telles sondes.^{19,20} Ainsi, des nanoparticules fluorescentes ont pu être dérivatisées de façon à introduire en leur sein plusieurs dizaines voire centaines de groupements fonctionnels. Il est alors possible d'utiliser ces groupements fonctionnels pour greffer des cages DOTA-gadolinium (acide tétraacétique macrocyclique 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-N,N',N'',N'''), et ainsi obtenir un double marquage (Figure 1 - 3).²¹

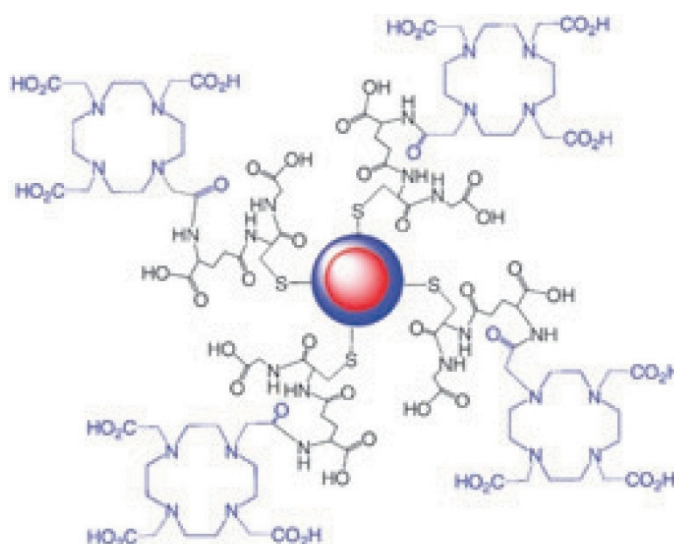


Figure 1 - 3 : Exemple de sonde Quantum Dots (QD) – DOTA pour l'imagerie en multi-modalité (Jin et al)²¹

Une autre approche intéressante est l'utilisation de dendrimères pour compenser les effets de sensibilité entre différentes techniques.²² Il est aussi possible de développer des sondes de type « fonctionnelle-fonctionnelle » comme une sonde TEP-IFR.²³ Les sensibilités de ces deux techniques

¹⁸ Kuil, J., Velders, A. H. and van Leeuwen, F. W. B., *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *10*, 1709.

¹⁹ Hwang, D. W., Ko, H. Y., Kim, S.-K., Kim, D., Lee, D. S. and Kim, S., *Chem. Eur. J.*, **2009**, *37*, 9387.

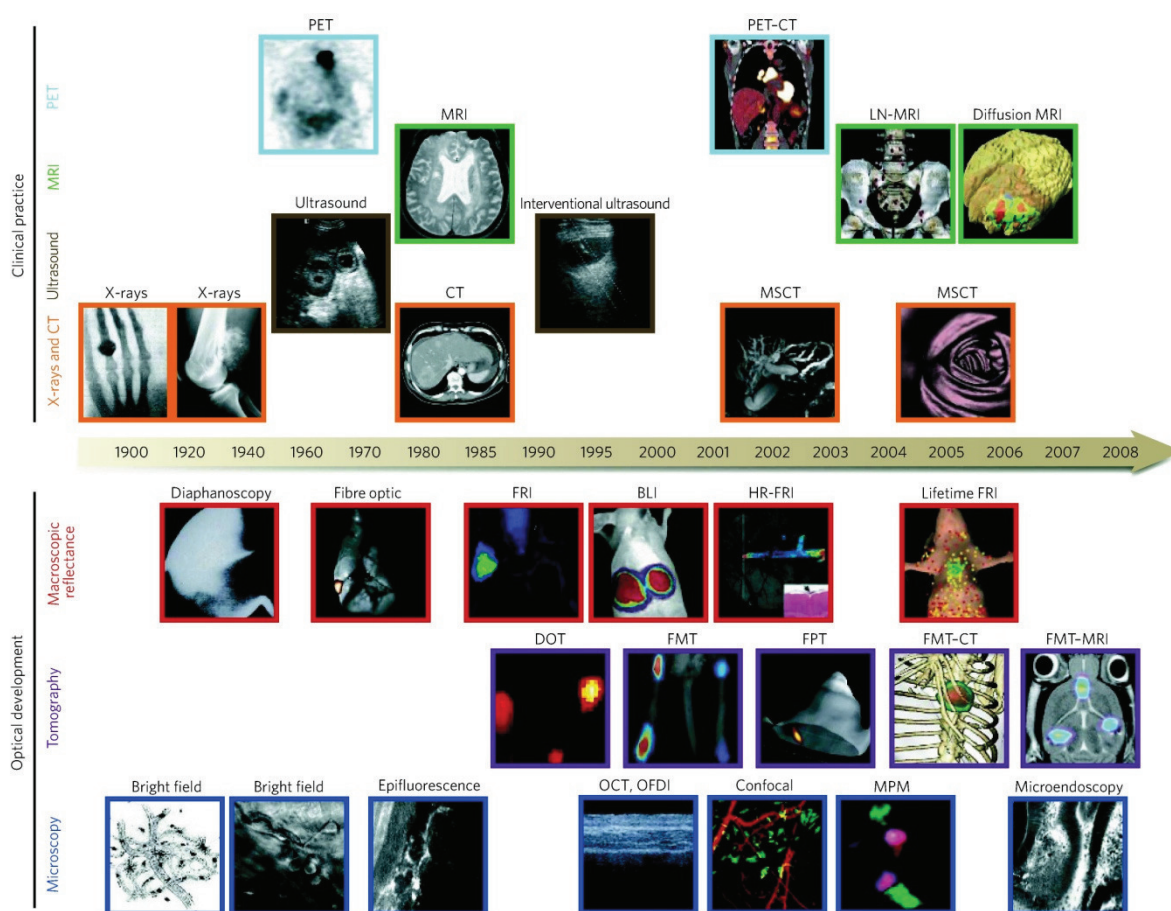
²⁰ Jennings, L. E. and Long, N. J., *Chem. Commun.*, **2009**, *24*, 3511.

²¹ Jin, T., Yoshioka, Y., Fujii, F., Komai, Y., Seki, J. and Seiyama, A., *Chem. Commun.*, **2008**, *44*, 5764.

²² Prinzen, L., Miserus, R.-J. J. H. M., Dirksen, A., Hackeng, T. M., Deckers, N., Bitsch, N. J., Megens, Douma, K., Heemskerk, J. W., Kooi, M. E., Frederik, P. M., Slaaf, D. W., van Zandvoort, M. A. M. J. and Reutelingsperger, C. P. M., *Nano Letters*, **2007**, *1*, 93.

²³ Ting, R., Aguilera, T. A., Crisp, J. L., Hall, D. J., Eckelman, W. C., Vera, D. R. and Tsien, R. Y., *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *10*, 1811.

étant dans la même gamme, il est alors possible de combiner les deux modalités sur la même architecture (bio)moléculaire. De plus, leurs sensibilités importantes leur permettent d'imager la totalité d'un organisme avec des quantités raisonnables et sans danger. La multi-modalité est donc une des prochaines étapes de l'imagerie moléculaire, comme le présente la Figure 1 - 4. Le développement de l'instrumentation et le couplage des techniques permettent aux scientifiques de disposer d'outils de plus en plus diversifiés et donc aisément modulables en fonction de l'application ciblée. Cela rend notamment possible une utilisation dédiée de chaque appareil pour le diagnostic d'une maladie donnée, ou l'étude d'un mécanisme cellulaire particulier.²⁴



²⁴ Pour une revue très complète sur la bimodalité : Louie, A., *Chem. Rev.*, **2010**, 5, 3146.

²⁵ Weissleder, R. and Pittet, M. J., *Nature*, **2008**, 7187, 580.

3 L'imagerie optique

3.1. Introduction à l'imagerie optique

L'imagerie optique regroupe trois techniques : la fluorescence, la bioluminescence et la chémiluminescence. La fluorescence est la plus utilisée aussi bien historiquement qu'actuellement. Elle a connu de très nombreux développements dans les contextes *in vitro et in vivo*, en particulier avec la découverte de la GFP²⁶ (Green Fluorescent Protein) mais aussi avec le développement de nouveaux fluorophores organiques absorbant et émettant dans le proche infra-rouge. Nous présenterons principalement cette technique par la suite. La bioluminescence a connu de grandes avancées ces dernières décennies, tout d'abord par la découverte du couple luciférase/luciférine, puis par le séquençage d'un nombre croissant d'organismes vivants, mais aussi grâce aux techniques avancées de manipulation génétique. Elle est maintenant la méthode de choix pour étudier le fonctionnement « en direct » (suivi, interactions et devenir) des protéines dans un organisme. La bioluminescence doit malheureusement se limiter à de la recherche fondamentale sans espoir de passer au stade clinique. En effet, les manipulations génétiques nécessaires à l'utilisation de la bioluminescence ne sont pas applicables chez l'Homme. La chémiluminescence reste, à de rares exceptions près, encore un domaine de recherche fondamentale. Cependant, des exemples de plus en plus nombreux de sondes chémiluminescentes apparaissent dans la littérature scientifique et des systèmes de plus en plus sophistiqués (*vide infra*) et autonomes devraient voir le jour dans ces prochaines dizaines d'années, ceci dans le but de s'ouvrir aux applications *in vivo*.

L'imagerie optique fondée sur la technique de fluorescence possède par rapport à d'autres techniques une grande sensibilité, une simplicité de mise en œuvre (composés généralement stables dans le temps, injection en quantités limitées, etc) et un appareillage moins coûteux et moins encombrant que pour les techniques concurrentes. Ceci permettrait donc de voir prochainement le développement à grande échelle et l'implantation d'imageurs optiques dans les milieux médicaux et pharmaceutiques.

3.2. Cahier des charges de l'imagerie optique

La conception d'une nouvelle sonde (bio)moléculaire optique nécessite un cahier des charges relativement contraignant. En effet, la lumière visible servant à exciter le fluorophore est fortement absorbée par les tissus vivants. C'est pourquoi il est très difficile de travailler au-delà de 0,5 cm de profondeur dans la gamme 450-600 nm des fluorophores usuels. De plus la diffusion de la lumière augmente avec la distance et nuit fortement à la qualité des images obtenues. La Figure 1 - 5 montre

²⁶ Pour des revues récentes, voir le numéro spécial consacré à la GFP : *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *10*, 2813.

l'absorption de l'hémoglobine en fonction de la longueur d'onde. Ce graphique démontre qu'il est important de travailler au-delà de 650 nm pour avoir une absorption réduite des tissus vivants. Le domaine visible (> 450 nm) reste donc restreint à de l'imagerie de surface.²⁵

Il est à noter, que si nous travaillons au-delà de 900 nm, c'est cette fois, le problème de l'eau que nous rencontrons. En effet, l'eau absorbe énormément les ondes infrarouges comme le présente la Figure 1 - 5. Cela définit donc ce qui est appelé une « fenêtre d'imagerie » comprise entre 650 et 900 nm. Les fluorophores (notamment organiques) synthétisés et utilisés pour des applications *in vivo* doivent donc absorber et émettre dans cette gamme, ce qui représente déjà un défi synthétique car peu de familles de fluorophores présentent ces propriétés en milieu physiologique.²⁷

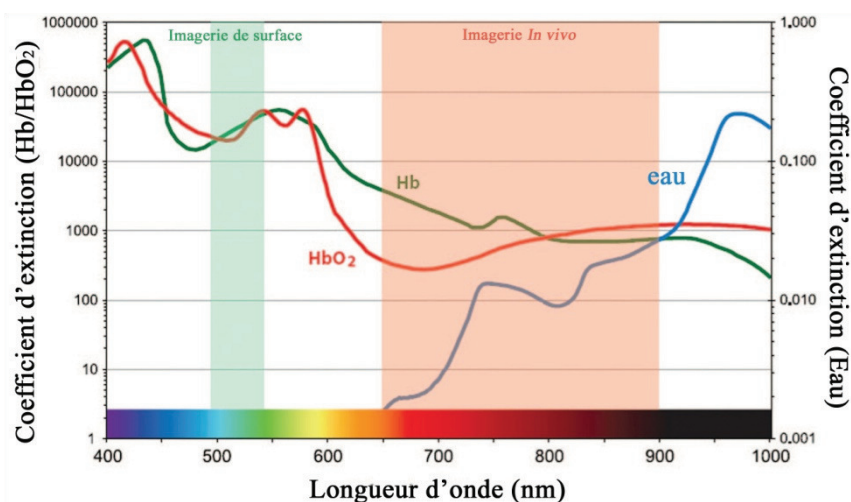


Figure 1 - 5 : Graphique d'absorption de l'hémoglobine et de l'eau en fonction de la longueur d'onde (Kobayashi *et al*)²⁸

Un autre problème majeur est l'autofluorescence des tissus provenant en grande partie de l'hémoglobine mais aussi des biomolécules comme les coenzymes, la chlorophylle, NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), les acides aminés (tryptophane par exemple) ou encore les bases de l'ADN. Ce problème est cependant contourné de la même manière que l'absorption des tissus, c'est-à-dire en utilisant des fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge.

La Figure 1 - 6 montre la différence notable d'autofluorescence des tissus en fonction de la longueur d'onde utilisée pour l'excitation. La souris (ou plus généralement l'organisme à imager) devient invisible à la lumière dans le proche infrarouge. Ceci permet de fortement augmenter le rapport signal sur bruit et donc d'améliorer la précision de la mesure.

²⁷ Escobedo, J. O., Rusin, O., Lim, S. and Strongin, R. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2010**, *1*, 64.

²⁸ Kobayashi, H., Ogawa, M., Alford, R., Choyke, P. L. and Urano, Y., *Chem. Rev.*, **2009**, *5*, 2620.

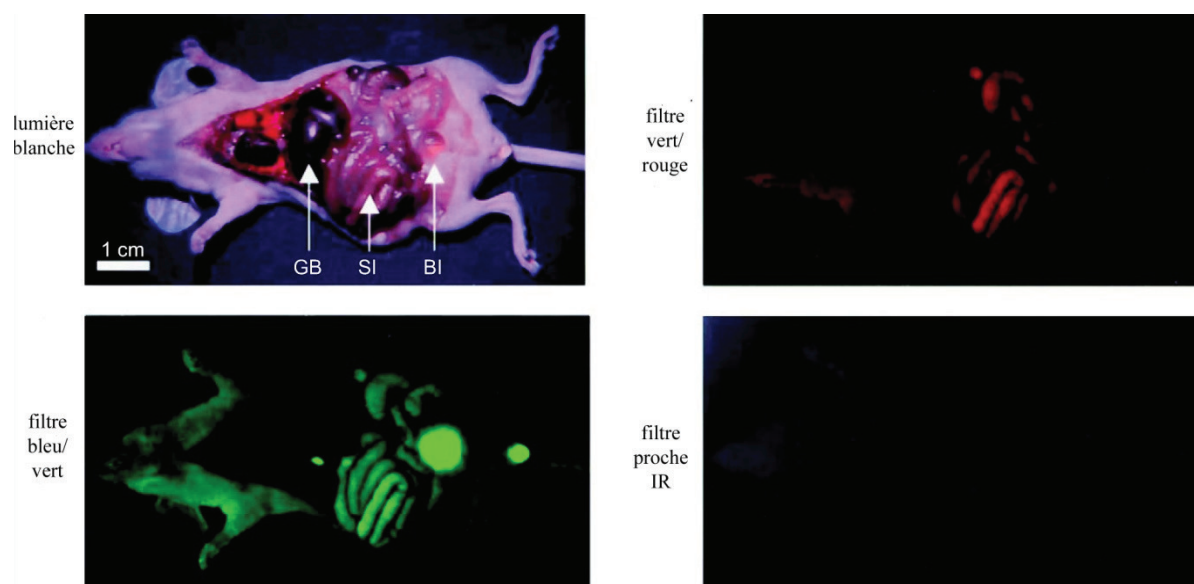


Figure 1 - 6 : Démonstration de l'autofluorescence des tissus vivants à différentes longueurs d'onde (Frangioni)²⁹

Une autre méthode pour passer outre l'autofluorescence des tissus est la luminescence en temps résolu. Celle-ci est principalement l'apanage des complexes de lanthanides, notamment pour des applications en bio-analyse.³⁰ Dans ce cas, l'émission du luminophore dure plusieurs microsecondes voire millisecondes après l'excitation (contrairement à la dizaine de nanosecondes dans le cas des fluorophores organiques classiques), ce qui permet de s'affranchir aisément de la fluorescence résiduelle des milieux biologiques, en utilisant les dispositifs optiques appropriés. Ceci permet d'obtenir ainsi un bruit de fond très faible et une bonne résolution. Les complexes de lanthanides sont aujourd'hui principalement utilisés dans un contexte *in vitro*. Leur application *in vivo* (même si elle représente une alternative intéressante) demande encore des développements technologiques afin notamment de pouvoir exciter ces complexes métalliques à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm et de s'affranchir de leur faible brillance. En effet, la plupart des réactifs luminescents commerciaux à base de complexes de lanthanides peuvent être, dans le meilleur des cas, excités par des photons UV-A. La Figure 1 - 7 explicite le principe de fonctionnement de la luminescence en temps résolu.

²⁹ Frangioni, J. V., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 5, 626.

³⁰ Bünzli, J.-C. G., *Chem. Rev.*, **2010**, 5, 2729.

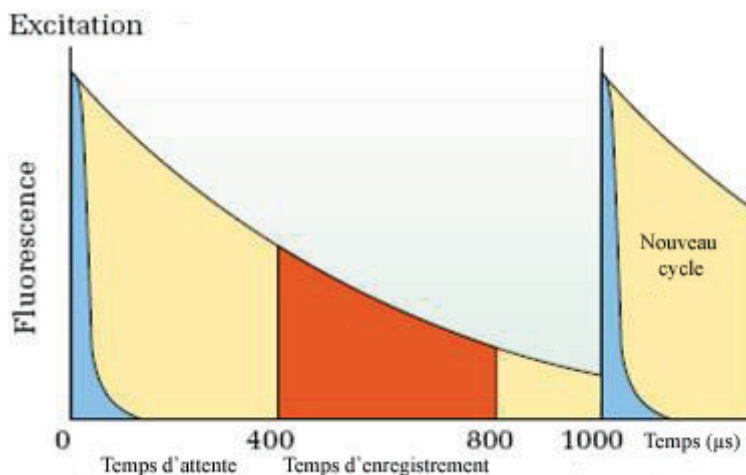


Figure 1 - 7 : Schéma de principe de la luminescence en temps résolu (Site internet de Perkin-Elmer) – bleu : représentation de l’autofluorescence des tissus, ocre : enregistrement de la fluorescence

Seule une partie des problèmes rencontrés lorsque l’on souhaite mettre en pratique et optimiser la synthèse de sondes (bio)moléculaires optiques a été explicitée ci-dessus. Cependant la liste est longue, le tableau suivant (Tableau 1- 1) reprend une partie des différents paramètres à optimiser pour développer de nouvelles sondes optiques. Ce tableau est donc un petit aperçu des problèmes que l’imagerie optique doit surmonter afin de devenir une méthode de référence en imagerie au même titre que les autres techniques citées précédemment.

Propriétés des fluorophores	Tissus et/ou cellule ciblés
Hydrosolubilité Longueurs d’onde d’excitation et d’émission Déplacement de Stokes important Coefficient d’extinction Rendement quantique Brilliance importante (> 30000 M ⁻¹ .cm ⁻¹) Résistance à l’agrégation Influence de l’environnement local Bioconjugaison aisée ou dérivatisation	Indice de réfraction du tissu/de la cible Autofluorescence du tissu Absorption de la lumière d’excitation par le tissu Quenching du fluorophore Diffusion par les membranes cellulaires ou sous-cellulaires
Biodistribution et pharmacocinétique	Collection de la lumière émise
Perméabilité des barrières vasculaires Clairance du sang Liaisons aux protéines plasmatiques Franchissement de la barrière hémato-encéphalique	Choix du filtre Sensibilité spectrale du détecteur Propriété de transmission de l’optique dans la gamme proche infrarouge

Tableau 1- 1 : Paramètres à optimiser dans le cadre de l’imagerie de fluorescence *in vivo*^{29,31}

³¹ Cours d’Isabelle Texier-Nogues sur les marqueurs luminescents (CEA Leti)

3.3. Exemples de développement de l'imagerie optique au stade préclinique

L'imagerie optique et principalement l'imagerie de fluorescence a longtemps été cantonnée à la microscopie et à ses améliorations successives (microscope confocal, excitation monophotonique et multiphotonique, etc). Le microscope se limite cependant à la visualisation de phénomènes à l'échelle de la centaine voire de quelques milliers de cellules et sur des épaisseurs restreintes (< 100 μm). Pour pouvoir imager des organes entiers voire des organismes vivants, il fallait donc que l'imagerie optique franchisse un nouveau pas. L'instrumentation s'étant considérablement développée ces dernières années par l'utilisation de lasers pulsés et de caméras CCD (Charge-Coupled Device) de plus en plus sensibles, deux techniques d'imagerie utilisant l'optique sont apparues : l'imagerie planaire et plus récemment la tomographie moléculaire de fluorescence.³²

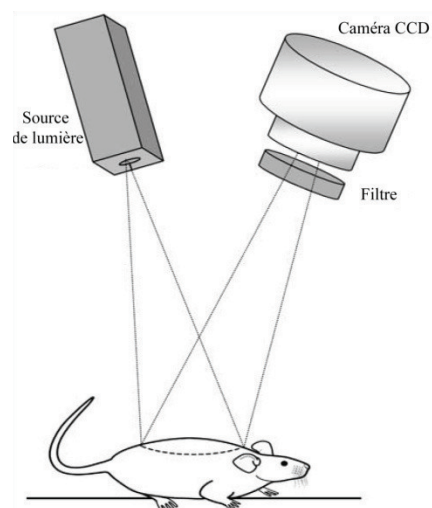


Figure 1 - 8 : Schéma de principe de l'imagerie de fluorescence par réflexion (Ntziachristos *et al*)³²

D'un point de vue optique, les deux techniques sont identiques comme le montre le schéma de principe (Figure 1 - 8). Le but est d'éclairer l'organisme étudié (organe, animal, etc) au moyen d'une source de lumière et de récupérer la lumière émise au moyen d'un détecteur, le plus souvent une caméra CCD. Les progrès techniques réalisés dans les sources de lumière ont permis de passer de simples filtres de lumière blanche à des lasers. Cela fournit une raie de lumière plus fine (bande passante de ± 3 nm contre ± 10 nm pour les filtres) permettant de cibler plus efficacement la longueur d'absorption d'un fluorophore donné et donc diminuer l'excitation parasite de molécules fluorescentes environnantes.

L'imagerie planaire est la méthode la plus simple à mettre en œuvre et de ce fait la plus utilisée actuellement. La technique principale utilisée est l'imagerie de fluorescence par réflexion (ou FRI pour Fluorescence Reflectance Imaging). Comme le présente la Figure 1 - 9, deux images sont en

³² Ntziachristos, V., Bremer, C. and Weissleder, R., *Eur. Radiol.*, **2003**, *1*, 195.

général enregistrées, l'une sans le filtre correspondant à la longueur d'onde d'émission de la sonde et l'autre avec. Les deux images sont ensuite superposées afin d'obtenir l'intensité supplémentaire correspondant à l'émission de la sonde. Cette technique est très bien adaptée et est couramment utilisée pour l'imagerie de tumeurs sous-cutanées ou peu profondes. Cependant, elle est rapidement mise en défaut en raison de la pénétration limitée de la lumière dans l'organisme et de sa diffusion importante. De plus, elle est non-quantitative ; en effet, un imageur ne pourra pas différencier une concentration importante de sondes en profondeur et une faible concentration en surface ce qui pose problème dans le cas de la localisation de tumeurs. A partir de quelques centimètres de profondeur, l'image obtenue ne sera qu'une fluorescence résiduelle de l'ensemble de l'organisme étudié sans réelle possibilité de localisation précise du phénomène ciblé. L'IFR reste donc limitée à des études de surfaces ou sub-épidermique ne dépassant pas 1 cm de profondeur.

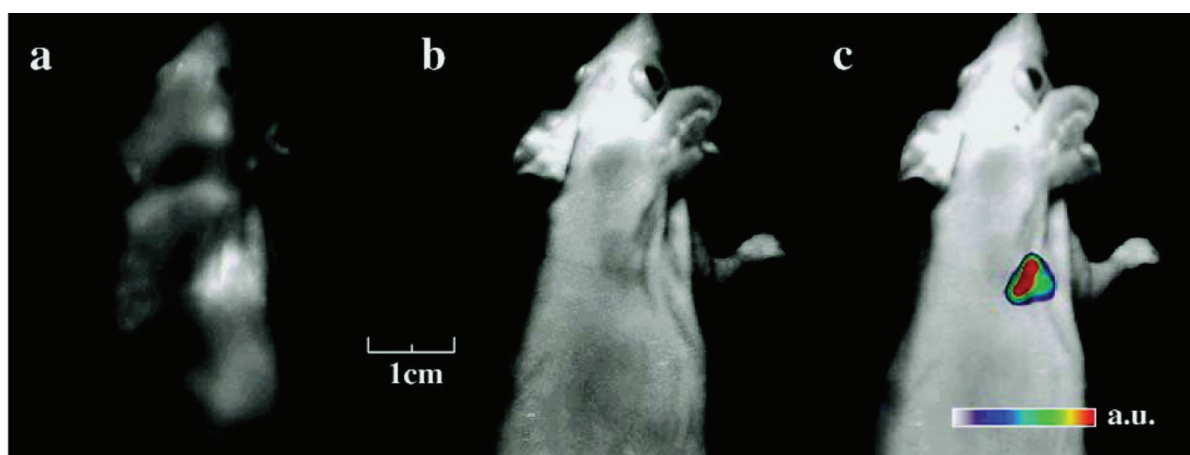


Figure 1 - 9 : Images classiquement obtenues en IFR : deux images sont enregistrées, une sans la bande-passante correspondant à la sonde (b) et une avec (a). Les images sont ensuite comparées et superposées pour obtenir le rendu final (c). (Ntziachristos *et al*)³²

La tomographie moléculaire de fluorescence (ou FMT pour Fluorescence-mediated Molecular Tomography) quant à elle représente l'espoir de l'imagerie optique et permettra très certainement de faire passer l'imagerie optique du stade expérimental et recherche fondamentale à sa large diffusion comme technique de routine. Elle consiste à faire une reconstitution 3D de la distribution de la sonde ciblée à partir de plusieurs images 2D enregistrées autour de l'animal. Les images sont ensuite traitées par de puissants algorithmes qui intègrent les équations de diffusion de lumière à travers un organisme vivant. L'image obtenue est donc virtuelle mais permet cependant de fournir une information plus précise sur la localisation de la sonde. De plus, cette technique permet de faire des mesures quantitatives, ce qui est un avantage dans le cas de la recherche et de l'évaluation de tumeurs cancéreuses et de leur évolution. Il est de plus possible de coupler la FMT à d'autres techniques comme l'IRM par exemple, ce qui permet de localiser le phénomène étudié par rapport aux organes et aux os de l'animal, fournissant une information et une précision supplémentaire. La Figure 1 - 10 présente un exemple de cette association (ici avec l'IRM).

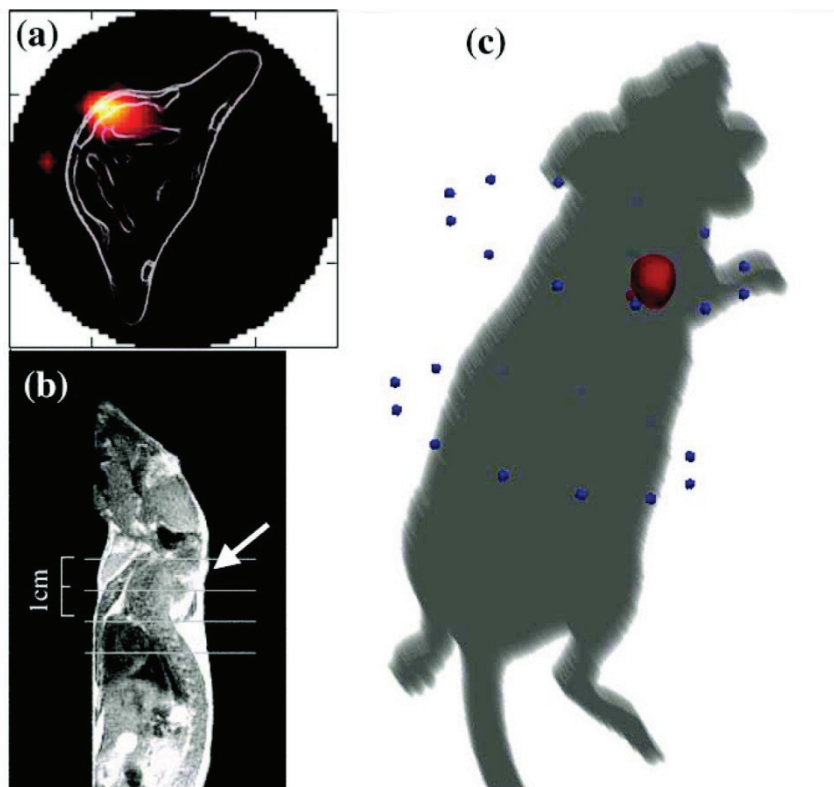


Figure 1 - 10 : Exemple d'utilisation de la FMT en parallèle avec l'IRM (Ntziachristos *et al*)³² – (a) : Imagerie de fluorescence brut, (b) : IRM, (c) : reconstitution tomographique

C'est dans ce contexte compétitif que la société QUIDD développe un système d'imagerie optique (QOS[®] pour Quidd Optical System) constitué d'une caméra de détection puissante et repositionnable automatiquement par rapport à l'animal. Cet appareil entièrement automatisé permet de faire des mesures précises en temps réel aussi bien en fluorescence, en bioluminescence qu'en chémiluminescence. De plus, sa polyvalence lui permettra d'évoluer pour ajouter des fonctionnalités à la demande du client (autres modalités d'imagerie, roue à filtres, etc) et notamment une fonction de tomographie. Les principaux concurrents du QOS[®] sont le XENOVEN IVIS-200 de la société Caliper (anciennement Xenogen Corporation) et le FMT 2500 de Perkin Elmer (anciennement VisEn). Ils incorporent tous les deux des modes de tomographie tridimensionnelle.



Figure 1 - 11 : Imageur optique QOS[®] développé par la société QUIDD

3.4. Conclusion

L'imagerie optique, utilisée depuis longtemps en microscopie, n'a pas fini d'évoluer. Elle pourrait représenter dans un avenir proche la méthode de choix pour la détection de phénomènes cellulaires dans un contexte aussi particulier que l'est *l'in vivo*. Sa simplicité de mise en œuvre, ainsi que sa bonne sensibilité pourrait en faire une technique polyvalente en recherche pré-clinique. Il reste néanmoins à mettre au point les algorithmes permettant de reconstruire les images 3D. Imager de plus en plus profondément dans un organisme sans utiliser de techniques invasives est le vrai défi. Progressivement, les améliorations successives permettent d'aller plus loin. Ainsi, l'imagerie optique pour le moment limitée au petit animal (rat, souris) pourrait être étendue à des animaux de plus grande taille voire à l'Homme et pourrait de ce fait, faire son apparition comme technique de routine dans les centres hospitaliers.

II. La fluorescence et la spectroscopie de fluorescence

1 Généralités

1.1. Historique et rappels

La luminescence peut être définie comme l'émission d'une lumière par désexcitation d'une espèce préalablement excitée. La méthode d'excitation de cette dernière permet de classer les différents types de luminescence comme le montre le tableau ci-dessous (Tableau 1- 2).

Phénomènes	Mode d'excitation
Photoluminescence (fluorescence et phosphorescence)	Absorption de lumière (photons)
Radioluminescence	Radiation ionisante (rayons X, α , β , γ)
Cathodoluminescence	Rayons cathodiques (faisceaux d'électrons)
Electroluminescence	Champ électrique
Thermoluminescence	Elévation de température ou irradiation radioactive
Chémiluminescence	Processus chimique
Bioluminescence	Processus biochimique
Triboluminescence	Friction, cassure et déformation
Sonoluminescence	Ultrasons

Tableau 1- 2 : Classement des différents types de luminescence³³

Dans la suite, nous nous intéresserons exclusivement aux phénomènes de fluorescence, de phosphorescence, de bioluminescence et de chémiluminescence.

La fluorescence est donc la capacité que possèdent certains produits chimiques à restituer l'énergie apportée par une excitation lumineuse via l'émission de lumière. Les espèces fluorescentes peuvent être classées suivant leur nature. Ainsi nous pouvons distinguer :

Les composés organiques : les polycycles aromatiques (naphtalène, anthracène, phénanthrène, pyrène, pérylène, etc), xanthènes, coumarines, oxazines, polyènes, diphenylpolyènes, les aminoacides aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine), les bases nucléiques etc.

Les composés inorganiques : l'ion uranyle (UO_2^+), les ions lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , etc), les verres dopés (Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, Ag), les nanocristaux semi-conducteurs (ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, etc).

Les composés organométalliques : les complexes de ruthénium, les complexes avec des ions lanthanides, etc.

³³ Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH: Weinheim, 2001.

L'histoire de la fluorescence moléculaire commence avec différentes observations de luminescence d'extraits de plantes. Ainsi, en 1565, N. Monardes a été le premier à décrire l'émission de fluorescence (sans pour autant lui donner un nom) d'une infusion de morceaux de bois tropical (*Pterocarpus indicus*).³⁴ Il fallut attendre E. Becquerel en 1842 qui observa que la longueur d'onde d'émission était plus grande que la longueur d'absorption et Sir G. G. Stokes en 1852, pour mettre en évidence la réfrangibilité de la lumière (propriété que présentent les rayons lumineux de subir une déviation quand ils passent dans un milieu de densité différente). Ces découvertes ont permis d'avoir la première caractérisation de la fluorescence. Sir G.G. Stokes fût le premier à introduire le terme de fluorescence en référence à la fluorite, minéral contenant majoritairement du fluorure de calcium et présentant des propriétés de fluorescence. Il est intéressant de noter que ce n'est pas la fluorite elle-même qui est fluorescente mais les impuretés qu'elle contient.³⁴

La fluorescence n'est cependant pas la seule voie de désexcitation. Il existe toute une série de possibilités permettant un retour à l'état fondamental énergétique comme l'explique le schéma ci-dessous (Figure 1 - 12).

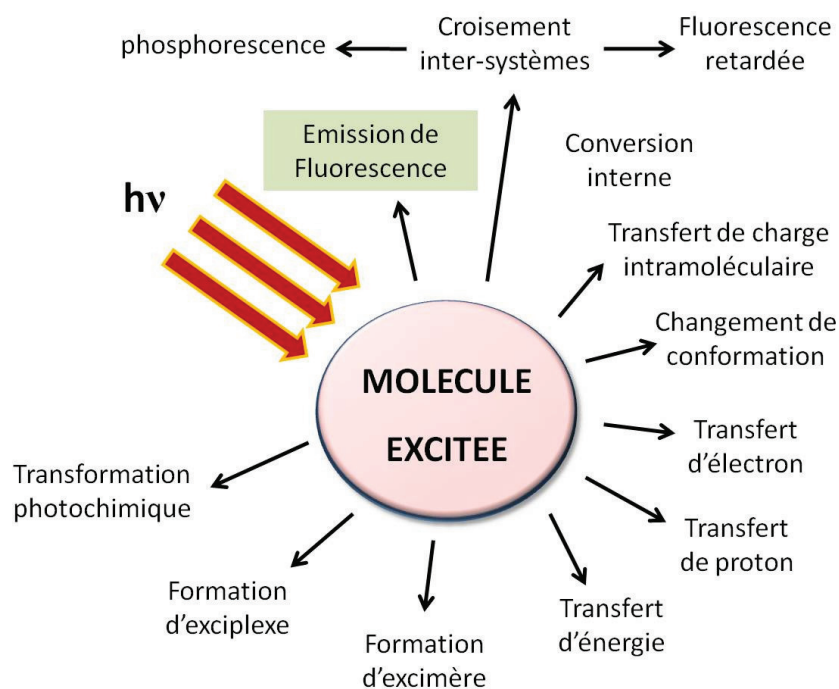


Figure 1 - 12 : Possibles voies de désexcitation³³

Nous nous intéresserons dans la suite de cet exposé aux phénomènes de fluorescence et de phosphorescence laissant de côté les autres modes de désexcitation. Nous ferons également un bref rappel du diagramme de Perrin-Jablonski, puis nous passerons en revue les paramètres qui régissent la fluorescence et qui caractérisent les fluorophores. Pour finir, nous décrirons quelques-uns des

³⁴ Muyskens, M. and Ed, V., *J. Chem. Educ.*, **2006**, *5*, 765.

principaux mécanismes connus pour influencer (positivement ou négativement) le phénomène de fluorescence et leur utilisation dans l'élaboration de sondes fluorescentes « intelligentes » permettant la détection de divers (bio)analytes d'intérêt.

1.2. Les caractéristiques de la fluorescence

1.2.1 Le diagramme de Perrin-Jablonski

Le diagramme de Perrin-Jablonski permet d'avoir un aperçu des phénomènes d'excitation et de désexcitation faisant suite à l'absorption d'un photon par fluorophore (Figure 1 - 13).

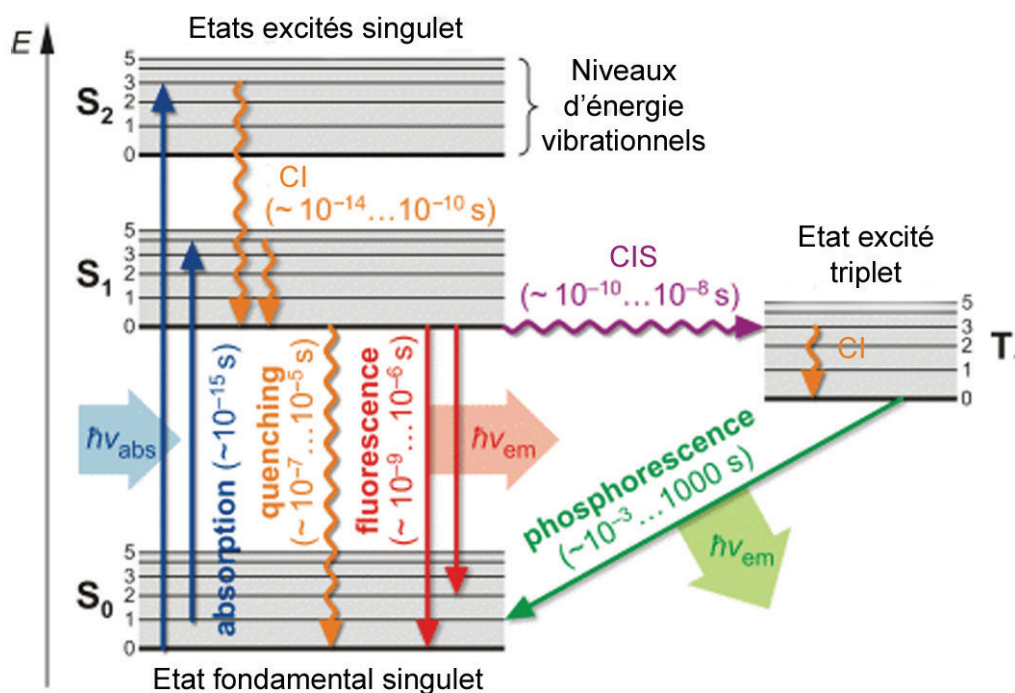


Figure 1 - 13 : Diagramme de Perrin-Jablonski (CI : Conversion interne, CIS : Conversion inter-système)

Les électrons étant préalablement dans leur état fondamental singulet sont excités par l'afflux de photons et passent à un état excité singulet (S_1 , S_2 , etc). Ce processus est très rapide (de l'ordre de 10^{-15} s). Les électrons peuvent ensuite subir plusieurs voies de désexcitation, différenciées entre désexcitations radiatives et non-radiatives. Parmi les désexcitations non-radiatives, nous avons la conversion interne (CI) où les électrons passent dans un autre état excité ($S_3 \rightarrow S_1$, $S_2 \rightarrow S_1$) et le retour à l'état fondamental sans radiation (appelé aussi « quenching », terme anglo-saxon qu'il est possible de traduire par extinction, mais que nous garderons dans la suite de ce manuscrit car il est communément utilisé dans le domaine). Ce dernier peut être dû à des collisions avec les molécules environnantes, en particulier le solvant qui absorbe l'énergie sous forme de chaleur par exemple. C'est l'une des raisons qui explique les mauvaises propriétés spectroscopiques de certains fluorophores organiques en milieu aqueux.

Les électrons peuvent aussi repasser à l'état fondamental en émettant un photon, ce processus est appelé la fluorescence. Il a une durée comprise entre la nano- et la microseconde. C'est donc un phénomène rapide.

La phosphorescence est le pendant de la fluorescence, à l'exception qu'il est beaucoup plus lent. La différence entre la fluorescence et la phosphorescence est l'état de spin de l'état excité. Dans le cas de la fluorescence, il n'y a pas de changement de spin entre l'état fondamental et l'état excité de la molécule. En revanche, dans le cas de la phosphorescence, il y a un changement de spin à l'état excité appelé « croisement inter-système ». Ensuite les électrons repassent à leur état fondamental (transition T1 → S1). La molécule excitée est donc dans un état « triplet ». Il en résulte une émission de lumière prolongée dans le cas de la phosphorescence. Ceci est dû aux transferts d'électrons entre les niveaux énergétiques n'ayant pas le même état de spin. En effet, ces transferts sont beaucoup plus longs (pouvant atteindre plusieurs centaines de secondes) car théoriquement interdits par les règles de la mécanique quantique.

1.2.2 Coefficient d'absorption, rendement quantique et brillance


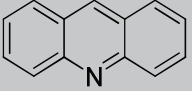
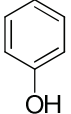
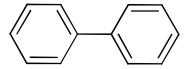
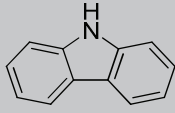
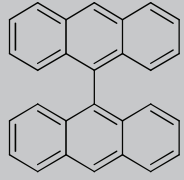
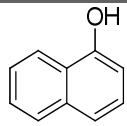
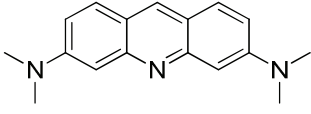
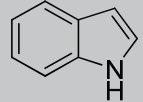
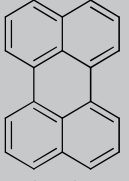
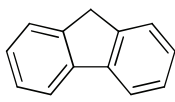
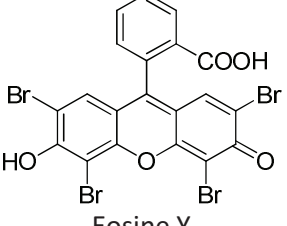
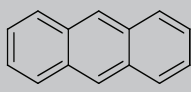
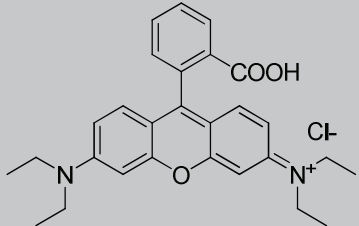
Le coefficient d'absorption molaire (ϵ) traduit la capacité d'absorption de la lumière par un chromophore, et par extension d'un fluorophore, c'est-à-dire que plus ce coefficient est important, plus le fluorophore aura d'électrons disponibles susceptibles de passer de l'état fondamental à l'état excité. Un bon fluorophore aura donc un coefficient d'absorption molaire important puisqu'il aura la potentialité électronique pour émettre de la fluorescence. La relation de Beer-Lambert est bien connue pour relier l'absorbance observée à la concentration en fluorophore étudié par un facteur multiplicatif correspondant à la longueur du trajet optique et au coefficient d'absorption molaire. Cette loi se traduit par la relation suivante :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times l \times C$$

« A_{λ} » est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée, « ϵ_{λ} » le coefficient d'absorption molaire à cette longueur d'onde (exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$), « l » la longueur de la cuve en centimètre et « C » la concentration de l'espèce en solution ($mol.l^{-1}$).

Généralement, les structures aromatiques ont des coefficients d'absorption molaire importants. En effet, les électrons dans les orbitales π sont délocalisés sur l'ensemble de la structure de la molécule et donc plus facilement excitables. Ainsi selon une règle empirique, plus le réseau d'électrons délocalisés est important, plus le coefficient sera élevé. Cela explique le fait que les fluorophores organiques soient quasiment exclusivement des structures polycycliques aromatiques. Le tableau suivant (Tableau 1- 3) présente quelques valeurs de coefficient d'absorption molaire issues de la

littérature. Nous pouvons remarquer que plus la structure aromatique est importante, plus le coefficient d'absorption molaire augmente. Cela n'est évidemment pas le seul paramètre. Les électrons non-liants des hétéroatomes (N, O ou S par exemple) peuvent participer à la délocalisation électronique et augmenter le coefficient d'absorption molaire, comme l'illustre la comparaison entre l'anthracène et l'acridine, ou entre l'acridine et l'acridine orange.

Composé	ϵ (en $M^{-1}.cm^{-1}$)	Composé	ϵ (en $M^{-1}.cm^{-1}$)
 Benzène	≈ 200	 Acridine	$\approx 12\ 000$
 Phénol	$\approx 2\ 000$	 Biphényle	$\approx 16\ 000$
 Carbazole	$\approx 4\ 200$	 Bianthracène	$\approx 24\ 000$
 1-Naphtol	$\approx 5\ 400$	 Acridine orange	$\approx 30\ 000$
 Indole	$\approx 5\ 500$	 Pérylène	$\approx 34\ 000$
 Fluorène	$\approx 9\ 000$	 Eosine Y	$\approx 90\ 000$
 Anthracène	$\approx 10\ 000$	 Rhodamine B	$\approx 105\ 000$

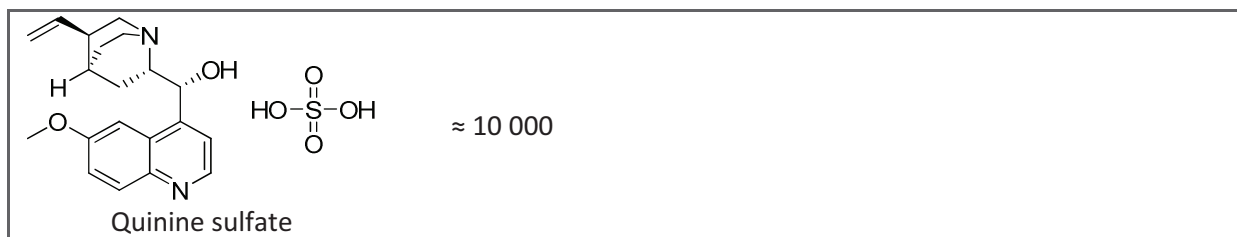


Tableau 1- 3 : Quelques exemples de coefficient d'absorption molaire (ϵ)³³

Le rendement quantique relie les propriétés potentielles d'un fluorophore à ses propriétés réelles de fluorescence. En effet, celui-ci se définit naturellement comme le rapport entre le nombre de photons absorbés sur le nombre de photons émis par un processus de fluorescence. Nous obtenons donc l'équation suivante :

$$\phi_F = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

Contrairement au coefficient d'absorption molaire, ce paramètre est beaucoup moins facile à appréhender et à moduler de manière rationnelle. Le rendement peut être fortement influencé et dépendre du composé, du solvant d'étude, des liaisons hydrogène, de la température, de la viscosité et de la présence de molécules ou de groupement fonctionnels « quenchers ». De plus, une compétition avec les voies de désexcitation comme la phosphorescence diminue d'autant le rendement quantique de fluorescence. Il est donc difficile de déterminer des lois empiriques d'évolution du rendement quantique. Toutefois, il est connu que le rendement quantique diminue au fur et à mesure que la température augmente. De plus, il est en général plus élevé dans les solvants organiques que dans les tampons aqueux car l'eau favorise les désexcitations non-radiatives.

La brillance est le facteur donnant une idée de la qualité spectroscopique globale du fluorophore. Elle se définit simplement comme le produit du rendement quantique par le coefficient d'extinction molaire.

$$B = \epsilon \times \phi_F$$

La brillance est à la valeur de référence permettant de comparer les fluorophores entre eux en donnant une échelle commune. Pour des applications bio-analytiques, et en particulier pour l'imagerie optique *in vivo*, une valeur de 30 000 M⁻¹.cm⁻¹ de brillance est jugée nécessaire.³⁵ Peu de fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge présentent cette propriété en milieu physiologique à l'exception des Cyanines 5. Cependant, cette valeur devrait être amenée à baisser dans les prochaines années au fur et à mesure de l'amélioration de la sensibilité des appareils de détection.

³⁵ Wolfbeis, O. S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 17, 2980.

1.2.3 Déplacement de Stokes

La différence entre la longueur d'onde d'émission et la longueur d'onde d'absorption est appelée déplacement de Stokes (Figure 1 - 14). Cette valeur traduit la perte énergétique correspondant à la désexcitation non-radiative entre le niveau énergétique d'absorption et le niveau énergétique d'émission de fluorescence, nécessaire pour avoir un fluorophore.

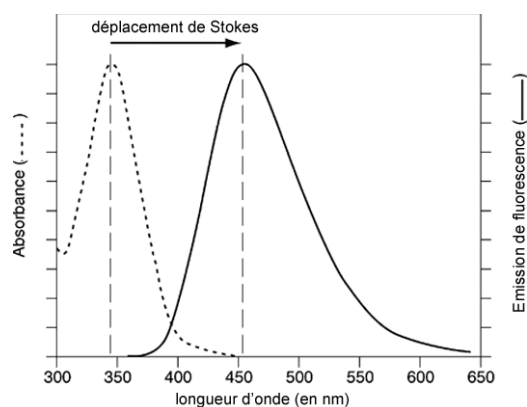


Figure 1 - 14 : Schéma illustratif du déplacement de Stokes³⁶

Ce facteur est très important en particulier pour l'instrumentation car plus les spectres d'excitation et d'émission sont séparés, plus il est facile de filtrer la lumière incidente qui pourrait perturber le signal en sortie. Par ailleurs, une bande d'émission très différente de la bande d'absorption permet d'utiliser des filtres différents en entrée et en sortie d'un dispositif d'imagerie et ainsi, de réduire considérablement le bruit de fond. Néanmoins, un déplacement de Stokes trop important se traduit en général par une chute du rendement quantique.

Le déplacement de Stokes peut dépendre du moment dipolaire du fluorophore. Ainsi une molécule présentant des charges nettes négatives et positives possédera un déplacement de Stokes important. Ce phénomène est appelé l'effet « push-pull » où un fluorophore possède à la fois un groupement donneur d'électrons (-OH, -OR, -NH₂, -NHR, -NHR₂, etc) et un groupement attracteur (COOR, NR₃⁺, etc.).

³⁶ Site internet Current Protocols (Wiley)

1.2.4 Spectre d'excitation

Le spectre d'excitation s'obtient en mesurant la fluorescence résultante de l'excitation à différentes longueurs d'onde. Le spectre s'obtient en traçant l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation du fluorophore. Ce spectre peut être ensuite comparé au spectre d'absorption, ce qui permet de déterminer le nombre d'espèces existant à l'état fondamental. En effet, si le spectre d'émission est identique au spectre d'absorption, ceci montre qu'une seule espèce à l'état fondamental est excitée pour donner de la fluorescence. En revanche, si le spectre d'excitation est très différent, ce phénomène met en évidence l'existence de plusieurs espèces présentes à l'état fondamental comme des agrégats, des complexes, des formes tautomériques ou des impuretés. Le spectre d'émission est donc une source d'information importante pour comprendre les différentes interactions du fluorophore avec lui-même (agrégats de type H ou J par exemple) ou avec son environnement (effets de solvants).

1.3. Effets environnementaux et principaux mécanismes

1.3.1 Paramètres influençant la fluorescence

La fluorescence est influencée de manière importante par l'environnement du fluorophore. C'est d'ailleurs un des points qui fait le succès de la spectroscopie de fluorescence. En effet, beaucoup de sondes sont fondées sur la sensibilité du fluorophore à des paramètres comme le pH, la polarité du solvant voire la formation ou la suppression de liaisons hydrogène. La mesure du pH est particulièrement indiquée par exemple dans l'imagerie de cellules car le pH intracellulaire joue un rôle important dans le fonctionnement des enzymes, dans la résistance aux médicaments, le transport ionique ou l'apoptose. De nombreuses structures fluorescentes sensibles au pH ont donc été développées ces dernières années.³⁷

Pour résumer, les paramètres influençant la fluorescence sont rassemblés sur le graphique suivant (Figure 1 - 15).

³⁷ Han, J. and Burgess, K., *Chem. Rev.*, **2010**, 5, 2709.

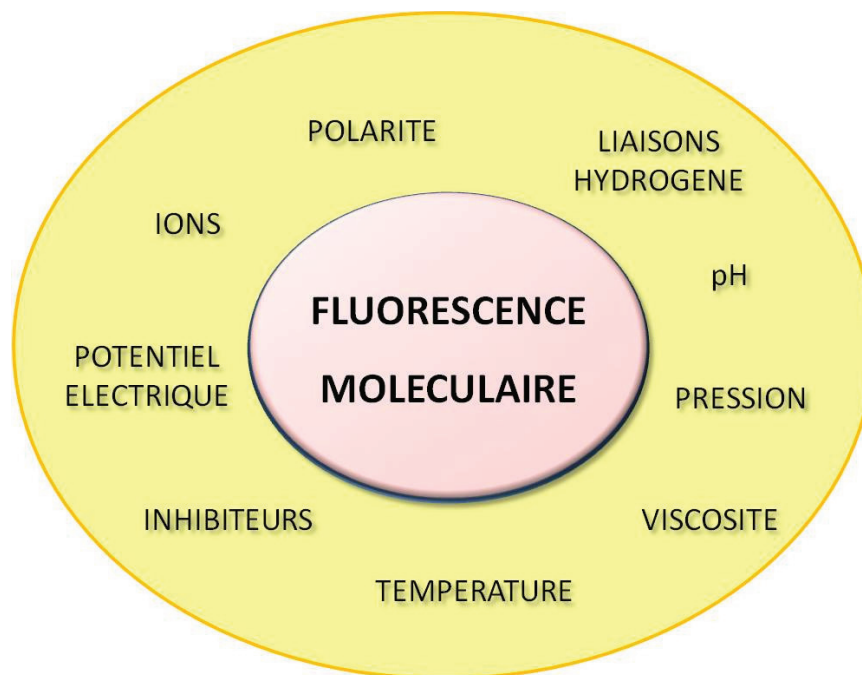


Figure 1 - 15 : Paramètres influençant la fluorescence (d'après Valeur)³³

Ce graphique traduit aussi la complexité de mettre en place des sondes fluorescentes dont les propriétés optiques sont uniquement influencées par le paramètre à étudier.

1.3.2 Le transfert de charge intramoléculaire

Le transfert de charge intramoléculaire (ou ICT pour Internal Charge Transfer) est un mécanisme s'appuyant sur la propriété qu'ont les fluorophores d'avoir un moment dipolaire très différent à l'état fondamental et à l'état excité. En général le moment dipolaire est beaucoup plus important à l'état excité qu'à l'état fondamental. Il y a alors une réorganisation du solvant autour du fluorophore afin de minimiser cet état de charge et stabiliser l'orbitale moléculaire correspondante. Il se produit ainsi un effet bathochrome, puisque l'orbitale excitée est plus basse en énergie, donnant une barrière énergétique entre l'état excité et l'état fondamental moins élevée. Cela explique la possibilité d'avoir une émission de fluorescence différente pour un même fluorophore suivant la polarité du solvant (Figure 1 - 16).

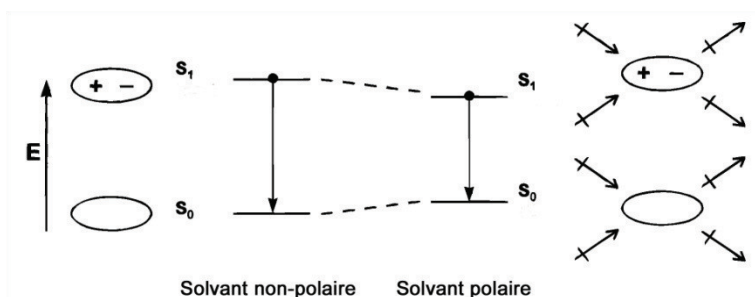


Figure 1 - 16 : Effet de solvant sur le spectre d'émission d'un fluorophore³⁸

Ce mécanisme a été largement utilisé dans le développement de sondes à cations (H^+ , Ca^{2+} , Na^+ et Mg^{2+}). Le principe est que le cation interagit avec la partie « donneur » du fluorophore (riche en électrons) et empêche de rendre la charge disponible pour augmenter le moment dipolaire. Il en résulte un déplacement vers les basses longueurs d'onde de l'absorption et du spectre d'excitation du fluorophore (Figure 1 - 17).

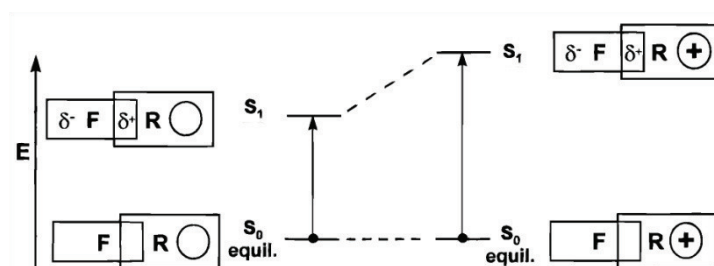


Figure 1 - 17 : Effet de cation sur le spectre d'absorption³⁸

Cette propriété permet la mise au point de sondes ratiométriques en particulier dans le cas de la détection de métaux lourds. Deux longueurs d'onde sont en général utilisées pour pouvoir améliorer la précision par un calcul de ratio et ainsi disposer d'un étalon interne sur la molécule afin de calibrer l'émission. La figure suivante (Figure 1 - 18) est un exemple récent dans le cas de la détection du cation Pb^{2+} . La fluorescence diminue à une longueur d'onde alors qu'elle augmente à une autre en fonction du nombre d'équivalents de cation présent dans la solution.³⁹

³⁸ de Silva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., Gunnlaugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T. and Rice, T. E., *Chem. Rev.*, **1997**, 5, 1515.

³⁹ Ni, X.-L., Wang, S., Zeng, X., Tao, Z. and Yamato, T., *Org. Lett.*, **2011**, 4, 552.

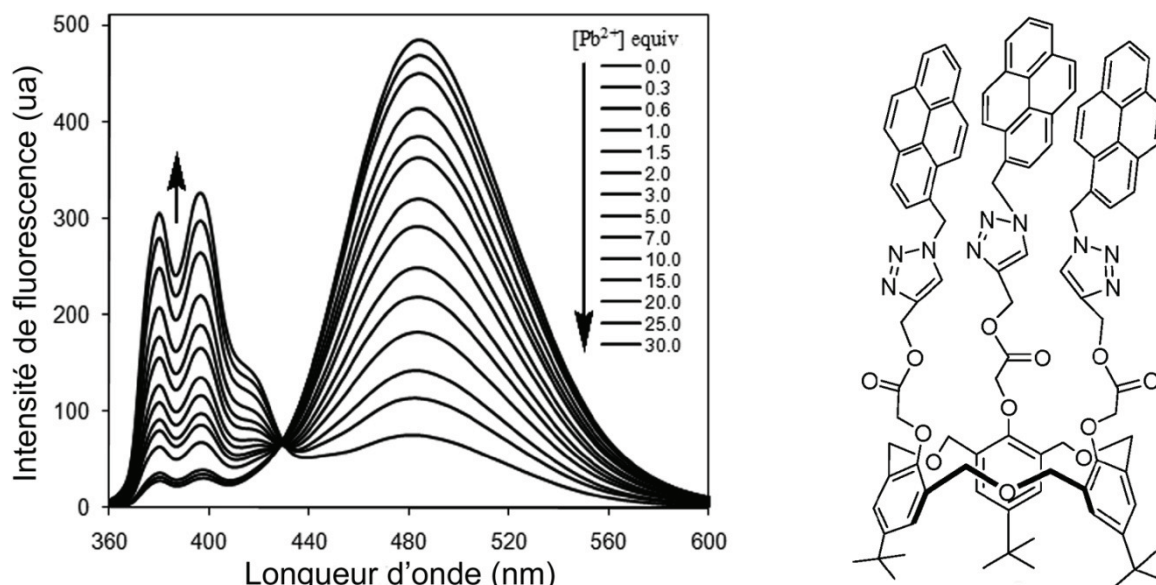


Figure 1 - 18 : Spectre d'émission d'une sonde ratiométrique du cation Pb^{2+} en fonction du nombre d'équivalents³⁹

1.3.3 Le transfert d'électron photoinduit⁴⁰

Le transfert d'électron photoinduit (ou PeT pour Photoinduced electron Transfer) est le mécanisme à la base du développement de nombreuses sondes. Il est bien connu et étudié depuis longtemps car il intervient dans les systèmes photosynthétiques⁴¹. Le fluorophore doit posséder un groupement donneur d'électrons (en général porteur d'un doublet électronique non-liant, un groupement amino par exemple) et un groupement accepteur (en général le reste de la structure aromatique). Le processus se déroule en plusieurs étapes : lors de l'excitation du fluorophore (l'accepteur), un électron passe de l'orbitale HOMO à l'orbitale LUMO. Habituellement, cet électron doit ensuite se désexciter et repasser dans l'orbitale HOMO. Plusieurs processus similaires sont possibles, par exemple, dans le cas où l'orbitale des électrons du donneur (orbitale non-liante) d'un fluorophore est située entre les deux orbitales HOMO et LUMO de l'accepteur. Pour compenser la perte électronique à l'état fondamental lié à l'excitation, le donneur transfère un électron de son orbitale vers l'accepteur. Il récupère ensuite l'électron manquant de l'orbitale LUMO. On a donc une désexcitation sans émission de fluorescence. Le schéma suivant explique ce mécanisme (Figure 1 - 19).

⁴⁰ Mattay, J., Bissell, R., Prasanna de Silva, A., Nimal Gunaratne, H., Mark Lynch, P., Maguire, G., McCoy, C. and Samankumara Sandanayake, K., in *Photoinduced Electron Transfer V*, Springer Berlin / Heidelberg, **1993**, pp. 223.

⁴¹ Wasielewski, M. R., *Chem. Rev.*, **1992**, 3, 435.

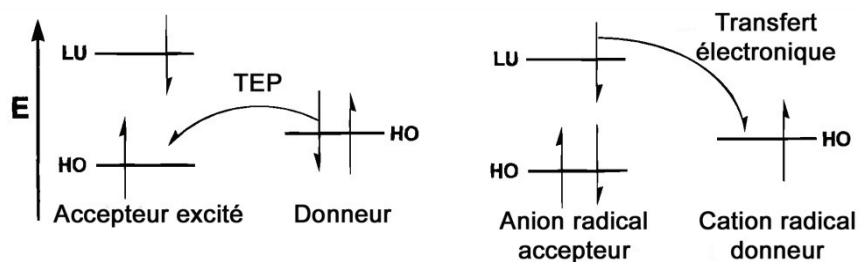


Figure 1 - 19 : Schéma du mécanisme électronique de la TEP³⁸

Le donneur est en général une fonction amine ou éther. En présence d'un analyte (en général un cation), le doublet non-liant de l'azote est impliqué dans la complexation, le niveau énergétique de l'orbitale occupée du donneur est modifiée, et n'est plus disponible pour assurer son rôle de donneur, la fluorescence est alors restaurée et la sonde est « allumée ». Le mécanisme de la TeP est donc à la base de toutes les sondes « on-off » développées ces dernières années pour la détection de cations.^{42,43}

Des systèmes plus complexes fonctionnant comme des portes logiques électroniques ont pu également être développés en se fondant sur ce phénomène. La Figure 1 - 20 est l'exemple d'une sonde pour les cations H^+ et Na^+ . Si l'un des deux analytes est manquant dans le milieu, la sonde est éteinte. En revanche, si les deux analytes sont présents, la sonde est allumée. Par comparaison avec l'électronique, cette sonde fonctionne comme une porte logique de type « AND ».⁴²

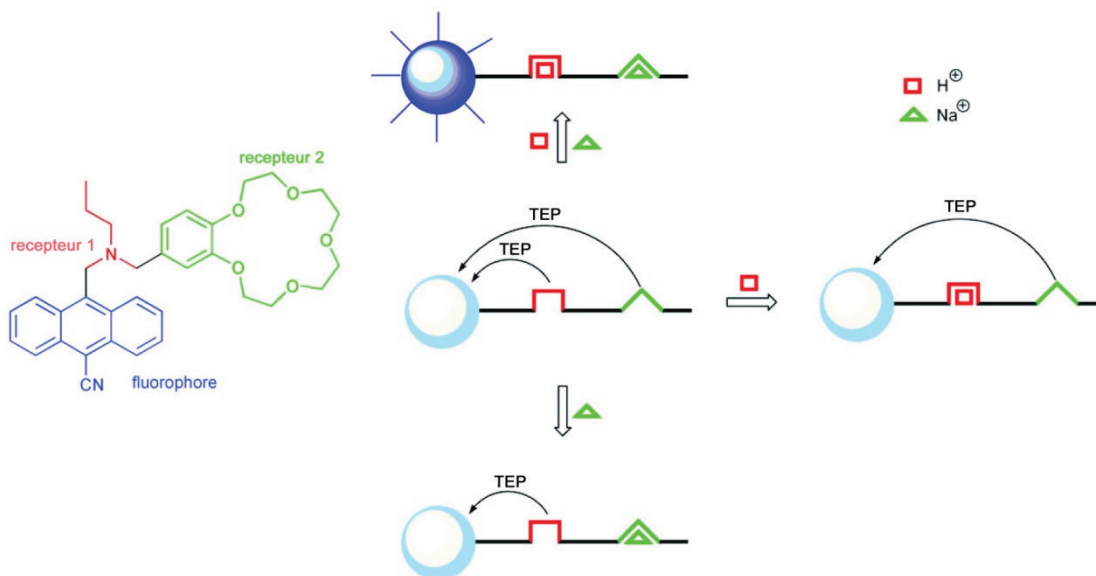


Figure 1 - 20 : Sonde fonctionnant comme une porte logique AND pour H^+ et Na^+ (Andreasson *et al*)⁴²

1.3.4 Le FRET

⁴² Andreasson, J. and Pischel, U., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *1*, 174.

⁴³ Lodeiro, C., Capelo, J. L., Mejuto, J. C., Oliveira, E., Santos, H. M., Pedras, B. and Nunez, C., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *8*, 2948.

Le FRET (pour « Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer ») est un cas particulier de désexcitation non radiative, correspondant à un transfert d'énergie entre deux entités. Ce transfert est très utilisé, car il est très sensible à la distance entre les deux partenaires. Dans ce cas, deux entités (en général une paire de fluorophores mais cela peut également être une paire fluorophore/quencher) sont sur la même molécule ou proches dans l'espace. L'une (un fluorophore) est appelée le donneur, l'autre l'accepteur. Lorsque le donneur est excité, il y a un transfert énergétique non radiatif vers l'accepteur. En conséquence, alors qu'il n'a pas été directement excité, l'accepteur émet à sa propre longueur d'onde d'émission (dans le cas où le deuxième partenaire est aussi un fluorophore) ou se désexcite de manière non-radiative par relaxation (dans le cas où le deuxième partenaire est un quencher). L'efficacité de ce transfert d'énergie FRET dépend principalement de la distance séparant les deux entités, avec une dépendance en $1/R^6$, si R est la distance entre les deux fluorophores ou fluorophore/quencher. Ce principe a été mis à profit pour la synthèse de sondes ciblant diverses enzymes de la classe des hydrolases (notamment les protéases⁴⁴ ou les phosphodiésterases⁴⁵). Par exemple, si les deux entités sont fixées sur une même architecture peptidique, substrat d'une protéase d'intérêt, la sonde est normalement « éteinte » (dans le cas où l'accepteur est un quencher) tant que les deux partenaires sont proches dans l'espace. Après la coupure enzymatique du peptide, les deux partenaires vont s'éloigner, le mécanisme de FRET ne pourra plus fonctionner et le donneur récupérera son émission de fluorescence propre. Nous aurons donc une sonde activable (*vide infra*).

⁴⁴ Tung, C.-H., *Pept. Sci.*, **2004**, 5, 391.

⁴⁵ Kikuchi, K., Takakusa, H. and Nagano, T., *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2004**, 6, 407.

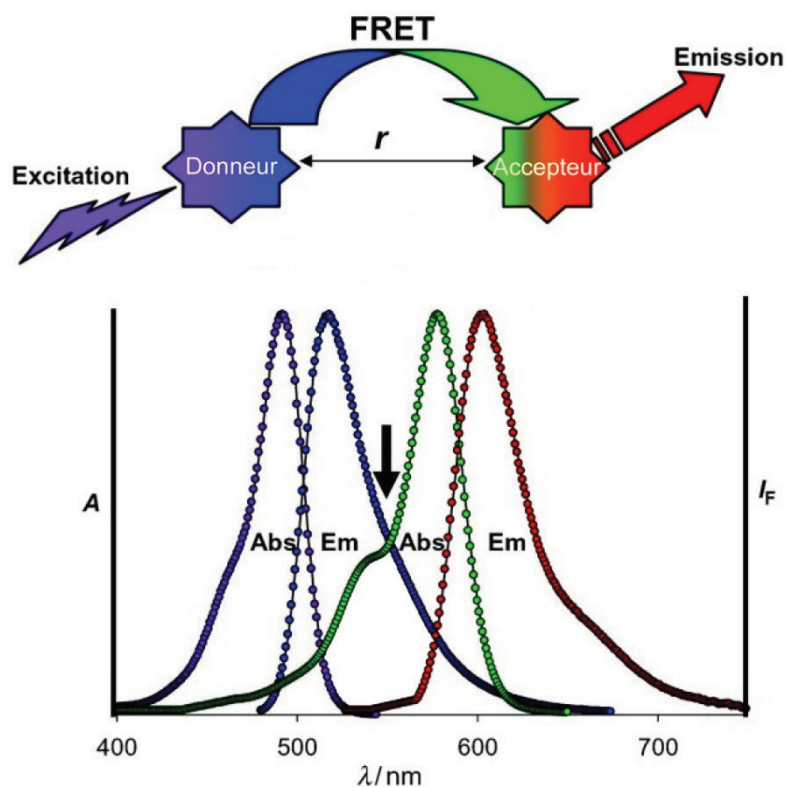


Figure 1 - 21 : Schéma de principe du FRET et illustration (Sapsford et al)⁴⁶

Comme l'explique la Figure 1 - 21, le FRET ne fonctionne que si le spectre d'émission du donneur recouvre en partie le spectre d'absorption de l'accepteur. En effet, lors de l'excitation du donneur, celui-ci va transférer de l'énergie vers l'accepteur. Si l'orbitale de l'accepteur n'est pas énergétiquement accessible, un transfert efficace ne peut avoir lieu.

Le BRET (pour « Bioluminescence Resonance Energy Transfer ») est l'analogue du FRET en bioluminescence. Le donneur est alors un bioluminophore, la coelentérazine par exemple, dont la conversion en un intermédiaire haut en énergie est assurée par une enzyme, la *Renilla Luciferase* (*RLuc*), qui est à l'origine de son excitation (et a fortiori de son émission de lumière). Historiquement, la coelentérazine a été découverte en même temps que la GFP dans la célèbre méduse *Aequorea victoria*. Elle est à l'origine de l'émission de photons de longueur d'onde 395 nm et peut, dans ce cas, être couplée à la GFP, qui absorbe à cette longueur d'onde et émet à 510 nm.⁴⁷ Cette propriété est un outil exceptionnel dans le développement de bio-senseurs biologiques. En effet, par modification génétique d'une protéine d'intérêt, il est possible d'implémenter le gène codant pour la luciférase et pour la GFP (ou des GFP modifiées pour émettre à d'autres longueurs d'onde). Il est alors possible de suivre une protéine en temps réel dans un organisme vivant. Le BRET peut être utilisé pour étudier la

⁴⁶ Pour une revue récente, voir : Sapsford, K. E., Berti, L. and Medintz, I. L., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *28*, 4562.

⁴⁷ Xia, Z. and Rao, J., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2009**, *1*, 37.

séparation des deux partenaires (le bioluminophore et le fluorophore) par modification des propriétés d'émission.

Cette approche a aussi été appliquée en remplaçant l'accepteur par un fluorophore organique synthétique ou par un nanocristal semi-conducteur fluorescent (encore appelé « quantum dot » (QD)) afin de faire des sondes sur-mesure pour les besoins de l'analyse ciblée. (Figure 1 - 22)

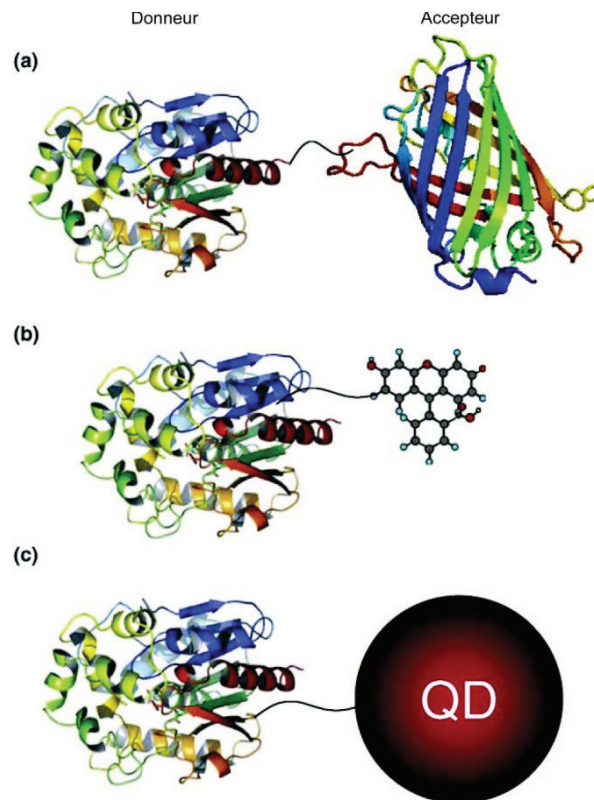


Figure 1 - 22 : Utilisation du BRET en couplant une protéine bioluminescente à une protéine fluorescente (a), un fluorophore (b) ou un « quantum dot » (c) (Xia *et al*)⁴⁷

2 Les fluorophores

2.1. Généralités

La famille des fluorophores est immense. Nous pouvons distinguer notamment les fluorophores dits endogènes (comme les acides aminés et les protéines fluorescentes) et les fluorophores synthétiques. Pour une utilisation en imagerie optique, les fluorophores synthétiques doivent répondre à un cahier des charges très précis et contraignant. Ils doivent posséder une très bonne stabilité chimique en milieu physiologique. Ainsi il est nécessaire d'éviter la présence de fonctionnalités connues pour réagir efficacement avec des constituants cellulaires (co-enzymes, thiols biologiques, etc). Les fluorophores doivent également présenter une bonne stabilité photochimique. En effet, le photoblanchiment (aussi appelé photobleaching en anglais) est un mécanisme photochimique qui conduit à la perte des propriétés fluorescentes du fluorophore par suite de réactions irréversibles à l'état excité. La famille des fluorophores de type cyanine (et dérivés apparentés comme les merocyanines et squarines) présentée plus loin, a pour principal inconvénient de comporter une longue chaîne polyméthine (de 3 à 7 atomes de carbone) très sensible au photoblanchiment *via* sa réaction avec l'oxygène singulet^{48,49} (Figure 1 - 23). Il est intéressant de noter que les cyanines sont aussi instables à la lumière à l'état fondamental. Outre ces propriétés indispensables (citées précédemment), les fluorophores doivent avoir : une bonne brillance afin de pouvoir utiliser des quantités raisonnables de sondes, une bonne sensibilité et enfin si possible, en particulier dans le cas des sondes *in vivo*, une bonne solubilité dans les milieux aqueux et une résistance à l'agrégation. Ces deux dernières propriétés sont en général obtenues par introduction de groupements hydrophiles chargés négativement (sulfonate ou phosphonate). La polarité du fluorophore doit être ajustée (pas trop importante) dans le cas de sondes intracellulaires car celui-ci ne pourrait plus pénétrer facilement dans la cellule.

⁴⁸ Touchkine, A., Nguyen, D.-V. and Hahn, K. M., *Org. Lett.*, **2007**, *15*, 2775.

⁴⁹ Samanta, A., Vendrell, M., Das, R. and Chang, Y.-T., *Chem. Commun.*, **2010**, *39*, 7406.

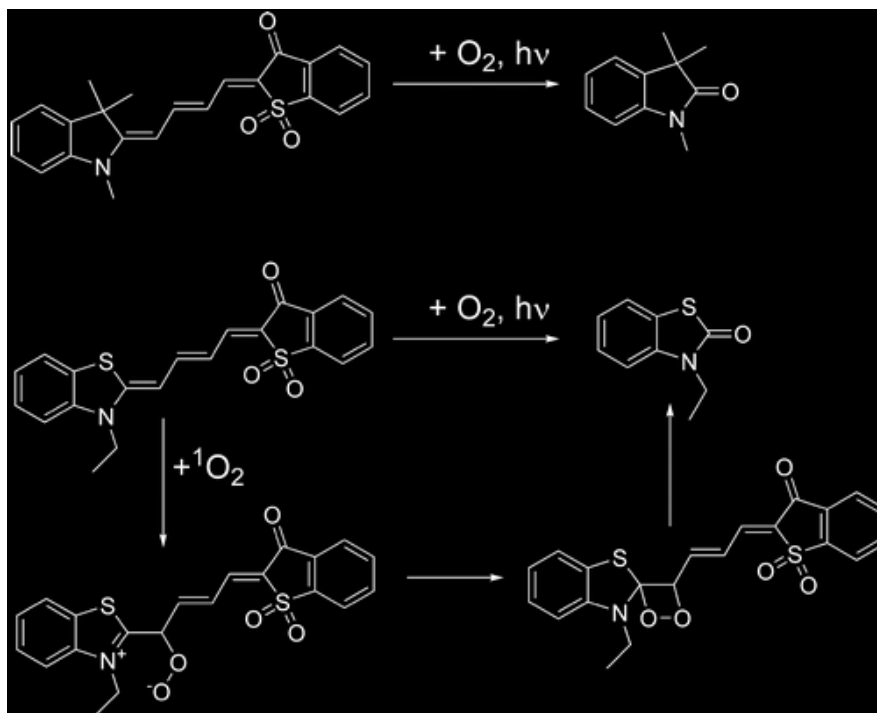


Figure 1 - 23 : Exemple de dégradation de mérocyanine en présence d'oxygène singulet (Toutchkine *et al*)⁴⁸

Dans la suite, nous parlerons essentiellement des fluorophores organiques synthétiques, les plus utilisés actuellement comme marqueur optique des sondes (bio)moléculaires. La figure suivante (Figure 1 - 24) est une vision synoptique des fluorophores actuellement présents sur le marché et couramment utilisés pour des applications bio-analytiques dans les différents contextes *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*. Cette figure permet d'avoir une vue d'ensemble des molécules en fonction de deux propriétés clés : leur longueur d'onde d'émission et leur brillance. Il est ainsi possible de sélectionner la famille de fluorophores la plus utile et pertinente pour une application spécifique (*in vitro*, *in cellulo*, *in vivo*) en fonction des besoins ou des équipements disponibles (filtres, etc). Dans la suite de l'exposé, nous présenterons uniquement les familles des cyanines, des BODIPYs, des coumarines et des benzophénoxazines, principales familles de fluorophores utilisées en imagerie optique *in vivo* et abordées lors de cette thèse.

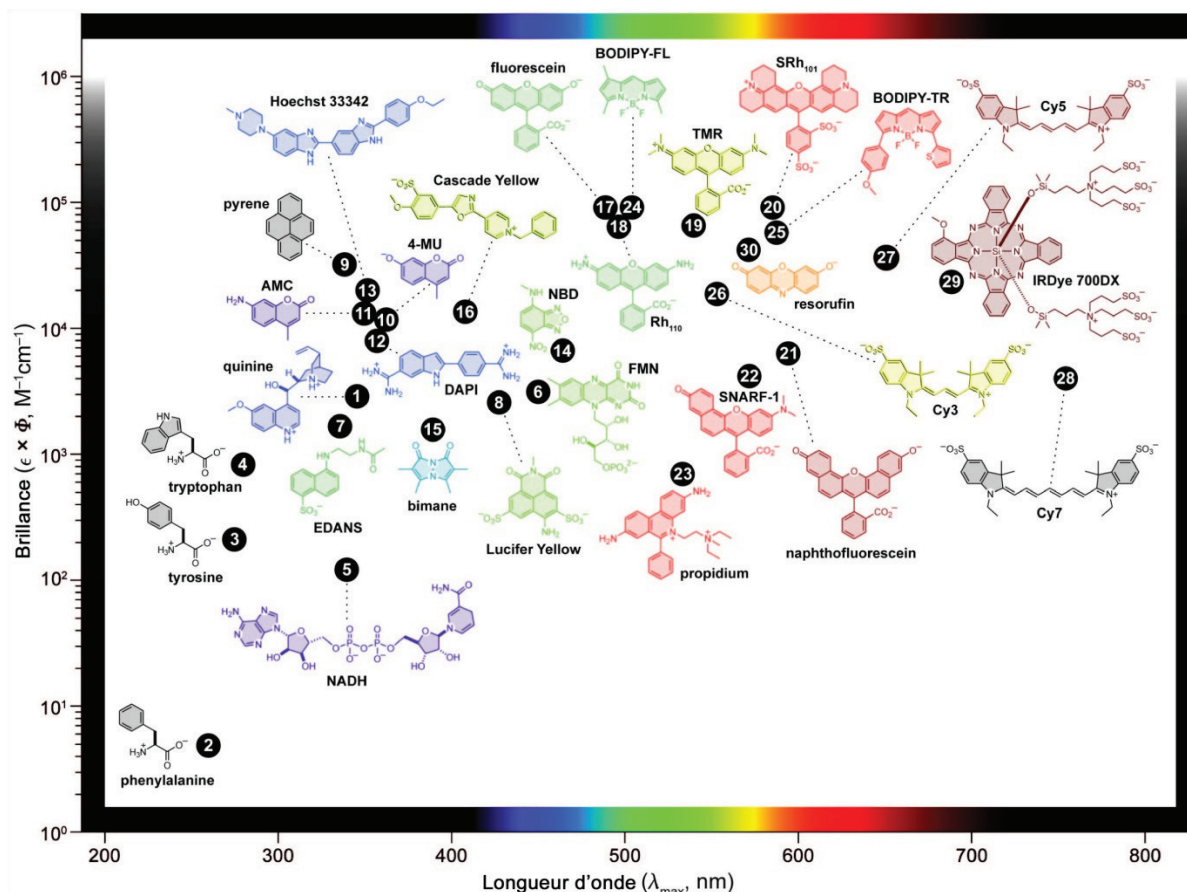


Figure 1 - 24 : Représentation synthétique des familles de fluorophores en fonction de la longueur d'onde d'émission et de la brillance⁵⁰

2.2. La famille des cyanines⁵¹

La famille des cyanines est la famille de fluorophores la plus utilisée en imagerie optique pour des applications *in vivo*. Une cyanine est constituée d'une chaîne polyméthine avec un donneur (un hétérocycle possédant au moins un atome d'azote neutre, indole par exemple) à une extrémité et un accepteur (un hétérocycle possédant au moins un atome d'azote quaternarisé donc chargé, indole par exemple) à l'autre extrémité. Les cyanines possèdent une absorption et une émission dans la gamme 550-800 nm en fonction de la longueur de la chaîne polyméthine. De plus, l'efficacité de fluorescence reste bonne dans l'eau et les tampons aqueux, à condition que ces structures soient correctement fonctionnalisées à l'aide de groupements hydrophiles (le plus souvent des motifs acide sulfonique SO_3H , sous forme de sulfonates en milieu physiologique). Nous pouvons distinguer trois sous-familles de cyanines en fonction de la longueur de la chaîne polyméthine, dont les noms sont conventionnellement abrégés en Cy3, Cy5 et Cy7 (Figure 1 - 25).

⁵⁰ Lavis, L. D. and Raines, R. T., *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 142.

⁵¹ Ballou, B., Ernst, L. A. and Waggoner, A. S., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 795.

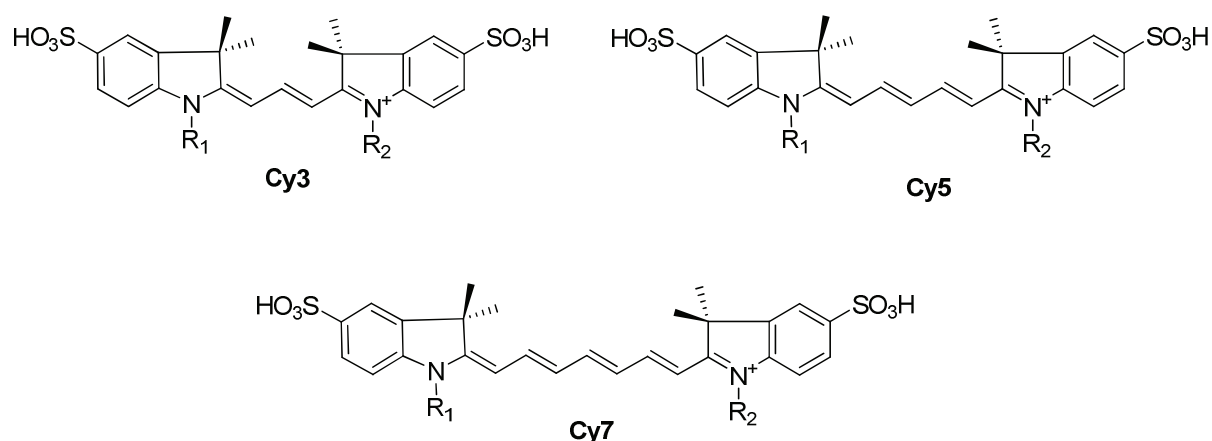


Figure 1 - 25 : Les trois familles de cyanines les plus utilisées (Cy3, Cy5 et Cy7)⁵²

Le coefficient d'absorption molaire des cyanines est très élevé (compris entre 150 000 et 250 000 $M^{-1}.cm^{-1}$) et pour le moment inégalé dans cette partie du spectre électromagnétique. De plus, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont aisément modulables en jouant sur la longueur de la chaîne (déplacement bathochrome d'environ 100 nm par motif $CH_2=CH_2$ ajouté) et sur la nature des substituants présents sur le cycle indolique (un déplacement bathochrome de 15-30 nm peut être obtenu en introduisant un second cycle aromatique). Les cyanines développées par le groupe de A. S. Waggoner et aujourd'hui commercialisées par GE Healthcare sous le nom CyDye™ sont bien solubles dans les milieux aqueux. Elles sont connues pour ne pas s'agréger du fait d'un positionnement optimisé des groupements SO_3H , ce qui leur a valu leur succès pour des applications d'imagerie *in vivo*. Il est intéressant de noter que l'ICG (« Indocyanine Green »), un dérivé d'une Cy7, est actuellement la seule cyanine ayant obtenu une autorisation de la FDA pour une utilisation clinique (Figure 1 - 26). En effet, elle est utilisée dans le diagnostic médical pour analyser le flux sanguin (foie, cœur, cerveau, etc).

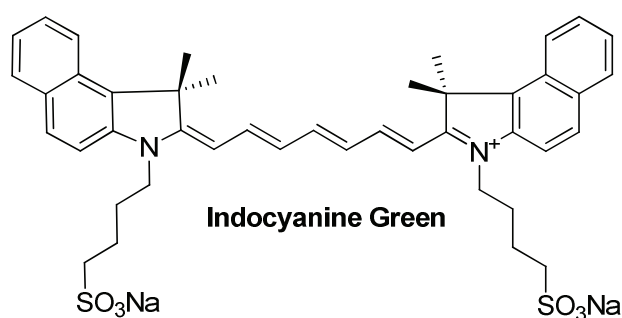


Figure 1 - 26 : Formule complète de l'ICG

⁵² Les dérivés présentés sont ceux commercialisés par la General Electric Company et initialement développés dans cette publication : Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J. and Waggoner, A. S., *Bioconjugate Chem.*, **1993**, 2, 105.

L'autre cyanine d'intérêt est la Cy5.5. Elle est le marqueur le plus utilisé à ce jour dans la synthèse de sondes *in vivo* ainsi qu'en tant que standard pour les mesures de rendement quantique (Figure 1 - 27).⁵³

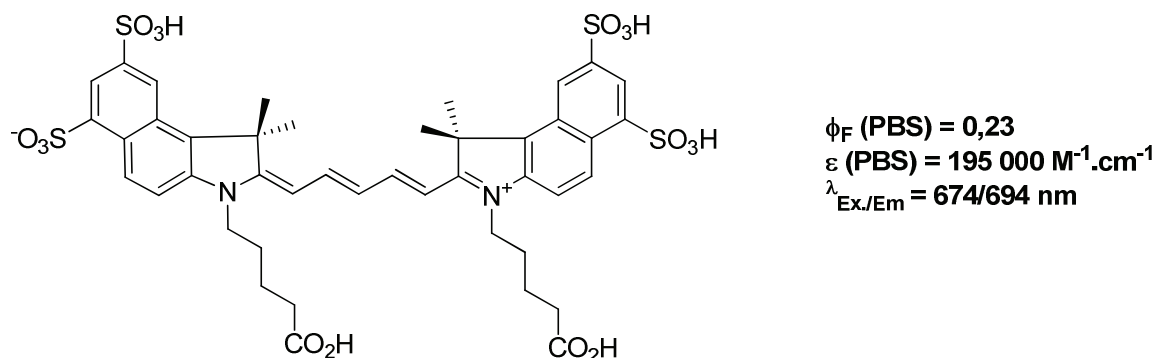


Figure 1 - 27 : Structure de la cyanine 5.5 vendue par la General Electric Company

L'inconvénient majeur des cyanines est leur sensibilité importante au photoblanchiment. Sous irradiation par exemple, la Cy7 a une durée de demi-vie de l'ordre de 150 à 180 secondes, ce qui s'avère faible dans le cas d'études prolongées pour certaines pathologies (oncologie par exemple).

L'innovation dans ce domaine a été de stabiliser les cyanines Cy7 *via* l'introduction d'un cycle à 6 chaînons au milieu de la chaîne polyméthine. Elles ont également été hydrosolubilisées et rendues bioconjuguables par l'introduction d'une fonction réactive CO₂H en position *méso*.^{54,55} Outre les travaux de QUIDD dans ce domaine, menés en collaboration avec l'Université de Rouen, ces molécules font l'objet de nombreux travaux de la part des laboratoires académiques comme de la part des entreprises de biotechnologies. Nous pouvons citer notamment Dyomics, VisEn (Perkin Elmer) ou Li-Cor pour les entreprises privés et les travaux de Samanta *et al*⁵⁶ dans le domaine universitaire, qui a permis de trouver des dérivés Cy7.0 photostables.

⁵³ Mujumdar, S. R., Mujumdar, R. B., Grant, C. M. and Waggoner, A. S., *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 3, 356.

⁵⁴ Bouteiller, C., Clavé, G., Bernardin, A., Chipon, B., Massonneau, M., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Bioconjugate Chem.*, **2007**, 4, 1303.

⁵⁵ Pham, W., Cassell, L., Gillman, A., Koktysh, D. and Gore, J. C., *Chem. Commun.*, **2008**, 16, 1895.

⁵⁶ Samanta, A., Vendrell, M., Das, R. and Chang, Y.-T., *Chem. Commun.*, **2010**, 39, 7406.

2.3. La famille des BODIPYs

Le premier BODIPY (pour BORE-DIPYrométhène) a été synthétisé en 1968.⁵⁷ Depuis, ces analogues rigidifiés de cyanines ont fait l'objet d'intenses travaux afin d'optimiser leur synthèse et leurs propriétés physico-chimiques et spectrales.^{58,59} Leur avantage est que leurs propriétés optiques sont peu influencées par la polarité et au pH du milieu. Ils possèdent un bon rendement quantique (du moins en milieu organique) dû à un état triplet à l'état excité très peu peuplé.⁶⁰ De plus, les BODIPYs ont une grande photostabilité (photoblanchiment réduit) ce qui en fait une alternative crédible aux cyanines pour l'élaboration de sondes optiques. Leurs propriétés optiques sont également modulables en fonction des substituants qui les entourent. Il est donc possible d'obtenir des dérivés émettant dans le rouge. Pour finir, leur bande d'émission est très fine ce qui facilite la mise en œuvre instrumentale pour leur détection. Néanmoins, le principal inconvénient des BODIPYs et c'est sur ce point que la recherche s'active particulièrement ces dernières années, est leur très faible solubilité en milieu aqueux. Nous pouvons citer comme exemple, les efforts consentis par notre laboratoire, en collaboration avec le groupe de R. Ziessel (LCOSA, ECPM, Strasbourg), dans ce domaine et qui font actuellement l'objet d'une thèse (Figure 1 - 28).^{61, 62, 63}

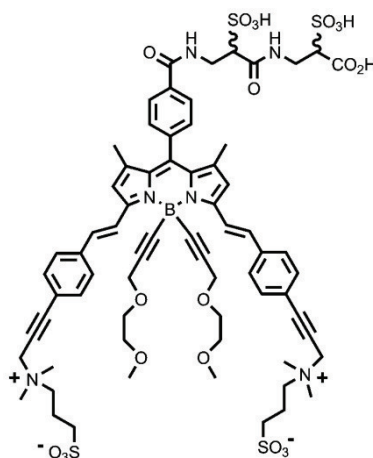


Figure 1 - 28 : Exemple de C-BODIPY hydrosoluble émettant dans le rouge

Les BODIPYs sont des structures modulables synthétiquement, principalement via deux types de modifications (Figure 1 - 29). La première est la substitution du cœur indacène en position 1, 2, 3 ou 4, 5, 6. Ces positions sont en général utilisées pour moduler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission du fluorophore. Ce type de substitution permet également de rigidifier la structure et

⁵⁷ Treibs, A. and Kreuzer, F.-H., *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 1, 208.

⁵⁸ Loudet, A. and Burgess, K., *Chem. Rev.*, **2007**, 11, 4891.

⁵⁹ Ulrich, G., Ziessel, R. and Harriman, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 7, 1184.

⁶⁰ Ziessel, R., *Comptes Rendus Chimie*, **2007**, 7, 622.

⁶¹ Thèse de Cédrik Massif (2009-2012), ANR FluoMag

⁶² Niu, S. L., Ulrich, G., Ziessel, R., Kiss, A., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Lett.*, **2009**, 10, 2049.

⁶³ Niu, S. L., Massif, C., Ulrich, G., Ziessel, R., Renard, P. Y. and Romieu, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 1, 66.

d'augmenter ainsi sensiblement le rendement quantique. Il est aussi possible de substituer les atomes de fluor portés par le bore, notamment par des acétylénures fonctionnalisés, mais cela ne modifie pas (ou très peu) les longueurs d'onde d'absorption et d'émission. En revanche, il est possible d'apporter par exemple de l'hydrosolubilisation, par modification post-synthétique de ces C-BODIPYs.^{64,65,66} La position *meso*, c'est-à-dire la position 8 est particulière. En général, elle ne permet pas d'étendre la délocalisation des électrons mais permet en revanche d'introduire des substituants pour réaliser de la PeT. Il est donc possible de réaliser des sondes par l'introduction de groupements sensibles (chélates de métaux, fonctions sensibles au pH, groupements bioconjuguables pour le marquage de protéines).

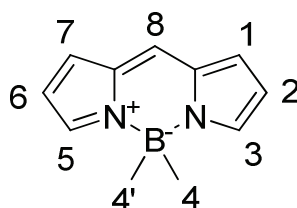


Figure 1 - 29 : Nomenclature du cœur 4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène

Les BODIPYs sont actuellement principalement vendus sous la marque Molecular Probes® (société Invitrogen) sous forme de fluorophore bioconjuguable *via* un motif ester de *N*-hydroxysuccinimide (réactif vis-à-vis des amines primaires) ou α -halogénoacétyle (réactif vis-à-vis des thiols). Ces réactifs peuvent donc être directement utilisés pour le marquage de divers biopolymères (acides nucléiques, protéines, etc). L'avenir pourrait être à la synthèse et à la commercialisation de sondes spécifiques incorporant des BODIPYs.

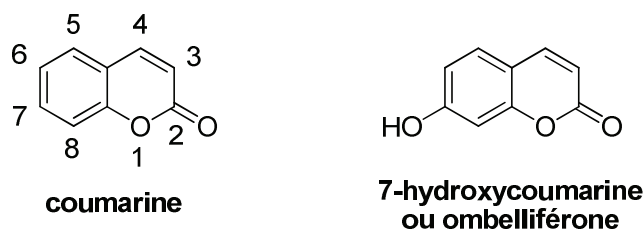
2.4. La famille des coumarines

Contrairement aux deux familles précédentes, la famille des coumarines dérive d'une structure de base très largement présente dans la nature (plus de 1000 composés comportant un cœur coumarine ont déjà été décrits). Il est intéressant de noter que la coumarine simple (Figure 1 - 30) n'est quasiment pas fluorescente, contrairement à la coumarine substituée en position 7 par un groupement hydroxyle ou aminé. L'ombelliférone, nom d'usage de la 7-hydroxycoumarine, est fortement fluorescente (notamment en milieu physiologique) et est à l'origine du succès de ce type de molécules (émettant dans le bleu) comme fluorophores de marquage.

⁶⁴ Niu, S.-L., Ulrich, G., Retailleau, P., Harrowfield, J. and Ziessel, R., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 27, 3840.

⁶⁵ Didier, P., Ulrich, G., Mely, Y. and Ziessel, R., *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 18, 3639.

⁶⁶ Bura, T. and Ziessel, R., *Org. Lett.*, **2011**, ASAP.



$$\lambda_{\max} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 356 / 452 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 13\,000$$

$$\Phi_{\text{F}} = 0,76 \% \text{ (PBS pH: 7,4)}$$

Figure 1 - 30 : Nomenclature de la coumarine et représentation de l'ombelliférone⁶⁷

L'ombelliférone est un composé commercial très utilisé dans les crèmes solaires car elle absorbe les rayonnements UV et réémet de la lumière dans le bleu ce qui permet de protéger la peau de l'effet délétère des rayonnements UVs.

Les coumarines ont des propriétés spectroscopiques particulières fortement influencées par les substitutions effectuées en positions 5, 6, 7 et 8. Elles ont de bons rendements quantiques dus à leur structure très rigide, qui ne laisse pas de place à une vibration trop grande pouvant entraîner une désexcitation non-radiative. Elles possèdent aussi un grand déplacement de Stokes (de l'ordre de 100 nm) très utile pour minimiser le bruit de fond. Leur stabilité chimique est bonne pour des pHs inférieurs à 10 (au-delà, la lactone s'ouvre, ce qui a pour conséquence d'annihiler les propriétés de fluorescence). Le principal inconvénient des coumarines reste leurs longueurs d'onde d'absorption et d'émission qui se limitent à l'UV (A ou B) pour l'absorption et au visible pour l'émission.

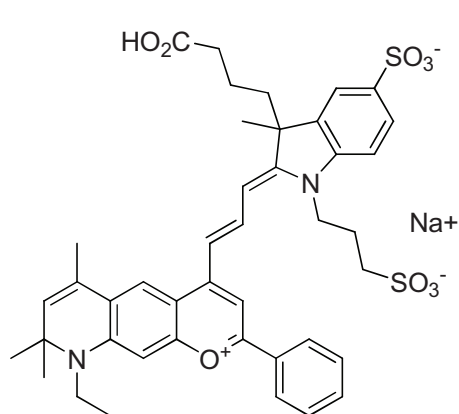
Il est important de citer dans cette course aux « bonnes » longueurs d'ondes d'émission, bien que les structures ne soit pas exactement des dérivés de coumarines, les travaux de la société DYOMICS GmbH qui synthétise des fluorophores de type hémicyanine, émettant dans le proche infrarouge.^{68,69,70} Ces fluorophores (Figure 1 - 31) constituent une autre alternative commerciale crédible aux cyanines et nous ont inspirés pour obtenir des coumarines excitables et émettant dans le proche infra-rouge.

⁶⁷ Setsukinai, K.-i., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 12, 2453.

⁶⁸ Pauli, J., Vag, T., Haag, R., Spieles, M., Wenzel, M., Kaiser, W. A., Resch-Genger, U. and Hilger, I., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 9, 3496.

⁶⁹ Pauli, J., Brehm, R., Spieles, M., Kaiser, W., Hilger, I. and Resch-Genger, U., *J. Fluoresc.*, **2010**, 3, 681.

⁷⁰ Pauli, J., Grabolle, M., Brehm, R., Spieles, M., Hilger, I. and Resch-Genger, U., *Bioconjugate Chem.*, **2011**, Just accepted.

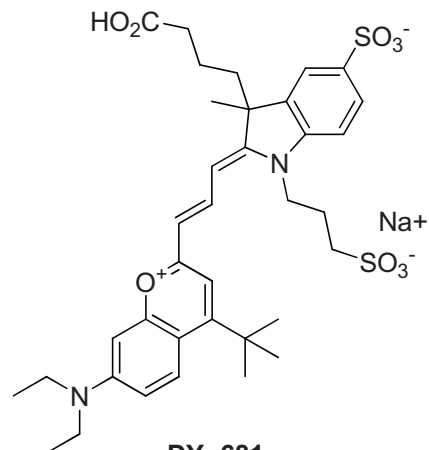


DY -676

$$\lambda_{\text{max}} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 678 / 702 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 180\,000$$

$$\Phi_{\text{F}} = 31 \% \text{ (BSA/PBS)}$$



DY -681

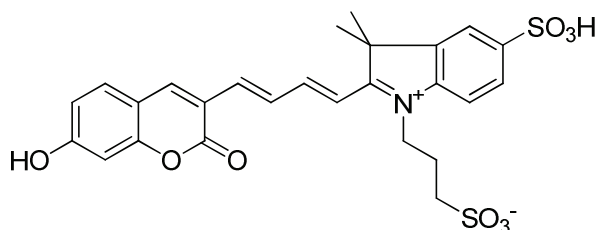
$$\lambda_{\text{max}} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 690 / 710 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 140\,000$$

$$\Phi_{\text{F}} = 40 \% \text{ (BSA/PBS)}$$

Figure 1 - 31 : Exemples de structures développées par l'entreprise DYOMICS GmbH

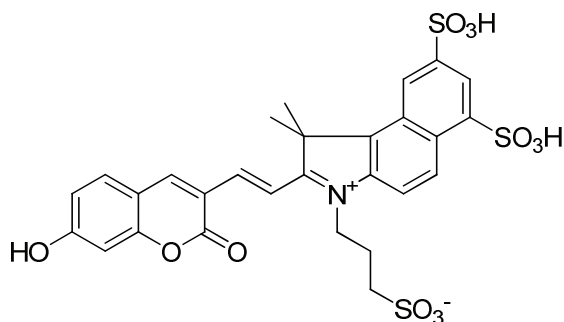
Pour obtenir des coumarines excitables et émettant dans le proche infrarouge, le laboratoire a récemment travaillé avec l'entreprise Quidd à l'élaboration et à la synthèse de dérivés de coumarines à conjugaison étendue afin de déplacer les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le rouge. Ainsi, des hybrides hémicyanine-coumarine hydrosolubles ont été synthétisés.⁷¹ (Figure 1 - 32)



$$\lambda_{\text{max}} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 592 / 722 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 24\,500$$

$$\Phi_{\text{F}} = 1,1 \%$$



$$\lambda_{\text{max}} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 578 / 643 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 65\,500$$

$$\Phi_{\text{F}} = 2,7 \%$$

⁷¹ Richard, J.-A., Massonneau, M., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Lett.*, **2008**, *19*, 4175.

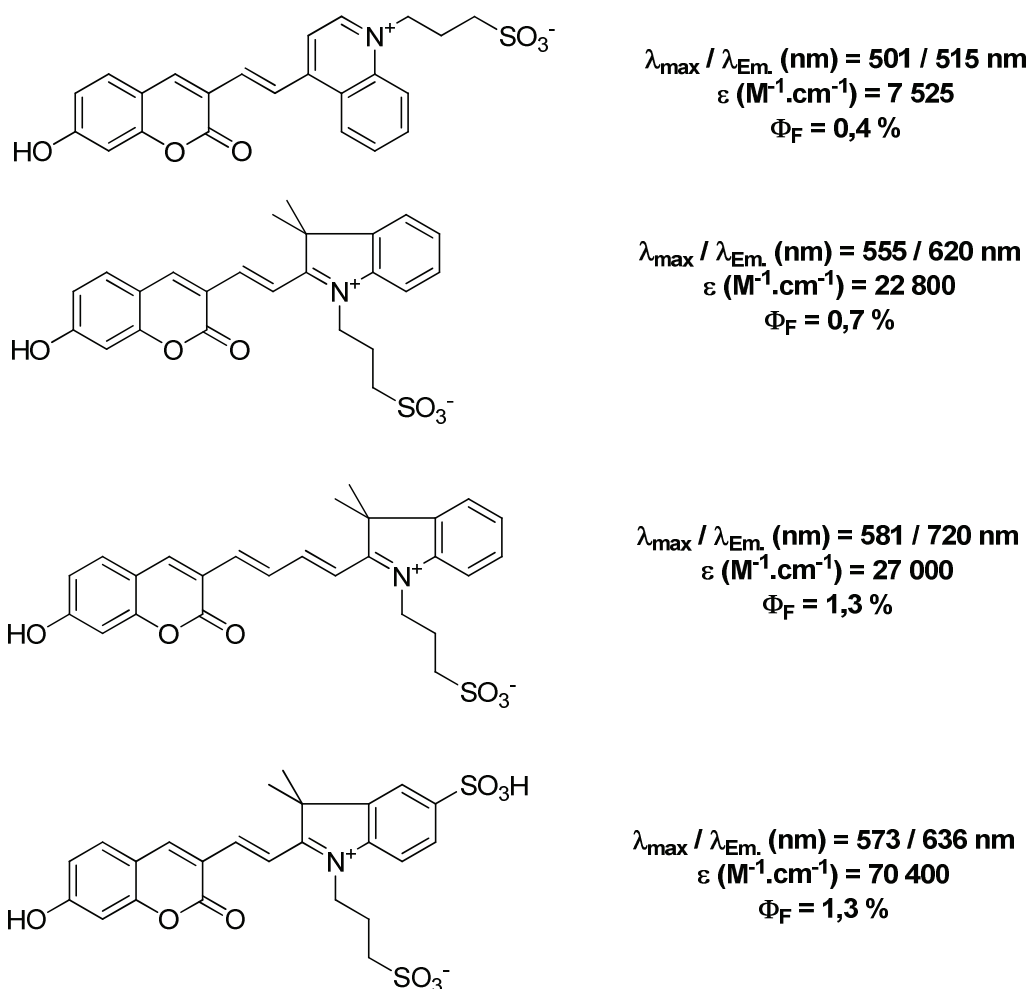


Figure 1 - 32 : Structure et caractéristiques dans le PBS des hybrides hémicyanine-coumarine synthétisés au laboratoire

Ces fluorophores présentent une émission dans le rouge ou le proche infrarouge, un déplacement de Stokes important (de l'ordre de 130 nm pour certains dérivés), un bon coefficient d'absorption molaire et une très bonne solubilité en milieu aqueux. Malheureusement, ils possèdent un rendement quantique dans le PBS (pour Phosphate-Buffer-Saline) très faible, ce qui leur confère une brillance de l'ordre de $2\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ peu compatible avec des applications *in vivo*. Une hypothèse pour interpréter ces faibles valeurs de rendement quantique serait la trop grande flexibilité de la chaîne polyméthine, favorisant le phénomène de relaxation non-radiative. Toutefois, les hydroxy-coumarines que nous avons développées ont l'avantage d'être pro-fluorescents. En effet, ils ont la capacité de rester « éteints » ou latents lorsqu'ils sont attachés à un substrat et de devenir fluorescents lorsqu'ils sont détachés du substrat en question. Cette propriété particulière sera expliquée plus en détail dans le chapitre 2 (*vide infra*).

L'avenir des coumarines comme marqueur optique dans des sondes destinées à l'imagerie *in vivo* ne pourra donc être envisagé que par la conception et la synthèse de nouveaux composés présentant un rendement quantique plus important en milieu physiologique (*vide infra*). C'est déjà le cas par exemple des molécules de Dyomics GmbH (présentées plus haut). Cependant, celles-ci ne sont pas

dérivatisables au moyen d'une fonction phénol et donc, ne possèdent pas de caractère pro-fluorescent.

2.5. Les fluorophores de type oxazine

Les oxazines et plus particulièrement les benzophénoxazines (BPO) forment une famille de colorants qui sont aussi des fluorophores (Meldola's Blue, Nile Red, Nile Blue, etc).⁷² Ils ont l'avantage d'avoir une émission dans le rouge voire dans le proche-infrarouge associée à des rendements quantiques corrects et un bon coefficient d'absorption molaire, ce qui leur confère une brillance comprise entre 10 000 à 40 000 M⁻¹.cm⁻¹. Ces molécules sont donc potentiellement compatibles avec des applications en bio-analyse.^{73,74} De plus, leur synthèse est aisée et connue depuis longtemps ce qui permet de les obtenir facilement et en grande quantité. La Figure 1 - 33 présente deux exemples de benzophénoxazines : « Nile Red » et « Nile Blue ». L'effet « push-pull » commun à tous les fluorophores émettant dans le proche infrarouge est à nouveau présent dans cette famille de fluorophores. Le donneur d'électrons est constitué par une aniline tertiaire et l'accepteur par, soit une fonction cétone (dans le cas de « Nile Red ») soit une fonction iminium (dans le cas de « Nile Blue »).

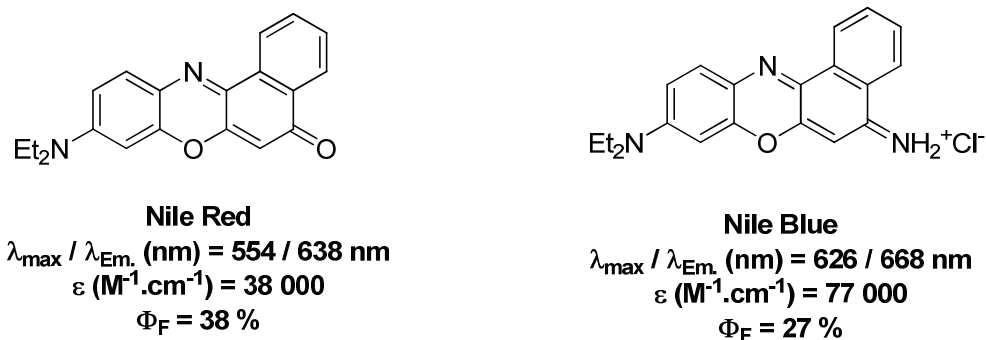


Figure 1 - 33 : Structure et caractéristiques spectrales dans le MeOH de « Nile Red » et « Nile Blue »

Le principal inconvénient de ces structures est leur très faible solubilité dans les milieux aqueux ce qui interdit les applications dans un contexte *in vivo*. Il y a cependant un regain d'intérêt ces dernières années pour ce type de fluorophores, avec la synthèse de BPOs hydrosolubles et bioconjuguables (Figure 1 - 34).^{75,76,77}

⁷² Pour une revue récente, voir: Jose, J. and Burgess, K., *Tetrahedron*, **2006**, 48, 11021.

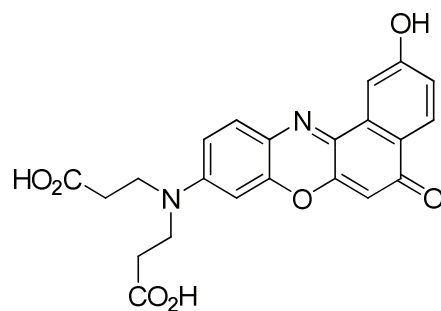
⁷³ Le cresyl violet par exemple est utilisé dans une sonde pro-fluorescence pour la détection *in cellulo* et *in vitro* de la caspase-3 « Magic Red » : Lee, B. W., Johnson, G. L., Hed, S. A., Darzynkiewicz, Z., Talhouk, J. W. and Mehrotra, S., *BioTechniques*, **2003**, 5, 1080.

⁷⁴ Lavis, L. D., Chao, T.-Y. and Raines, R. T., *ChemBioChem*, **2006**, 8, 1151.

⁷⁵ Jose, J. and Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **2006**, 20, 7835.

⁷⁶ Jose, J., Ueno, Y. and Burgess, K., *Chem. Eur. J.*, **2009**, 2, 418.

⁷⁷ Jose, J., Loudet, A., Ueno, Y., Barhouni, R., Burghardt, R. C. and Burgess, K., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 9, 2052.



$$\lambda_{\max} / \lambda_{\text{Em.}} \text{ (nm)} = 560 / 648 \text{ nm}$$

$$\varepsilon \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)} = 7\,529$$

$$\Phi_{\text{F}} = 33 \%$$

Figure 1 - 34 : Exemple de structure BPO hydrosoluble⁷⁵

Nous pouvons citer l'exemple des travaux du groupe de J. Marchand-Brynaert où les phénoxazines sont hydrosolubilisés au moyen de groupement sulfonamides ou phosphonates (Figure 1 - 35).⁷⁸

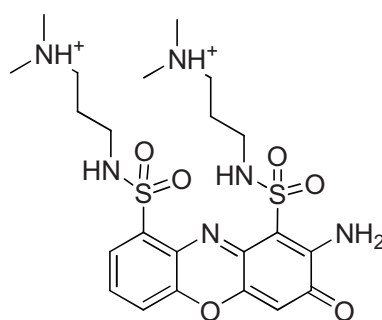


Figure 1 - 35 : Exemple de phénoxazine hydrosoluble (Bruyneel et al)⁷⁸

Ces structures hydrosolubles ont été utilisées pour la détection de peptidases. C'est le cas par exemple des travaux du groupe de R. Weissleder pour imager la galactosidase.⁷⁹ Un autre exemple intéressant d'utilisation de benzophénoxazines a été développé récemment par le groupe d'A. S. Klymchenko pour imager les membranes cellulaires par l'introduction sur le cœur benzophénoxazine d'« ancrs » cellulaires.⁸⁰ Il s'agit de tensioactifs avec une partie hydrophile constituée d'une fonction sulfonate et une partie hydrophobe constituée par une chaîne lipidique. Le fluorophore quant à lui est inséré dans la membrane en raison de sa forte hydrophobie (Figure 1 - 36).

⁷⁸ Bruyneel, F., D'Auria, L., Payen, O., Courtoy, P. J. and Marchand-Brynaert, J., *ChemBioChem*, **2010**, *10*, 1451.

⁷⁹ Ho, N.-H., Weissleder, R. and Tung, C.-H., *ChemBioChem*, **2007**, *5*, 560.

⁸⁰ Kucherak, O. A., Oncul, S., Darwich, Z., Yushchenko, D. A., Arntz, Y., Didier, P., Me'ly, Y. and Klymchenko, A. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *13*, 4907.

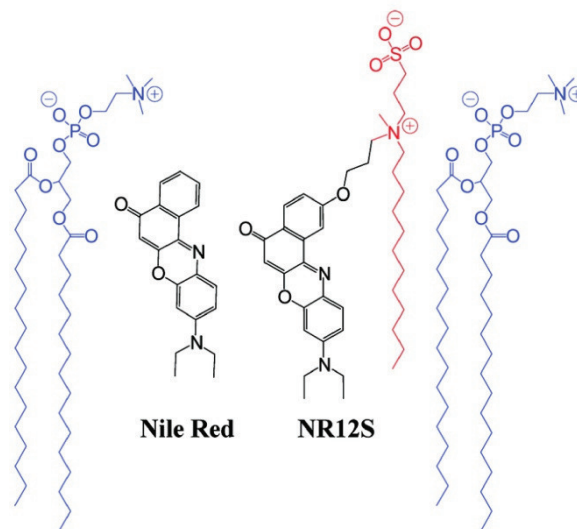


Figure 1 - 36 : Structure de la sonde pour l'imagerie des membranes et positionnement supposé dans la membrane cellulaire (Kucharak *et al*)⁸⁰

Nous verrons par la suite que ce type de structure a été choisi pour développer nos cassettes chémiluminescentes émettant dans le rouge, en raison notamment de leur grande stabilité chimique.

3 Exemples d'utilisation de la spectroscopie de fluorescence

La fluorescence est un outil de détection largement utilisé dans de nombreuses applications bio-analytiques. Ce chapitre présente un aperçu rapide des utilisations possibles telles que les capteurs chimiques, les sondes activées et les sondes dites « intelligentes » (sondes activables). Afin d'illustrer ces diverses utilisations, nous décrivons quelques exemples récents et choisis.

3.1. Les capteurs chimiques ou sondes ratiométriques

Les capteurs chimiques constituent une large gamme de sondes (bio)moléculaires. Il est compliqué voire impossible de donner une liste exhaustive des (bio)analytes ciblés et des sondes utilisées dans ce but. Cependant, il est possible de les classer en deux catégories : les détecteurs de cations et les détecteurs d'anions.

Les détecteurs de cations sont la plus grosse catégorie. Ils incluent les sondes à pH, toutes les sondes destinées à détecter des métaux lourds (Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , etc) mais aussi les cations d'intérêt biologiques (Zn^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , etc) qui interviennent dans de nombreux processus fonctionnels du corps humain.

Les sondes à pH sont très nombreuses. Elles sont en général fondées sur la propriété qu'ont certains fluorophores d'avoir une fluorescence modifiée en fonction de la protonation ou non de l'un de leurs éléments fonctionnels. Outre les nombreux exemples utilisant les coumarines^{81,82} ou les rhodamines,⁸³ un autre exemple intéressant est l'utilisation d'un système fluorophore-espaceur-récepteur qui permet de mesurer des changements faibles de pH et ainsi d'imager des cellules vivantes (Figure 1 - 37).⁸⁴

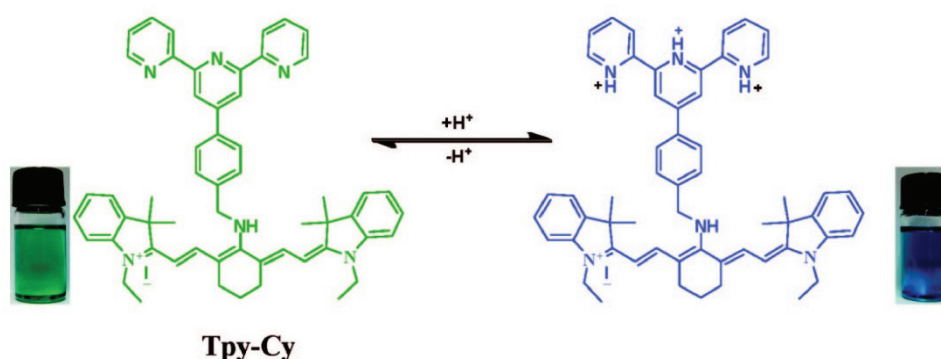


Figure 1 - 37 : Sondes sensibles aux changements mineurs de pH (Tang *et al*)⁸⁴

⁸¹ Lee, M., Gubernator, N. G., Sulzer, D. and Sames, D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 26, 8828.

⁸² Mizukami, S., Watanabe, S. and Kikuchi, K., *ChemBioChem*, **2009**, 9, 1465.

⁸³ Best, Q. A., Xu, R., McCarroll, M. E., Wang, L. and Dyer, D. J., *Org. Lett.*, **2010**, 14, 3219.

⁸⁴ Tang, B., Yu, F., Li, P., Tong, L., Duan, X., Xie, T. and Wang, X., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 8, 3016.

La Figure 1 - 38 représente la courbe de réponse de fluorescence résultant du pH de la molécule précédente. Cette courbe présente une zone linéaire entre 6,5 et 8.0 ce qui permet de faire des mesures précises de pH après calibration, et ce directement sur des compartiments cellulaires.

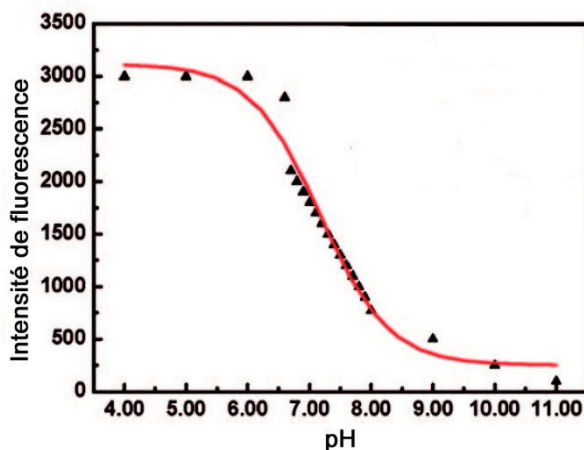


Figure 1 - 38 : Courbe de réponse de fluorescence au pH⁸⁴

Les sondes à détection de cations sont aussi très répandues. Elles permettent de détecter un élément précis *via* une mesure de fluorescence et idéalement, de connaître la quantité de l'élément ciblé présent dans la solution. Le principal problème de ces sondes est la spécificité pour un analyte ciblé. Si nous prenons l'exemple des ions Cu^{2+} et Hg^{2+} , il est très compliqué de différencier un signal de fluorescence dû à l'un ou à l'autre de ces cations. En effet, la plupart des sondes à cations sont fondées sur des cages chélatantes pour capter sélectivement l'ion ciblé.⁸⁵ Dans le cas du mercure et du cuivre, ces deux cations possèdent un rayon de covalence de 1,32 Å. Il est donc très complexe de les différencier uniquement par la taille de l'atome. Il est donc nécessaire de faire intervenir pour certains éléments leurs propriétés chimiques pour les différencier. Un exemple intéressant est fondé sur l'utilisation d'une rhodamine.⁸⁶ Le capteur est constitué d'un cœur de rhodamine 6G modifié sous forme de thiolactame (ce qui annihile sa fluorescence en supprimant la communication entre les groupements donneurs et accepteurs), *N*-substitué par un motif allyle. Le cation Hg^{2+} étant thiophilique et π -philique, il va se lier aux deux motifs et induire une ouverture du motif spiro-thiolactame. Ainsi, le cœur rhodamine 6G initialement non-fluorescent sera à nouveau capable d'émettre des photons du fait de sa structure électronique entièrement conjuguée. L'avantage de ce système est sa réversibilité, ce qui permet de faire un suivi en temps réel en particulier dans des études *in cellulo*. (Figure 1 - 39)

⁸⁵ Callan, J. F., de Silva, A. P. and Magri, D. C., *Tetrahedron*, **2005**, 36, 8551.

⁸⁶ Lin, W., Cao, X., Ding, Y., Yuan, L. and Yu, Q., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 16, 3618.

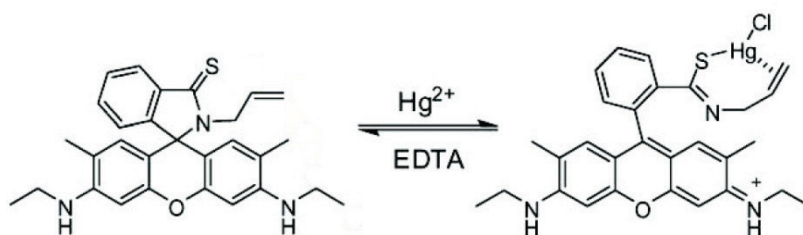


Figure 1 - 39 : Sonde réversible pour la détection des ions Hg²⁺ (Lin *et al*)⁸⁶

La détection d'anions a aussi été étudiée ces dernières années même si, en termes de nombre de publications, elle est beaucoup moins importante que la détection des cations. Il existe soit des systèmes chélatants à base de motifs amide ou ammonium,⁸⁷ soit des systèmes fondés sur la réactivité chimique de l'ion ciblé. En général, le caractère nucléophile des anions est à l'origine de la réaction ciblée. De nombreuses fonctions chimiques peuvent être utilisées pour détecter un tel analyte.⁸⁸ Par exemple, la réaction d'addition nucléophile d'un anion sur un motif cétonique modifie les propriétés du fluorophore possédant cette fonction.⁸⁹ Il est aussi possible d'utiliser les acides boroniques. Les ions cyanures par exemple vont substituer l'acide boronique libre et changer les propriétés de fluorescence du fluorophore associé (Figure 1 - 40).⁹⁰

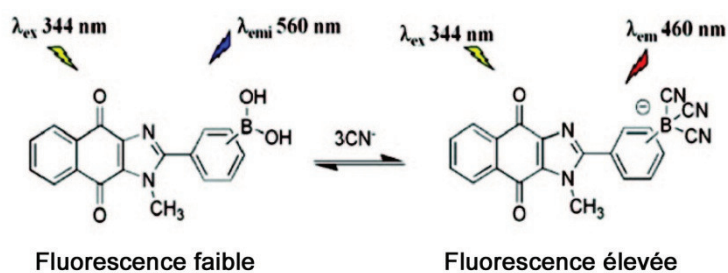


Figure 1 - 40 : Exemple de sonde destinée à la détection des ions cyanure (Jamkratoke *et al*)⁹⁰

L'addition réversible d'ions cyanure sur l'acide boronique modifie la longueur d'onde d'émission du fluorophore et permet, après calibration, de doser la quantité d'ions présents dans la solution à analyser. Dans ce cas, la modification de fluorescence est due à un transfert de charge intramoléculaire. La polarité de la molécule est modifiée de manière importante une fois les ions cyanure additionnés. Il s'ensuit un effet hypsochrome avec un changement du maximum d'émission de fluorescence d'environ 100 nm (Figure 1 - 41). Le principal défi à relever dans ce domaine est la sélectivité de la réaction ciblée pour un anion particulier. Dans le cas (cité ci-dessus) les ions fluorures

⁸⁷ Gale, P. A., Garcia-Garrido, S. E. and Garric, J., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *1*, 151.

⁸⁸ Mohr, G., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, *5*, 1201.

⁸⁹ Isaad, J. and Perwuelz, A., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *44*, 5810.

⁹⁰ Jamkratoke, M., Ruangpornvisuti, V., Tumcharearn, G., Tuntulani, T. and Tomapatnaget, B., *J. Org. Chem.*, **2009**, *10*, 3919.

donnent également un déplacement hypsochrome, mais l'intensité de fluorescence résultante est moindre.

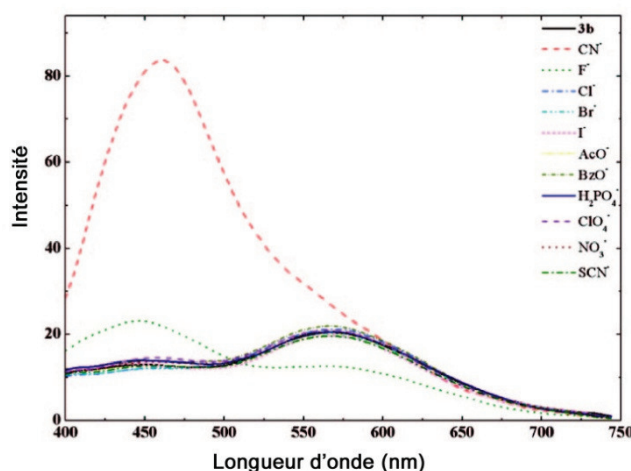


Figure 1 - 41 : Modification de la fluorescence en fonction de l'anion (Jamkratoke *et al*)⁹⁰

3.2. Les sondes activées

Parfois, il n'est pas forcément nécessaire de développer des sondes de type « on-off » où la fluorescence est modifiée en présence ou non de l'analyte ciblé. C'est le cas par exemple de l'imagerie des tumeurs, où il est possible d'utiliser l'effet « EPR » (pour « Enhanced Permeability and Retention Effect »). Deux phénomènes sont responsables de l'effet EPR au sein des tissus tumoraux : d'une part, une angiogenèse rapide et anarchique qui génère des vaisseaux sanguins perméables par lesquels sont extravasées les molécules circulantes et de l'autre, un réseau lymphatique qui croît trop lentement pour permettre l'élimination des molécules. Ainsi des nanoparticules/nano-objets doués de propriétés optiques pourront rester bloqués/és dans les tumeurs. Ce phénomène est exploité dans la synthèse de sondes « naturellement » activées, c'est-à-dire toujours fluorescentes. En effet, l'élimination naturelle de la sonde dans le reste du corps comparé à la rétention ayant lieu dans les tumeurs permet d'obtenir en général des images avec un faible bruit de fond. Un exemple intéressant a été récemment publié et utilise un polymère de type chitosane sur lequel est lié un fluorophore de type Cy5.5 (Figure 1 - 42).⁹¹

⁹¹ Lee, C.-M., Jang, D., Kim, J., Cheong, S.-J., Kim, E.-M., Jeong, M.-H., Kim, S.-H., Kim, D. W., Lim, S. T., Sohn, M.-H., Jeong, Y. Y. and Jeong, H.-J., *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 2, 186.

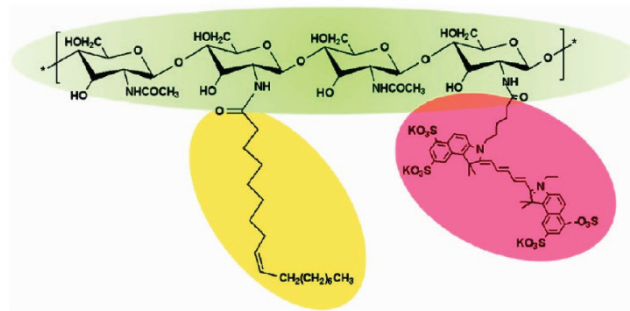


Figure 1 - 42 : Structure chimique de Cy5.5-oleyl-chitosane (Lee *et al*)⁹¹

Cette sonde a permis d'obtenir des images *in vivo* et *ex vivo* sur des souris (Figure 1 - 43 et Figure 1 - 44). L'inconvénient principal de ce type de sonde est mis en exergue sur la Figure 1 - 44. Des organes comme le foie ou les reins ont une vascularisation proche des tumeurs ce qui fait qu'une tumeur logée près d'un de ces organes sera confondue avec l'organe et ne pourra pas être détectée spécifiquement.

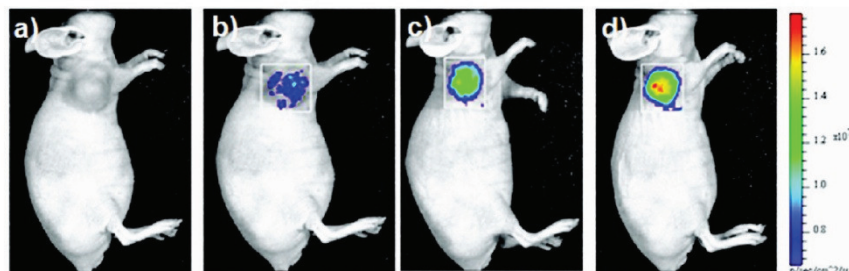


Figure 1 - 43 : Images *in vivo* de la sonde « naturellement » activée (Lee *et al*)⁹¹

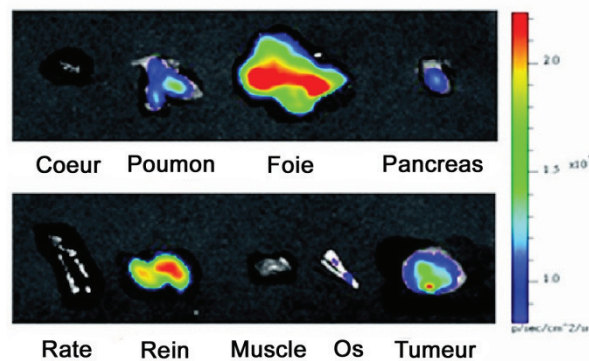


Figure 1 - 44 : Images *ex vivo* de la sonde activée (Lee *et al*)⁹¹

Ces sondes activées sont très adaptées à l'imagerie des tumeurs (sauf cas vus précédemment) et permettent de repérer facilement ces dernières. Elles peuvent également apporter une assistance à la chirurgie. En effet, la sonde fluorescente peut guider le chirurgien lors de l'excision des tissus tumoraux.⁹² L'entreprise Fluoptics par exemple développe et commercialise des systèmes d'aide à la

⁹² Themelis, G., Harlaar, N., Kelder, W., Bart, J., Sarantopoulos, A., van Dam, G. and Ntziachristos, V., *Ann. Surg. Oncol.*, **2011**, 1.

chirurgie. Une caméra portable, utilisable en salle de chirurgie est associée avec une sonde fluorescente activée. Ce dispositif permet de détecter les tumeurs et de les enlever.⁹³

3.3. Les sondes activables

Une sonde activable correspond à une sonde dont la fluorescence est exacerbée par un phénomène chimique ou biologique ciblé. Ces sondes activables permettent d'augmenter fortement le rapport signal sur bruit car elles n'émettent un signal qu'une fois en présence du (bio)analyte ciblé (et éventuellement après réaction avec celui-ci) et sont « silencieuses » le reste du temps. Ces sondes sont en général utilisées pour la détection d'enzymes hydrolytiques car elles sont très sensibles et très sélectives (étant donné qu'elles dépendent de l'enzyme étudiée).⁹⁴ Il existe principalement deux types de sondes activables : les sondes basées sur le principe de quenching entre deux fluorophores (comme le FRET ou les sondes autoquenchées) illustrées en Figure 1 - 45 ; et les sondes dites pro-fluorescentes ou chémiluminescentes. Ces dernières seront détaillées dans les autres chapitres (chapitre 2 pour la pro-fluorescence et chapitre 3 pour la chémiluminescence).

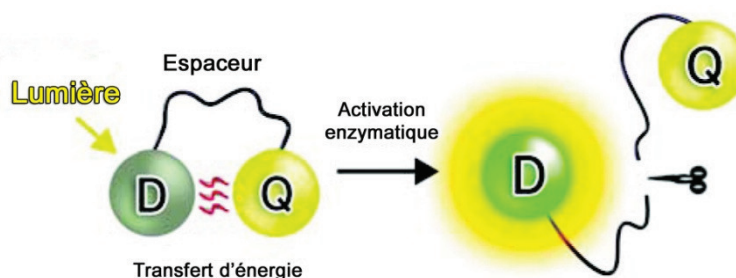


Figure 1 - 45 : Schéma d'un exemple de sonde activable par une enzyme (D pour Dye et Q pour Quencher)

Un exemple de sonde FRET pour la détection de la caspase-3 dans un contexte *in vivo* a été publié par la société Li-Cor Biosciences et sa structure est présentée ci-dessous (Figure 1 - 46). Le quencher est un dérivé de Cy7 (IRDye® QC-1) avec l'une des deux unités indoliques substituée par une amine tertiaire. Ce motif est connu pour annihiler la fluorescence via le phénomène de PeT. Le quencher est lié à un peptide de reconnaissance de la caspase-3 GDEVDGAK, lui-même relié à un fluorophore IRDye® 800CW (analogue de Cy7 stabilisé et tétra-sulfonaté). L'ensemble est peu ou pas fluorescent. En revanche, en présence de caspase-3, le peptide est reconnu et clivé. Les deux partenaires (fluorophore et quencher) s'éloignent et la fluorescence de la cyanine IR Dye® 800CW voisine de 800 nm est restaurée.⁹⁵

⁹³ <http://www.fluoptics.com/>

⁹⁴ Lee, S., Park, K., Kim, K., Choi, K. and Kwon, I. C., *Chem. Commun.*, **2008**, 36, 4250.

⁹⁵ Peng, X., Chen, H., Draney, D. R., Volcheck, W., Schutz-Geschwender, A. and Olive, D. M., *Anal. Biochem.*, **2009**, 2, 220.

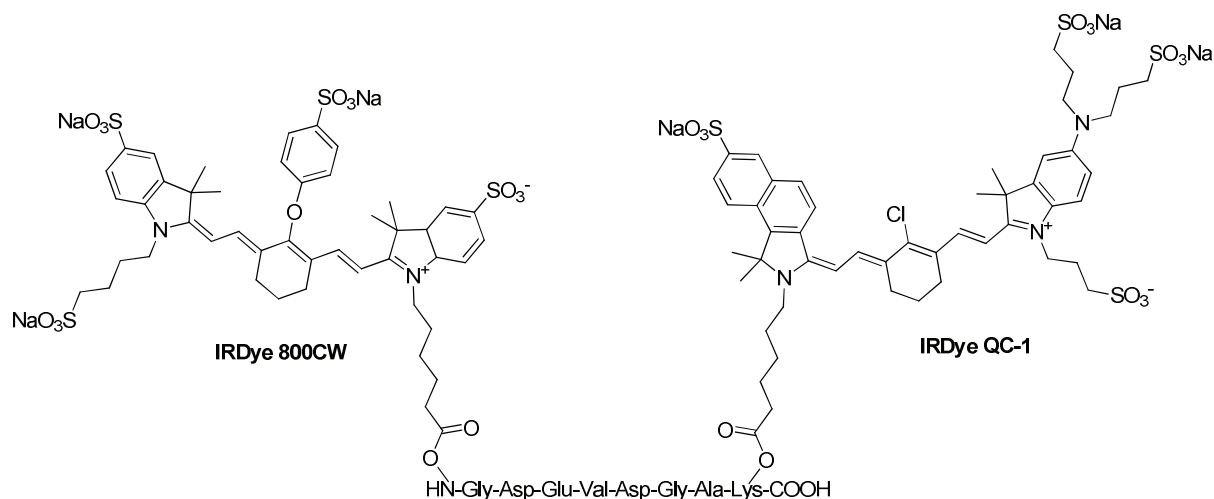


Figure 1 - 46 : Structure de la sonde pour la détection de la caspase-3

C'est dans ce contexte que l'entreprise QUIDD en collaboration avec le laboratoire a développé une sonde FRET activable spécifique à la caspase-3, la QCasp3.2. Le fluorophore de cette sonde est une Cy 5.0 et le quencher est le composé commercial QSY-21. La formule développée de cette sonde est présentée dans la Figure 1 - 47.

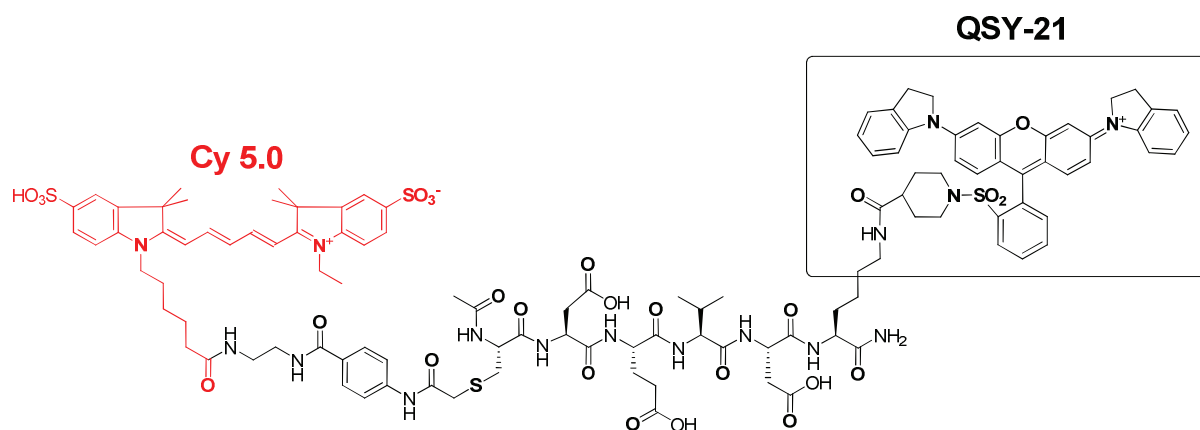


Figure 1 - 47 : Sonde pour la détection de la caspase-3

Cette sonde a été validée biologiquement sur des modèles *in vivo* et *ex vivo*.^{96,97} Des innovations sont actuellement en cours pour améliorer notamment la pénétration cellulaire.

Les sondes activables sont la principale source d'innovation en matière de nouveaux composés pour l'imagerie optique. Leur haute sensibilité (lié à un bruit de fond diminué) et leur forte affinité pour le (bio)analyte ciblé en font des produits de haute-technologie et donc à forte valeur ajoutée. Leur synthèse est cependant souvent très complexe. Les composés obtenus ne sont pas forcément faciles à purifier et à caractériser, et ont une stabilité à long terme limitée. Le potentiel d'innovation est

⁹⁶ Pantos, C., Mourouzis, I., Saranteas, T., Clavé, G., Ligeret, H., Noack-Fraissignes, P., Renard, P.-Y., Massonneau, M., Perimenis, P., Spanou, D., Kostopanagiotou, G. and Cokkinos, D., *Basic Research in Cardiology*, **2009**, *1*, 69.

⁹⁷ Debunne, M., Portal, C., Delest, B., Brakenhielm, E., Lallemand, F., Henry, J.-P., Ligeret, H., Noack, P., Massonneau, M., Romieu, A., Renard, P.-Y., Thuillez, C. and Richard, V., *Int. J. Mol. Imaging*, **2011**, 13 pp.

cependant immense et des composés toujours plus spécifiques et sensibles devraient apparaître au cours de la prochaine décennie.

3.4. Les cassettes fluorescentes

Les cassettes fluorescentes (aussi appelées cassettes TBET pour « Through Bond Energy Transfer ») sont des systèmes moléculaires apparus récemment. Le principe est de lier deux fluorophores organiques ayant des absorption/émission « non complémentaires » (contrairement aux paires FRET) par une ou plusieurs triples liaisons carbone-carbone (ou une ou plusieurs unités benzéniques).⁹⁸ Un exemple de cassette TBET complexe est représenté en Figure 1 - 48.⁹⁸

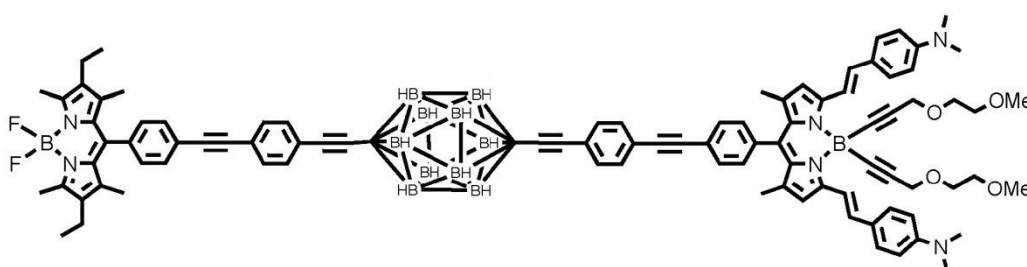


Figure 1 - 48 : Exemple de cassette TBET complexe⁹⁹

Les cassettes fluorescentes ont l'avantage d'effectuer le transfert énergétique sans un recouvrement des spectres d'absorption et d'émission du donneur et de l'accepteur. Elles permettent d'obtenir des déplacements de Stokes très importants (allant jusqu'à 300 nm). Cela permet, si les fluorophores sont correctement substitués, de constituer son système sur mesure en modulant la longueur d'onde d'absorption et d'émission du système.¹⁰⁰ (Figure 1 - 49).

⁹⁸ Loudet, A., Thivierge, C. and Burgess, K., *Dojin News*, **2011**, 137, 1.

⁹⁹ Ziessel, R., Ulrich, G., Olivier, J. H., Bura, T. and Sutter, A., *Chem. Commun.*, **2010**, 42, 7978.

¹⁰⁰ Ueno, Y., Jose, J., Loudet, A., Pérez-Bolivar, C., Anzenbacher, P. and Burgess, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 1, 51.

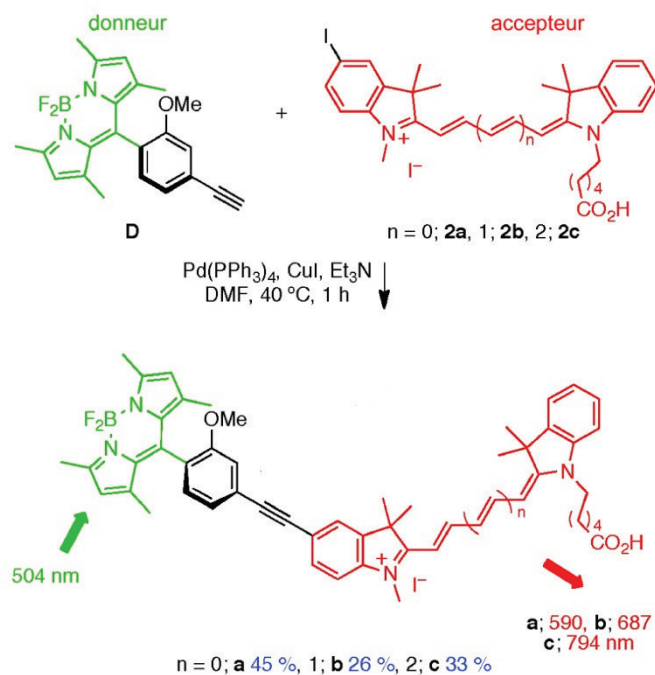


Figure 1 - 49 : Exemples de cassettes BODIPY-cyanines (Ueno *et al*)¹⁰⁰

En conclusion de cette partie bibliographique sur la fluorescence, il apparaît que la spectroscopie de fluorescence regroupe à la fois des équipements différents mais aussi de nombreux marqueurs fluorescents. Du plus simple au plus complexe, chaque catégorie de sondes a son propre domaine d'application et ses propres caractéristiques. Le chimiste (bio)organicien doit donc déterminer la manière la plus simple et la plus efficace d'imager une cible biologique donnée. Une règle simple veut que plus la spécificité augmente, plus la sensibilité diminue et inversement. Il faut donc toujours trouver le bon compromis en fonction de la cible thérapeutique ou (bio)analytique ciblée. Un autre point à prendre en compte est la complexité synthétique de certaines structures, pouvant s'avérer contraignante. Le but est donc de trouver des systèmes plus simples et faciles d'accès pouvant être tout aussi ou pratiquement aussi efficaces.

III. La chémiluminescence

1 La bioluminescence

1.1. Historique de la bioluminescence

La bioluminescence est un phénomène connu depuis l'antiquité, en particulier via l'observation des vers luisants (lucioles), qui consiste pour un organisme vivant à émettre de la lumière. Son observation a été maintes fois rapportée sur différents organismes (bactéries, planctons, lucioles, champignons, crustacés, mollusques, etc) et plus récemment sur de nombreux animaux des profondeurs océaniques, par les campagnes menées ces dernières années sur l'exploration des abysses marines. Les premières molécules impliquées dans la bioluminescence ont été isolées et identifiées par O. Shimomura et son équipe en même temps que la GFP en 1962.¹⁰¹ Il s'agissait au départ d'une protéine extraite d'une méduse bioluminescente *Aequorea victoria* qui émet de la lumière uniquement en présence de calcium.¹⁰² Nous apprendrons plus tard que l'aequorin était en fait un intermédiaire peroxyde relativement stable formé par la réaction de la *luciferase coelenterate* sur un composé chimique, la coelentérazine (luciférine spécifique de cette luciférase) avec de l'oxygène. Par la suite, d'autres systèmes bioluminescents seront extraits et étudiés en détails. Il a été observé à l'heure actuelle que plusieurs centaines d'espèces, principalement marines, étaient susceptibles d'émettre de la lumière via ce mécanisme de bioluminescence, principalement à visée de camouflage, d'attraction (en particulier à visée de reproduction comme pour la luciole), de répulsion ou de communication.

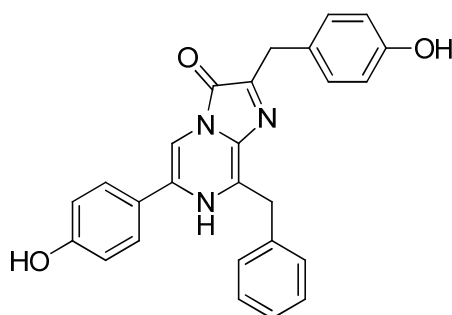


Figure 1 - 50 : Structure de la coelentérazine

Les luciférases sont ainsi dénommées en référence à Lucifer (porteur de la lumière en traduction du latin *lucem ferre*) car la lumière émise est dite lumière « froide » et ne s'accompagne pas d'émission de chaleur. Elles sont une classe d'enzymes capable d'oxyder, en présence d'oxygène, un substrat déterminé : la luciférine qui lui est spécifique. La luciférine n'est pas une molécule unique, mais un ensemble de molécules, substrats spécifiques de leur partenaire enzymatique. Il existe donc autant

¹⁰¹ Shimomura, O., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *31*, 5590.

¹⁰² Hastings, J. W., *Gene*, **1996**, *1*, 5.

de couple luciférase/luciférine que d'espèces d'animaux produisant la bioluminescence. Le tableau ci-dessous (Tableau 1- 4) présente quelques espèces émettant de la bioluminescence avec la longueur d'onde d'émission du système et le poids moléculaire correspondant de l'enzyme associée.

Organisme lumineux	Luciférine et facteurs associés	Luciférase (en kDa)	Emission (en nm)
Bactéries	FMNH ₂ ; RCHO	80	495-500
Dinoflagellés	Tétrapyrrole ; H ⁺	60-130	475
Cnidaires (méduses)	Coelentérazine ; Ca ²⁺	21	460-490
Annélides (vers)	N-isovaléryl-3-amino propanal ; H ₂ O ₂	300	500
Mollusques	Formiate d'énoïl; terpène ou aldéhyde aromatique	170	500
Crustacés	Noyau imidazopyrazine	60	465
Insectes	Benzothiazole ; ATP ; Mg ²⁺	100	560

Tableau 1- 4 : Tableau des couleurs de bioluminescence en fonction des organismes

La longueur d'onde d'émission de bioluminescence est intimement corrélée avec l'habitat de l'espèce qui émet cette bioluminescence. La figure suivante (Figure 1 - 51) présente cette particularité. Nous pouvons remarquer que les espèces marines émettent plutôt dans la gamme 450-500 nm alors que les espèces terrestres émettent vers 550-580 nm.

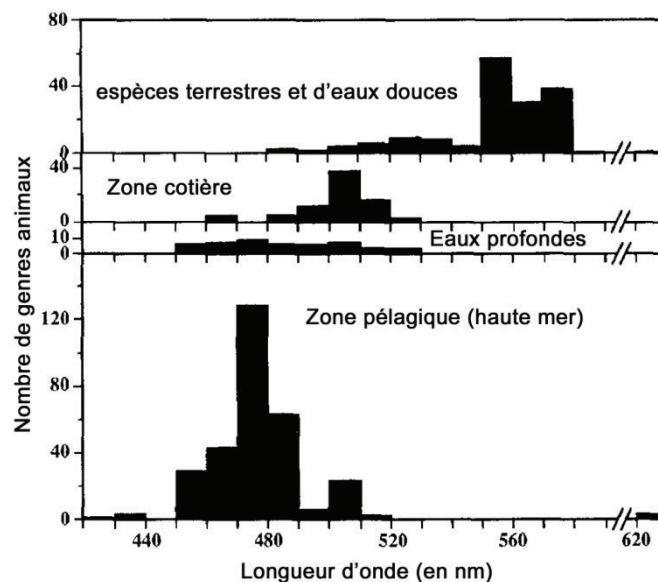


Figure 1 - 51 : Répartition des longueurs d'onde d'émission en fonction de la zone d'habitat¹⁰²

Pour les espèces vivant en eaux profondes, les longueurs d'onde d'émission s'expliquent par le fait que la lumière bleue et verte est plus puissante et émet plus loin qu'une lumière orange.

1.2. Mécanismes de la bioluminescence¹⁰³

Le mécanisme de la bioluminescence dépend du système étudié et donc du couple luciférase/luciférine mis en jeu. Nous nous restreindrons à présenter le mécanisme intervenant dans la bioluminescence historique, c'est-à-dire celle de *aequorea*. L'espèce chimique émettant de la lumière dans *aequorea* est une photoprotéine constituée d'une apoprotéine et d'un chromophore liés entre eux de manière non-covalente. Le chromophore est préalablement généré à partir d'une luciférine de type coelentérate : la coelentérazine et de l'oxygène moléculaire. Lorsque le calcium est mis en présence de la photoprotéine, la coelentérazine est oxydée en coelentéramide qui se décompose pour donner une lumière bleue (émission à 465 nm) et du CO₂. L'apoprotéine est là pour assurer le transfert de l'émission de bioluminescence et constitue une cage de protection autour de la coelentéramide pour maximiser l'émission de lumière. Le schéma suivant (Figure 1 - 52) récapitule le cycle de réactions conduisant à l'émission de lumière de *aequorea*.

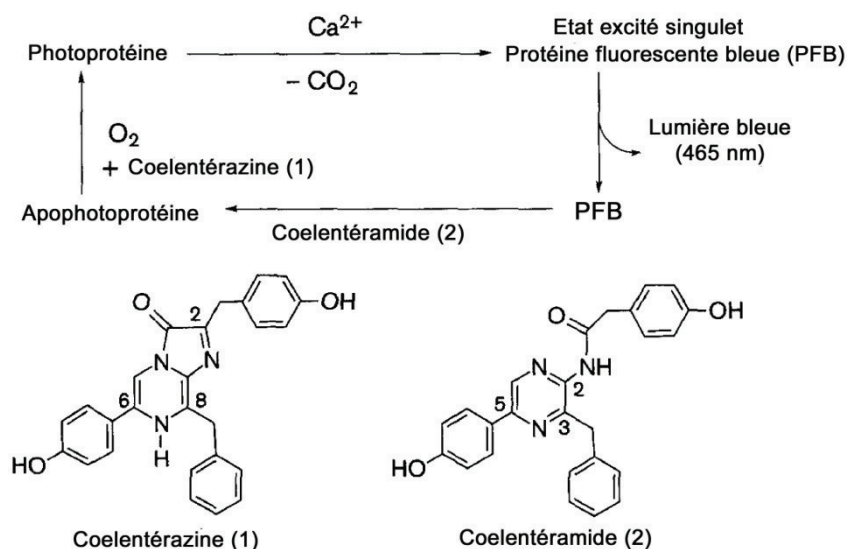


Figure 1 - 52 : Cycle de bioluminescence intervenant dans *aequorea* (Ohmiya et al)¹⁰³

La transformation chimique de la coelentérazine en coelentéramide, est illustrée sur le schéma réactionnel ci-dessous (Figure 1 - 53).

¹⁰³ Ohmiya, Y. and Hirano, T., *Chem. Biol.*, **1996**, 5, 337.

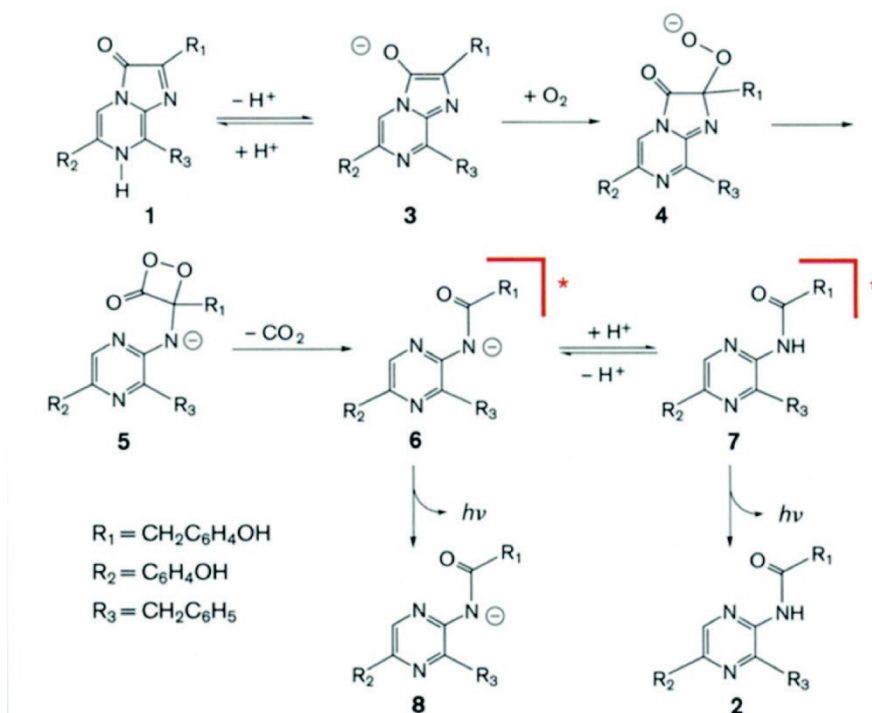


Figure 1 - 53 : Réactions chimiques de la coelentérazine (composé 1) (Ohmiya *et al*)¹⁰³

La molécule **3** réagit avec l'oxygène moléculaire pour former l'intermédiaire dioxétanone **5**. Celui-ci, par perte du dioxyde de carbone, produit un anion d'état excité singulet **6** qui peut soit émettre directement de la lumière soit se protoner en coelentéramide **7**. Cette dernière émet aussi de la lumière.¹⁰³

1.3. Exemples d'applications de la bioluminescence

Le principal avantage de la bioluminescence est sa très haute sensibilité avec une limite de détection, proche de 10^{-18} à 10^{-21} mol, largement plus basse que celles obtenues avec les autres techniques spectroscopiques. La bioluminescence a connu de nombreux développements notamment via le couplage de la partie bioluminescente avec différentes enzymes comme des oxydases, des déshydrogénases ou des kinases.¹⁰⁴

Il existe plusieurs manières de mettre en place un outil de bioluminescence dans un système cellulaire ou dans un organisme entier. La figure ci-dessous (Figure 1 - 54) détaille trois différentes techniques existantes actuellement.

La technique du gène rapporteur est la principale technique mise au point ces dernières années en génie génétique. Le gène rapporteur est une séquence d'ADN qui code pour une protéine ou une enzyme facilement détectable, par exemple par bioluminescence (Figure 1 - 54a). Il est ensuite introduit artificiellement dans une cellule pour suivre l'expression d'un gène ou pour avoir un bio-

¹⁰⁴ Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E. and Guardigli, M., *Trends Biotechnol.*, **2004**, 6, 295.

détecteur dans la totalité de la cellule. Le gène rapporteur le plus utilisé actuellement est celui qui code pour la lucifère, *Lampyrus noctiluca*. Des manipulations génétiques récentes ont été mises au point pour obtenir des émissions de lumière dans différents gammes spectrales (bleue, verte, rouge) en fonction des besoins et des applications ciblées. La limitation de la technique est la nécessité de lyser les cellules pour obtenir un signal, car la luciférine correspondante ne traverse pas les membranes cellulaires.

L'amélioration de cette technique est le système rapporteur en double ou « dual-reporter system » (Figure 1 - 54b). Dans ce cas, la quantification de luminescence est faite de manière précise par comparaison des cinétiques d'émission entre la protéine reportrice de l'analyse et la protéine de contrôle. Cette dernière protéine a des propriétés de luminescence connues, contrôlées et quantifiées afin de pouvoir servir de référence. Cette technique est particulièrement bien adaptée au criblage à haut débit.¹⁰⁵

Une autre technique est l'utilisation de protéines bifonctionnelles (Figure 1 - 54c). Nous obtenons alors une protéine fusionnée, formée par rassemblement des gènes codants pour une enzyme bioluminescente et des gènes codants pour une protéine liante spécifique d'un analyte. C'est une manière universelle de pratiquer des tests immunologiques si la protéine en question est un anticorps spécifique de l'analyte à détecter/doser.¹⁰⁶

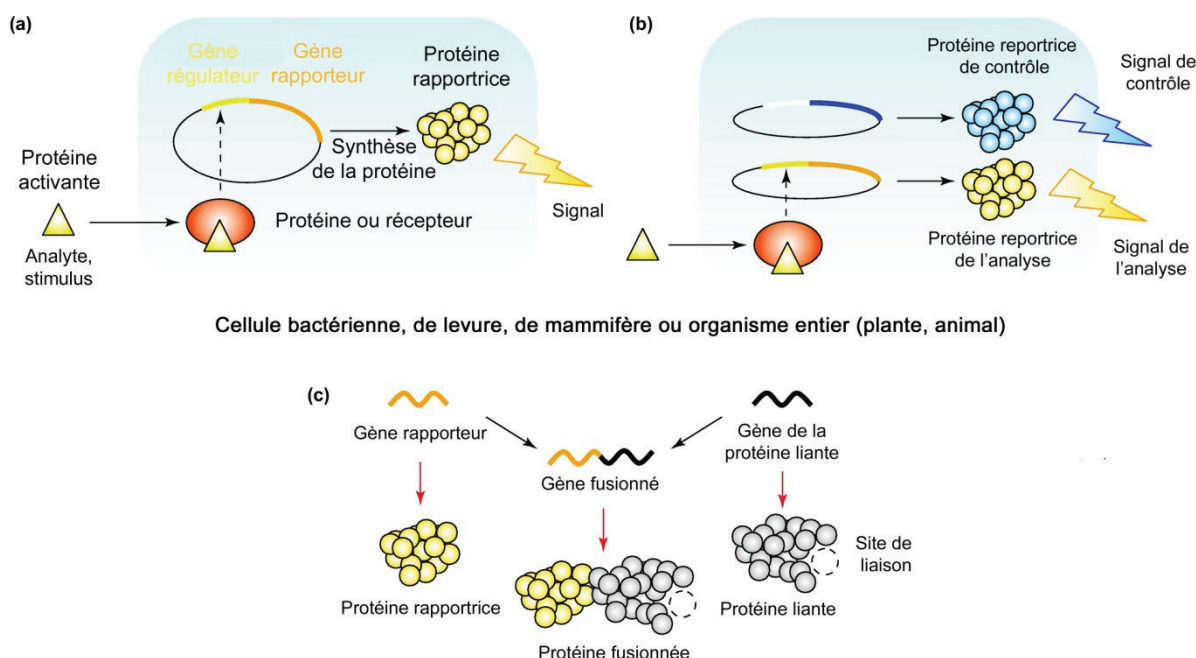


Figure 1 - 54 : Différentes techniques utilisant la bioluminescence. (Roda et al)¹⁰⁴

¹⁰⁵ Adamczyk, M., Moore, J. A. and Shreder, K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 3, 395.

¹⁰⁶ Karp, M. and Oker-Blom, C., *Biomol. Eng.*, **1999**, 1-4, 101.

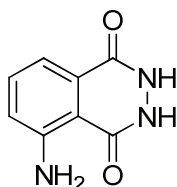
Les dernières techniques développées récemment en bioluminescence font intervenir, comme vu précédemment, les techniques de BRET où la protéine bioluminescente est associée à la GFP. Elles ne seront donc pas rediscutées dans cette partie.

Pour conclure, ces quelques exemples montrent les utilisations potentielles et réelles de la bioluminescence. C'est en effet une technique extrêmement répandue en biologie et en criblage haut-débit. Elle nécessite cependant une ingénierie génétique complexe et la présence du substrat (luciférine) de l'enzyme (luciférase) à proximité du site de protection de l'enzyme. Avec l'avènement des séquenceurs haut débit d'ADN, elle est la technique par excellence pour suivre en temps réel et pour comprendre le fonctionnement des protéines dans un organisme vivant (cellules, organismes vivants). Du fait de son ingénierie génétique, elle restera cependant pour toujours cantonnée à des activités de recherche et d'essais précliniques sans espoir de passer au niveau clinique. Comme nous le verrons par la suite, la chémiluminescence peut donc constituer une alternative crédible à la bioluminescence pour une utilisation potentielle chez l'Homme.

2 Introduction à la chémiluminescence

2.1. Aspects historiques

Les phénomènes de luminescence sont connus depuis l'antiquité. Cependant, le premier rapport de « luminescence artificielle », c'est-à-dire de chémiluminescence date de 1669.¹⁰⁷ Le médecin allemand H. Brand isole de l'urine, une substance qui « brille continuellement dans le noir ». Cette substance est connue maintenant sous le nom de phosphore blanc (P₄). Le terme de chémiluminescence apparaît cependant beaucoup plus tard en 1888 avec E. Weidemann comme une source à part entière de lumière froide. Le luminol, le chémiluminophore le plus connu notamment du grand public, a été synthétisé dès 1902 mais ses propriétés de chémiluminescence n'ont été révélées qu'en 1913 et étudiées beaucoup plus tard en 1928 par Albrech. Depuis, la chémiluminescence a connu de nombreux développements bien qu'elle soit bien souvent uniquement associée au luminol.



luminol

Figure 1 - 55 : Formule développée du luminol.

2.2. Exemples d'utilisation

Les utilisations de la chémiluminescence sont très nombreuses. Nous pouvons citer les applications dans le domaine des tests biologiques,¹⁰⁸ des analyses alimentaires,¹⁰⁹ des analyses environnementales et dans les techniques d'analyse de laboratoire comme l'électrophorèse capillaire.¹¹⁰ Le schéma suivant (Figure 1 - 56) reprend les diverses applications de la chémiluminescence aussi bien dans l'industrie que dans le domaine médical.

¹⁰⁷ Jimenez, A. M. and Navas, M. J., *Grasas Aceites*, **2002**, *1*, 64.

¹⁰⁸ Roda, A., Pasini, P., Guardigli, M., Baraldini, M., Musiani, M. and Mirasoli, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **2000**, *6*, 752.

¹⁰⁹ Navas, M. J. and Jiménez, A. M., *Food Chem.*, **1996**, *1*, 7.

¹¹⁰ Huang, X.-J. and Fang, Z.-L., *Anal. Chim. Acta*, **2000**, *1-2*, 1.

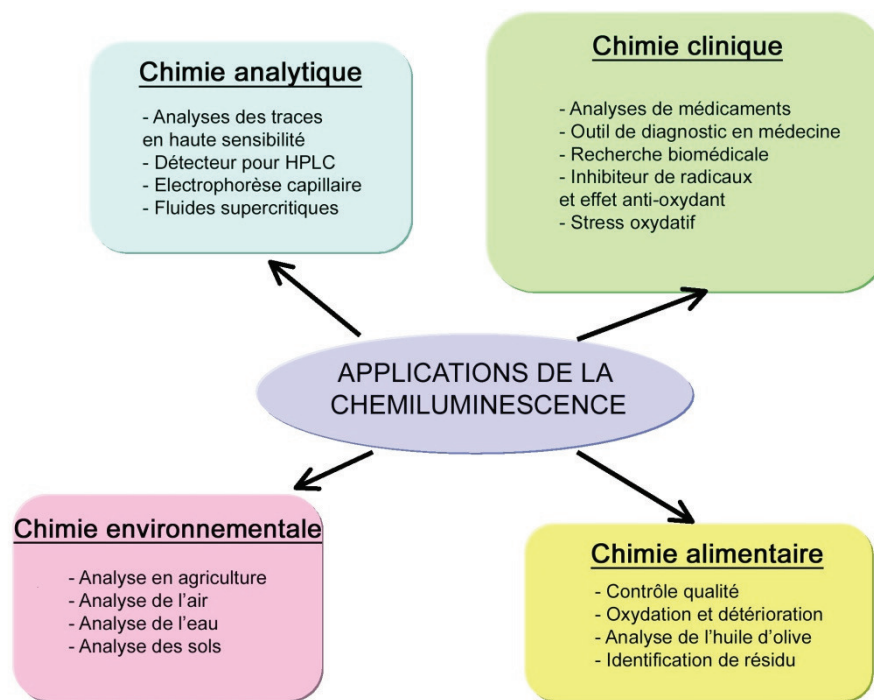


Figure 1 - 56 : Diverses applications de la chémiluminescence (Jimenez *et al*)¹⁰⁷

Plus spécifiquement, le luminol est très connu car il est utilisé en criminologie scientifique. Il sert à détecter des échantillons biologiques (sang, sperme, etc) sur une scène de crime. L'analyse se passe en deux temps. Le luminol est d'abord aspergé sur la zone qu'on souhaite inspecter. Ensuite, une solution de peroxyde d'hydrogène et d'hydroxyde de soude est ajoutée. Les zones où un catalyseur potentiel est présent (en général le fer de l'hémoglobine) s'illuminent. La quantité nécessaire de catalyseur pour déclencher la réaction étant extrêmement faible, la sensibilité de cette technique est très importante ce qui permet de détecter des quantités très faibles de matériel biologique (y compris sur des zones précédemment lavées). Le schéma suivant (Figure 1 - 57) reprend la réaction chimique du luminol à l'origine de l'émission de lumière.

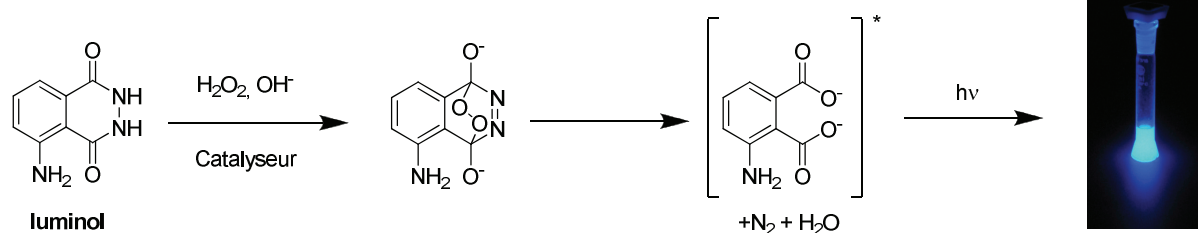


Figure 1 - 57 : Réaction du luminol mis en jeu typiquement en criminologie

Un autre exemple « tout public » d'utilisation de la chémiluminescence est l'émission de lumière des bracelets utilisés dans les fêtes foraines. Le composé chémiluminescent est un oxalate d'aryle, similaire pour tous les bracelets. La couleur est modifiée par l'ajout d'un fluorophore relais qui récupère l'énergie du chémiluminophore pour émettre à sa propre longueur d'onde. Il s'agit alors d'une chémiluminescence dite indirecte. L'oxalate, en présence d'une source de peroxyde

d'hydrogène produit une dioxétanedione intermédiaire, instable, qui se dégrade en produisant deux molécules de CO₂ et de l'énergie. Cette énergie est transférée au fluorophore, qui produit la lumière (Figure 1 - 58).

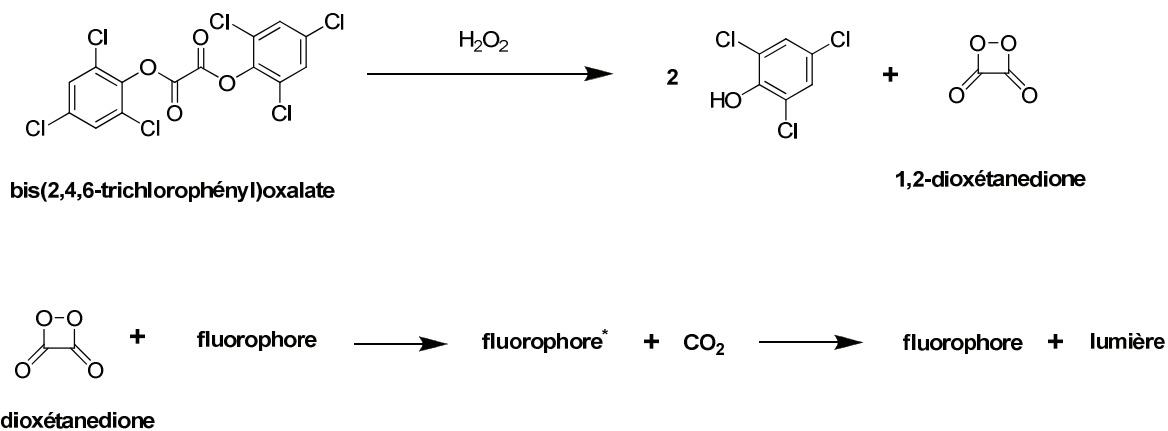


Figure 1 - 58 : Réaction chimique ayant lieu dans les bracelets chémiluminescents

2.3. Mécanismes de la chémiluminescence

Dans la suite, nous exposerons deux types de mécanisme mis en jeu dans les réactions de chémiluminescence des chémiluminophores de type 1,2-dioxétane, espèce chimique clé de mon travail de thèse présenté dans les chapitres suivants. L'un de ses mécanismes, appelé CIEEL (pour « Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence ») est le mécanisme historiquement attribué à la décomposition des 1,2-dioxétanes. Ce mécanisme a récemment été remis en cause¹¹¹ et pourrait être remplacé par un mécanisme appelé CTID (« Charge Transfer Induced Decomposition »). Ces deux mécanismes sont présentés ci-dessous.

2.3.1 Mécanisme CIEEL

Ce mécanisme a été décrit pour la première fois en 1979.¹¹² Les auteurs proposent un mécanisme impliquant un donneur d'électron (en général, un phénol protégé) et notre source d'énergie (le 1,2-dioxétane). Lors d'un déclenchement enzymatique ou chimique, le donneur d'électron transfère un électron vers le dioxétane qui est déstabilisé et se fragmente de manière homolytique. Un retour d'électron (BET pour « Back Electron Transfer ») s'effectue alors vers la partie principale de la molécule (celle contenant le phénol) ce qui la conduit dans un état excité. Le retour à l'état fondamental de la molécule entraîne l'émission de lumière (Figure 1 - 59).

¹¹¹ Matsumoto, M., Watanabe, N., Hoshiya, N. and Ijuin, H. K., *Chem. Rec.*, **2008**, *4*, 213.

¹¹² Schuster, G. B., *Acc. Chem. Res.*, **1979**, *10*, 366.

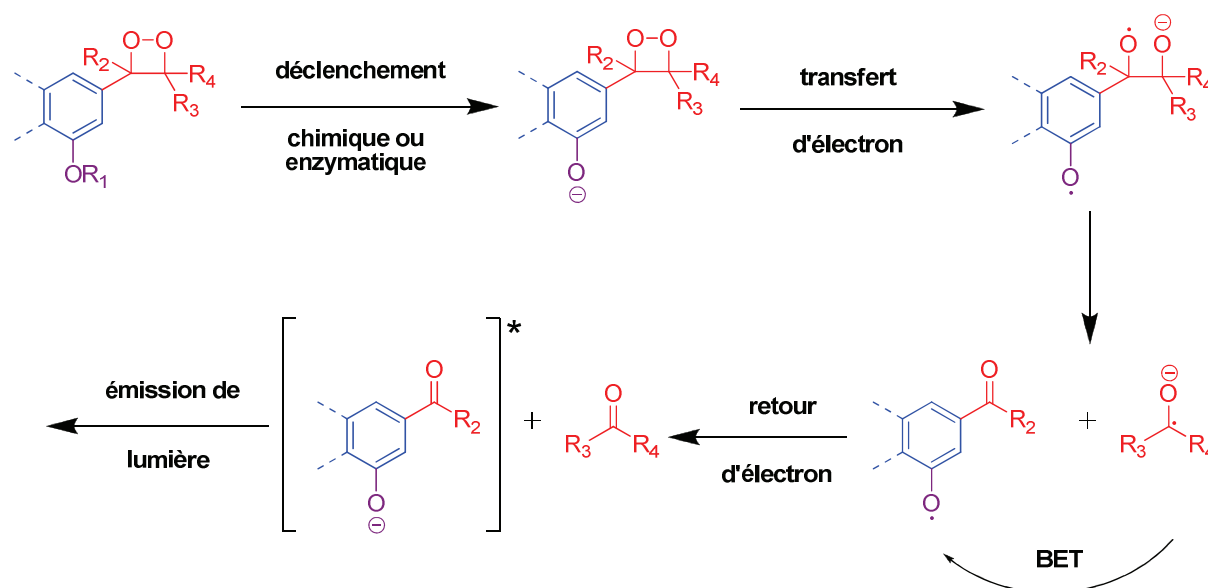


Figure 1 - 59 : Mécanisme détaillé du CIEEL (Schuster *et al*)¹¹²

2.3.2 Mécanisme CTID

Ce mécanisme a été proposé dans les années 80 et a été mis à profit très récemment par le groupe de M. Matsumoto aux 1,2-dioxétanes.^{111, 113} Contrairement au mécanisme CIEEL, il est beaucoup plus simple. De plus, il élimine l'étape de transfert d'électron en retour (BET) qui pose problème dans la justification du mécanisme.

La Figure 1 - 60 explicite ce mécanisme. L'initiation se produit comme précédemment par formation du phénolate d'aryle. La charge portée par le phénol est alors transférée vers le dioxétane. Celui-ci se fragmente avec un oxygène du dioxétane portant la charge et l'autre portant l'électron surnuméraire. Le phénol récupère alors un électron et donc, sa charge complète. Il se retrouve à cet instant dans un état excité singulet et en repassant à l'état fondamental va émettre de la lumière. Dans ce cas, quand la chémiluminescence est déclenchée au moyen d'une base, nous parlons de décomposition induite par une base (BIT pour « Base-Induced Decomposition ») passant par un mécanisme CTID.

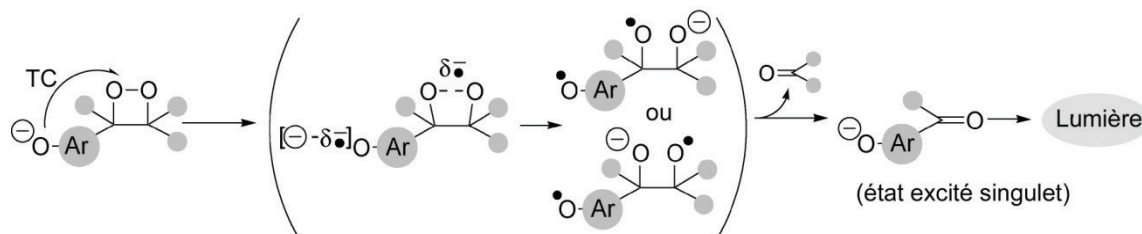


Figure 1 - 60 : Schéma du mécanisme CTID (Matsumoto *et al*)¹¹¹

¹¹³ Tanimura, M., Watanabe, N., Ijuin, H. K. and Matsumoto, M., *J. Org. Chem.*, **2011**, 3, 902.

Les publications récentes évoquent le mécanisme de CTID pour expliquer l'émission des 1,2-dioxétanes. Cependant, il est encore courant de voir le mécanisme de CIEEL revendiqué pour ces espèces du fait du caractère récent des propositions concernant l'autre mécanisme, de l'insuffisance de preuves de celui-ci et de l'utilisation exclusive du mécanisme de CIEEL pendant plus de 20 ans.

3 Les sondes chémiluminescentes

Comme alternative potentielle à la bioluminescence tout en gardant une très bonne sensibilité, des sondes chémiluminescentes déclenchables de manière enzymatique sont apparues ces dernières années. Ces sondes sont en général fondées sur des architectures de type 1,2-dioxétane. Ces structures sont relativement stables et différentes méthodes de synthèse ont pu être développées. Cependant, les sondes chémiluminescentes restent très confidentielles. En effet, bien qu'il existe un nombre important de kits de détection *in vitro* chémiluminescents sur le marché, peu de publications ont été écrites sur la chémiluminescence *in vivo*. Cela traduit la difficulté d'obtenir ce genre de sondes et le potentiel innovant existant pour le développement de sondes chémiluminescentes utilisables *in vivo*.

3.1. Kit de détection d'enzymes hydrolytiques

Le premier exemple de kit de détection d'enzymes hydrolytiques fondé sur une architecture de type 1,2-dioxétane date de 1989.^{114, 115} Il a été conçu pour détecter la phosphatase alcaline. Comme le montre la Figure 1 - 61, il est composé d'une partie 1,2-dioxétane stabilisée par des groupes très encombrants. Le dioxétane est enrichi en électrons au moyen d'un groupement méthoxy. Le déclenchement de la chémiluminescence est assuré par une substitution du phénol de l'aryle au moyen d'un groupement qui est substrat de l'enzyme ciblée, ici un acide phosphorique.

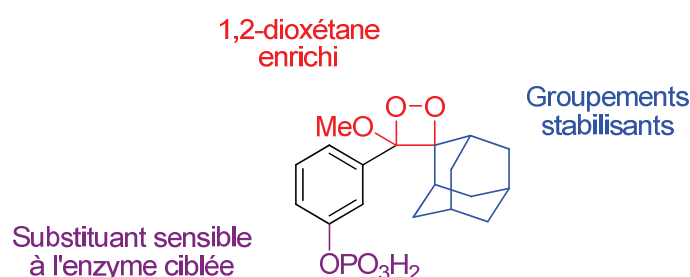


Figure 1 - 61 : Premier exemple de sondes à protéases chémiluminescentes basées sur un 1,2-dioxétane

Par la suite, les sondes développées pour détecter d'autres enzymes seront fondées sur ce même type d'architecture en modifiant la nature du motif de reconnaissance/substrat compatible avec l'enzyme ciblée. Ainsi, d'autres sondes à hydrolases ont été développées sur ce principe. Nous pouvons citer des exemples pour détecter la β -galactosidase¹¹⁶ ou encore pour détecter la neuraminidase¹¹⁷ (la neuraminidase est une des enzymes présentes à la surface du virus de la grippe).

¹¹⁴ Bronstein, I., Voyta, J. C., Thorpe, G. H., Kricka, L. J. and Armstrong, G., *Clin. Chem.*, **1989**, 7, 1441.

¹¹⁵ Thorpe, G. H., Bronstein, I., Kricka, L. J., Edwards, B. and Voyta, J. C., *Clin. Chem.*, **1989**, 12, 2319.

¹¹⁶ Kricka, L. J., *Clin. Chem.*, **1991**, 9, 1472.

¹¹⁷ Buxton, R. C., Edwards, B., Juo, R. R., Voyta, J. C., Tisdale, M. and Bethell, R. C., *Anal. Biochem.*, **2000**, 2, 291.

Un exemple intéressant est une sonde pour la détection de l'acétylcholine estérase.¹¹⁸ La différence majeure avec les sondes précédentes est que le phénol a été remplacé par un thiophénol. De ce fait, le déclenchement de la chémiluminescence se produit par rupture d'un pont disulfure par la thiocholine provenant de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'enzyme (Figure 1 - 62). La substitution du second thiophénol par deux groupements nitro permet de diriger l'attaque du thiol de la thiocholine.

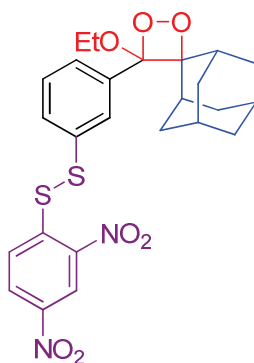


Figure 1 - 62 : Sonde chémiluminescente pour la détection de l'acétylcholine estérase

Il est intéressant de noter que beaucoup de ces kits de détection sont maintenant commerciaux et vendus pour la plupart par la société Invitrogen (Molecular Probes®).

3.2. Sonde chémiluminescente pour les protéases

Il est important de noter que les seules classes d'hydrolases pour lesquelles aucun kit commercial n'est disponible actuellement sont les protéases. En effet, le déclenchement de la chémiluminescence nécessite la formation d'un anion (oxygéné, soufré) pour qu'un électron puisse être efficacement transféré au dioxétane. Or, les protéases libèrent une amine et un carboxylate. L'amine ne peut pas être déprotonnée à pH physiologique et les carboxylates ne transfèrent pas leur anion au dioxétane dans ce type de système.¹¹⁹ Il faut donc trouver une solution innovante pour appliquer la chémiluminescence aux protéases.

Parmi les protéases d'intérêt, celles impliquées dans le phénomène d'apoptose sont des cibles biologiquement pertinentes. En effet, l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un phénomène biologique primordial pour le milieu médical et pharmaceutique. Elle est nécessaire à de nombreux phénomènes biologiques, car elle permet de réguler l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Elle intervient dans la morphogénèse ou le système immunitaire en général. Des dysfonctionnements dans la régulation de l'apoptose interviennent dans de nombreuses pathologies,

¹¹⁸ Sabelle, S., Renard, P.-Y., Pecorella, K., de Suzzoni-Dézard, S., Créminon, C., Grassi, J. and Mioskowski, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *17*, 4874.

¹¹⁹ Bronstein, I., Edwards, B., Martin, C., Sparks, A. and Voyta, J. C. (TROPIX, INC.).Dioxetane compounds for the chemiluminescent detection of proteases, methods of use and kits therefore, WO 96/24849, 1996

soit par défaut (prolifération des cellules cancéreuses ou dans le développement de certains virus comme l'herpès, le VIH, etc), soit par excès (maladies neurodégénératives ou phénomènes ischémiques).

Dans ce cadre, le laboratoire a développé une sonde chémiluminescente pour détecter la caspase-3. La caspase-3 est une enzyme importante faisant partie d'un groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'apoptose, de nécrose et d'inflammation. La société QUIDD, en collaboration avec l'équipe de P.-Y. Renard, a développé des sondes ciblant cette enzyme, car une fois cette enzyme activée, le phénomène d'apoptose est irréversible.

La sonde développée au cours de la thèse de J.-A. Richard est donc composée d'un térapeptide DEVD (D pour acide aspartique, E pour acide glutamique et V pour Valine). Ce peptide est spécifiquement reconnu et clivé à son extrémité C-terminale par la caspase-3. Il est relié au moyen d'un bras auto-immolable PABA (pour alcool para-amino-benzylique) au chemiluminophore vu précédemment. Ce bras est indispensable car il permet de transmettre l'information de déclenchement depuis une fonction aniline (libérée suite à l'hydrolyse enzymatique du lien pseudo-peptidique) jusqu'à une fonction phénol. La Figure 1 - 63 présente la structure de cette sonde. Ce principe de relais d'information, entre la coupure d'une liaison amide et la formation d'un phénol/phénolate, est la solution proposée par le laboratoire à la société Quidd pour pouvoir exploiter la chémiluminescence à la détection de protéases. Ceci a été protégé par un brevet commun, entre l'Université de Rouen et la société QUIDD en 2005.¹²⁰

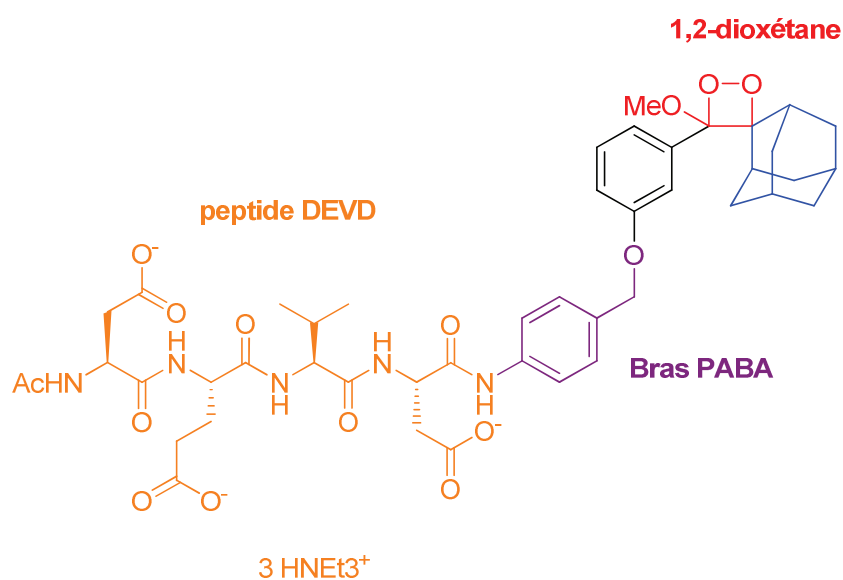


Figure 1 - 63 : Formule développée de la sonde à caspase-3

¹²⁰ Renard, P.-Y., Romieu, A. and Massonneau, M. (Quidd / Université de Rouen). Biomarqueur à émission lumineuse, FR2886292, 2006

Cette sonde fonctionne très bien dans un contexte *in vitro*. Elle nécessite cependant l'emploi d'un protocole particulier de révélation de la chémiluminescence. En effet, la réaction enzymatique a lieu à pH physiologique qui est peu favorable à la formation du phénolate à l'origine de la réaction chémiluminescente. La chémiluminescence est donc déclenchée à posteriori et enregistrée dans un tampon basique afin de favoriser la conversion en phénolate. De plus, un tensioactif (ici le CTAB pour bromure de cetyltriméthylammonium) et un fluorophore relais (ici la fluorescéine) sont ajoutés afin de créer une cage hydrophobe autour du dioxétane et ainsi augmenter l'émission de lumière. La chémiluminescence est donc enregistrée à la longueur d'onde d'émission de la fluorescéine et le profil cinétique enzymatique est obtenu par la suite comme le montre la Figure 1 - 64.

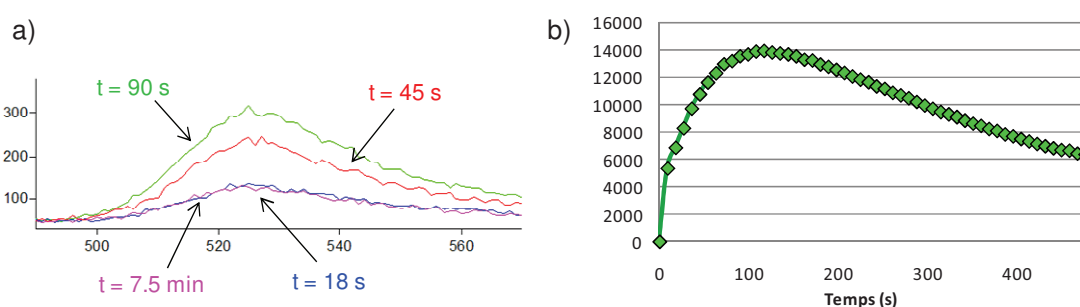


Figure 1 - 64 : Spectre d'émission de chemiluminescence (a) et émission totale en fonction du temps (b)¹²¹

Cette sonde a fait l'objet de deux publications^{121,122} ; elle n'est cependant pas utilisable *in vivo*.

3.3. Exemples d'utilisation de la chémiluminescence dans un contexte *in vivo*

Bien qu'il y ait de nombreux exemples d'utilisation de la bioluminescence *in vivo*, il en existe seulement peu concernant la chémiluminescence. Trois exemples *in vivo* sont décrits ci-dessous.

Le premier exemple a été publié en 2010 par le groupe de R. Mason.¹²³ Il consiste à utiliser le kit commercial Galacto-Light Plus™ commercialisé par Applied Biosystems (groupe Invitrogen). Ce kit contient la sonde chémiluminescente spécifique de la β -galactosidase, un tampon et un amplificateur de chémiluminescence (un fluorophore). La figure suivante (Figure 1 - 65) montre la structure de la sonde chémiluminescente utilisée dans ce kit. L'atome de chlore présent sur le phénol permet d'abaisser le pKa de déclenchement de la chémiluminescence afin d'émettre à des pH plus proches des conditions physiologiques.

¹²¹ Richard, J.-A., Jean, L., Schenkels, C., Massonneau, M., Romieu, A. and Renard, P.-Y., *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *14*, 2941.

¹²² Richard, J.-A., Jean, L., Romieu, A., Massonneau, M., Noack-Fraissignes, P. and Renard, P.-Y., *Org. Lett.*, **2007**, *23*, 4853.

¹²³ Liu, L. and Mason, R. P., *PLoS ONE*, **2010**, *8*, e12024.

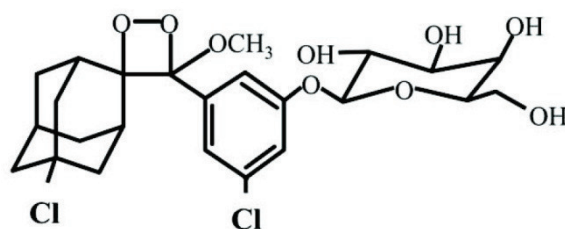


Figure 1 - 65 : Structure complète du chémiluminophore utilisé dans le kit Galacto-Light Plus^{TM123}

La sonde est bien déclenchée en présence de β -galactosidase et des images correctes ont pu être enregistrées comme le présente la Figure 1 - 66. Cependant, ce kit est injecté directement dans la tumeur d'une souris, ce qui limite beaucoup ce système. Cette publication de R. Mason *et al.* ne représente que des travaux très préliminaires de chémiluminescence *in vivo*. Cet exemple est toutefois intéressant et il est important de le prendre en compte dans le développement futur de sondes chémiluminescentes. En particulier, il valide une certaine résistance du motif dioxétane *in vivo*, à partir du moment où il est stabilisé.

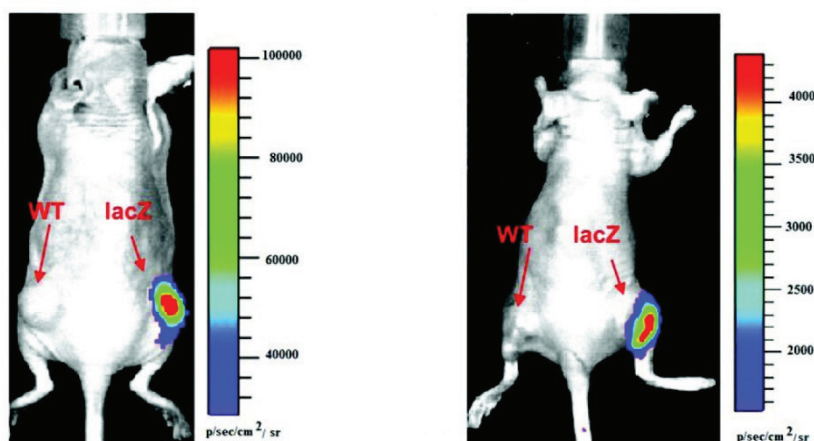


Figure 1 - 66 : Images de la souris après 10 s d'exposition (gauche) et 60 s (droite) (Liu *et al.*)¹²³

Le deuxième exemple est fondé sur la formation de nanoparticules chémiluminescentes.¹²⁴ La synthèse de ces nanoparticules est décrite dans le schéma suivant (Figure 1 - 67). Le principe est de coévaporer un précurseur de chémiluminophore, un ester de peroxyalate (1) obtenu sous forme de polymère, avec un fluorophore (2) qui va servir de relais de chémiluminescence. Les nanoparticules formées sont sensibles à l'eau oxygénée et, en contact avec celle-ci (4), vont immédiatement émettre de la lumière (5) à la longueur d'onde du fluorophore (ici 630 nm).

¹²⁴ Lee, D., Khaja, S., Velasquez-Castano, J. C., Dasari, M., Sun, C., Petros, J., Taylor, W. R. and Murthy, N., *Nat. Mater.*, **2007**, *10*, 765.

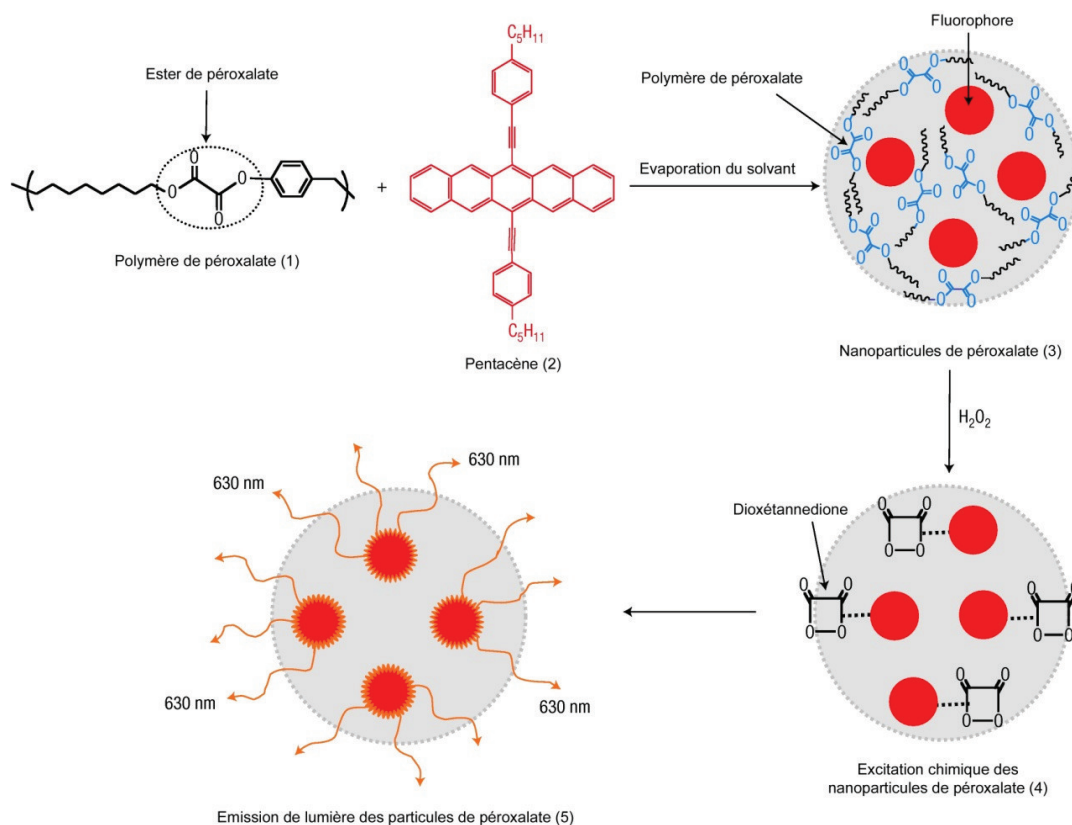


Figure 1 - 67 : Synthèse et déclenchement de nanoparticules chémiluminescentes (Lee et al)¹²⁴

Cet exemple est très intéressant car il ouvre la voie à la chémiluminescence dans le rouge voire le proche-infrarouge en choisissant le bon fluorophore et à une émission efficace de chémiluminescence en milieu *in vivo*. De plus, les auteurs ont montré la spécificité de ces nanoparticules vis-à-vis de l'eau oxygénée. Les images *in vivo* sur des souris sont présentées sur la Figure 1 - 68. Les nanoparticules sont injectées directement dans la patte arrière, suivie du peroxyde d'hydrogène et les images sont enregistrées. Ce système bien que *in vivo* n'est absolument pas spécifique à un organe ou à une enzyme mais uniquement à une espèce réactive de l'oxygène. Il est donc d'une portée limitée au processus d'inflammation pour lequel la détection des espèces réactives de l'oxygène est importante. Cependant aucune donnée n'est fournie sur la quantité de peroxyde d'hydrogène nécessaire pour obtenir une image, et donc sur la sensibilité de la sonde.

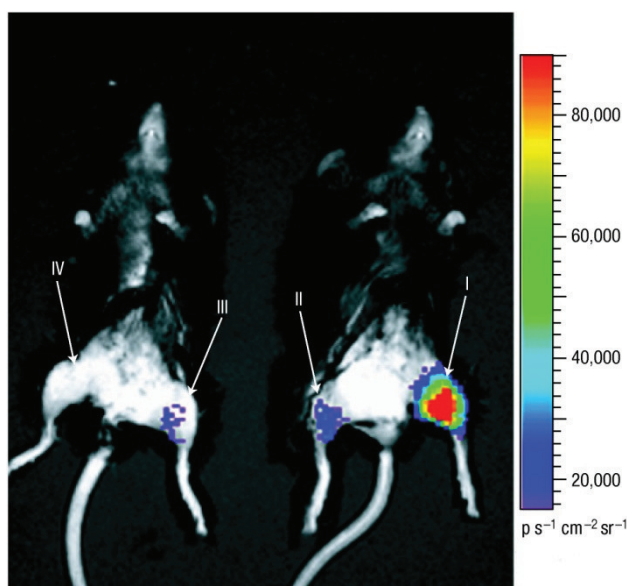


Figure 1 - 68 : (I) Nanoparticules + 10 μ M d'eau oxygénée ; (II) Nanoparticules + 1 μ M d'eau oxygénée ; (III) Nanoparticules seulement ; (IV) Contrôle négatif (Lee et al)¹²⁴

Un dernier exemple très récent de chémiluminescence *in vivo* ne concerne pas un cycle dioxétane, mais l'utilisation de macrocycle de type endopéroxyde (Figure 1 - 69). L'espèce produisant de la lumière est un 2,3-dioxabicyclo[2.2.2]octane, protégé du solvant aqueux par un macrocycle constitué d'anthracène. La chémiluminescence est donc plus intense et de ce fait suffisante pour permettre d'obtenir des images *in vivo*.¹²⁵

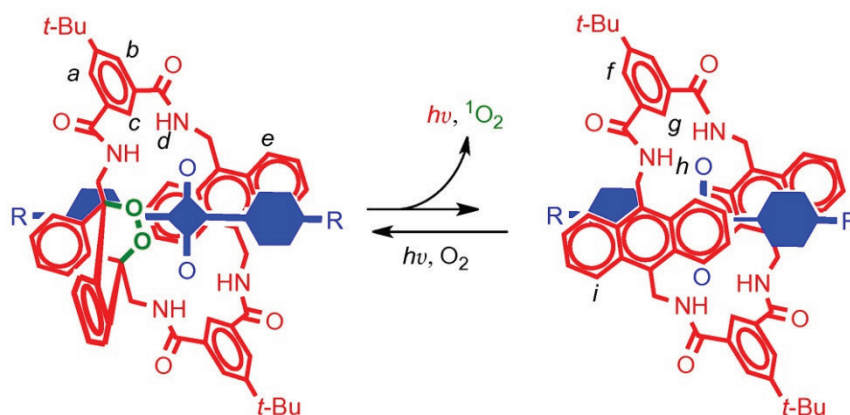


Figure 1 - 69 : Réaction réversible d'addition d'oxygène singlet sur le précurseur de chémiluminescence (Baumes et al)¹²⁵

Ces trois exemples permettent d'illustrer le défi que représente la chémiluminescence *in vivo*. Le chapitre 3 de cette thèse a pour objectif d'apporter des solutions potentielles à la synthèse de sondes chémiluminescentes utilisables dans un contexte *in vivo*. Nous pourrions remarquer à cette occasion la difficulté que représente la synthèse de ce type de sondes.

¹²⁵ Baumes, J. M., Gassensmith, J. J., Giblin, J., Lee, J.-J., White, A. G., Culligan, W. J., Leevy, W. M., Kuno, M. and Smith, B. D., *Nat. Chem.*, **2010**, *12*, 1025.

L'objectif de cette thèse est la synthèse de sondes luminescentes pour l'imagerie *in vivo* de l'activité protéasique. Il y a donc un double objectif :

Développer de nouveaux profluorophores émettant dans le proche infrarouge et possédant de bonnes propriétés optiques dans un milieu physiologique. L'objectif à long terme étant d'intégrer ces nouveaux pro-fluorophores dans une sonde à protéases spécifique.

Expérimenter de nouvelles voies d'accès à des chémiluminophores répondant à un double objectif : émettre dans le proche infrarouge et avoir une bonne émission dans les solvants aqueux. L'objectif final sera de développer des sondes chémiluminescentes pouvant être utilisées de manière autonome dans un contexte *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*.

La suite de ce manuscrit s'axera sur deux chapitres : la pro-fluorescence avec les progrès effectués sur ce point pendant la durée de la thèse et la chémiluminescence avec la présentation des nouveaux chémiluminophores obtenus.

Chapitre 2

Synthèse et modification de nouveaux pro-fluorophores

Ce chapitre est consacré à la synthèse de pro-fluorophores à phénol émettant dans le proche infrarouge et leurs possibles dérivatisations.

I. Introduction à la pro-fluorescence

1 Principe de la pro-fluorescence

1.1. Introduction à la pro-fluorescence

La pro-fluorescence désigne la capacité qu'ont certains fluorophores d'avoir une modification de leur fluorescence suite à une réaction chimique mettant un jeu un (bio)analyte ciblé. La réaction chimique peut être une modification réversible d'une fonction chimique donnée (estérification, éthérification, phosphorylation, etc) mais aussi une cyclisation, une réduction, une oxydation ou encore une substitution.¹²⁶ Cela se caractérise par une diminution (effet hypochrome), une augmentation (effet hyperchrome) ou une extinction complète de la luminescence mais peut aussi être un déplacement bathochrome ou hypsochrome des longueurs d'onde d'absorption et d'émission (Figure 2 - 1). Le terme pro-fluorophore désignera la sonde pro-fluorescente dans son ensemble. Dans la littérature, nous trouverons aussi les termes de fluorophores latents (latent fluorophore) ou de sondes fluorogéniques (fluorogenic probes). Nous considérerons cependant ces termes identiques dans la suite de l'exposé.

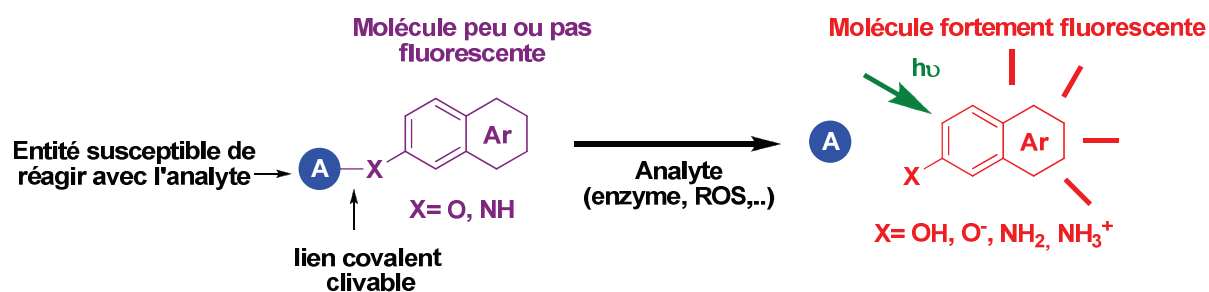


Figure 2 - 1 : Schéma de principe de la pro-fluorescence

Les figures suivantes (Figure 2 - 2 et Figure 2 - 3) présentent deux exemples tirés de la littérature illustrant le principe de pro-fluorescence.¹²⁶ L'un des exemples est basé sur la substitution réversible d'un phénol, se traduisant par une modification de la délocalisation des électrons sur l'aromatique, et donc des niveaux énergétiques accessibles lors de l'excitation (Figure 2 - 2). L'autre repose sur l'ouverture d'un cycle, se traduisant par un recouvrement de l'aromaticité globale du fluorophore (Figure 2 - 3).

¹²⁶ Eun Jun, M., Roy, B. and Han Ahn, K., *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 7583.

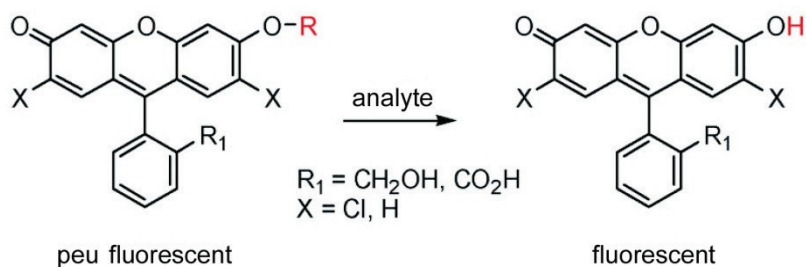


Figure 2 - 2 : Exemple de pro-fluorophore, ici de type substitution réversible d'une fonction phénol (Jun *et al*)¹²⁶

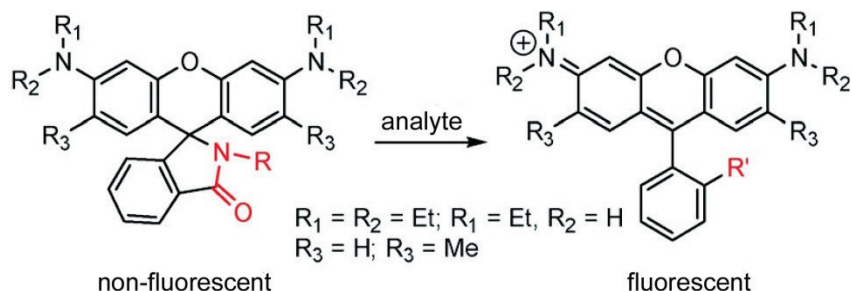


Figure 2 - 3 : Exemple de pro-fluorophore, ici après une réaction d'ouverture de cycle (Jun *et al*)¹²⁶

Dans ce contexte, le laboratoire a présenté plusieurs solutions, dont une cyclisation originale basée sur une réaction de Mannich.¹²⁷ Le sel d'iminium initial est non-fluorescent. Lorsque l'amine est libérée après l'hydrolyse du carboxamide, le produit cyclise spontanément pour donner un dérivé pyrazino-benz[e] indole fluorescent (Figure 2 - 4).

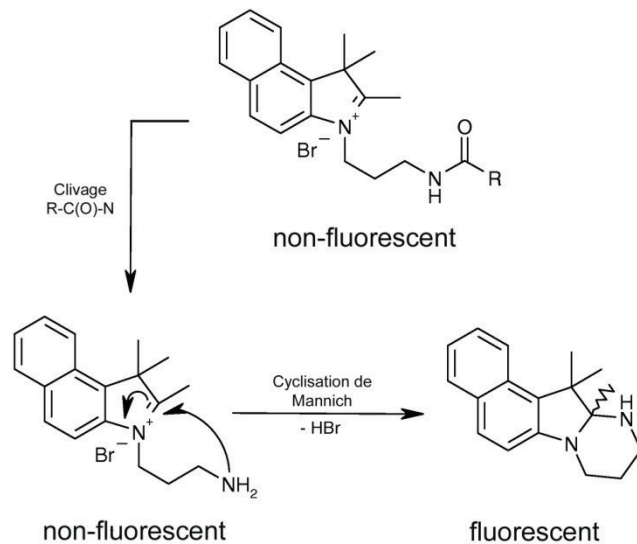


Figure 2 - 4 : Cyclisation de Mannich appliquée à la pro-fluorescence

Ce phénomène de pro-fluorescence est mis à profit dans l'élaboration de nombreuses sondes (bio)moléculaires optiques destinées à la détection de divers (bio)analytes tels que, des enzymes, des cations métalliques en particulier les métaux de transition, des anions, des réducteurs biologiques, des espèces réactives de l'oxygène, etc.¹²⁸ Outre l'aspect « smart probe » quantifiable, l'avantage

¹²⁷ Clavé, G., Bernardin, A., Massonneau, M., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 35, 6229.

¹²⁸ Johnsson, N. and Johnsson, K., *ACS Chem. Biol.*, **2007**, 1, 31.

principal de la pro-fluorescence par rapport à d'autres approches (types FRET par exemple) est l'utilisation d'un seul chromophore. Ceci peut s'avérer financièrement intéressant et souvent plus accessible du point de vue synthétique. Ces sondes sont généralement très sélectives et leur faible bruit de fond ne dépend quasiment pas de la concentration. Cela permet donc de travailler dans une gamme de concentrations beaucoup plus grande sans augmenter significativement le bruit de fond.

Dans la suite, nous nous attacherons à présenter uniquement quelques exemples de pro-fluorophores en nous focalisant sur les fluorophores à phénol. Afin de disposer d'une même approche pour les sondes chémiluminescentes que pour les sondes pro-fluorescentes, et compte tenu du type de cibles choisies par l'entreprise QUIDD (protéases) et des technologies brevetées par l'entreprise et le laboratoire,^{129,130} nous étudierons les réactions de pro-fluorescence de formation et de rupture de liaisons covalentes. Par conséquent, nous ne présenterons pas les pro-fluorophores fondés sur des interactions non-covalentes de type liaison hydrogène ou interactions électrostatiques (sondes pour la détection des protéines taguées poly-His, anions de type phosphate, etc) qui mettent en jeu la plupart du temps des phénomènes de transfert d'électron photoinduits, déjà présentés dans l'introduction.

1.2. Exemples de pro-fluorophores

Les réactions chimiques pouvant être à l'origine de la pro-fluorescence sont nombreuses. Cependant, il existe peu de fluorophores présentant des propriétés intrinsèques de pro-fluorescence. En effet, de nombreuses sondes pro-fluorescentes sont fondées sur une modification chimique réversible d'un fluorophore. Ici, nous présenterons uniquement les fluorophores « naturellement » pro-fluorescents, c'est-à-dire sans modification complexe du cœur du fluorophore. Nous nous limiterons donc aux modifications de type substitution de fonction.

Lorsque les atomes d'oxygène ou d'azote de certains fluorophores (i.e., anilines, phénols ou plus rarement thiophénols fluorescents) sont substitués par des groupements électroattracteurs (pour donner des dérivés amide, ester ou thioester), ceux-ci voient leurs caractéristiques de fluorescence profondément modifiées. Ces fluorophores appartiennent à la famille des coumarines, des xanthènes (fluorescéines, rhodamines, rhodols, ...), des oxazines ou encore des acridinones. Intuitivement, la pro-fluorescence s'explique par le fait que le doublet électronique de l'hétéroatome (oxygène ou azote) n'est plus disponible pour participer à la délocalisation électronique lorsqu'il est substitué.¹³¹

¹²⁹ Renard, P.-Y., Romieu, A., Richard, J.-A. and Massonneau, M. (QUIDD). Nouveaux composés pro-fluorescents, FR2910387, 2006

¹³⁰ Renard, P.-Y., Romieu, A. and Massonneau, M. (Quidd / Université de Rouen). Light-Emitting Biomarker, US 2009041669, 2005

¹³¹ Chen, X. Q., Sun, M. and Ma, H. M., *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *4*, 477.

Suite à la réaction avec l'analyte ciblé, la liaison avec le groupe électroattracteur est rompue et le doublet électronique redevient disponible ; la fluorescence est alors restaurée. Nous pouvons distinguer les fluorophores à aniline de ceux à phénol (ou thiophénol). Les fluorophores dérivés d'une aniline fluorescente sont les plus nombreux. L'exemple le plus marquant est celui des rhodamines qui possèdent deux motifs aniline.¹³² Il est nécessaire d'avoir un des deux groupements amino libre pour que le chromophore ait un caractère fluorescent. La différence de niveau de fluorescence entre la version latente et la version libre du fluorophore atteint un rapport de 150 dans le cas de la rhodamine 110 (Rh 110) par exemple.¹³³ Cela permet d'avoir des niveaux de bruit de fond extrêmement faibles augmentant ainsi le rapport signal sur bruit. Les rhodamines utilisées dans des sondes pro-fluorescentes sont donc soit substituées deux fois avec un groupement réactif à l'analyte ciblé, soit une des deux fonctions amine est « bloquée » et l'autre est utilisée pour la détection.

Le groupe de Z.-Q. Wang a décrit la synthèse et l'utilisation de sonde pour la détection de la caspase-3 utilisant cette stratégie.¹³⁴ La sonde est constituée d'un peptide de reconnaissance DEVD, substrat de la caspase-3 directement lié à une Rh 110. L'autre fonction aniline de la rhodamine est protégée au moyen d'un groupement morpholine carboxamide (Figure 2 - 5).

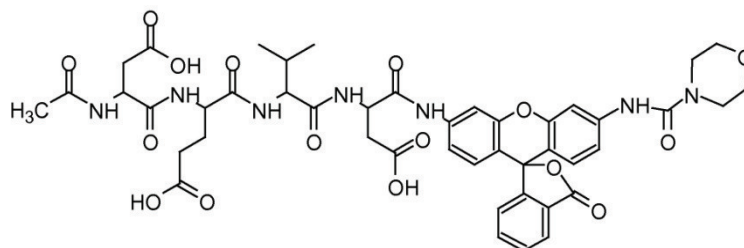


Figure 2 - 5 : Sonde pro-fluorescente pour la détection de la caspase-3

Les deux exemples suivants sont issus des travaux du groupe de recherche de B. Tang et illustrent les deux situations évoquées ci-dessus (Figure 2 - 6 et Figure 2 - 7). Ils concernent des sondes destinées à imager les thiols biologiques (cystéine, homocystéine, glutathion, etc). Dans le premier exemple (Figure 2 - 6), la sonde ne présente qu'une seule fonction aniline de la rhodamine 6G (R6G).¹³⁵

¹³² Beija, M., Afonso, C. A. M. and Martinho, J. M. G., *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 8, 2410.

¹³³ Lavis, L. D., Chao, T.-Y. and Raines, R. T., *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 4, 252.

¹³⁴ Wang, Z.-Q., Liao, J. and Diwu, Z., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 9, 2335.

¹³⁵ Tang, B., Xing, Y., Li, P., Zhang, N., Yu, F. and Yang, G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 38, 11666.

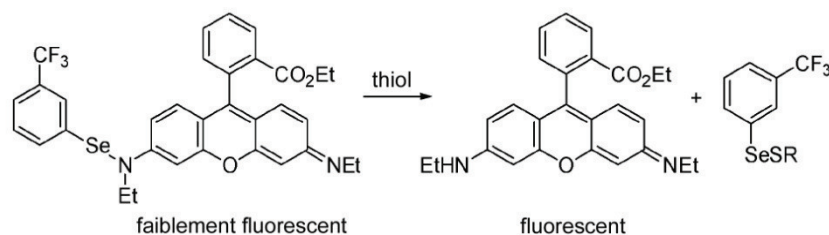


Figure 2 - 6 : Sondes basées sur une structure de type rhodamine 6G pour la détection des thiols biologiques (Tang et al)¹³⁵

Dans le deuxième exemple (Figure 2 - 7), la Rh 110 est substituée quatre fois avec des groupements arylsélénio.¹³⁶ En présence de thiol, la Rh 110 est libérée de ces substituants et la fluorescence est exaltée. La différence de fluorescence entre la forme spiro-lactone *N*-substituée et la forme ouverte est d'un facteur 170. Ceci permet d'avoir une très bonne sensibilité et d'atteindre un seuil de détection de 144 picomolaires.

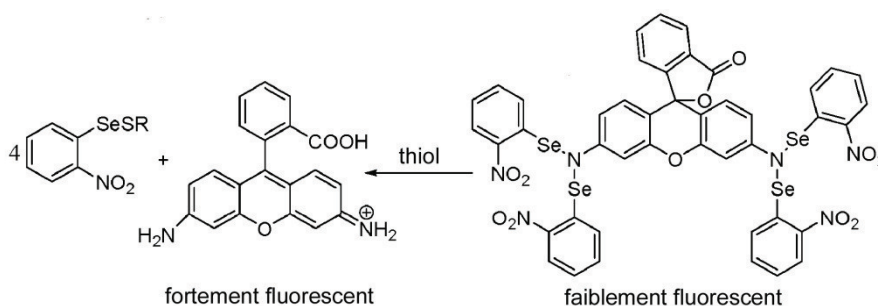


Figure 2 - 7 : Sonde basée sur une structure de type rhodamine 110 pour la détection des thiols biologiques (Tang et al)¹³⁶

Dans la suite de l'exposé, nous cantonnerons nos exemples aux pro-fluorophores à peptidases présentant un intérêt pour le laboratoire et la société QUIDD. Pour les autres types de sondes, le lecteur intéressé pourra se référer aux revues de J.-L. Reymond qui détaillent d'autres exemples de pro-fluorophores.^{137,138}

Les sondes pro-fluorescentes fondées sur la substitution d'une fonction aniline sont nombreuses. En effet, cette fonction présente de nombreux avantages. Elle permet d'accrocher directement une séquence peptidique substrat d'une peptidase d'intérêt et ainsi d'imager directement cette activité enzymatique, cela bien entendu sous réserve que l'enzyme soit tolérante du côté C-terminal. L'exemple suivant est une substitution de fluorophore à aniline appliquée à la détection de la caspase-8, qui le clive en C-terminal, libérant directement l'aniline (Figure 2 - 8).¹³⁹

¹³⁶ Tang, B., Yin, L., Wang, X., Chen, Z., Tong, L. and Xu, K., *Chem. Commun.*, **2009**, 35, 5293.

¹³⁷ Reymond, J.-L., Fluxa, V. S. and Maillard, N., *Chem. Commun.*, **2009**, 1, 34.

¹³⁸ Reymond, J.-L., van Deursen, R., Blum, L. C. and Ruddigkeit, L., *MedChemComm*, **2010**, 1, 30.

¹³⁹ Reszka, P., Schulz, R., Methling, K., Lalk, M. and Bednarski, P. J., *ChemMedChem*, **2010**, 1, 103.

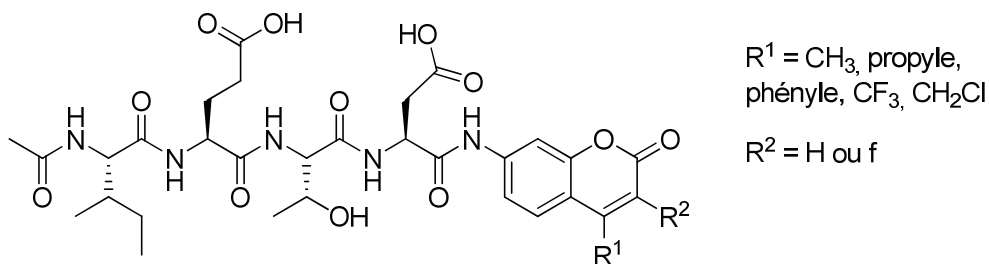


Figure 2 - 8 : Exemple d'utilisation de substitution de fonction aniline, ici sur une aminocoumarine

De par leur fonction aniline, ces fluorophores sont extrêmement modulables pour imager des amidases ou des peptidases, et le lien amide est particulièrement stable en milieu physiologique. Un autre exemple présenté ci-dessous est une sonde pro-fluorescente pour la détection de la dipeptidyl peptidase IV. Un dérivé hydrosoluble de la benzophénoxazine est utilisé comme fluorophore. Le tout est lié à un térapeptide (Gly-Pro-Gly-Pro), substrat de l'enzyme, qui le clive en C-terminal (Figure 2 - 9).^{140,141}



Figure 2 - 9 : Sonde pour la détection de la dipeptidyl peptidase 4¹⁴⁰

Un dernier avantage des fluorophores à aniline est la faible influence du pH sur la fluorescence, excepté en milieu extrêmement acide, et donc la compatibilité de cette stratégie avec les milieux physiologiques. En revanche, très peu de peptidases acceptent une telle modification en position C-terminale tout en conservant des cinétiques de clivage acceptables pour une application en imagerie médicale. Une partie des travaux que l'entreprise QUIDD réalise en collaboration avec le laboratoire, consiste à trouver des solutions alternatives à ces problèmes, en utilisant par exemple des bras réactifs auto-immolables.^{142,143}

Les fluorophores à phénol, bien que moins nombreux sont également très utilisés pour la détection des activités estérase, phosphatase et galactosidase.¹⁴⁴ Les principales limitations de ces pro-fluorophores sont que la fluorescence de ces fluorophores à phénol dépend du pH, et aussi que les liens esters ou acétals sont fragiles en milieu physiologique. Etant donné que les peptidases clivent des liaisons amides, le phénol ne peut être libéré directement. Il est donc nécessaire de transférer

¹⁴⁰ Ho, N.-H., Weissleder, R. and Tung, C.-H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *10*, 2599.

¹⁴¹ Lai, K. S., Ho, N.-H., Cheng, J. D. and Tung, C.-H., *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *4*, 1246.

¹⁴² Thèse de Yves Meyer

¹⁴³ Renard, P.-Y., Romieu, A., Richard, J.-A. and Massonneau, M. (QUIDD). Nouveaux composés pro-fluorescents, FR2910387, 2008

¹⁴⁴ Reymond, J.-L., Fluxa, V. S. and Maillard, N., *Chem. Commun.*, **2009**, *1*, 34.

l'information « coupure d'un lien amide » à la libération d'un phénol. Pour ce faire, la stratégie adoptée par le laboratoire et l'entreprise QUIDD consiste à utiliser un bras espaceur auto-immolable entre le peptide et le fluorophore. Ce bras réactif permet de libérer le phénol fluorescent *via* une réaction domino initiée par la réaction avec le (bio)analyte ciblé. Les fluorophores à phénol présentent en outre un intérêt en termes de brevetabilité pour une entreprise comme QUIDD car les fluorophores à phénol sont peu couverts. De plus, ils ouvrent le champ de possibilité de sondes pro-fluorescentes à d'autres fluorophores que ceux dérivés d'aniline. Les fluorophores étant des espèces stériquement très encombrantes, il est intéressant d'éloigner le fluorophore du substrat peptidique afin de ne pas encombrer le site actif de l'enzyme. Ceci peut s'avérer, dans les cas les plus favorables, bénéfique pour les propriétés enzymatiques de la sonde pro-fluorescente. Dans cette optique, des travaux significatifs dans le domaine des fluorophores à phénol ont été réalisés au sein du laboratoire pour développer de nouveaux bras réactifs pour la détection des peptidases.^{145,146,147} De plus, ces travaux développés en pro-fluorescence pourront être utilisés pour la conception de sondes chémiluminescentes. En effet, la principale famille de chémiluminophores accessibles induisent un déclenchement de la chémiluminescence *via* l'apparition d'une fonction phénolate ou thiophénolate (*vide infra, chapitre 3*).

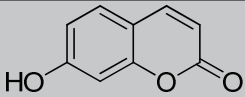
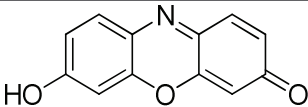
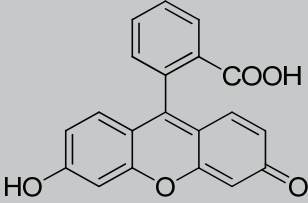
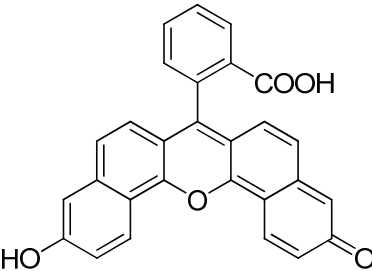
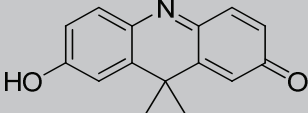
¹⁴⁵ Thèse de Yves Meyer (Financement QUIDD-CNRS – 2007-2010)

¹⁴⁶ Meyer, Y., Richard, J.-A., Massonneau, M., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Lett.*, **2008**, 8, 1517.

¹⁴⁷ Meyer, Y., Richard, J.-A., Delest, B., Noack, P., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 1777.

1.3. Les pro-fluorophores à phénol

Les pro-fluorophores à phénol sont peu nombreux, le tableau suivant récapitule les différents phénols fluorescents existants dont les propriétés de fluorescence sont fortement dépendantes de la substitution ou non de leur groupement hydroxyle. (Tableau 2 - 1)

Profluorophore	Abs / Em (en nm)	Rendement quantique	Coefficient d'absorption molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$)
 Ombélliférone	356 / 452	0,76 (PBS, pH 7,4) ¹⁴⁸	13 000
 Résorufine	571 / 585	0,74 (pH 9,5) ¹⁴⁹	62 000
 Fluorescéine	494 / 521	0,93 (pH 13)	92 300
 Naphtofluorescéine	595 / 660	0,14 (pH 9,5) ¹⁵⁰	44 000
 DAO	638 / 651	0,079 (PBS, pH 7,4) ¹⁵⁰	24 450

¹⁴⁸ Setsukinai, K.-i., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 12, 2453.

¹⁴⁹ Site internet de Molecular Probes (Invitrogen)

¹⁵⁰ Valeur déterminée au sein du laboratoire.

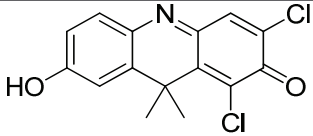
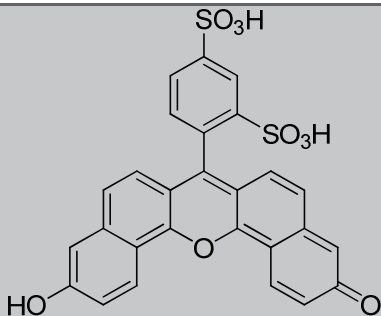
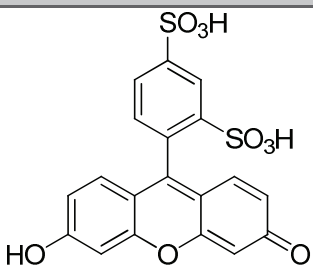
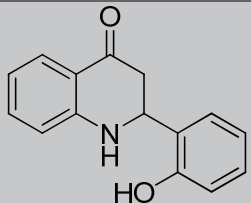
 <p>DDAO</p>	646 / 659	0,19 (PBS, pH 7,4) ¹⁵⁰	38 400
 <p>Fluorophore du groupe de R. Weissleder</p>	614 / 676	0,055 (tampon bicarbonate, pH 10) ¹⁵¹	43 000
 <p>Fluorophore du groupe de R. Weissleder</p>	500 / 521	0,81 (tampon bicarbonate, pH 10) ¹⁵¹	69 000
 <p>HPQ</p>	375 / 490	-	14 200

Tableau 2 - 1 : Profluorophores à phénol (structure et propriétés spectroscopiques)

A la vue de leurs propriétés spectrales, les seuls fluorophores utilisables pour des applications *in vivo*, c'est-à-dire émettant au-delà de 600 nm sont la naphthofluorescéine, DAO (7-hydroxy-9H-(9,9-diméthylacridin-2-one) et DDAO (7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one). Les valeurs de brillance restent cependant faibles. De plus, la fluorescence de DAO (et son analogue dichloré DDAO) est fortement influencée par les thiols biologiques ce qui peut s'avérer délétère pour des applications *in vivo*.¹⁵² Une sonde basée sur un fluorophore de type DDAO a été utilisée par le groupe

¹⁵¹ Hilderbrand, S. A. and Weissleder, R., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 25, 4383.

¹⁵² Richard, J.-A., Meyer, Y., Jolivel, V. r., Massonneau, M., Dumeunier, R. l., Vaudry, D., Vaudry, H., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 8, 1707.

de M. Goeldner pour des applications d'imagerie *in cellulo*,¹⁵³ et au sein de la collaboration entre le laboratoire et l'entreprise QUIDD (cf. 2.2).

De nouvelles structures intéressantes ont été développées par le groupe de R. Weissleder et pourraient présenter des applications pour l'imagerie *in vivo*.¹⁵¹ Nous pouvons aussi citer les travaux sur le fluorophore HPQ (2-hydroxyaryl 4-(3H)-quinazolinone) et ses dérivés, initialement développés par Molecular Probes® (Invitrogen).¹⁵⁴ Ces composés connaissent actuellement un regain d'intérêt pour des applications en imagerie de la part notamment du groupe de J. Hasserodt.^{155,156,157} Ils fonctionnent cependant un peu différemment puisqu'ils sont complètement insolubles et non fluorescents à l'état liquide et deviennent fluorescents en précipitant.

Dans ce contexte, il est donc indispensable de développer de nouveaux fluorophores à phénol émettant dans le rouge ou dans le meilleur des cas dans le proche infrarouge. Le laboratoire et la société QUIDD se sont donc penchés sur ce problème depuis plusieurs années. Les hybrides coumarine-hémicyanines présentés précédemment en sont un exemple.¹⁵⁸ Nous avons choisi pour notre étude de continuer à travailler avec des structures à base de 7-hydroxycoumarine (ou Ombélliférone).

¹⁵³ Warther, D., Bolze, F., Léonard, J., Gug, S., Specht, A., Puliti, D., Sun, X.-H., Kessler, P., Lutz, Y., Vonesch, J.-L., Winsor, B., Nicoud, J.-F. and Goeldner, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 8, 2585.

¹⁵⁴ Naleway, J. J., Fox, C. M. J., Robinhold, D., Terpetschnig, E., Olson, N. A. and Haugland, R. P., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 46, 8569.

¹⁵⁵ Waibel, M. and Hasserodt, J., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 23, 2767.

¹⁵⁶ Zhang, X.-b., Waibel, M. and Hasserodt, J., *Chem. Eur. J.*, **2010**, 3, 792.

¹⁵⁷ Aw, J., Shao, Q., Yang, Y., Jiang, T., Ang, C. and Xing, B., *Chemistry – An Asian Journal*, **2010**, 6, 1317.

¹⁵⁸ Richard, J.-A., Massonneau, M., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Lett.*, **2008**, 19, 4175.

2 Exemples de sondes pro-fluorescentes pour la détection de la caspase-3

2.1. Revue de la littérature et sondes commerciales

Comme nous l'avons vu précédemment, la détection de caspase-3 représente un objectif majeur dans la compréhension de mécanismes biologiques tel que l'apoptose. La caspase-3 a l'avantage de reconnaître une courte séquence peptidique (DEVD) ce qui facilite la synthèse de sondes à grandes échelles. De plus elle est très tolérante du côté C-terminal, donc il est possible de greffer une entité autre qu'un acide aminé. Les sondes pour la détection de la caspase-3 sont par conséquent majoritairement des sondes pro-fluorescentes.

Une des premières sondes décrites pour la détection de la caspase-3 utilisent la 7-amino-4-trifluorométhylcoumarine comme fluorophore (Figure 2 - 10).¹⁵⁹

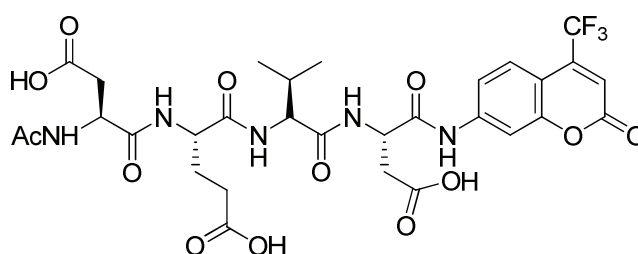


Figure 2 - 10 : Sonde pro-fluorescente pour la détection de la caspase-3 (Gurtu *et al*)¹⁵⁹

Cette sonde fonctionne très bien mais émet dans le bleu (vers 450 nm) ce qui la limite à une utilisation *in vitro* voire *in cellulo*.

Les sondes commerciales destinées à détecter la caspase-3 dans des contextes biologiques plus ambitieux (principalement *in cellulo*) utilisent Rh 110 ou des dérivés des benzophénoxazines (crésyl violet par exemple). Nous pouvons citer notamment la sonde Apo-ONE®, constituée de deux peptides de reconnaissance DEVD de part et d'autre de la rhodamine (Figure 2 - 11).¹⁶⁰

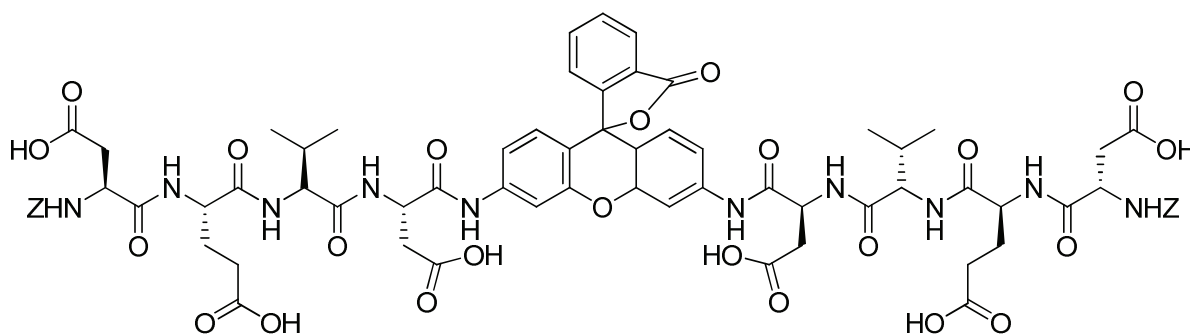


Figure 2 - 11 : Sonde commerciale Apo-ONE®

¹⁵⁹ Gurtu, V., Kain, S. R. and Zhang, G., *Anal. Biochem.*, **1997**, *1*, 98.

¹⁶⁰ Jixiang, L., Bhalgat, M., Zhang, C., Zhenjun, D., Hoyland, B. and Klaubert, D. H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *22*, 3231.

Cette sonde possède six fonctions acide carboxylique, ce qui lui confère un caractère très hydrophile bénéfique pour sa formulation mais délétère pour le franchissement des membranes cellulaires.

Une solution partielle a été apportée à ce problème avec la sonde commerciale Magic Red® qui utilise le crésyl violet comme aniline fluorescente. Il s'agit en fait d'une « pro-sonde » car les fonctions acide carboxylique sont protégées sous forme d'esters méthyliques. La sonde peut ainsi rentrer dans les cellules ; les estérases cellulaires hydrolysent alors ces esters méthyliques, et le caractère hydrophile dévoilé permet la rétention de la sonde. Cette dernière peut alors être activée par la caspase-3 *in cellulo* (Figure 2 - 12).¹⁶¹ Etant donné que le crésyl violet émet dans le proche infrarouge, la Magic Red® est la première sonde commerciale émettant dans cette gamme spectrale.

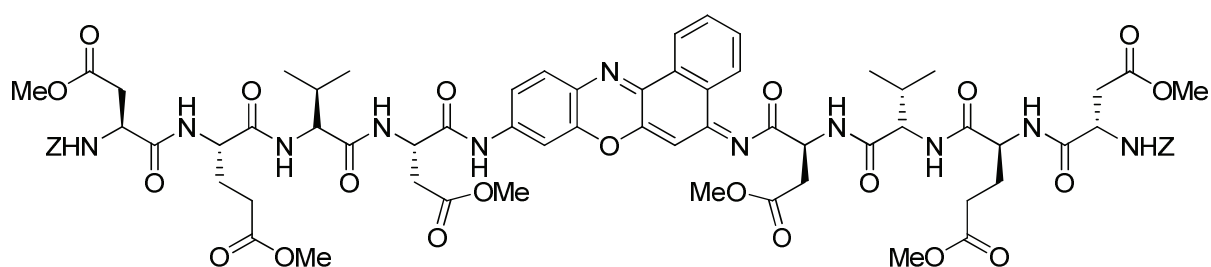


Figure 2 - 12 : Sonde commerciale Magic Red®

En revanche, cette sonde a l'inconvénient d'être totalement insoluble en milieu aqueux en raison du caractère fortement hydrophobe du crésyl violet. Si des analogues hydrosolubles du crésyl violet ont été synthétisés pour pallier ce problème (*vide supra*), ceci limite fortement ses applications dans les contextes biologiques, et, *de facto*, peu d'applications biologiques de Magic Red® ou ses dérivés n'ont été décrites dans la littérature.

¹⁶¹ Lee, B. W., Johnson, G. L., Hed, S. A., Darzynkiewicz, Z., Talhouk, J. W. and Mehrotra, S., *BioTechniques*, **2003**, 5, 1080.

2.2. Sondes pro-fluorescentes précédemment développées au laboratoire.

C'est dans ce contexte qu'il a été développé au sein de notre laboratoire des sondes pour la détection de la caspase-3. Comme vu précédemment, ces sondes sont basées sur des pro-fluorophores à phénol. Une première sonde témoin utilisant la 7-hydroxycoumarine comme marqueur fluorescent a été synthétisée afin de valider la stratégie choisie qui implique l'utilisation d'un bras espaceur réactif (PABA pour Para Amino Benzyl Alcool). Elle n'est pas utilisable dans un contexte *in vivo* puisque sa longueur d'onde d'émission est située dans le visible, vers 460 nm (Figure 2 - 13).¹⁶²

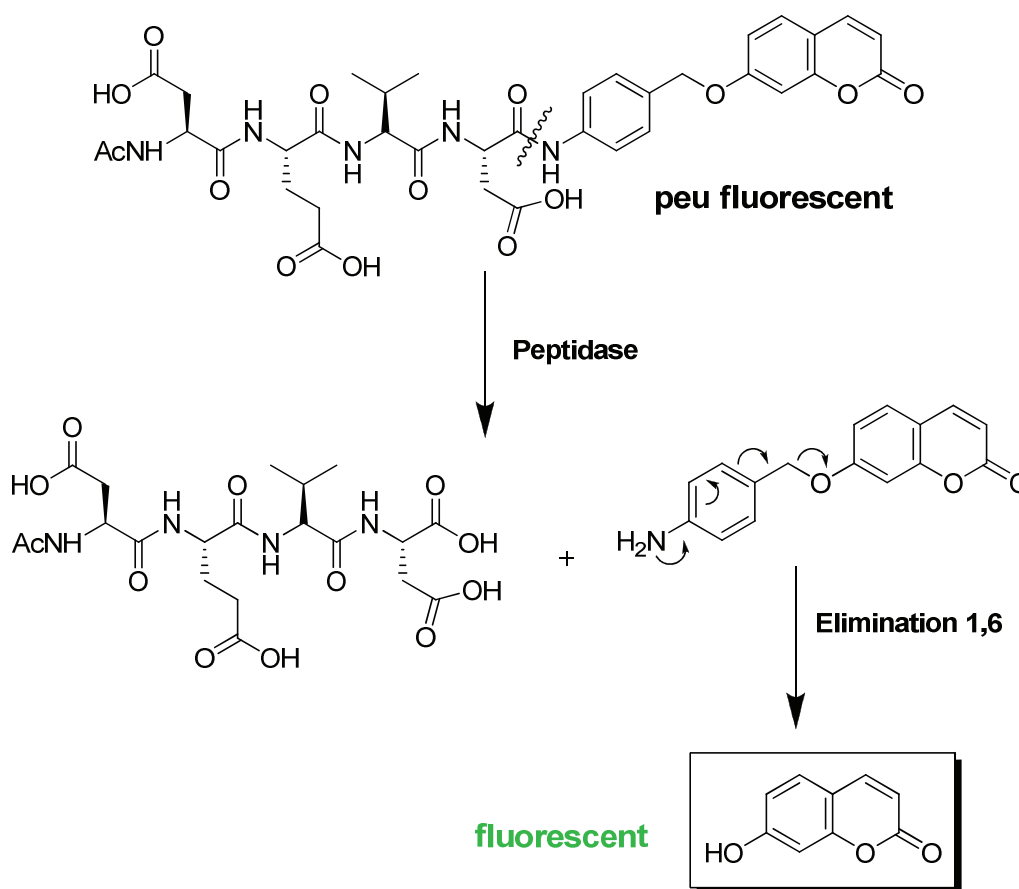


Figure 2 - 13 : 1^{ère} sonde pro-fluorescente pour la détection de la caspase-3 développée au laboratoire et mécanisme de décomposition du bras auto-immolable

Dans un deuxième temps, une sonde pro-fluorescente émettant dans le proche infrarouge a été synthétisée. Elle utilise le fluorophore DAO (*vide supra*) et a fait l'objet d'une publication.¹⁶³

¹⁶² Thèse de Jean-Alexandre Richard (Financement QUIDD- région Haute-Normandie 2005-2008)

¹⁶³ Richard, J.-A., Meyer, Y., Jolivel, V. r., Massonneau, M., Dumeunier, R. I., Vaudry, D., Vaudry, H., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 8, 1707.

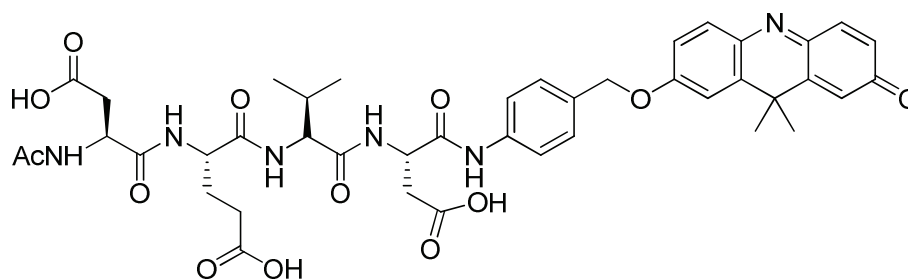


Figure 2 - 14 : Sonde pro-fluorescente pour la détection de la caspase-3 et émettant dans le proche infrarouge¹⁶³

Cette sonde présente l'inconvénient d'être réactive vis-à-vis des thiols, donnant pour résultat une extinction partielle de la fluorescence de DAO. Cette réactivité limite donc les applications de la sonde dans un contexte *in vivo*, en raison des nombreux thiols présents dans les milieux biologiques (cystéine, glutathion, ...).

Afin de pallier ce problème, le fluorophore DDAO a été utilisé à la place de DAO. En effet, contrairement à ce dernier, DDAO ne présente pas une sensibilité aux thiols aussi marquée. Des résultats récents de la littérature ont montré que son utilisation en imagerie cellulaire était possible (*vide supra*).¹⁵³ Seulement, l'utilisation du bras réactif PABA ne fonctionne pas car DDAO est un très bon groupe partant. Ainsi, le lien éther unissant le PABA à ce fluorophore est peu stable et la sonde s'hydrolyse rapidement en milieu aqueux à pH physiologique. Ceci conduit à un niveau basal de fluorescence élevé totalement rédhibitoire pour la détection d'une activité enzymatique.

Un bras réactif de structure plus complexe et plus stable en milieu physiologique a donc été développé. Il entre dans la composition de la sonde YM 355 (Figure 2 - 15).¹⁶⁴

¹⁶⁴ Thèse d'Yves Meyer (Financement QUIDD-CNRS – 2007-2010)

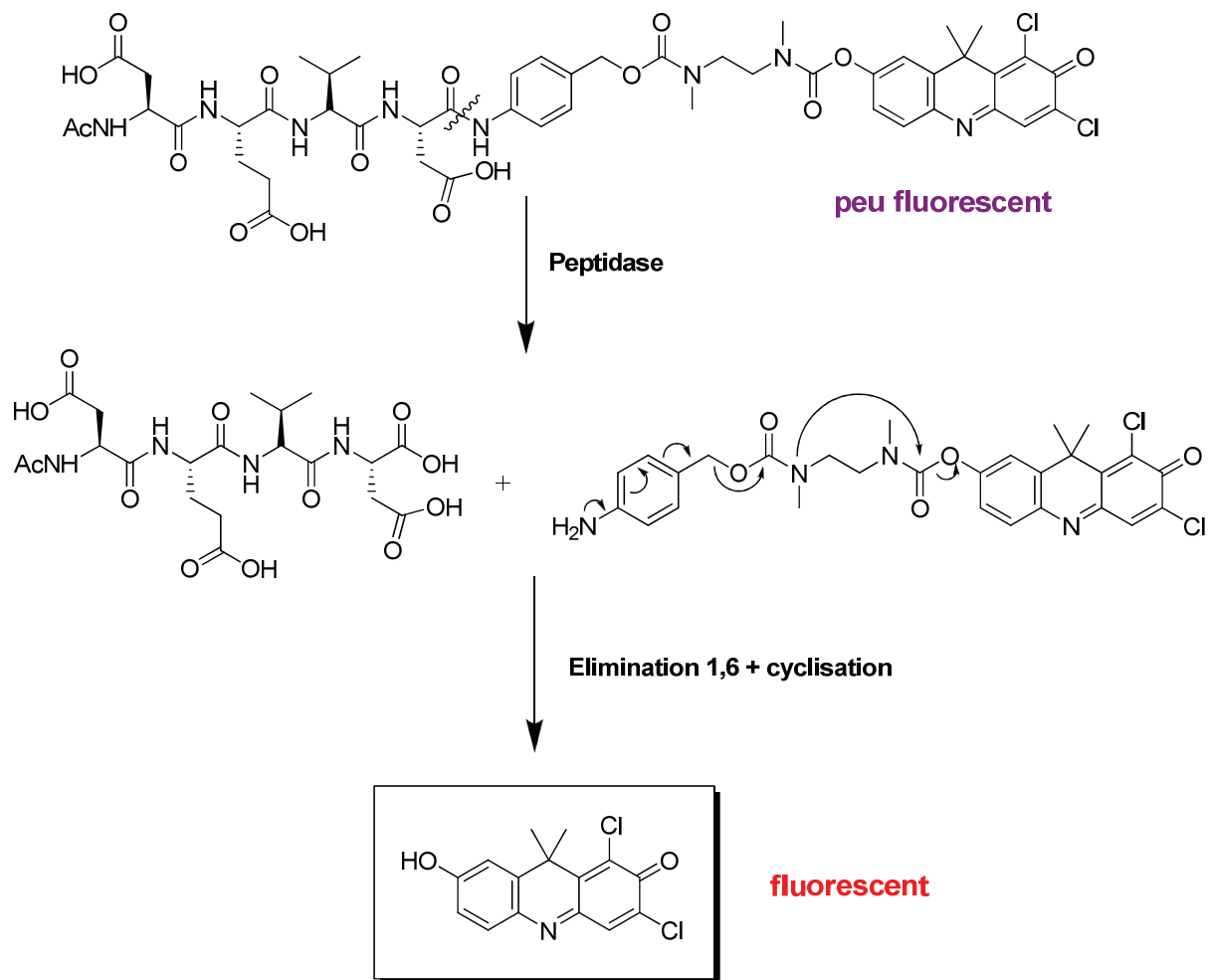


Figure 2 - 15 : Sonde pro-fluorescente YM 355 pour la détection de la caspase-3 *in cellulo* et/ou *in vivo* et mécanisme de fragmentation du bras auto-immolable

Cette sonde a été testée *in vitro*. Elle donne de bons résultats en termes d'activation enzymatique par la caspase-3 recombinante et présente une très bonne stabilité en milieu physiologique. Les tests *in vivo* d'YM 355 sont actuellement en cours d'analyse. Même s'il est impossible de préjuger des résultats des expériences de validation biologique actuellement en cours, nous pouvons penser que cette sonde pourrait constituer une alternative potentielle et crédible à Magic Red® avec de meilleures propriétés physico-chimiques.

II. Synthèse de pro-fluorophores à phénol de type bis-coumarine

1 Travaux antérieurs

Nous avons vu dans le premier chapitre que le laboratoire travaillait depuis plusieurs années sur la synthèse de nouveaux pro-fluorophores dérivés de la 7-hydroxycoumarine. Les structures précédemment synthétisées¹⁶⁵ (voir chapitre 1) sont un premier pas vers l'obtention de fluorophores émettant dans le rouge voir le proche infrarouge. Elles possèdent de bonnes propriétés physico-chimiques (solubilité dans l'eau, absence de réactivité vis-à-vis des thiols biologiques), un large déplacement de Stokes et peuvent être utilisées pour des applications *in vivo*. Cependant, les rendements quantiques de ces hybrides sont faibles en milieu physiologique (de 0,7 à 2,7 %), ce qui conduit à des valeurs de brillance faibles (de 160 à 1800) à priori peu compatible avec les exigences du *in vivo*. Ce paramètre est cependant à nuancer car le groupe de R. Weissleder a réussi à réaliser de l'imagerie *in vivo* dans le cas de la détection d'activité myéloperoxydase, avec un fluorophore à phénol possédant un rendement quantique de seulement 3%.¹⁶⁶ Les faibles valeurs de rendement quantique de nos hybrides pourraient être dues à la trop grande flexibilité de la chaîne polyméthine, unissant la coumarine à l'hétérocycle azoté (Figure 2 - 16).

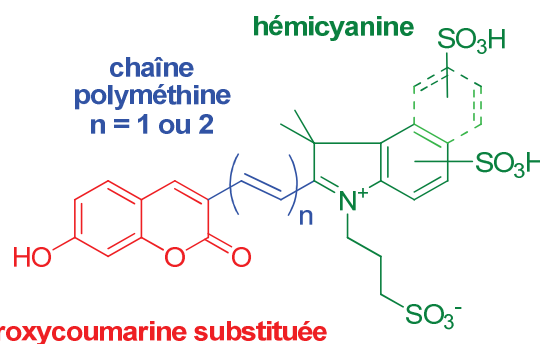


Figure 2 - 16 : Structure des fluorophores précédemment synthétisés

Nous souhaitons conserver la structure de la 7-hydroxycoumarine car elle possède des propriétés spectrales intéressantes qu'il serait pertinent de conserver au sein d'architectures hybrides plus complexes : un déplacement de Stokes important de l'ordre d'une centaine de nanomètres, un rendement quantique élevé en milieu physiologique, une fonctionnalisation possible par substitution de ses positions 3 et 4 en particulier, pour notamment étendre la conjugaison. De plus, ces propriétés de pro-fluorescence bien connues en font le fluorophore de choix pour la synthèse de sondes pro-fluorescentes.^{144,167,168}

¹⁶⁵ Thèse de Jean-Alexandre Richard

¹⁶⁶ Shepherd, J., Hilderbrand, S. A., Waterman, P., Heinecke, J. W., Weissleder, R. and Libby, P., *Chem. Biol.*, **2007**, *11*, 1221.

¹⁶⁷ Goddard, J.-P. and Reymond, J.-L., *Trends Biotechnol.*, **2004**, *7*, 363.

¹⁶⁸ Goddard, J.-P. and Reymond, J.-L., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2004**, *4*, 314.

L'inconvénient des coumarines reste leur gamme spectrale d'utilisation, située dans l'UV-visible (350/450 nm). Cette gamme doit donc être étendue au rouge voire au proche infrarouge (au-delà de 650 nm). La stratégie choisie consiste à étendre la délocalisation électronique en profitant d'un effet « push-pull » sur la coumarine. Le groupement 7-hydroxyle serait le donneur d'électrons et l'accepteur d'électrons serait constitué par le motif lactone. Nous nous sommes donc tout naturellement tournés vers des structures de type bis-coumarine.

Par une approche de type convergente, nous avons décidé de synthétiser l'intermédiaire clé 3-éthynyl-7-hydroxycoumarine **1**, qui pourra ensuite être couplé à une autre coumarine convenablement substituée. Ainsi nous prévoyons de lier les deux unités coumarine soit par une triple liaison carbone-carbone, soit par une double liaison ou encore par un cycle triazole issu d'une réaction de cycloaddition de type Huisgen (Figure 2 - 17).¹⁶⁹

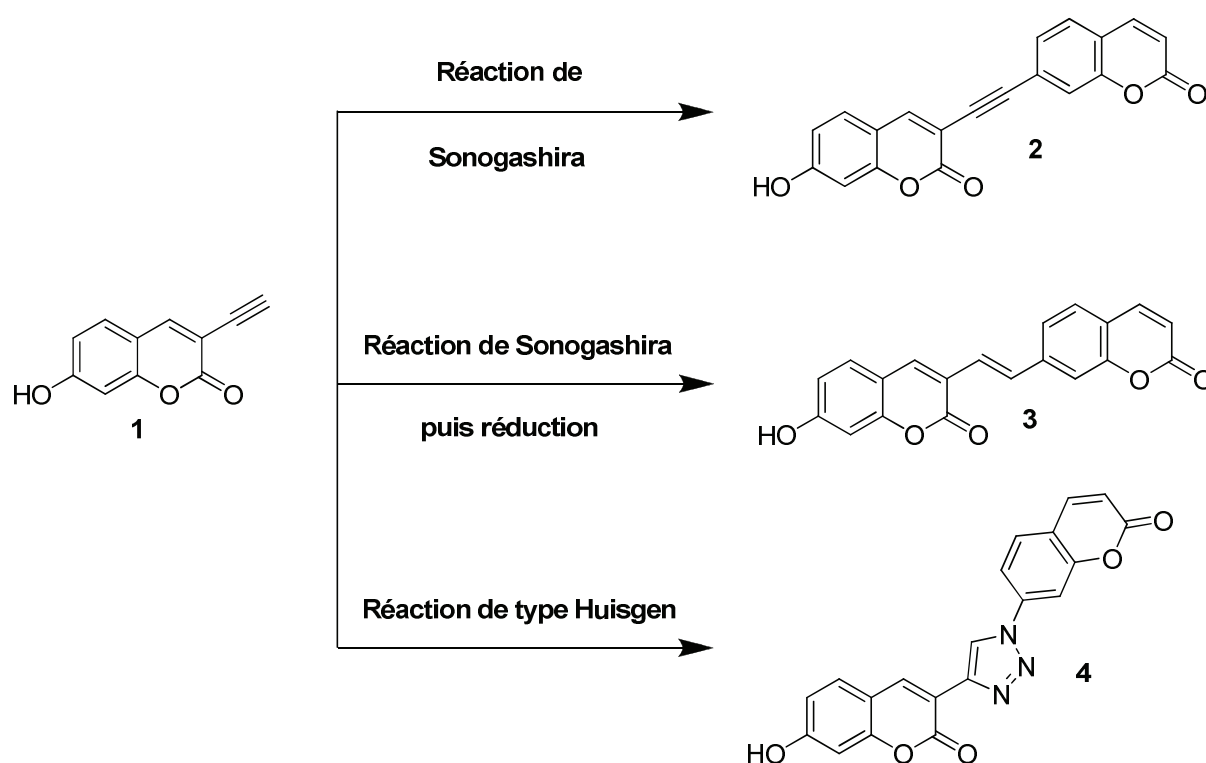


Figure 2 - 17 : Plan de synthèse convergente pour l'obtention de nouveaux pro-fluorophores à phénol à structure bis-coumarine

Nous espérons ainsi obtenir le fluorophore **2** par une réaction de Sonogashira,¹⁷⁰ et le fluorophore **3** par la même réaction de Sonogashira suivie d'une réduction de la triple liaison en double. Si cette voie d'obtention du fluorophore **3** n'aboutit pas, nous pourrions opter pour une stratégie de type Wittig. L'idée de synthétiser le fluorophore **3** provient d'un brevet de l'entreprise SANDOZ (de 1981)

¹⁶⁹ Bräse, S., Gil, C., Knepper, K. and Zimmermann, V., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 33, 5188.

¹⁷⁰ Chinchilla, R. and Najera, C., *Chem. Rev.*, **2007**, 3, 874.

faisant état de ce type de composés dimériques (mais avec un lien entre les deux coumarines situé sur d'autres positions). La couleur des produits décrits (bleu-violet) dans ce brevet suggérait une délocalisation complète du système π sur l'ensemble de la structure.¹⁷¹ Nous espérons, par l'obtention du fluorophore **4**, évaluer la bonne délocalisation des électrons à travers le cycle triazole. Ceci permettrait d'obtenir d'autres hybrides et une famille de fluorophores « clickés ». Plusieurs exemples de ces fluorophores existent dans la littérature.^{172,173,174} La figure suivante (Figure 2 - 18) présente deux exemples de nouveaux fluorophores « clickés ».

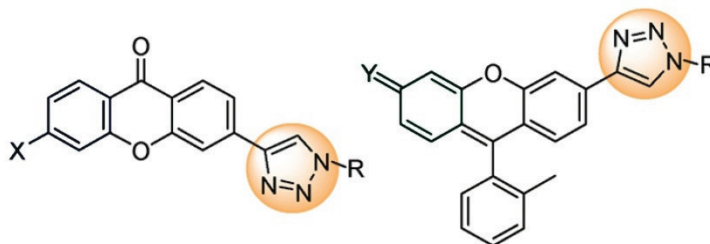


Figure 2 - 18 : Exemples de fluorophores « clickés »¹⁷²

Les fluorophores que nous souhaitons synthétiser, aux propriétés physico-chimiques non optimisées (notamment la solubilité dans l'eau), permettraient d'ouvrir la voie à une nouvelle classe de phénols fluorescents émettant dans le rouge.

¹⁷¹ Fleck, F. (SANDOZ SA). Nouveaux dérivés de la 7-vinyl-coumarine utilisables comme azurants optiques et leur préparation, FR 8118579, 1981

¹⁷² Li, J., Hu, M. and Yao, S. Q., *Org. Lett.*, **2009**, *14*, 3008.

¹⁷³ Key, J. A., Koh, S., Timerghazin, Q. K., Brown, A. and Cairo, C. W., *Dyes Pigm.*, **2009**, *2*, 196.

¹⁷⁴ Du Y, L., Ni Y, N., Li, M. and Wang, B., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *8*, 1152.

2 Synthèse et évaluation de pro-fluorophores coumarine-coumarine

2.1. Synthèse

Nous avons choisi un méthyle comme groupement protecteur du phénol de la coumarine en raison de sa grande stabilité dans différentes conditions (acides, basiques, réductrices), et de la disponibilité du produit de départ, le 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde **5**. Nous aborderons tout d'abord la synthèse de l'intermédiaire clé **6**, la 3-éthynyl-7-méthoxycoumarine en 5 étapes puis son utilisation dans la synthèse des nouveaux fluorophores ciblés.

2.1.1 Synthèse de l'intermédiaire clé

La 3-hydroxy-7-méthoxycoumarine **7** a été obtenue par condensation de la *N*-acétylglycine **8** commerciale sur le dérivé benzaldéhyde **5**. Nous nous sommes inspirés pour cela d'une publication de Pavé *et al*¹⁷⁵ où la synthèse de pyridocoumarines est décrite. Les deux réactifs sont mis en présence d'acétate de potassium et d'anhydride acétique et chauffés à reflux pendant 14 h. La 3-acétamido-7-méthoxycoumarine **9** intermédiaire est récupérée par précipitation et directement engagée dans une étape d'hydrolyse acide à reflux d'une solution molaire d'acide chlorhydrique. Le rendement reste faible sur deux étapes (22%) mais conforme à celui de la littérature. Il dépend de manière importante des substituants portés par la coumarine (Figure 2 - 19).

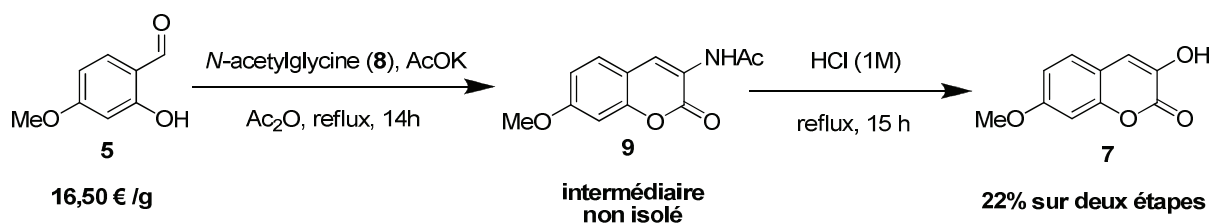


Figure 2 - 19 : Synthèse de la 3-hydroxy-7-méthoxycoumarine **7**

La première étape est une réaction de Perkin suivie par une lactonisation, facilitée par l'obtention du système aromatique. Le faible rendement (22%) s'explique d'une part par l'utilisation de conditions dures de réactions (reflux, etc) et d'autre part par la récupération du produit par précipitation. Nous avons pu obtenir un produit à haut degré de pureté mais avec des pertes de matériel importantes.

La coumarine éthynylrique **6** est ensuite obtenue en trois étapes. Le phénol **7** est préalablement activé en son dérivé triflate **10** de manière quasi-quantitative (91%) par traitement avec l'anhydride triflique et la pyridine dans le dichlorométhane anhydre. Puis la réaction de Sonogashira est réalisée au moyen du triméthylsilylacétylène et de l'acétate de palladium(II). Le rendement correct de cette réaction (74%) permet ensuite d'engager l'intermédiaire obtenu dans la réaction de déprotection du groupement triméthylsilyle dans les conditions classiques (K₂CO₃ dans le méthanol). Du

¹⁷⁵ Pavé, G., Chalard, P., Viaud-Massuard, M.-C., Troin, Y. and Guillaumet, G. r., *Synlett*, **2003**, 07, 0987.

dichlorométhane a été ajouté à la réaction afin de faciliter la solubilité et donc d'accélérer la réaction. L'intermédiaire clé **6** est obtenu avec un rendement quantitatif (Figure 2 - 20).

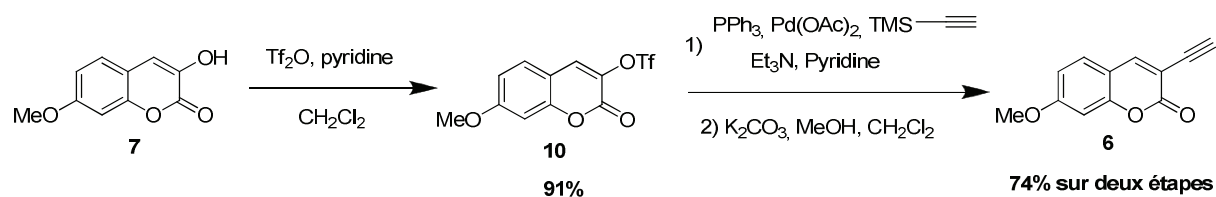


Figure 2 - 20 : Synthèse de l'intermédiaire clé **6**

Malgré les rendements faibles des deux premières étapes conduisant au composé **7**, l'intermédiaire clé **6** a pu être obtenu à l'échelle du gramme.

2.1.2 Essais de synthèse de l'hybride contenant un motif triazole

Nous avons choisi de faire des premiers essais pour obtenir l'hybride comportant un motif triazole. Une coumarine hydrosoluble comportant un groupement azido en position 7 était disponible au laboratoire,^{176,177} ce qui nous permettait de réaliser une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de type Huisgen (Figure 2 - 21). Quelques conditions de réactions ont été testées et sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 - 2).

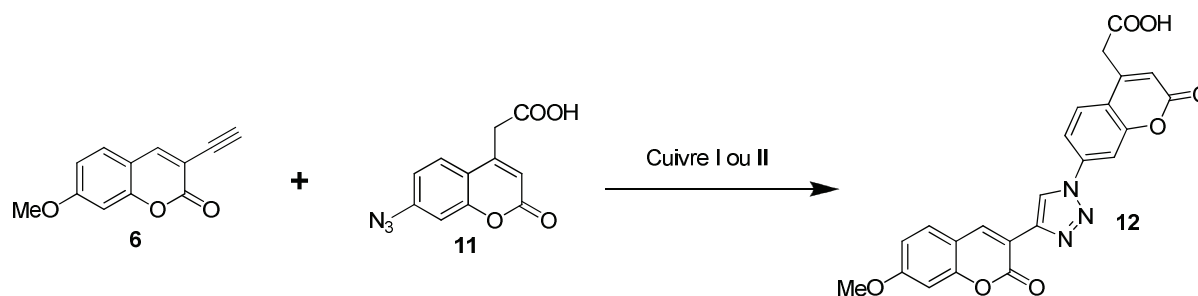


Figure 2 - 21 : Essais d'une cycloaddition de type Huisgen

Entrée	Source de cuivre	Réducteur	Solvants	Résultats
1	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	Ascorbate de sodium	EtOH / H ₂ O (1:1 v/v)	Produits de départ
2	CuI	-	EtOH / CH ₂ Cl ₂ (2:1,5 v/v)	Produits de départ
3	CuSO ₄ , 5 H ₂ O	Ascorbate de sodium	CH ₂ Cl ₂ / H ₂ O (1:1 v/v)	Produits de départ

Tableau 2 - 2 : Essais de cycloaddition de type Huisgen (température ambiante, réactif équimolaire)

Deux sources de cuivre ont été testées (entrée 1 et 2) mais n'ont pas donné de résultat. Nous pensons que le manque de réactivité pouvait être lié à des problèmes de solubilité. Toutefois, l'utilisation d'un mélange de solvants différent (entrée 3) n'a pas permis d'obtenir un meilleur

¹⁷⁶ Thèse de Ludivine Louise, Université de Rouen, soutenue le 17 décembre 2007

¹⁷⁷ Paunescu, E., Louise, L., Jean, L., Romieu, A. and Renard, P.-Y., *Dyes Pigm.*, **2011**, 3, 427.

résultat. Ces conditions de réaction ne nous ont pas permis de récupérer de produit de cycloaddition. Ceci peut en partie s'expliquer par la faible réactivité de la triple liaison de la coumarine **6** et par l'instabilité de la coumarine **11**.¹⁷⁷ Les essais sur cette synthèse n'ont pas été poursuivis car nous avons préféré privilégier la synthèse des autres pro-fluorophores présentés plus haut. En effet, la cycloaddition [3 + 2] de type Huisgen nous paraissait la voie la plus incertaine pour obtenir un nouveau fluorophore émettant dans le proche infrarouge en raison de la possible non-délocalisation des électrons à travers le cycle triazole. De plus, une publication de Key *et al*.¹⁷⁸ confirma plus tard qu'un cycle triazole ne permet pas d'étendre la délocalisation électronique et donc d'obtenir un déplacement bathochrome significatif de l'absorption et de l'émission de la coumarine.

2.1.3 Synthèse du pro-fluorophore **2**

Nous avons donc concentré nos efforts sur la synthèse de la bis-coumarine **15** présentant un lien de type triple liaison carbone-carbone. La 7-hydroxycoumarine commerciale (ou ombélliférone) **13** a donc été activée en dérivé triflate au moyen de l'anhydride triflique, avec un rendement quantitatif, pour fournir la coumarine **14** en grandes quantités (échelle de plusieurs grammes).

Des conditions standard de réaction de Sonogashira ont été utilisées afin de coupler la coumarine éthylique **6** avec la coumarine activée **14**. Le catalyseur employé est de l'acétate de palladium (II) et le réducteur est la triphénylphosphine (Figure 2 - 22).

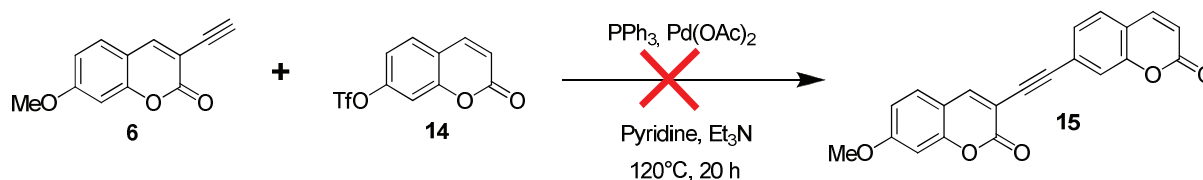


Figure 2 - 22 : Essais de couplage via une réaction de Sonogashira

La réaction n'a pas fourni le produit de couplage désiré **15**. Cependant, nous avons pu isoler quelques milligrammes d'un produit que nous avons pu identifier (notamment *via* des analyses de masse électrospray) comme étant un dérivé métallé (bis-palladié) du produit souhaité. Ce produit ayant été purifié sur gel de silice, il est surprenant de constater qu'un tel complexe métallique stable se soit formé. La distribution isotopique bien particulière du palladium confirme néanmoins la présence de ces deux atomes. Les faibles quantités de produit obtenues combinées à sa solubilité médiocre dans la plupart des solvants d'analyse à notre disposition, ne nous ont pas permis d'obtenir une caractérisation univoque de sa structure, notamment par RMN. Ces analyses doivent donc être réalisées afin de savoir si ce composé est un simple adduit de palladium formé dans la source ESI du spectromètre de masse ou s'il est réellement un complexe métallique stable et isolable. Il est

¹⁷⁸ Key, J. A., Koh, S., Timerghazin, Q. K., Brown, A. and Cairo, C. W., *Dyes Pigm.*, **2009**, 2, 196.

intéressant de noter que la quantité de produit récupéré correspond plus ou moins à la quantité attendue pour ce complexe si l'on considère la source de palladium (II) comme le réactif limitant de cette réaction (Figure 2 - 23).

ESI / positive mode

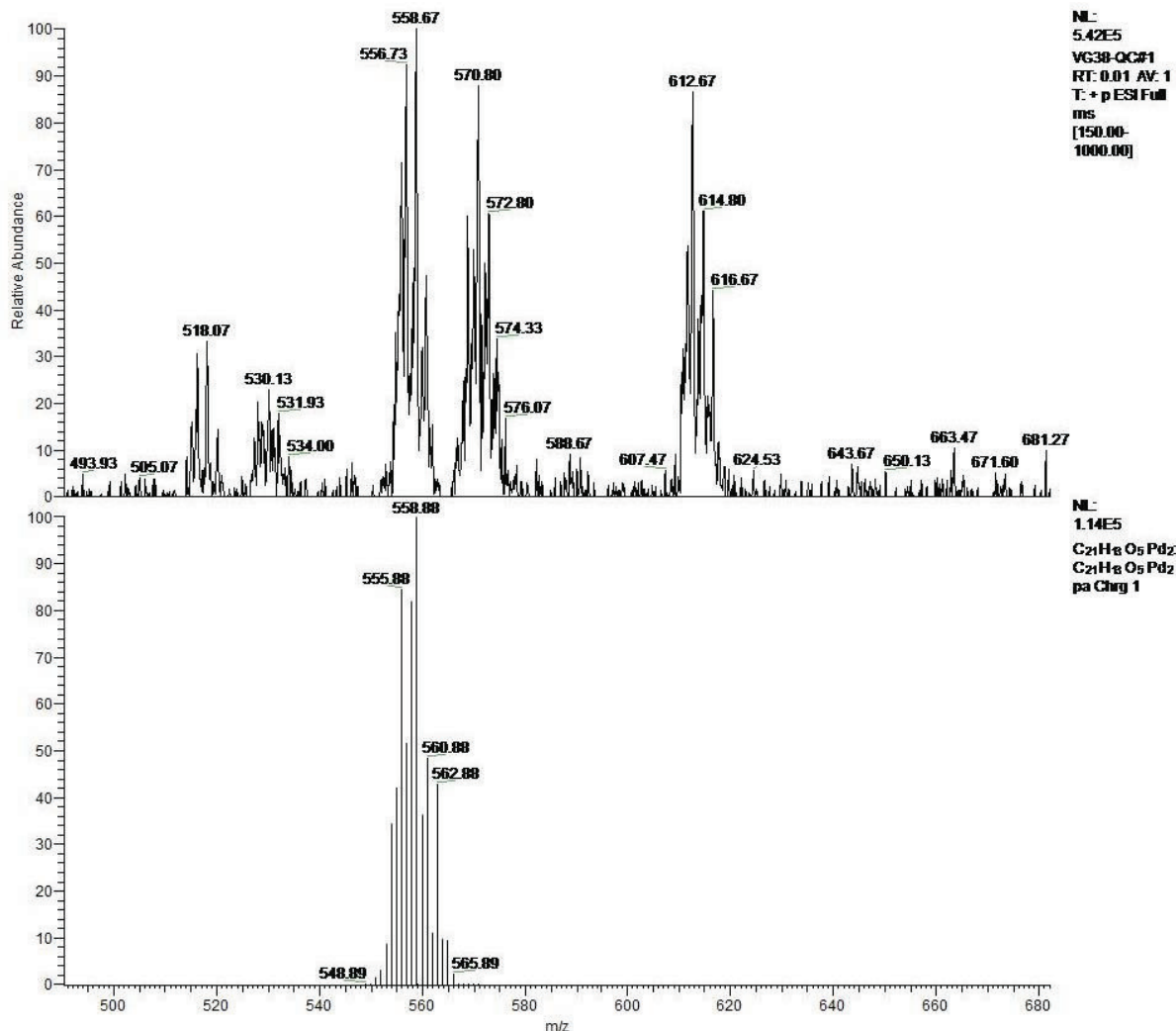


Figure 2 - 23 : Spectre de masse et spectre simulé du composé bis-palladié obtenu (ESI+)

Devant cette impasse, nous avons décidé de modifier le schéma réactionnel afin d'inverser les partenaires impliqués dans la réaction de Sonogashira. Ainsi, d'un coté nous aurons le dérivé triflate **10** précédemment synthétisé (cf. Figure 2 - 20), de l'autre la 7-éthynylcoumarine **16** obtenue en deux étapes à partir de la coumarine 7-*O*-triflate **14** (Figure 2 - 24).

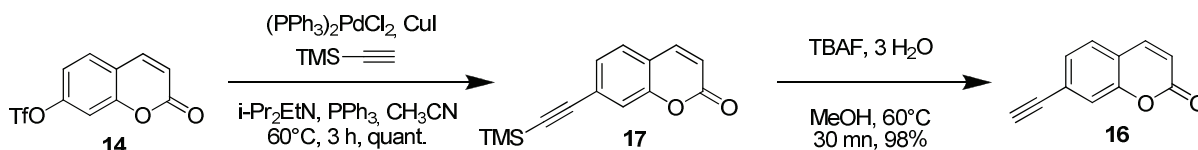


Figure 2 - 24 : Synthèse de la coumarine éthylique **16**

Les rendements sur ces deux étapes sont quasi-quantitatifs. Nous avons privilégié le dichlorure de palladium (II) bistriphénylphosphine comme source de palladium car ce complexe est plus efficace pour ce type de réaction, plus facile d'utilisation et stable à température ambiante.

Un essai de couplage a ensuite été testé entre la coumarine **16** et la coumarine **10**. Encore une fois, le catalyseur employé est de l'acétate de palladium (II) et le réducteur est la triphénylphosphine. Nous avons obtenu le même résultat que celui observé précédemment, c'est-à-dire, la formation en très faible quantité d'un adduit comportant deux atomes de palladium (Figure 2 - 25).

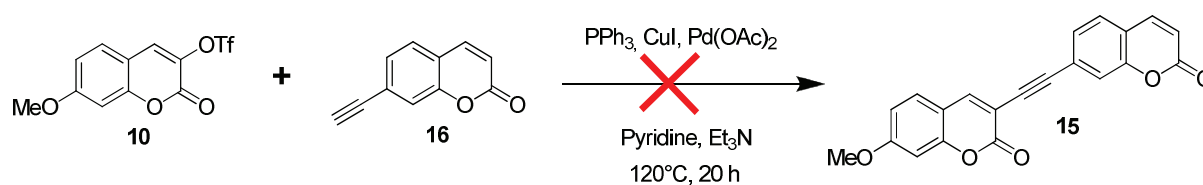


Figure 2 - 25 : Essais de couplage via une réaction de Sonogashira

Devant ce problème, nous avons décidé une nouvelle fois de modifier la stratégie de synthèse. Nous supposons que la réaction de couplage ne fonctionne pas à cause de la très faible réactivité des deux coumarines et de l'enrichissement en électrons de la triple liaison, qui conduit au piégeage des espèces palladiées présentes dans le milieu. En se fondant sur une publication de LeBras et al concernant une réaction de couplage de Sonogashira efficace entre une coumarine et un dérivé aryle portant une triple liaison carbone-carbone,¹⁷⁹ nous avons décidé d'appliquer cette stratégie à notre coumarine 7-O-triflate **10** et à un dérivé benzénique correctement substitué **18**. En effet, le pro-fluorophore bis-coumarine **15** pourrait être accessible *via* une réaction de Perkin (ou apparentée) sur le composé **19** issu de couplage Pd-catalysé, et ce afin de former le deuxième cœur coumarinique (Figure 2 - 26).

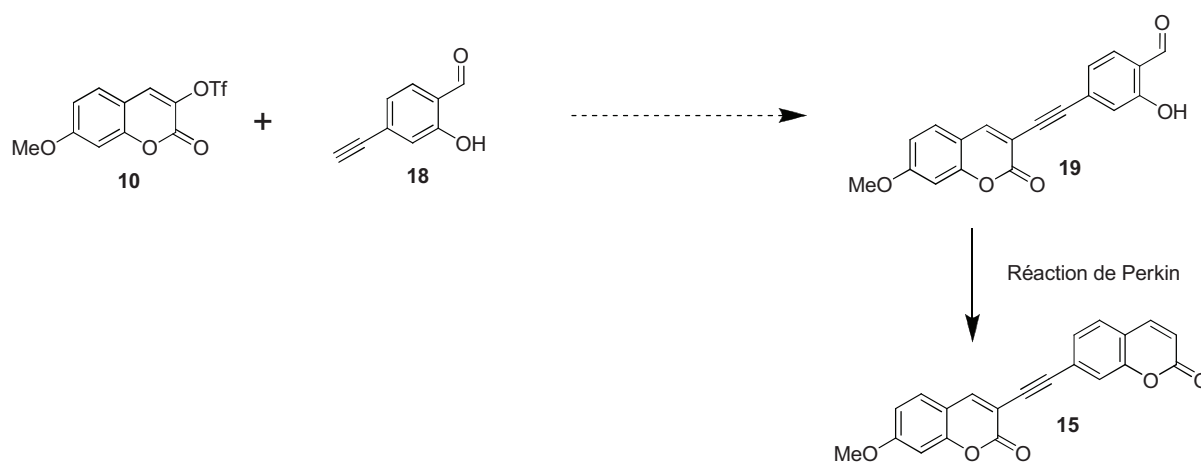


Figure 2 - 26 : Voie de synthèse envisagée pour l'obtention du motif bis-coumarine **15**

¹⁷⁹ Le Bras, G. I., Radanyi, C., Peyrat, J.-F. o., Brion, J.-D., Alami, M. d., Marsaud, V. r., Stella, B. and Renoir, J.-M., *J. Med. Chem.*, **2007**, *24*, 6189.

Pour synthétiser le composé **18**, nous sommes partis de l'acide 4-bromosalicylique **20** comme produit de départ (Figure 2 - 27). La première étape est la substitution de l'amine par un brome via une réaction de Sandmeyer pour former l'acide 4-bromosalicylique **21** avec un très bon rendement (95%). L'acide **21** est ensuite réduit en alcool **22** au moyen du AlLiH_4 , avec un rendement de 47%. Afin d'améliorer ce rendement, nous avons réalisé une estérification préalable de l'acide carboxylique du composé **21** pour donner l'intermédiaire **23**, avec un rendement de 53%. Nous espérons que la réduction de ce dernier en alcool nous permettrait d'optimiser les résultats. Le rendement de cette étape de réduction est meilleur (61%) mais combiné à celui de l'étape d'estérification, le rendement total est inférieur (32%) à la réaction de réduction réalisée dans un premier temps. Cette voie « d'optimisation » ne montre donc pas d'intérêt supplémentaire (Figure 2 - 27).

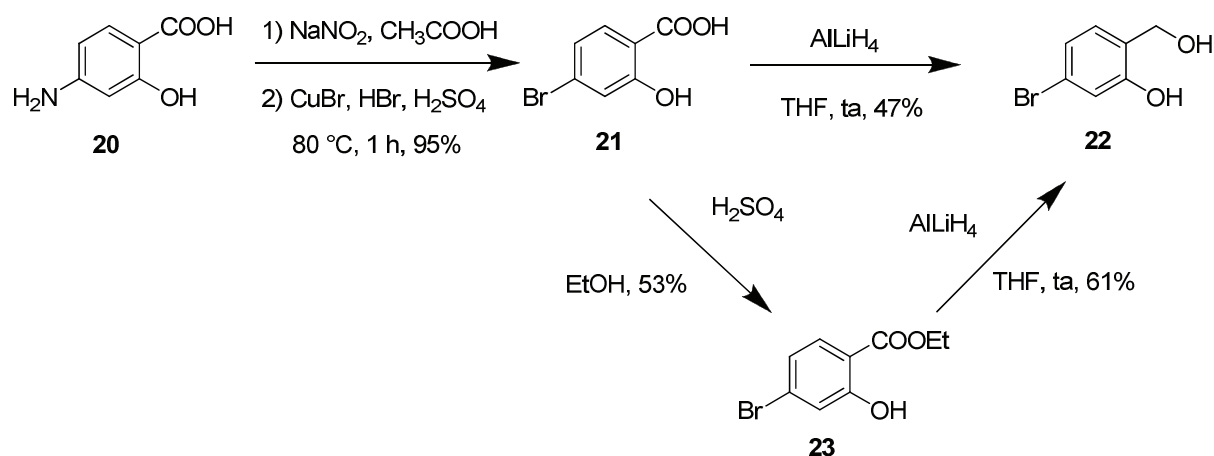


Figure 2 - 27 : Synthèse de l'alcool **22**

L'alcool benzylique **22** a ensuite été oxydé en présence d'IBX (acide 2-iodoxybenzoïque) pour fournir le benzaldéhyde **24** avec un rendement de 55%. Une réaction de Sonogashira a été réalisée sur ce produit et a permis d'obtenir le composé **25** avec un rendement faible de 35% (Figure 2 - 28).

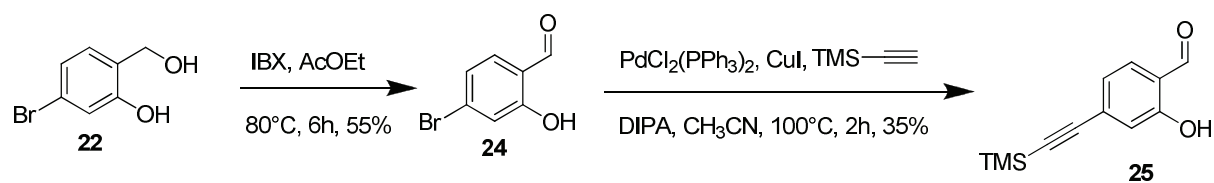


Figure 2 - 28 : Synthèse du dérivé benzaldéhyde **25**

La quantité de produit obtenue sur cette dernière étape n'étant pas assez importante (~10 mg), la synthèse n'a pas pu être finalisée. Devant les faibles rendements de cette voie de synthèse qui restent à optimiser et après la découverte de nouvelles conditions de couplage efficaces, cette synthèse a été abandonnée.

Ces conditions ont été mises au point avec le 4-iodophénol **26** et la coumarine substituée **16** facilement disponible en grandes quantités. Nous avons ainsi pu obtenir le fluorophore à phénol modèle **27** en utilisant les conditions suivantes : le palladium (II) bistriphénylphosphine, l'iodure de cuivre et de la triéthylamine, le tout dans le THF (Figure 2 - 29).¹⁸⁰ Le rendement est faible (32%) mais suffisant pour ensuite analyser les propriétés spectroscopiques du composé (*vide infra*).

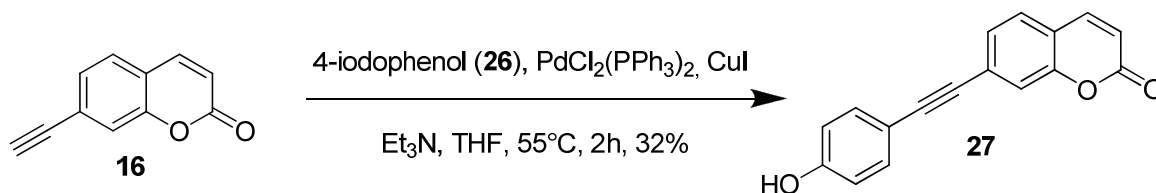


Figure 2 - 29 : Synthèse du fluorophore **27**

Fort de ce premier succès, nous avons ensuite appliqué cette méthodologie à la synthèse du fluorophore biscoumarine ciblé. La coumarine 7-*O*-triflate **10** a donc été couplée à la 7-éthynylcoumarine **16** dans des conditions identiques et le fluorophore **28** a été obtenu avec un rendement faible de 12% (Figure 2 - 30).

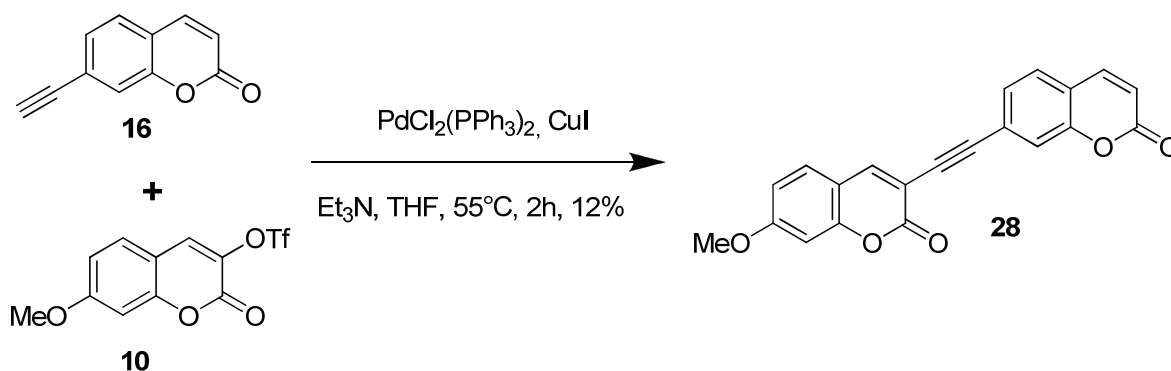


Figure 2 - 30 : Synthèse du fluorophore **28**

La source de palladium dans ce cas, n'est pas la même que dans les couplages précédents. Cela peut expliquer la différence de réactivité avec les essais effectués précédemment. Le composé **28** a ensuite été déprotégé au moyen du tribromure de bore dans le dichlorométhane anhydre. Le produit **2** a été obtenu avec un rendement également faible (12%). Ceci peut s'expliquer notamment par la petite échelle de synthèse (< 50 mg, 140 μmol) qui rend difficile un contrôle rigoureux des conditions anhydres du mélange réactionnel (Figure 2 - 31).

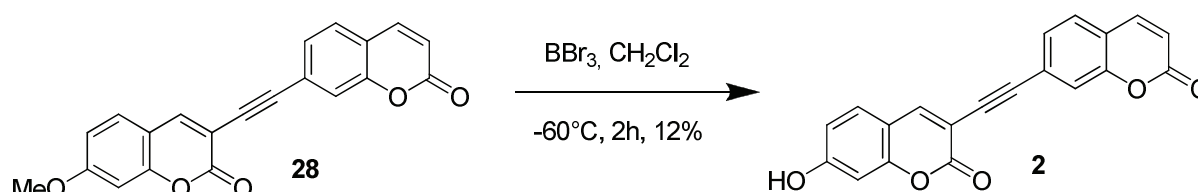


Figure 2 - 31 : Obtention du fluorophore final **2**

¹⁸⁰ Han, J., Jose, J., Mei, E. and Burgess, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *10*, 1684.

Pour conclure, nous sommes parvenus à la synthèse du pro-fluorophore **2**. Sa structure a été confirmée par RMN du proton et spectrométrie de masse. Les propriétés spectroscopiques ont ensuite pu être évaluées (*vide infra*). La voie de synthèse devra tout de même être optimisée.

2.1.4 Essais de synthèse du pro-fluorophore **3**

Pour obtenir le pro-fluorophore **3**, nous avons voulu réduire directement la triple liaison carbone-carbone en double liaison. Nous nous sommes fondés sur la publication d'Hayashi et al¹⁸¹ qui décrit une réduction de triple liaison au moyen de trichlorure d'indium(III). L'indium(III) est ensuite reformé *in situ* par réduction, au moyen d'un réducteur (Et_3SiH). Cette technique a été utilisée sur des substrats aliphatiques (Figure 2 - 32).



Figure 2 - 32 : Essais de réduction de la triple liaison carbone-carbone en double liaison

La réaction n'a cependant pas fonctionné et aucun produit n'a donc pu être récupéré. De plus, cette réaction n'a pas pu être optimisée en raison des quantités très faibles de produit de départ disponible (< 10 mg). Cette réaction implique un mécanisme radicalaire et la structure particulière de notre pro-fluorophore **2** ne facilite pas la formation univoque d'un seul intermédiaire radicalaire, du fait de la délocalisation possible des électrons sur d'autres parties de la molécule. Devant ce problème, nous avons préféré utiliser une voie de synthèse indépendante pour le pro-fluorophore **3** afin de pouvoir optimiser plus facilement la synthèse de ce composé.

La voie de synthèse choisie implique la formation de la double liaison carbone-carbone par une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE).¹⁸² Cette réaction consiste à faire réagir un carbanion stabilisé sous forme d'ylure de phosphonate avec un aldéhyde. Contrairement aux ylures de phosphore impliqués dans la réaction de Wittig, les carbanions sont plus nucléophiles et plus basiques ce qui facilite en général les réactions de couplage avec des aldéhydes peu réactifs.

L'idée était donc de synthétiser la coumarine phosphonate **30** et de la faire réagir sur la 3-formylcoumarine **29** pour obtenir *via* la réaction HWE le pro-fluorophore **31** (Figure 2 - 33).

¹⁸¹ Hayashi, N., Shibata, I. and Baba, A., *Org. Lett.*, **2004**, 26, 4981.

¹⁸² Boutagy, J. and Thomas, R., *Chem. Rev.*, **1974**, 1, 87.



Figure 2 - 33 : Réaction de Horner-Wadsworth-Emmons pour la synthèse du profluorophore 31

Nous avons donc synthétisé la coumarine **30** à partir de la 7-méthylcoumarine **32** en deux étapes. La première étape est une bromation radicalaire au moyen du *N*-bromosuccinimide en présence du peroxyde de benzoyle qui joue le rôle d'initiateur de réaction. La deuxième étape est une réaction d'Arbuzov classique entre la 7-(bromométhyl)coumarine **33** et la triéthylphosphite.¹⁸³ Les bons rendements obtenus sur les deux étapes (67% et 84%) nous ont permis de synthétiser facilement la coumarine substituée **30** à l'échelle du gramme (Figure 2 - 34).

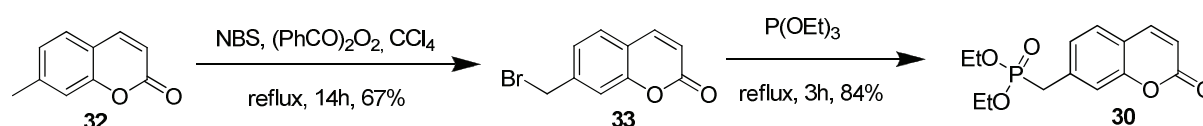


Figure 2 - 34 : Synthèse de la coumarine phosphonate 30

Nous avons choisi comme partenaire de la coumarine **30** pour la réaction HWE, la 3-formylcoumarine **34** qui a été précédemment synthétisée au laboratoire.¹⁸⁴ Des essais de réaction HWE ont été réalisés afin d'obtenir le pro-fluorophore **35** (Figure 2 - 35). Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau suivant (Tableau 2 - 3).

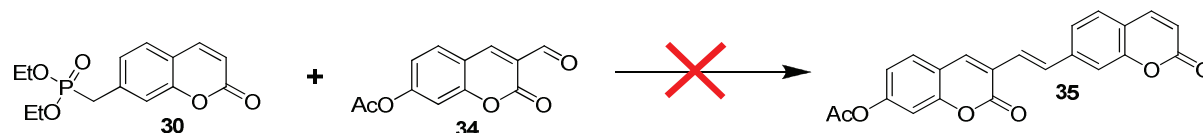


Figure 2 - 35 : Essais de synthèse du pro-fluorophore 35

Entrée	Base	Solvant	Résultats
1	NaH (1,2 equiv.)	THF	désacétylation de 34
2	NaH (1,05 equiv.)	THF	désacétylation de 34
3	Na métallique	DMF / MeOH (85:15, v/v)	désacétylation de 34

Tableau 2 - 3 : Essais de synthèse du composé 35 (60°C, 15h)

Ces différents tests n'ont pas permis de détecter (même en quantités minimales) et d'obtenir le produit désiré. La réaction se déroulant en présence d'hydruure de sodium, le groupement acétyle du phénol de la coumarine est déprotégé en premier avant même la déprotonation du phosphonate. Ainsi, la fonction aldéhyde de la coumarine **34** devient beaucoup moins réactive si le phénol est sous forme de phénolate car l'effet électro-donneur +M de ce substituant diminue fortement l'électrophilie de l'aldéhyde et ne peut donc pas réagir efficacement avec l'ylure de phosphonate

¹⁸³ Ianni, A. and Waldvogel, S. R., *Synthesis*, **2006**, *13*, 2103.

¹⁸⁴ Thèse de Jean-Alexandre Richard

dérivé de la coumarine **30**. La coumarine portant l'aldéhyde a été modifiée afin d'intégrer un groupement protecteur de phénol stable en conditions fortement basiques. Un groupement protecteur méthoxyméthyle (MOM) a été choisi et la coumarine **36** a été synthétisée en deux étapes par déprotection en conditions basiques du phénol de la coumarine **34** pour obtenir le composé **37** puis addition de chlorure de méthoxyméthyle pour obtenir avec des rendements satisfaisants la coumarine **36** (Figure 2 - 36).

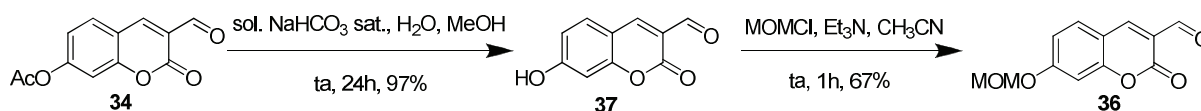


Figure 2 - 36 : Synthèse de la coumarine protégée **36**

Nous avons ensuite effectué la réaction de HWE entre la coumarine **36** et la coumarine **30** préalablement obtenue (Figure 2 - 37). Cependant comme nous pouvons le constater dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 - 4) et malgré les différentes conditions testées, le produit **38** désiré n'a jamais pu être obtenu.

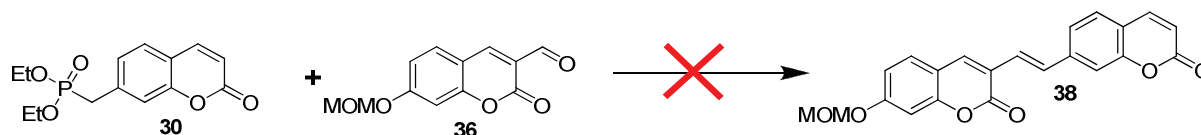


Figure 2 - 37 : Essais de synthèse du composé **38**

Entrée	Base	Solvant	Température / Durée	Résultats	Changement de couleur [#]
1	NaH (1,2 equiv.)	THF	ta, 48 h	Dégradation de 36	-
2	Na (1,5 equiv.)	DMF/MeOH 5:1 v/v	ta, 48 h	Dégradation de 36	rouge foncé
3*	<i>t</i> -BuOK (2 equiv.)	DMF	ta, 1h	Dégradation de 36	rouge foncé
4*	<i>t</i> -BuOK (1,5 equiv.)	DMF	ta, 15h puis 50°C, 5h	Dégradation de 36	rouge foncé
5*	K ₂ CO ₃ (1,5 equiv.)	DMF	80°C, 15h	Dégradation de 36	Pas de changement
6*	<i>t</i> -BuOK (1,15 equiv.)	DMF	ta, 2h	Pas de réaction	rouge foncé
7*	K ₂ CO ₃ (1,05 equiv.) + éther couronne 18-C-6	DMF	ta, 24h	Pas de réaction	rouge saumon
8*	<i>t</i> -BuOK (1 equiv.)	toluène	ta, 5h	Dégradation de 36	rouge foncé
9*	NaH	THF	ta, 4h	Pas de réaction	orange

Tableau 2 - 4 : Ensemble des conditions testées pour la synthèse du composé **38**

[#] Changement de couleur observé après l'addition de la base sur le phosphonate **30**

* La base est d'abord additionnée sur le phosphonate **30** avant que l'aldéhyde ne soit ajouté.

De ce tableau, nous pouvons en conclure que la coumarine **36** est particulièrement instable en conditions basiques et que la fonction aldéhyde de cette dernière n'est pas très réactive en raison de sa conjugaison avec le cœur coumarinique. La coloration rouge foncé obtenue après l'addition de la base sur le phosphonate **30** est un signe que la formation de l'ylure a bien lieu. C'est donc la deuxième partie de la réaction impliquant une addition nucléophile sur le carbonyle de la coumarine **36** qui pose problème. Même avec un seul équivalent, l'aldéhyde **36** est rapidement dégradé dans les conditions de réaction et ne peut donc pas réagir correctement pour former le pro-fluorophore attendu **38**.

La synthèse du pro-fluorophore **3** n'a donc pas pu aboutir. D'autres méthodes devront être envisagées pour accéder à ce composé.

2.2. Evaluation des propriétés spectroscopiques

Du fait de la forte hydrophobie des composés précédemment obtenus, les mesures ont été uniquement faites dans les solvants organiques (CH₃CN).

Les propriétés spectroscopiques des deux phénols synthétisés, **27** et **2** ont été évaluées. Ainsi, nous avons pu vérifier si notre hypothèse de départ était validée, à savoir que si le système π est plus étendu, le fluorophore devait absorber et émettre à des longueurs d'onde plus lointaines que la 7-hydroxycoumarine parente. Nous avons donc tout d'abord enregistré le spectre d'absorption et d'émission du fluorophore **27** (Figure 2 - 39).

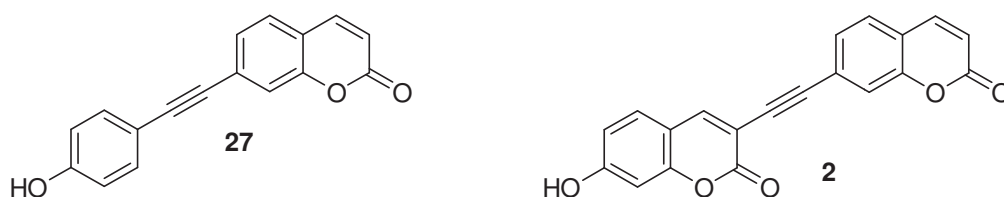


Figure 2 - 38 : Rappel de la structure des fluorophores 27 et 2

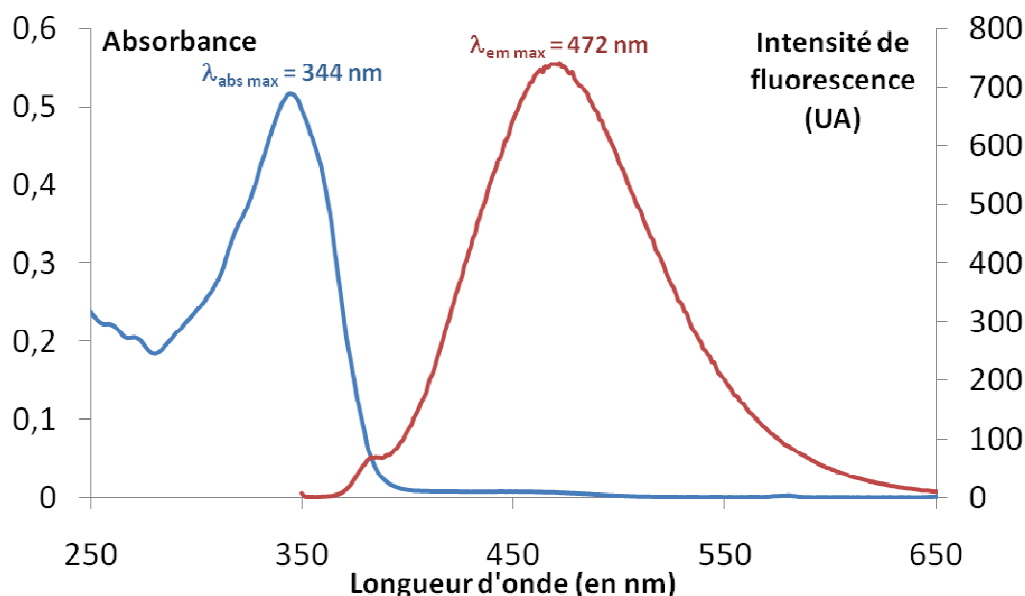


Figure 2 - 39 : Spectre d'absorption et d'émission du fluorophore 27 (solvant : CH₃CN, 25°C, 25 μ M (Abs.), 2,5 μ M (Fluo.), excitation : 344 nm)

Le coefficient d'absorption molaire de ce composé a été mesuré à 38 600 M⁻¹.cm⁻¹ (344 nm) ce qui est largement supérieur au coefficient d'absorption molaire des coumarines classiques (de l'ordre de 15 000 M⁻¹.cm⁻¹). Le déplacement de Stokes est de 130 nm et est en accord avec des structures de type 7-hydroxycoumarine.¹⁴⁸ En revanche, les longueurs d'onde d'absorption et d'émission restent dans le visible centrées respectivement à 344 nm et 472 nm. La triple liaison ne semble donc pas permettre l'obtention d'un système conjugué entre le phénol et le cœur coumarine.

Nous avons également étudié les propriétés spectroscopiques du fluorophore **2** (Figure 2 - 40). Le coefficient d'absorption molaire de ce composé a été déterminé à $22\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (375 nm). Nous pouvons remarquer que les spectres d'absorption et d'émission sont moins bien définis que pour le fluorophore précédent. Cela peut se traduire par une superposition des spectres des deux coumarines. Le léger décalage d'absorption entre les deux coumarines peut être dû à la différence de substitution des deux partenaires (position 7 pour l'un et 3 pour l'autre). Nous pouvons interpréter cela comme une délocalisation incomplète des électrons entre les deux coumarines. Cela est en accord avec les longueurs d'onde d'absorption et d'émission qui sont toujours situées dans le visible et dans la gamme des absorptions/émissions des coumarines classiques. La triple liaison n'est donc pas adaptée pour étendre la délocalisation électronique d'un fluorophore dans notre cas. Ce constat s'accorde avec les structures « cassettes » développées très récemment où la conjugaison électronique n'est pas étendue à l'ensemble de la molécule.¹⁸⁵

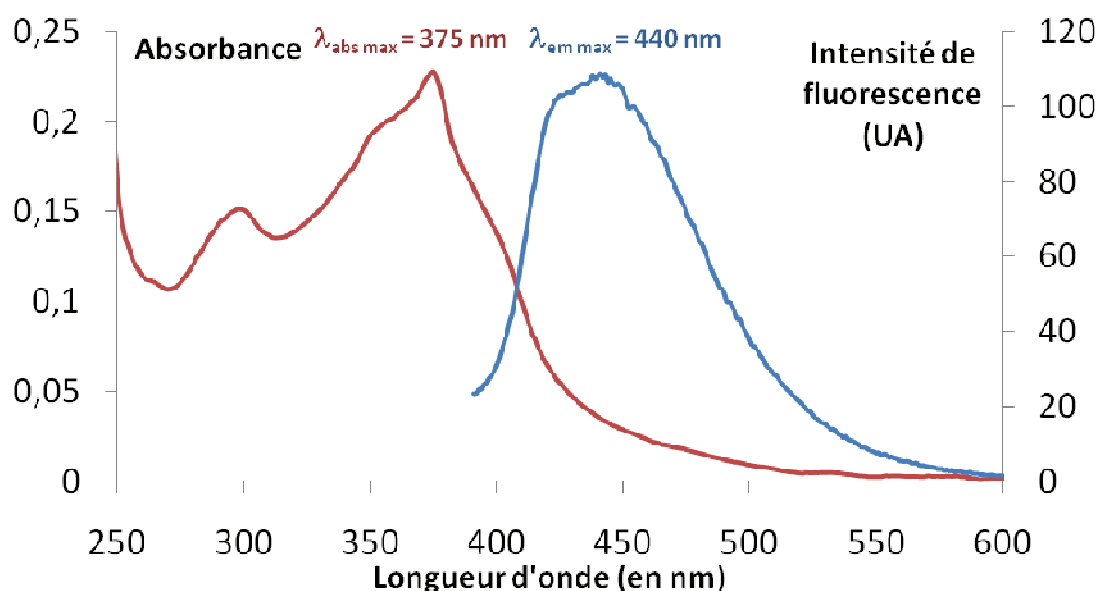


Figure 2 - 40 : Spectre d'absorption et d'émission du profluorophore **2** (solvant : CH_3CN , 25°C , $105\ \mu\text{M}$ (Abs.), $1,0\ \mu\text{M}$ (Fluo.), excitation : 380 nm)

¹⁸⁵ Loudet, A., Thivierge, C. and Burgess, K., *Dojin News*, **2011**, 137, 1.

3 Conclusion

Les pro-fluorophores à phénol développés et présentés dans ce sous-chapitre n'ont pas donné les résultats escomptés. Nous pouvons affirmer que la délocalisation électronique des électrons n'a pas lieu, ce que nous pouvons interpréter par l'hypothèse, probable, que la triple liaison carbone-carbone crée un angle de 90°C entre les deux coumarines.¹⁸⁵ La structure n'étant pas plane, l'hybride bis-coumarine n'a pas les propriétés spectroscopiques d'un seul fluorophore « fusionné » mais de deux unités fluorescentes indépendantes possédant chacune des longueurs d'onde d'absorption et d'émission distinctes ce qui explique l'allure très large des spectres enregistrés sur la Figure 2 - 40.

Afin de remédier à ce problème nous avons tenté à partir des composés **6** et **16** d'obtenir un pro-fluorophore **40** impliquant deux unités coumarine reliées entre elles par deux triples liaisons carbone-carbone. Le composé **16** avait donc été bromé afin d'obtenir la coumarine **39** mais les essais de couplage de type Sonogashira n'ayant pas abouti, cette idée n'a pas été poursuivie (Figure 2 - 41).

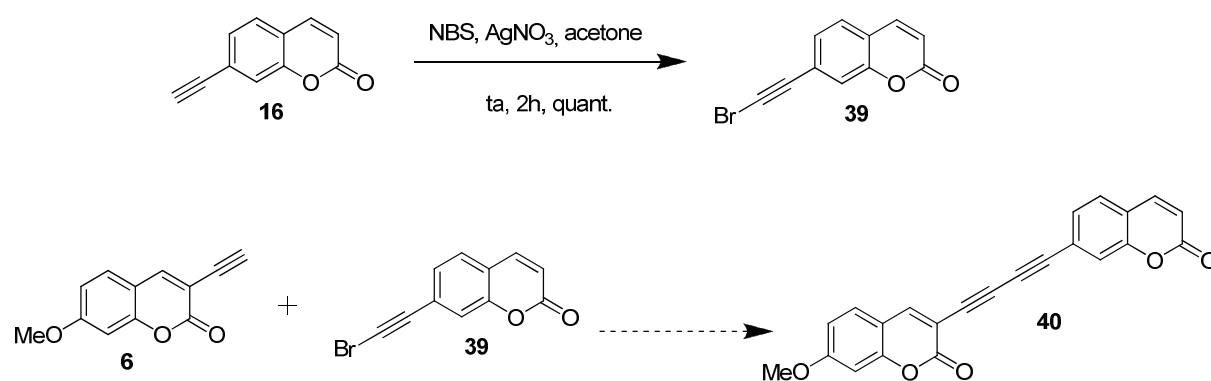


Figure 2 - 41 : Projet de synthèse du composé **40** à partir de la coumarine substituée **39**

III. Hydrosolubilisation de pro-fluorophores à phénol

En parallèle des études précédentes, nous avons également travaillé à l'optimisation des propriétés physico-chimiques de pro-fluorophores à phénol déjà existants et émettant dans le rouge (notamment la solubilité dans l'eau et la résistance à l'auto-agrégation en milieu physiologique). En effet, devant le défi synthétique que représente l'obtention de nouveaux pro-fluorophores à phénol émettant dans le proche infrarouge, il nous est apparu pertinent d'explorer en parallèle la chimie de phénols fluorescents moins originaux mais plus facilement et rapidement implémentables aux sondes pro-fluorescentes développées par QUIDD. Ceci a le double avantage d'avoir des certitudes sur la gamme d'émission des composés sur lesquels nous travaillons et de mettre au point des méthodes d'hydrosolubilisation originales applicables à d'autres fluorophores. C'est aussi pour l'entreprise QUIDD un moyen plus rapide d'obtenir des pro-fluorophores intéressants et libres de droit.

1 Pro-fluorophore de type benzothiazocyanocoumarine

Nous nous sommes intéressés à une structure décrite dans un brevet de 1982 de la société Ciba-Geigy, correspondant à un fluorophore dérivé de la 7-hydroxycoumarine (Figure 2 - 42).¹⁸⁶ Ce fluorophore a ensuite été synthétisé et étudié par l'équipe d'O. S. Wolfbeis.¹⁸⁷ Il porte un substituant cyano en position 4 et un groupement benzothiazole en position 3. Ce produit a un coefficient d'absorption molaire compris entre 23 300 et 33 100 M⁻¹.cm⁻¹ suivant le solvant, un maximum d'absorption entre 432 et 500 nm et une émission de fluorescence à 595 nm. Le rendement quantique n'a cependant pas été mesuré. Nous avons donc décidé de synthétiser un équivalent de ce fluorophore et d'évaluer ses propriétés optiques, pour ensuite le dériver afin de le rendre hydrosoluble. La modification porte sur le remplacement du motif carbonyle de la coumarine par une imine. Cela devrait permettre d'avoir un point d'ancrage pour des modifications post-synthétiques ainsi que, nous l'espérons, améliorer le système push-pull.¹⁸⁸ Des dérivés ont d'ailleurs été synthétisés en modifiant la partie imine de la molécule afin d'étendre la structure aromatique (Figure 2 - 43).¹⁸⁹

¹⁸⁶ Möckli, P. (Ciba-Geigy Corporation). Substitued benzopyran compounds, US 4547579, 1985

¹⁸⁷ Wolfbeis, O. S., Koller, E. and Hochmuth, P., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, *2*, 731.

¹⁸⁸ Guo, D., Chen, T., Ye, D., Xu, J., Jiang, H., Chen, K., Wang, H. and Liu, H., *Org. Lett.*, **2011**, *11*, 2884.

¹⁸⁹ Huang, S.-T., Jian, J.-L., Peng, H.-Z., Wang, K.-L., Lin, C.-M., Huang, C.-H. and Yang, T. C. K., *Dyes Pigm.*, **2010**, *1*, 6.

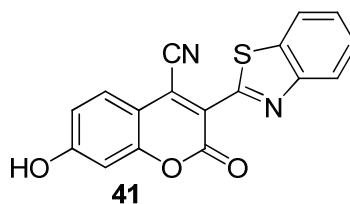


Figure 2 - 42 : Structure du pro-fluorophore décrit dans le brevet

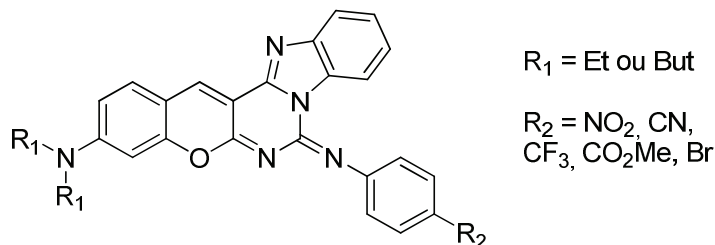


Figure 2 - 43 : Exemples de modification du pro-fluorophore 41

Il est intéressant de noter que depuis, ce composé et ses dérivés ont connu de nombreuses applications en imagerie en particulier par le groupe de H.-C. Huang. Nous pouvons citer notamment les travaux pour la détection des nitroréductases,¹⁹⁰ des salicylate hydrolases,¹⁹¹ pour la détection des thiols¹⁹² ou encore pour la DT-Diaphorase (oxydoréductase de quinone).¹⁹³ Dans ces travaux, les propriétés de pro-fluorescence ont systématiquement été mises à profit par la substitution, par l'analyte ciblé, de la position 7 de la coumarine **41**. L'exemple suivant présente une utilisation décrite de ce composé dans une séquence incluant un bras auto-immolable. Lorsque l'enzyme (DT-diaphorase) est mise en présence d'un dérivé de quinone, cette dernière est réduite puis un enchaînement de réactions intramoléculaires entraîne la libération du fluorophore. Ce dernier non-fluorescent dans la sonde initiale fluoresce ensuite à 595 nm (Figure 2 - 44).

¹⁹⁰ Huang, H.-C., Wang, K.-L., Huang, S.-T., Lin, H.-Y. and Lin, C.-M., *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 8, 3511.

¹⁹¹ Huang, S.-T., Teng, C.-J., Lee, Y.-H., Wu, J.-Y., Wang, K.-L. and Lin, C.-M., *Anal. Chem.*, **2010**, 17, 7329.

¹⁹² Huang, S.-T., Ting, K.-N. and Wang, K.-L., *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 1-2, 120.

¹⁹³ Huang, S.-T., Peng, Y.-X. and Wang, K.-L., *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 12, 1793.

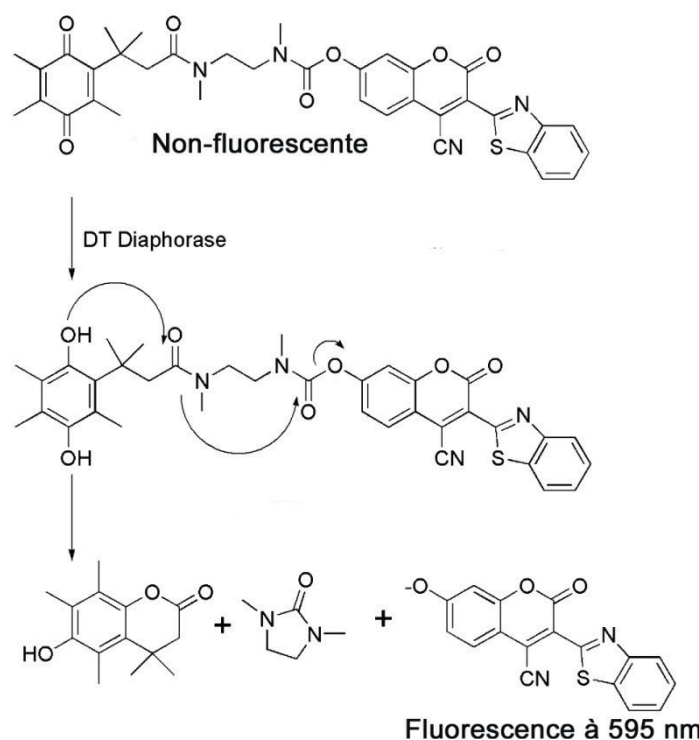


Figure 2 - 44 : Exemple d'utilisation du fluorophore dans une sonde pro-fluorescente¹⁹³

1.1. Synthèse

Dans ce but, nous avons ciblé dans un premier temps le fluorophore **44**, possédant une imine en lieu et place du carbonyle de la coumarine afin d'avoir une position dérivatisable par un groupe hydro-solubilisant. Ce composé a été obtenu en trois étapes à partir du 2,4 dihydroxybenzaldéhyde **42** commercial. Ce dernier est mis à réagir avec la 2-benzothiazolacétonitrile en présence de pipéridine dans le méthanol. Le produit **43** est obtenu avec un bon rendement optimisé de 81%. Les deux étapes suivantes sont réalisées dans le même pot. La première étape consiste à introduire le groupement cyano sur la structure de **43** avec l'utilisation du cyanure de potassium dans le DMF. La seconde étape *in situ* a pour but de réaromatiser le dérivé imino-coumarine en utilisant DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) comme oxydant doux.¹⁹⁴ Le fluorophore **44** est obtenu avec un rendement de 86% sur deux étapes.

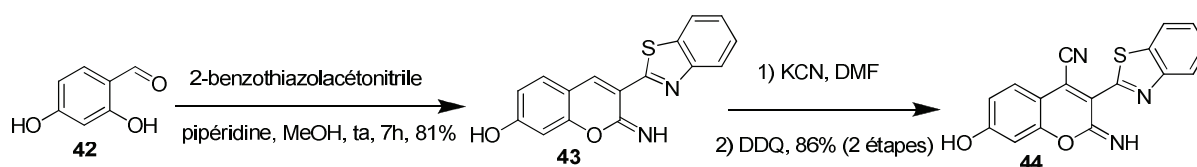


Figure 2 - 45 : Synthèse du pro-fluorophore **44**

Les bons rendements de cette synthèse permettent l'obtention du composé **44** à l'échelle du gramme. Il est intéressant de noter que le composé **44** présente une instabilité en milieu aqueux

¹⁹⁴ Bharate, S. B., *Synlett*, **2006**, 3, 496.

acide (HCl par exemple) *via* l'hydrolyse de son motif imine. Les propriétés spectroscopiques de ce fluorophore ont ensuite été évaluées en milieu physiologique simulé (tampon PBS à 25°C).

1.2. Propriétés spectroscopiques

Le coefficient d'absorption molaire a été déterminé à $18\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 453 nm mais la bande d'absorption est très large (entre 400 et 520 nm). L'émission de fluorescence à un maximum mesuré à 600 nm avec une bande à mi-hauteur couvrant la gamme 570-650 nm. Le rendement quantique a été déterminé en utilisant la rhodamine 6G comme référence et nous obtenons un rendement modeste de 5,9 % dans le tampon PBS. Le fluorophore étant peu soluble dans l'eau, une solution stock, voisine du millimolaire, a été préparée dans le DMSO. Ensuite, des dilutions successives dans le PBS ont été effectuées afin de faire les mesures. Aucune reprecipitation n'a été constatée dans la gamme de concentrations des mesures (micromolaire). Dans des tampons à pH plus élevée (tris HCl, pH 8,5), la solubilité du fluorophore augmente en raison de la déprotonation partielle du phénol. Le spectre d'excitation a aussi été enregistré et correspond au spectre d'absorption. Cependant, la faible solubilité dans l'eau de ce composé (notamment à pH 7.5) étant peu compatible avec des applications *in cellulo* et *in vivo*, il était indispensable d'explorer des approches synthétiques permettant une introduction aisée et efficace de motifs hydrophiles sur son cœur coumarine.

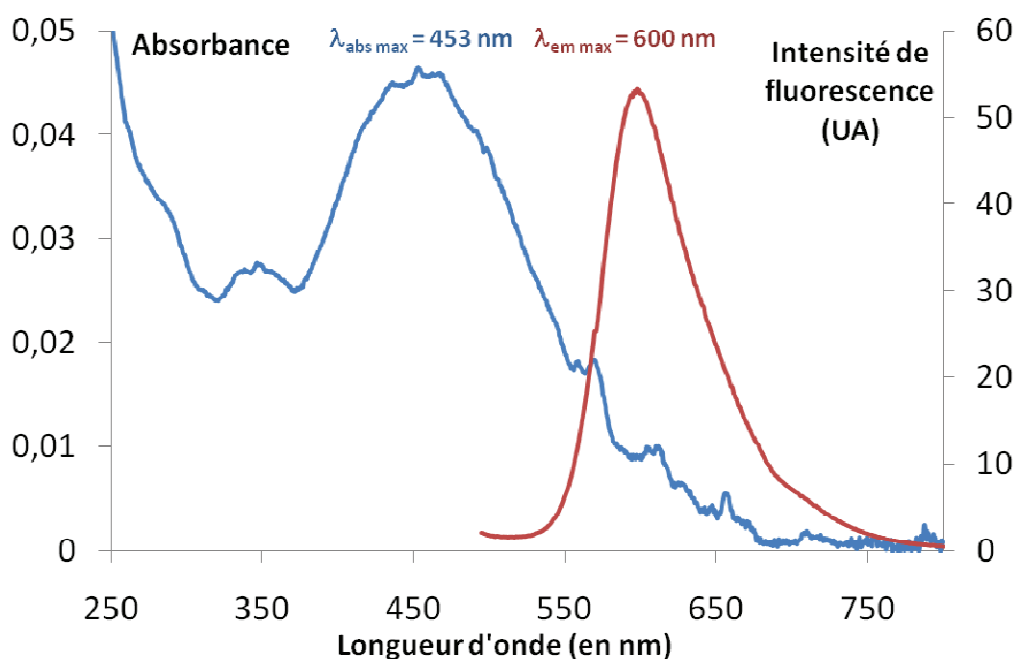


Figure 2 - 46 : Spectre d'absorption et d'émission du fluorophore 44 (solvant : PBS, 25°C, 5,2 μM , excitation : 453 nm)

2 Hydrosolubilisation du pro-fluorophore 44

2.1. Stratégie

L'hydrosolubilisation post-synthétique de fluorophores est une thématique chère du laboratoire. Elle présente l'avantage de faciliter les étapes de synthèse du fluorophore. En effet, si le dérivé hydrosolubilisant est lié au fluorophore dès le début de la synthèse, il est nécessaire par la suite d'effectuer les purifications sur phase inverse ce qui peut s'avérer plus long, plus coûteux et moins extensible à une échelle de synthèse supérieure, ou d'effectuer un cycle de protections/déprotections. Un deuxième avantage est qu'il n'est pas forcément nécessaire de retravailler l'intégralité de la synthèse du fluorophore mais seulement d'aménager des fonctions chimiques en fin de synthèse pour pouvoir amener le groupe hydrosolubilisant. Le laboratoire a développé une méthodologie d'hydrosolubilisation post-synthétique à base d'un acide aminé non naturel : l' α -sulfo- β -alanine. Nous avons pu ainsi hydrosolubiliser des familles de fluorophores comme les cyanines,¹⁹⁵ les bodipy^{196,197} et les rhodamines¹⁹⁸ ou encore les xanthènes (Figure 2 - 47).¹⁹⁹ Cette stratégie a été depuis étendue à la solubilisation d'autres agents d'imagerie, comme les sondes IRM au xénon polarisé (Figure 2 - 48).²⁰⁰

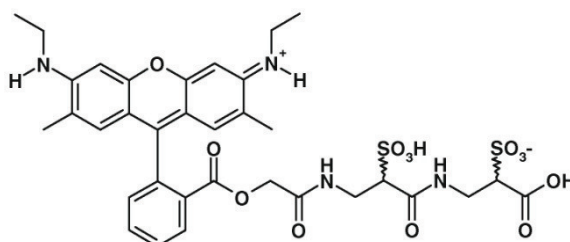


Figure 2 - 47 : Exemple de fluorophore hydrosolubilisé post-synthétiquement

¹⁹⁵ Romieu, A., Brossard, D., Hamon, M., Outaabout, H., Portal, C. and Renard, P.-Y., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *1*, 279.

¹⁹⁶ Niu, S. L., Ulrich, G., Ziessel, R., Kiss, A., Renard, P.-Y. and Romieu, A., *Org. Lett.*, **2009**, *10*, 2049.

¹⁹⁷ Niu, S. L., Massif, C., Ulrich, G., Ziessel, R., Renard, P. Y. and Romieu, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *1*, 66.

¹⁹⁸ Romieu, A., Brossard, D., Hamon, M., Outaabout, H., Portal, C. and Renard, P.-Y., *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *1*, 279.

¹⁹⁹ Romieu, A., Tavernier-Lohr, D., Pellet-Rostaing, S., Lemaire, M. and Renard, P.-Y., *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *25*, 3304.

²⁰⁰ Rousseau, B., Traoré, T., Clavé, G., Delacour, L., Kotera, N., Renard, P.-Y., Romieu, A., Berthault, P., Boutin, C. and Tassali, N., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 9702.

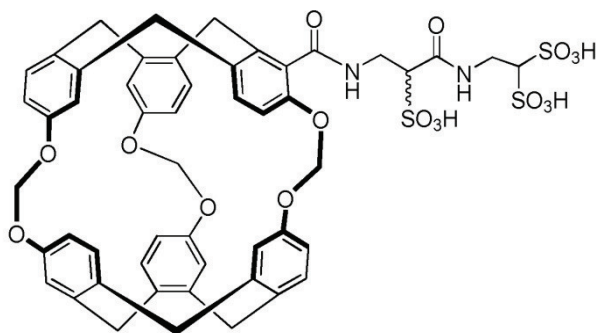
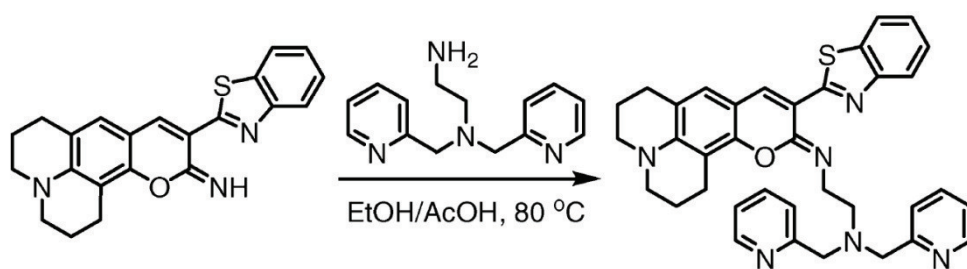


Figure 2 - 48 : Exemples de cryptophane hydrosoluble

Notre première stratégie d'hydrosolubilisation était de faire une réaction de trans-amination avec une amine préalablement dérivatisée avec des groupements ionisés ou facilement ionisables à pH physiologique (COOH, SO₃H, etc). Nous nous sommes inspirés d'une publication de Komatsu *et al* où les auteurs décrivent une sonde pour détecter les ions Zn²⁺.²⁰¹ En présence d'une amine primaire dans un mélange éthanol/acide acétique, l'imine de la coumarine est substituée pour fournir une nouvelle iminocoumarine comportant les bons substituants (Figure 2 - 48).

Figure 2 - 49 : Trans-amination d'une iminocoumarine²⁰¹

Nous avons donc décidé d'appliquer cette stratégie à notre composé **44** pour obtenir une iminocoumarine substituée doublement et portant de ce fait une charge positive (Figure 2 - 48). Nous pensions améliorer l'effet « push-pull » avec une fonction accepteur d'électrons comme l'imine. Les propriétés de fluorescence auraient donc pu être modifiées vers les hautes longueurs d'onde et un déplacement de Stokes plus important, en apportant en plus une hydrosolubilisation grâce aux substituants de l'imine.

²⁰¹ Komatsu, K., Urano, Y., Kojima, H. and Nagano, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *44*, 13447.

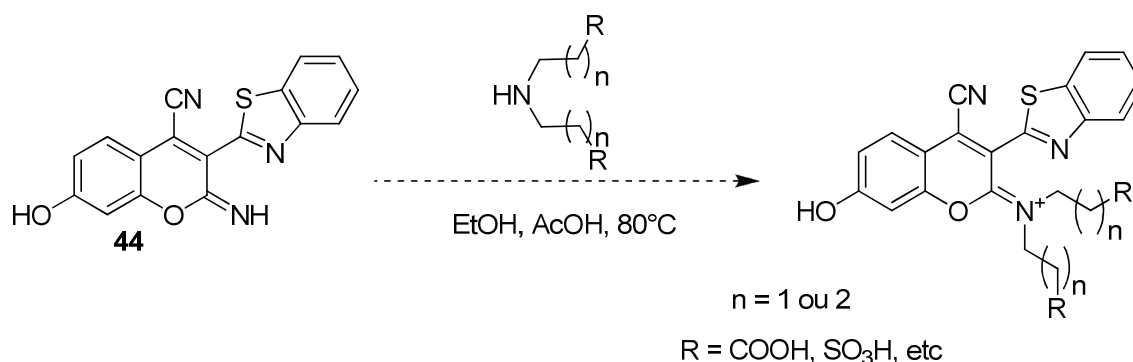


Figure 2 - 50 : Voie possible de dérivation du fluorophore 44

2.2. Essais d'hydrosolubilisation directs

Avant de synthétiser un (ou des) bras aminé(s) correctement substitué(s), nous avons choisi de tester cette réaction avec la diéthanoline, amine secondaire simple et disponible au laboratoire. Le but était de former le composé **45** dans les conditions décrites dans la publication de Komatsu et al²⁰¹ (Figure 2 - 51).

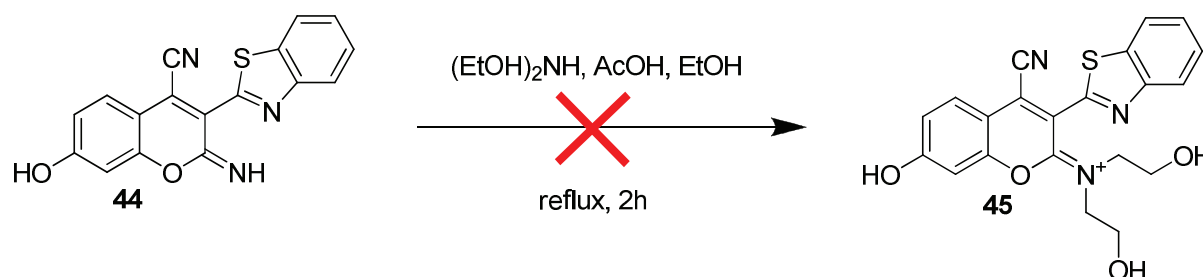


Figure 2 - 51 : Essai de synthèse du composé 45

Le produit attendu n'a pas été obtenu et la coumarine issue de l'hydrolyse de l'imine du produit de départ est récupérée. L'acide acétique présent dans le milieu, qui n'était pas parfaitement anhydre, a pu hydrolyser l'imine, connue pour être peu stable dans ces conditions.

Nous avons également remplacé la diéthanoline par la diéthylamine mais là encore le produit attendu n'a pas été obtenu. Seule la coumarine **41** (issue de l'hydrolyse du motif imine de **44**) a été récupérée.

Nous avons ensuite modifié les conditions expérimentales en supprimant l'acide acétique du milieu réactionnel (Figure 2 - 52). De plus, nous avons préféré utiliser le composé **43** car celui-ci est plus stable en conditions acides que le composé **44**. Le produit obtenu, qui n'est malheureusement pas le produit attendu, est un mélange du composé **46**, correspondant à un dérivé di-acétylé sur l'imine et le phénol, avec le composé **47**, correspondant au dérivé imine-acétylé.

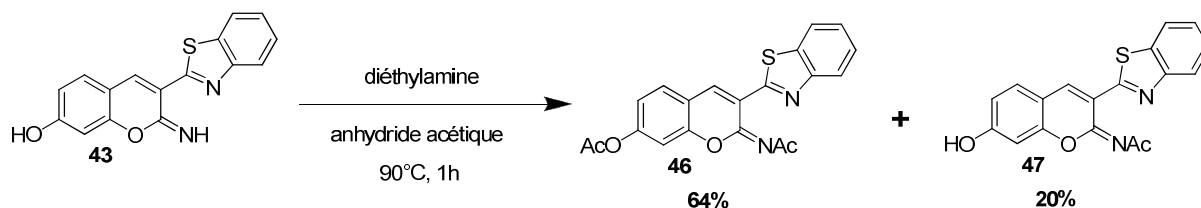


Figure 2 - 52 : Modifications des conditions de réactions de la trans-imation

Le composé **46** a été ensuite engagé dans une réaction de trans-imation en présence de diéthylamine et de pyridine mais, là encore, la réaction n'a pas conduit au produit désiré.

La trans-imation n'étant apparemment pas la stratégie la plus adaptée à notre substrat, nous avons décidé de faire une substitution directe de l'imine de la coumarine par un bras hydrosolubilisant correctement choisi. Le réactif de choix pour l'alkylation d'amines par des dérivés acide alkylsulfonique est la 1,3-propanesultone (ou son analogue à quatre atomes de carbone, la 1,4-butanesultone) qui est connue pour être très réactive vis-à-vis de nombreux nucléophiles.²⁰² La 1,3-propanesultone est le réactif de choix pour introduire des groupes hydrosolubilisants sur des fluorophores possédant des azotes quaternarisables (indole de cyanines par exemple).^{203,204} Une fois que la 1,3-propanesultone a réagi, la fonction acide sulfonique est « démasquée » et en général, le produit précipite dans le solvant organique utilisé pour la réaction. Cela permet donc de récupérer les produits par simple filtration, facilitant le traitement de ces réactions.

En faisant réagir la 1,3-propanesultone sur le composé **43**, nous espérons obtenir facilement la coumarine hydrosolubilisée **48** (Figure 2 - 53).

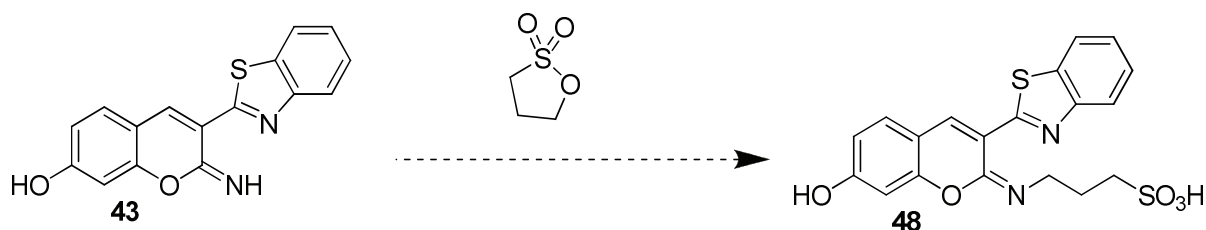


Figure 2 - 53 : Tentatives d'hydrosolubilisation de 43 avec la 1,3-propanesultone

Les différents essais effectués sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 - 5 : Essais d'hydrosolubilisation de 43 avec la 1,3-propanesultone

²⁰² Roberts, D. W. and Williams, D. L., *Tetrahedron*, **1987**, 6, 1027.

²⁰³ Pham, W., Lai, W.-F., Weissleder, R. and Tung, C.-H., *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 5, 1048.

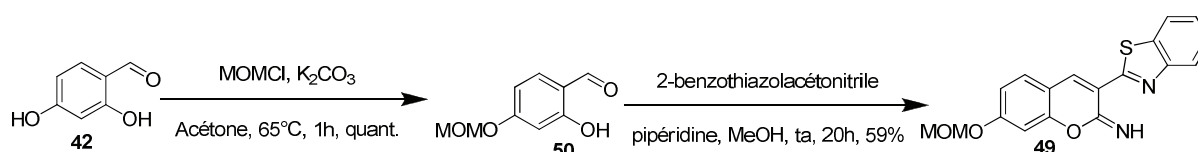
²⁰⁴ Pham, W., Medarova, Z. and Moore, A., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 3, 735.

Entrée	Solvant	Nb d'éq. Réactif	Conditions	Résultats
1	<i>n</i> -BuOH	1,05	120°C – 1h	Hydrolyse de l'iminocoumarine 43
2	<i>n</i> -BuOH / Et ₃ N 10:1 v/v	1,05	120°C – 3h30	Hydrolyse de l'iminocoumarine 43
3	2,6-lutidine	1,05	125°C – 3h	43 (80%), monosubstitué (<10%), disubstitué (<5%)
4	toluène / Et ₃ N 10:1 v/v	10	120°C – 4h	Mono, bi, tri et tétrasubstitué

Tableau 2 - 5 : Essais d'hydrosolubilisation de **43** avec la 1,3-propanesultone

Nous avons tout d'abord utilisé un protocole ne mettant en jeu que la 1,3-propanesultone dans le *n*-BuOH, mais l'iminocoumarine est cependant hydrolysée (entrée 1). En effet, au cours de la réaction le pH diminue en raison de l'ouverture de la 1,3-propanesultone et de la fonction acide sulfonique libérée. Le milieu a donc été tamponné avec de la triéthylamine pour empêcher cette hydrolyse acido-catalysée, cela n'a toutefois pas modifié le résultat (entrée 2). Nous avons alors utilisé la 2,6-lutidine comme solvant pour ses propriétés de base non nucléophile. Nous avons obtenu une faible quantité de produit (entrée 3). Nous avons alors utilisé le toluène, permettant de chauffer à des températures importantes et ajouté de la triéthylamine afin de tamponner le milieu. Devant l'absence de réaction, nous avons augmenté le nombre d'équivalents de 1,3-propanesultone pour atteindre un large excès de 10 équivalent (entrée 4). Dans ces conditions « extrêmes », nous obtenons un mélange de produits correspondant, après analyses de masse, au composé **43** avec une unité de 1,3-propanesultone, mais aussi 2, 3 et 4 unités. L'analyse par RMN n'a pas permis de déterminer précisément où la substitution avait eu lieu : l'imine de la coumarine, le thiazole du substituant ou le phénol.

Nous avons alors décidé de minimiser le nombre de sites réactifs de l'iminocoumarine en protégeant la fonction phénol du composé **43** par un groupement méthoxyméthyle. Le composé **49** a donc été synthétisé en deux étapes à partir du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **42**. La première étape est une étape de protection du phénol avec le chlorure de méthoxyméthyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétone. Le produit **50** est obtenu avec un rendement quantitatif. Ce dernier est ensuite engagé dans l'étape de formation de la coumarine avec le 2-benzothiazoleacétonitrile en présence de pipéridine dans le méthanol. Le composé **49** est donc obtenu avec un rendement correct (59%) à l'échelle du gramme (Figure 2 - 54).

Figure 2 - 54 : Synthèse du composé **49**

Comme précédemment, le composé **49** a ensuite été engagé dans une réaction de substitution nucléophile avec la 1,3-propanesultone. L'ensemble de ces essais sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 2 - 6).

Entrée	Solvant et réactif	Nb d'éq. Réactif	Conditions	Résultats
1	Et ₃ N / toluène- 1:15 v/v	10	80°C – 3 h	Réaction avec la triéthylamine
2*	K ₂ CO ₃ (5 equiv.) 1,4-dioxane	10	100°C – 4 h	Dégradation lors de la purification
3 [†]	K ₂ CO ₃ (10 equiv.) 1,4-dioxane	10	100°C – 3 h	Mélange complexe

Tableau 2 - 6 : Essais d'hydrosolubilisation du composé **49**

* Purification en TFA (0.1% dans l'eau, v/v)

[†] Purification en TEAB (25 mM, pH 7.5)

Ces essais complémentaires sur le composé **49** n'ont pas permis d'obtenir le produit attendu en quantités suffisantes et avec une pureté convenable. Devant l'impossibilité de contrôler correctement la régio-/chimiosélectivité de la réaction d'alkylation par la 1,3-propanesultone, nous avons décidé de travailler en amont et d'apporter l'hydrosolubilisation sur la 2-benzothiazoylacétonitrile en quaternarisant son atome d'azote (Figure 2 - 55). Les sultones sont en effet très efficaces pour alkylter les amines tertiaires. Le choix de cette stratégie a été renforcé par le fait que les deux étapes de formation de la coumarine sont réalisables dans des solvants fortement polaires (mélange DMF/H₂O par exemple) et donc compatibles avec des dérivés très hydrophiles comme ceux possédant un groupement sulfonate.

2.3. Essais d'hydrosolubilisation indirects

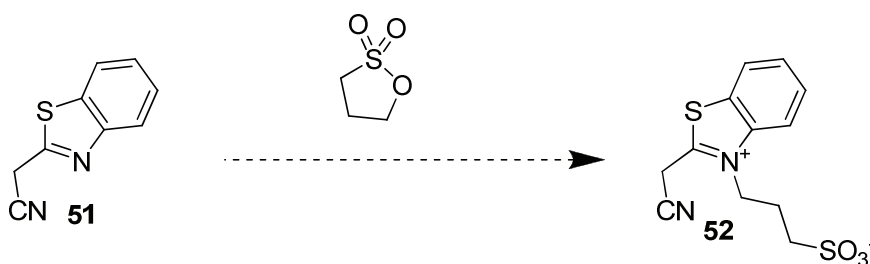


Figure 2 - 55 : Hydrosolubilisation en amont pour obtenir le dérivé hydrosoluble **52**

De nombreux essais ont été menés pour substituer le précurseur de la coumarine **51** et les données de ces tests sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 - 7).

Entrée	Solvants	Conditions	Résultats
1	1,3-propanesultone	>200°C, 15 mn	Mélange complexe
2	Et ₃ N, toluène 1:7 v/v 1,3-propanesultone (1 equiv.)	120°C, 2 h	Quaternarisation de la triéthylamine
3	toluène 1,3-propanesultone (1 equiv.)	120°C, 5 h	Pas de réaction
4	1,3-propanesultone	180°C, 10 mn	Un peu de produit (<5%)
5	1,3-propanesultone	180°C, 7 h	Perte du groupement nitrile

Tableau 2 - 7 : Essais de substitution du composé 51

Les essais menés n'ont pas permis d'obtenir le composé **52** de manière propre et en grandes quantités. Les mélanges complexes obtenus rendent les purifications sur grandes échelles très difficiles. Les températures de réaction utilisées sont l'une des raisons de la complexité des mélanges obtenus. Réduire le temps de réaction ou la température ne permettent pas à la réaction de fonctionner.

2.4. Perspectives

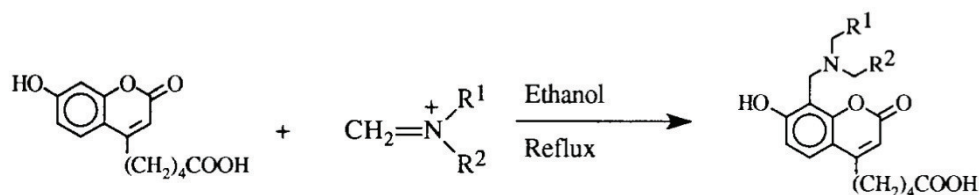
Après un nombre d'essais important sur les possibilités d'hydrosolubilisation rapide de ce fluorophore à l'aide de la 1,3-propanesultone, il a été décidé de ne pas poursuivre les essais. En effet, ce fluorophore étant loin d'être parfait, il pourrait s'avérer contre-productif de vouloir s'acharner à hydrosolubiliser ce composé. De plus, au fur et à mesure de l'état d'avancement des travaux, la complexité synthétique de l'hydrosolubilisation augmente, contrairement au choix voulu au départ qui consistait à hydrosolubiliser de manière post-synthétique des fluorophores de type iminocoumarine.

Cette voie de synthèse a donc été abandonnée et d'autres méthodes d'hydrosolubilisation de fluorophores ont été explorées (*vide infra*).

3 Synthèse d'un bras hydrosolubilisant compatible avec des réactions de type Mannich

3.1. Contexte

Toujours dans le contexte de la dérivatisation post-synthétique des fluorophores phénoliques, nous nous sommes intéressés à une publication d'Adamczyk *et al.*²⁰⁵ Ces travaux présentent l'addition d'un réactif de Mannich préalablement préparé sur la position 8 d'une 7-hydroxycoumarine (Figure 2 - 56).



(a) $\text{R}^1, \text{R}^2 = -(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, (b) $\text{R}^1, \text{R}^2 = -(\text{CH}_2)_5-$, (c) $\text{R}^1, \text{R}^2 = -(\text{CH}_2)_4-$
 (d) $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{Et}$, (e) $\text{R}^1 = \text{benzyle}$, $\text{R}^2 = \text{H}$;

Figure 2 - 56 : Addition sur une 7-hydroxycoumarine à l'aide d'un réactif de Mannich (Adamczyk *et al.*)²⁰⁵

L'intérêt d'une telle réaction est double : apporter une dérivatisation possible par l'introduction d'un bras aminé correctement substitué (hydrosolubilisation, greffage, etc) mais aussi abaisser le pKa du phénol de la coumarine grâce à une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton du phénol et le doublet non-liant de l'amine. L'abaissement du pKa peut être intéressant dans le cas de l'utilisation du fluorophore dans une sonde, afin de permettre après clivage le relargage et la déprotonation du fluorophore à pH physiologique, et donc de limiter les variations de fluorescence de la coumarine suivant le pH du milieu. Comme nous l'avons vu précédemment, les coumarines ont de meilleures propriétés spectroscopiques si le phénol est déprotonné car la charge portée par l'oxygène permet de fournir des électrons au reste de la structure. Ainsi le rendement quantique est amélioré avec l'augmentation de la population de coumarine chargée négativement. Nous allons donc essayer d'appliquer cette stratégie dans le cas de nos produits en synthétisant préalablement le réactif de Mannich qui nous intéresse.

²⁰⁵ Adamczyk, M., Cornwell, M., Huff, J., Rege, S. and Rao, T. V. S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *15*, 1985.

3.2. Essais de synthèse

Nous avons commencé par vérifier la faisabilité de la réaction en faisant réagir un réactif de Mannich préparé à partir de la diéthylamine sur la 7-hydroxycoumarine **53** (Figure 2 - 57).

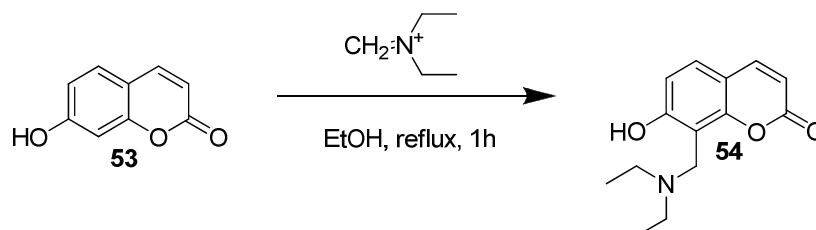


Figure 2 - 57 : Test de faisabilité pour obtenir le composé **54**

Le produit **54** est obtenu avec un rendement moyen non-optimisé (50%). Nous avons ensuite synthétisé le bras aminé disulfonaté désiré (Figure 2 - 58). Il sera synthétisé avec une chaîne carbonée de deux ou trois unités en fonction du réactif utilisé (1,3-propanesultone ou l'acide 2-bromosulfonique).

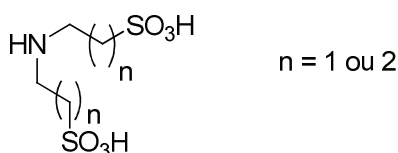
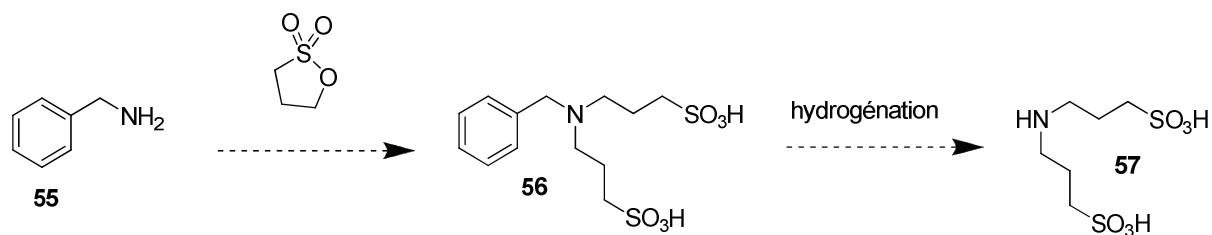


Figure 2 - 58 : Bras sulfonaté visé

Du fait de sa masse molaire faible et de sa forte polarité, le bras doit pouvoir être synthétisé en grosses quantités sans purification par HPLC semi-préparative sur colonne de silice à polarité de phase inversée. En effet, les quantités purifiables sur ce type de dispositif chromatographique sont relativement faibles (< 100 mg), du moins avec les colonnes disponibles au laboratoire. De plus, il se pose le problème de la détection du composé lors de sa purification car il ne comporte aucun chromophore UV. Il est donc indispensable d'optimiser les conditions de réactions afin d'obtenir un taux de conversion satisfaisant et une sélectivité autorisant une purification du mélange réactionnel par simple recristallisation.

La première voie de synthèse choisie consiste à additionner deux unités 1,3-propanesultone sur la benzylamine **55**, de le purifier à cette étape puis d'engager le composé **56** dans une réaction d'hydrogénation catalytique afin d'éliminer le groupement benzyle et de récupérer le produit formé **57** facilement par filtration puis recristallisation (Figure 2 - 59).

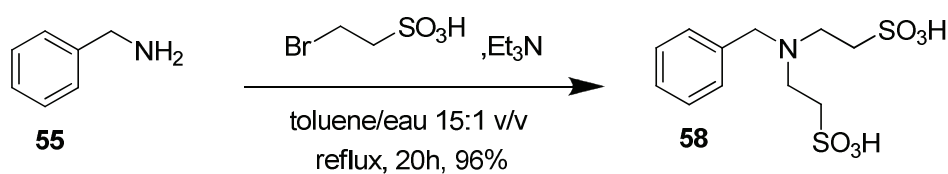


Les différentes conditions testées pour la première étape sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 2 - 8).

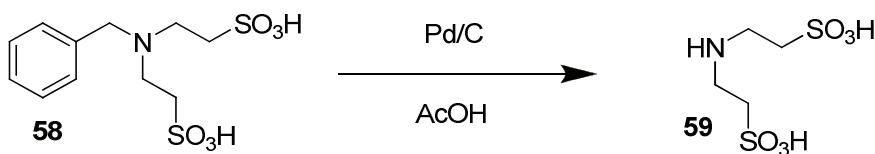
Entrée	Nb d'équiv. de 1,3-propanesultone	Base et solvant	Conditions	Résultat
1	2,5	DMF	80°C – 9 h 30	monosulfonaté
2	2	K ₂ CO ₃ – H ₂ O	reflux, 4 h	pas de réaction
3	2,5	toluène	reflux, 1h30	mélange complexe
4	2,5	DMF	60°C – 15 h	monosulfonaté
5	2,5	Na ₂ CO ₃ - MeOH	reflux, 80 h	mélange de mono et de di

Tableau 2 - 8 : Essais de substitution de la benzylamine 55 par la 1,3-propanesultone

N'arrivant pas à obtenir le produit désiré de cette manière, nous avons modifié la synthèse en utilisant l'acide 2-bromosulfonique à la place de la 1,3-propanesultone. Le produit a pu cette fois-ci être obtenu en utilisant de la triéthylamine et un mélange d'eau et de toluène (Figure 2 - 60).



Après deux recristallisations, le produit **58** est obtenu avec un très bon rendement de 96% et une pureté d'environ 90%. La dernière étape est la réduction au moyen de palladium sur charbon. La réaction de réduction fonctionne mais des problèmes dans la récupération du produit se sont alors posés. En effet, une masse largement supérieure à celle attendue est obtenue. Le produit contient donc des sels provenant soit des étapes précédentes, soit du catalyseur d'hydrogénation. Malgré les recristallisations, le produit **59** n'a pas pu être obtenu avec une qualité acceptable pour la suite de la synthèse (Figure 2 - 61).



3.3. Perspectives

Une fois les essais effectués sur les dérivés de la 7-hydroxycoumarine, nous pourrions imaginer d'appliquer cette stratégie à d'autres pro-fluorophores et à nos chémiluminophores. En effet, comme pour la fluorescence, nous avons besoin pour déclencher la chémiluminescence par déprotonation d'un phénol. C'est pourquoi, une substitution en *ortho* du phénol de notre chémiluminophore apporterait de l'hydrosolubilité mais aussi un abaissement du pKa ce qui faciliterait le déclenchement de la chémiluminescence en milieu physiologique (Figure 2 - 62).

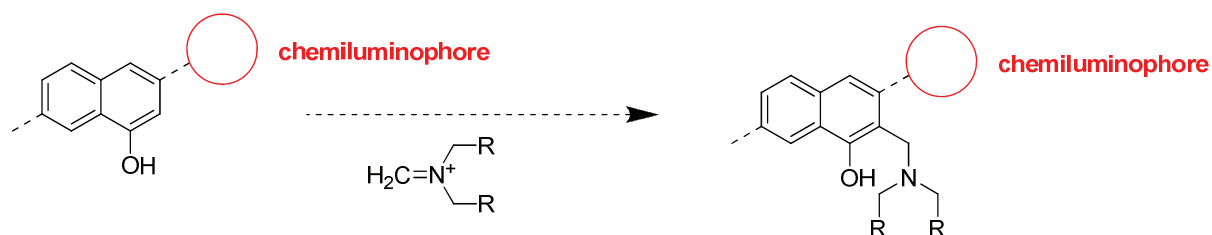


Figure 2 - 62 : Autre utilisation possible du réactif de Mannich : application en chémiluminescence

La synthèse du bras hydrosolubilisant est quasiment achevée. Il reste à trouver une méthode efficace d'hydrogénation afin de récupérer le composé **59** en grosses quantités et avec un bon degré de pureté. Nous pourrions ensuite tester ce bras sur un ensemble de fluorophores en commençant par des dérivés coumariniques et par la suite l'étendre à d'autres familles de fluorophores à phénol comme les fluorescéines ou les naphthofluorescéines. Des essais devront donc être effectués dans ce sens. Comme nous le verrons dans la suite de l'exposé, ce bras pourrait être aussi utilisé dans l'hydrosolubilisation de chémiluminophores qui sont en général des espèces peu solubles en milieu aqueux.

Dans la liste des nouveaux fluorophores à phénol, le groupe de T. Nagano a récemment présenté la synthèse d'une nouvelle série de fluorophores basée sur la fluorescéine. L'atome d'oxygène central a été remplacé par un atome de silicium (Figure 2 - 63).

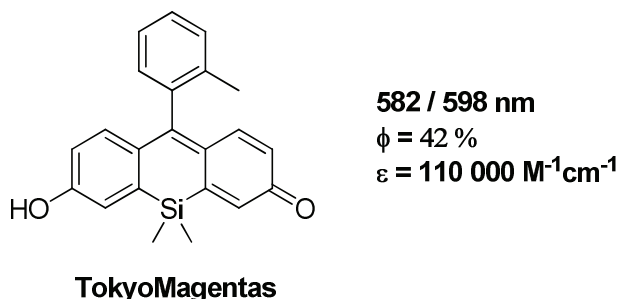


Figure 2 - 63 : Structure et propriétés spectrales du nouveau fluorophore silylé (tampon phosphate sodium pH=9)

Ce composé présente des propriétés spectrales très intéressantes puisque les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont déplacées de 60-70 nm vers le rouge par rapport à la fluorescéine. De plus le coefficient d'absorption molaire reste bon avec un rendement quantique tout à fait correct

de 42%. De plus, le silicium étant tétravalent, nous pourrions imaginer par la suite des dérivatisations possibles en fonctionnalisant le silicium afin par exemple d'apporter de l'hydrosolubilisation.

Cette partie conclut ce chapitre sur les essais effectués dans la synthèse et l'hydrosolubilisation de pro-fluorophores. Nous avons montré que la synthèse de nouveaux pro-fluorophores à phénol est un défi et que parfois, des systèmes structurellement simples sont difficilement accessibles du point de vue synthétique. Les voies de synthèse testées sont loin d'être exhaustives et certaines voies mériteraient d'être poursuivies afin d'arriver rapidement à des composés intéressants d'un point de vue applicatif.

Chapitre 3

Synthèse de nouveaux chémiluminophores

I. Revue de la littérature

Les exemples de chémiluminescence *in vivo* présentés dans le chapitre d'introduction sont une validation (même partielle) d'une certaine stabilité du motif 1,2-dioxétane en milieu physiologique.²⁰⁶ Fort de ce résultat, nous avons donc développé de nouveaux composés chémiluminescents ayant pour finalité une utilisation *in vivo*.

1 Les chémiluminophores de type 1,2-dioxétane

Découverts pour leurs propriétés de chémiluminescence depuis 1969,²⁰⁷ les 1,2-dioxétanes ont connu un regain d'intérêt dans les années 90 avec le développement de kits de détection chémiluminescents pour des tests *in vitro*. Ainsi depuis 1991, une vingtaine de publications par an sortent en moyenne sur la synthèse de motifs 1,2-dioxétane et/ou leurs applications en bio-analyse.²⁰⁸ Nous pouvons schématiser les espèces chémiluminescentes de type 1,2-dioxétane comme présenté dans la Figure 3 - 1. La source d'énergie permettant l'émission de lumière est constituée d'une structure 1,2-dioxétane, dont l'énergie issue de la décomposition est restituée sous forme de lumière. En tant que tel, cette structure est rarement stable. Il faut y ajouter des groupements très encombrants afin de stabiliser ce cycle à 4 chaînons. L'ensemble est lié de manière covalente à un chromophore, en général un résidu phényle ou naphtyle, qui détermine en partie les propriétés de chémiluminescence (longueur d'onde d'émission, intensité, etc). Pour déclencher la luminescence, une excitation électronique va déstabiliser le cycle et ainsi le fragmenter. Par les mécanismes vus précédemment (Chapitre I - paragraphe 2.3), cette fragmentation va induire la luminescence. L'excitation électronique est fournie au moyen d'un groupement déclencheur substitué sur le chromophore (aniline, phénol, thiol et carbanion).²⁰⁹

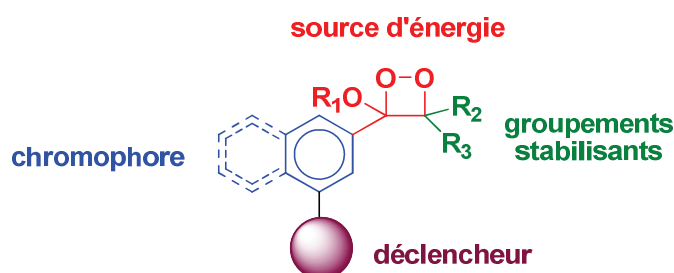


Figure 3 - 1 : Formule générale des chémiluminophores de type 1,2-dioxétane

²⁰⁶ Liu, L. and Mason, R. P., *PLoS ONE*, **2010**, *8*, e12024.

²⁰⁷ Kopecky, K. R. and Mumford, C., *Can. J. Chem.*, **1969**, *4*, 709.

²⁰⁸ Source Web of Science : recherche par mot clé : 1,2-dioxétane

²⁰⁹ Pour une revue très complète sur les 1,2-dioxétanes : Matsumoto, M., *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.*, **2004**, *1*, 27.

1.1. Choix du déclencheur

Le déclencheur doit être un groupement capable de donner des électrons au cycle 1,2-dioxétane afin de le déstabiliser et de le fragmenter. Les composés actuellement décrits sont donc les anilines, les phénols, les thiophénols, et d'une façon plus générale tout anion (y compris carbanion) stabilisé.

Quelques rares composés ont été décrits où le déclencheur est une fonction aniline, notamment un brevet de la société Tropix, Inc (anciennement propriété de Perkin Elmer et maintenant de la société Applied Biosystems).²¹⁰ Les revendications sont cependant très sommaires, et aucun rendement quantique n'est donné. Un substrat peptidique est lié directement à l'aniline du chémiluminophore. Lorsque le peptide est coupé par l'enzyme la chémiluminescence est émise (Figure 3 - 2).

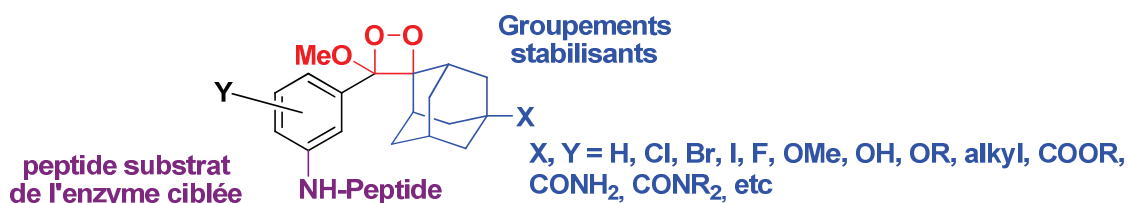


Figure 3 - 2 : Composés chémiluminescents décrits dans le brevet de Tropix, Inc

Le groupe de M. Matsumoto a aussi synthétisé des chémiluminophores azotés.²¹¹ Cependant, la luminescence reste faible. Cela est dû à un mauvais transfert d'électrons car à pH physiologique, l'aniline libre ne peut pas exister sous sa forme déprotonnée (pKa ~ 4-5). Ce phénomène illustre le fait qu'il faut nécessairement, pour avoir une bonne émission de chémiluminescence, un donneur d'électrons chargé négativement en milieu physiologique. Les phénols (pKa ~ 10) et thiophénols (pKa ~ 6-7) sont donc les candidats de choix pour obtenir un 1,2-dioxétane déclenchable en milieu physiologique.

Les chémiluminophores 1,2-dioxétanes à phénol sont étudiés depuis longtemps et diverses structures ont été synthétisées. Nous pouvons citer les travaux pionniers d'A. P. Schaap,²¹² de l'entreprise Lumigen Inc (propriété maintenant de la société Beckman Coulter),²¹³ ceux du groupe de M. Matsumoto²¹⁴ et les structures originales du groupe de W. J. Baader.²¹⁵ La figure suivante (Figure 3 - 3) présente quelques exemples de structures décrites dans les différentes publications de ces groupes.

²¹⁰ Bronstein, I., Edwards, B., Martin, C., Sparks, A. and Voyta, J. C. (TROPICX, INC.).Dioxetane compounds for the chemiluminescent detection of proteases, methods of use and kits therefore, WO 96/24849, 1996

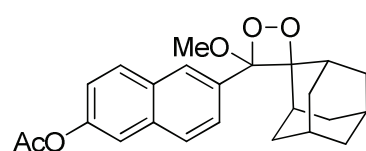
²¹¹ Watanabe, N., Ichikawa, M., Ono, A., Murakami, H. and Matsumoto, M., *Chem. Lett.*, **2005**, *5*, 718.

²¹² Schaap, A. P., Handley, R. S. and Giri, B. P., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *9*, 935.

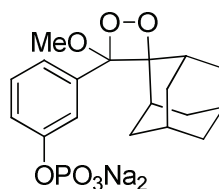
²¹³ Shamsipur, M. and Chaichi, M. J., *Luminescence*, **2002**, *5*, 299.

²¹⁴ Matsumoto, M., Watanabe, N., Hoshiya, N. and Ijuin, H. K., *Chem. Rec.*, **2008**, *4*, 213.

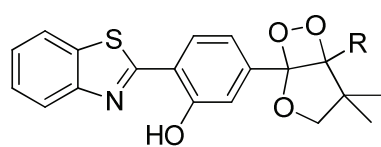
²¹⁵ Ciscato, L. F. M. L., Weiss, D., Beckert, R. and Baader, W. J., *J. Photochem. Photobiol., A*, **2011**, *1*, 41.



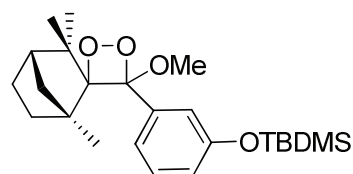
A. P. Schaap



Lumigen Inc.

R = Me, Et, *i*-Pr, *t*-Bu, H

M. Matsumoto



W. J. Baader

Figure 3 - 3 : Exemples de 1,2-dioxétanes présents dans la littérature

Le seul exemple décrit actuellement dans la littérature de 1,2-dioxétanes avec comme déclencheur un thiophénol est issu des travaux de P.Y. Renard lors de son stage post-doctoral dans le groupe de C. Mioskowski.^{216,217} Le chémiluminophore décrit a précédemment été présenté dans le premier chapitre (*vide supra*). Il a été utilisé pour détecter l'acétylcholinestérase *via* sa réaction avec la thiocholine (Figure 3 - 4).

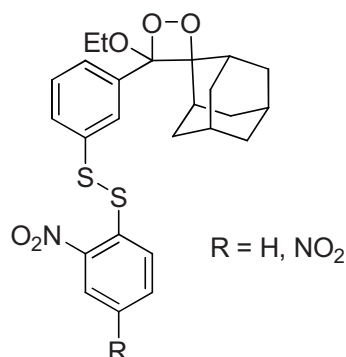
R = H, NO₂

Figure 3 - 4 : Chémiluminophore avec un thiophénol comme déclencheur

1.2. Choix des groupements stabilisants

Pour stabiliser le cycle 1,2-dioxétane, celui-ci a besoin à la fois d'être enrichi au moyen d'un groupement ou substituant donneur mais aussi d'être encombré stériquement.

Parmi les différentes structures « stabilisantes » décrites dans la littérature, deux types de groupements encombrants sont principalement utilisées. L'adamantane est le groupement

²¹⁶ Sabelle, S., Renard, P.-Y., Pecorella, K., de Suzzoni-Dézard, S., Créminon, C., Grassi, J. and Mioskowski, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *17*, 4874.

²¹⁷ Grassi, J., Sabelle, S. and Renard, P.-Y. (CEA). Composés 1,2-dioxétanes, leur préparation et leur utilisation pour le dosage de thiols et de l'acétylcholinestérase, FR2789075, 2000

stabilisant « historique » des 1,2-dioxétanes, il a été et est encore utilisé dans de très nombreuses structures dont certaines sont aujourd'hui commercialisées.²¹⁸

Depuis maintenant 15 ans, le groupe de M. Matsumoto²¹⁹ a développé une structure fondée sur un motif dihydrofurane (Figure 3 - 5). Le cycle 1,2-dioxétane est à la fois enrichi en électrons et stabilisé grâce à l'adjonction d'un second cycle. Le temps de demi-vie est significativement augmenté. Il a été estimé à 5,9 années pour R = *i*-Pr et 22,1 années pour R = *t*-Bu, à comparer avec 3,8 années pour l'équivalent adamantyle de cette structure.

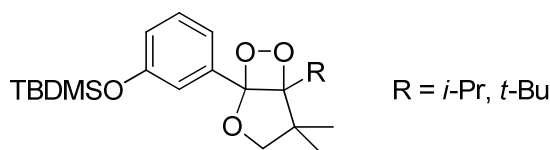


Figure 3 - 5 : Structure d'un 1,2-dioxétane plus stable

Après avoir exploré les groupes adamantyles pour stabiliser le dioxétane,^{220,221} qui étaient fonctionnels, mais manquaient de stabilité, nous avons choisi de travailler avec ce type de 1,2-dioxétanes pour développer nos sondes chémiluminescentes. C'est pourquoi, les structures présentées dans la suite de ce manuscrit sont basées sur ce type de cycle.

Un dernier exemple récemment synthétisé par le groupe de M. Matsumoto implique le remplacement du cycle dihydrofurane par un cycle *N*-acylpyrrolidine.²²²

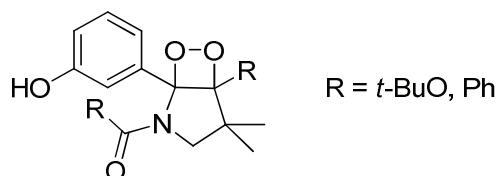


Figure 3 - 6 : 1,2-dioxétanes basés sur un cycle *N*-acylpyrrolidine

Ces composés présentent des durées de demi-vie supérieures à la version dihydrofurane avec respectivement 33,7 années pour R = *t*-BuO et 27,8 années pour R = Ph.

Il est possible d'influencer la longueur d'onde d'émission du chémiluminophore en modifiant la structure du déclencheur. Si nous comparons un chémiluminophore à phénol avec un chémiluminophore à aniline (Figure 3 - 7),²²³ nous remarquons que l'émission se situe dans le rouge

²¹⁸ Lumigen Inc. ou Tropix Inc. (Applied Biosystems) www.appliedbiosystems.com

²¹⁹ Matsumoto, M., Watanabe, N., Kasuga, N. C., Hamada, F. and Tadokoro, K., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 16, 2863.

²²⁰ Richard, J.-A., Jean, L., Romieu, A., Massonneau, M., Noack-Fraissignes, P. and Renard, P.-Y., *Org. Lett.*, **2007**, 23, 4853.

²²¹ Richard, J.-A., Jean, L., Schenkels, C., Massonneau, M., Romieu, A. and Renard, P.-Y., *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, 14, 2941.

²²² Matsumoto, M., Sano, Y., Watanabe, N. and Ijuin, H. K., *Chem. Lett.*, **2006**, 8, 882.

²²³ Watanabe, N., Ichikawa, M., Ono, A., Murakami, H. and Matsumoto, M., *Chem. Lett.*, **2005**, 5, 718.

(642 nm) pour celui à aniline et dans le bleu (469 nm) pour celui à phénol. En revanche, le rendement quantique de chémiluminescence chute drastiquement et passe de 20% pour le chémiluminophore à phénol à 0,00048% pour celui à aniline. Comme expliqué précédemment, cela est dû au mauvais transfert électronique de l'aniline vers le dioxétane à pH physiologique.

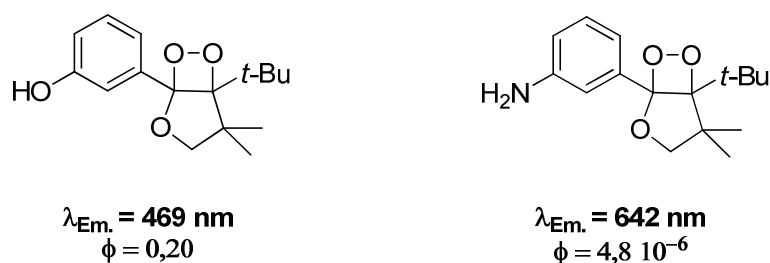


Figure 3 - 7 : Comparaison des déclencheurs

Afin de déplacer la longueur d'onde d'émission vers le rouge et de garantir un bon rendement quantique au système, il est nécessaire de garder un phénol ou un thiophénol comme déclencheur et de travailler sur le chromophore lié au cycle dihydrofurane.

1.3. Choix du chromophore

L'utilisation de polycycles aromatiques ou hétéro-aromatiques plus complexes qu'un phényle (450-500 nm) ou un naphthyle (500-550 nm) permet de déplacer les longueurs d'onde vers le rouge ou le proche infrarouge afin de pouvoir utiliser la chémiluminescence dans des contextes biologiques *in cellulo* ou *in vivo*.

Dans cette optique, le groupe de M. Matsumoto a décrit la synthèse d'un dioxétane émettant dans le proche infrarouge²²⁴ (709 nm) par l'introduction d'un anthracène. Le rendement quantique de chémiluminescence est cependant très faible puisqu'il culmine à 0,004% (Figure 3 - 8).

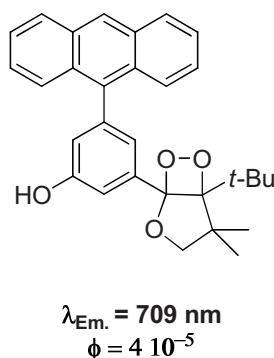


Figure 3 - 8 : Chémiluminophore émettant dans le proche infrarouge (solvant : benzène)

Il est aussi intéressant de citer pour la suite de la présentation les travaux effectués, encore une fois par le groupe de M. Matsumoto, portant sur la modification d'émission de lumière de dérivés

²²⁴ Matsumoto, M., Kasai, D., Yamada, K., Fukuda, N., Watanabe, N. and Ijuin, H. K., *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 43, 8079.

naphtaléniques en fonction de la position du groupement hydroxyle du déclencheur.²²⁵ En effet, cette équipe a synthétisé différents isomères de position de dioxétanes et a analysé les propriétés de chémiluminescence de ces composés. Elle a mis en évidence un effet « odd/even » (pair/impair) (Figure 3 - 9). Pour résumer, la position du phénol sur le cycle naphtalène permet de prédire le type d'émission de chémiluminescence résultant (« glow » ou « flash »).

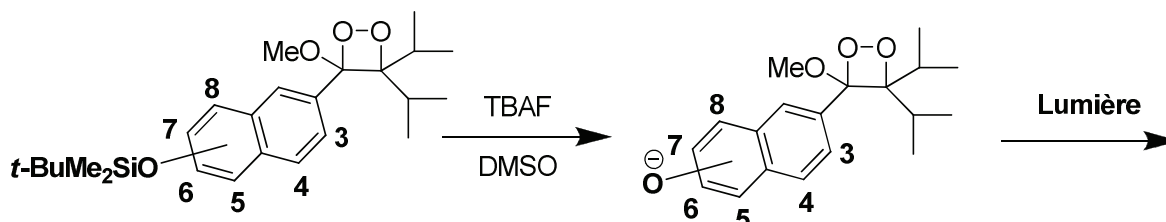


Figure 3 - 9 : Comparaison des émissions de chémiluminescence en fonction de la substitution

Les propriétés de chémiluminescence sont rassemblées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3 - 1).

Substitution	λ_{\max} (en nm)	Φ_{CL}	Type de luminescence	$t_{1/2}$ (en s)
Isomère 3	460	$2,7 \cdot 10^{-4}$	« glow »	7,3
Isomère 4	496	$5,2 \cdot 10^{-2}$	« flash »	0,076
Isomère 5	628	$7,4 \cdot 10^{-3}$	« glow »	4,8
Isomère 6	470	$3,2 \cdot 10^{-6}$	« flash »	0,15
Isomère 7	558	$5,6 \cdot 10^{-2}$	« glow »	250
Isomère 8	560	$3,7 \cdot 10^{-4}$	« flash »	0,24

Tableau 3 - 1 : Comparaison des propriétés d'émission de chémiluminescence (DMSO)

Nous pouvons remarquer que les valeurs de longueurs d'onde varient énormément allant de 460 à 628 nm. Les rendements quantiques varient également beaucoup en fonction de la substitution, allant jusqu'à un facteur 1000 entre la position 4 et la position 6. La durée de demi-vie des chémiluminophores est aussi importante puisqu'elle permet de déterminer le type de chémiluminescence résultante : « glow » ou « flash ». Ainsi, sur la position 4, nous aurons clairement une émission de type « flash » alors que la position 7 sera plutôt une émission de type « glow » persistante sur plusieurs dizaines de minutes. Ce tableau nous sera donc très utile par la suite afin de déterminer le meilleur candidat pour notre synthèse en fonction de l'application que nous souhaitons cibler. En effet, une chémiluminescence de type « glow » permet de détecter des événements sur le long terme alors qu'une chémiluminescence de type « flash » permet la détection de (bio)analytes à des concentrations beaucoup plus faibles. C'est pourquoi, il est nécessaire de choisir le meilleur compromis en fonction de la cible. Ces résultats peuvent, de plus, s'appliquer à d'autres chromophores comme les 7-hydroxycoumarines (*vide infra*).

²²⁵ Watanabe, N., Kobayashi, H., Azami, M. and Matsumoto, M., *Tetrahedron*, **1999**, 22, 6831.

Nous avons développé dans la suite de ce manuscrit la synthèse de nouveaux 1,2-dioxétanes en s'attachant plus particulièrement à modifier la partie chromophore.

2 Les chémiluminophores conjugués à des fluorophores organiques

Afin d'améliorer le rendement quantique de chémiluminescence, il peut être intéressant de lier le chémiluminophore à un fluorophore. Précédemment, nous avons ajouté des fluorophores-relais à la première sonde pour la caspase-3, que nous avons développée (cf Chap I).^{220,221} Ces fluorophores-relais formaient une cage hydrophobe autour du 1,2-dioxétane. Nous souhaitons maintenant développer des systèmes similaires mais cette fois-ci en attachant le fluorophore au chémiluminophore de manière covalente. L'utilisation d'un fluorophore-relais présente plusieurs avantages. Le premier est de pouvoir choisir le fluorophore en fonction de la longueur d'onde d'émission souhaitée. Le chémiluminophore doit émettre à une longueur d'onde proche de la longueur d'onde d'excitation du fluorophore afin d'avoir un transfert énergétique efficace. Le deuxième avantage est de pouvoir moduler les propriétés physico-chimiques du fluorophore afin de le rendre soluble dans l'eau par exemple. Plutôt que d'hydrosolubiliser une espèce chémiluminescente, il est en effet préférable de faire les modifications synthétiques nécessaires sur le fluorophore. Cela permet par exemple d'utiliser des fluorophores hydrosolubles déjà décrits ou encore d'apporter l'hydrosolubilité plus loin dans la synthèse, ce qui s'avère intéressant pour simplifier les étapes de synthèse et de purification. De plus, une modification directe du chémiluminophore est plus complexe synthétiquement, que l'utilisation de fluorophores hydrosolubles déjà développés.

2.1. Transfert d'énergie à travers l'espace

Le principe consiste à associer un chémiluminophore à un fluorophore de manière covalente. A l'instar de la BRET vu précédemment, nous aurons donc de la CRET (Chemiluminescence Resonance Energy Transfer). Nous pouvons citer notamment les travaux du groupe de K. Teranishi.²²⁶ Un chémiluminophore et une sulforhodamine 101 (commerciale sous le nom de Texas Red®) ont été greffés sur une cyclodextrine. Cette sonde est sensible à l'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ce système permet d'avoir une émission de chémiluminescence dans le rouge à 610 nm (longueur d'onde d'émission de la sulforhodamine 101) au lieu de 460 nm pour le chémiluminophore seul (Figure 3 - 10).

²²⁶ Teranishi, K., *Luminescence*, **2007**, 2, 147.

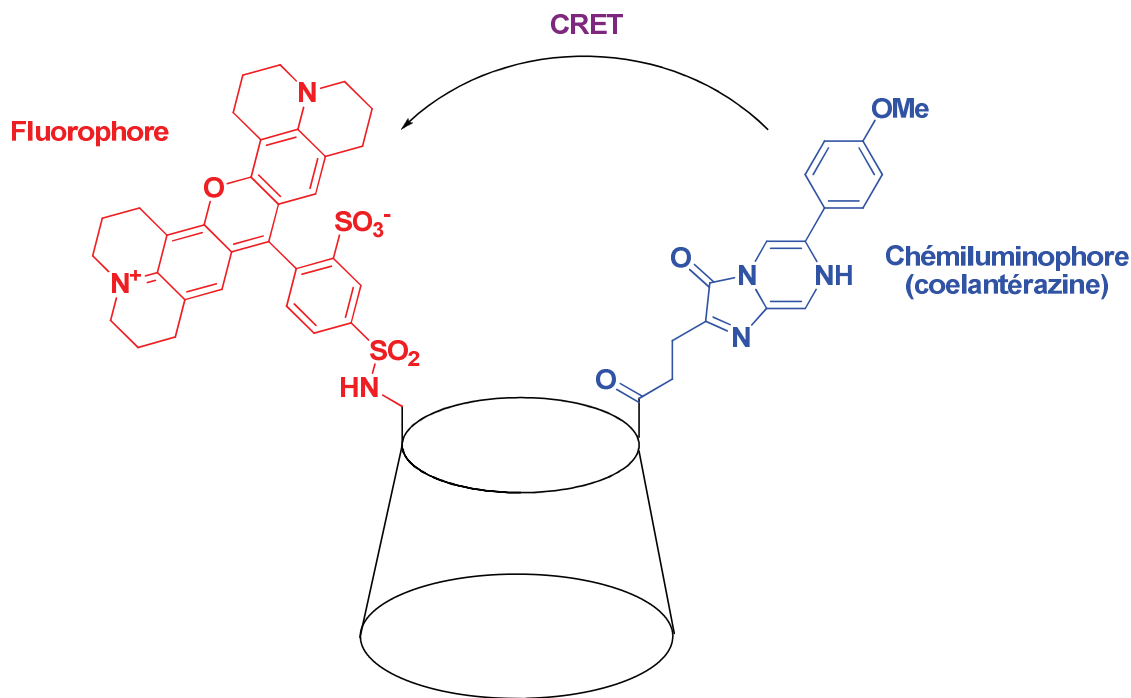


Figure 3 - 10 : Exemple d'utilisation de la CRET²²⁷

Un autre exemple structurellement plus proche de la première sonde chémiluminescente sensible à la caspase-3 développée au laboratoire, utilise un chémiluminophore de type 1,2-dioxétane et la fluorescéine.²²⁸ Les rendements quantiques de chémiluminescence en tampon aqueux sont comparés et un ratio de plus de 340 est obtenu entre le dérivé conjugué à la fluorescéine et celui non marqué (Figure 3 - 11). Utiliser un fluorophore-relais présente donc également un avantage pour améliorer l'émission de chémiluminescence dans les milieux aqueux. Bien que prometteuse, cette stratégie est un défi du point de vue synthétique car il faut prévoir un point d'accroche pour le fluorophore. Celui-ci doit, de plus, être greffé dans des conditions douces compatibles avec la stabilité du dioxétane.

²²⁷ Le chémiluminophore présenté n'est pas l'espèce qui émet de la lumière. Celui-ci n'émet de la lumière qu'une fois après avoir réagi avec le radical anion superoxyde.

²²⁸ Beck, S. and Koster, H., *Anal. Chem.*, **1990**, *21*, 2258.

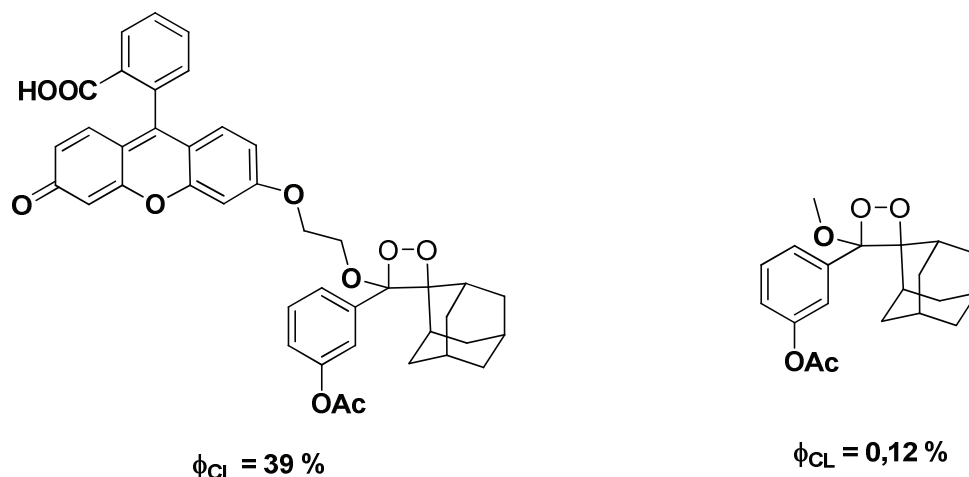


Figure 3 - 11 : Comparaison des rendements quantiques dans un milieu aqueux
(Déclenchement enzymatique : estérase, pH 9,2)

2.2. Transfert d'énergie à travers les liaisons

Une autre voie pour transférer de l'énergie de chémiluminescence vers un fluorophore organique est de les lier directement au moyen de triple(s) liaison(s) carbone-carbone, afin de transférer l'énergie à travers les liaisons. Cette voie a été initiée par le groupe de K. Burgess qui développe depuis plusieurs années des « cassettes » fluorescentes.²²⁹ Nous entendons par « cassettes » des structures constituées d'au moins deux fluorophores qui sont liés par un système permettant le transfert d'électrons à travers l'espace ou à travers les liaisons. Dans le cas d'un transfert à travers les liaisons, nous parlons de cassettes « TBET » pour (« Through-Bond Energy Transfer »).

Ainsi les cassettes développées par K. Burgess possèdent un donneur et un ou des accepteurs. Si le donneur est excité, il n'émet pas à sa longueur d'onde propre mais transfère l'énergie à travers les liaisons vers l'accepteur qui va ré-émettre à sa propre longueur d'onde (Figure 3 - 12) (*vide supra*).

²²⁹ Jiao, G.-S., Thoresen, L. H. and Burgess, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 48, 14668.

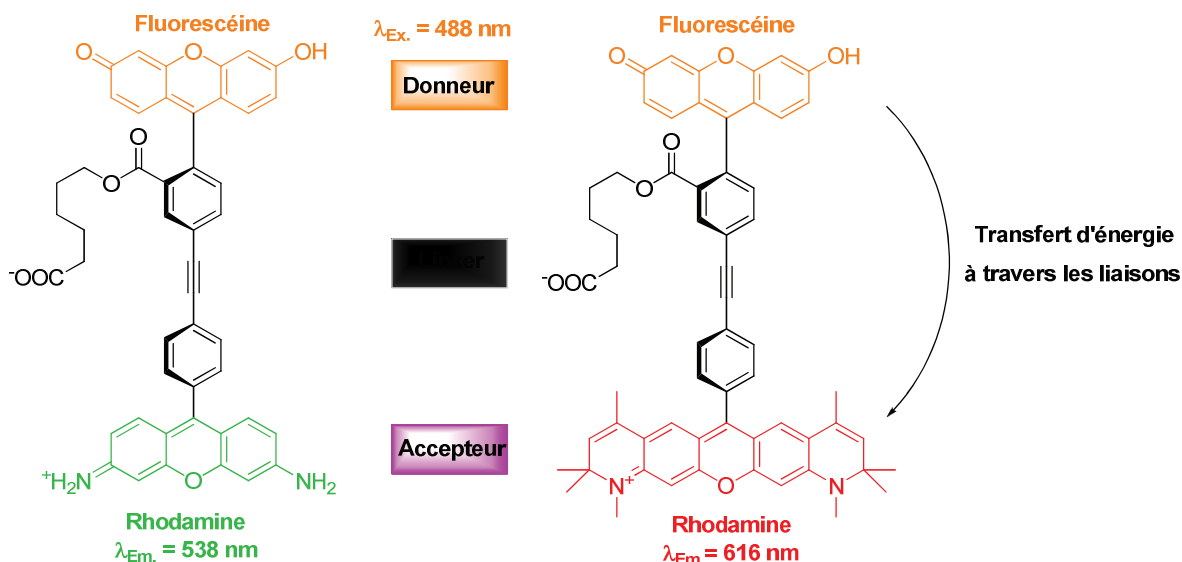


Figure 3 - 12 : Exemples de cassettes développés par le groupe de K. Burgess

Ce type de structures permet d'améliorer l'efficacité de transfert énergétique et d'augmenter le déplacement de Stokes apparent. Le groupe de K. Burgess a donc appliqué ce concept à la chémiluminescence en synthétisant la première « cassette » chémiluminescente.²³⁰ Pour cela, il a utilisé le luminol comme donneur qui est probablement le chémiluminophore le plus simple et le plus connu. Ce dernier a été associé à une benzophénoxazine d'une part et à la fluorescéine d'autre part. Comme nous pouvions nous y attendre, l'émission de chémiluminescence est observée à la longueur du fluorophore-relais (Figure 3 - 13).

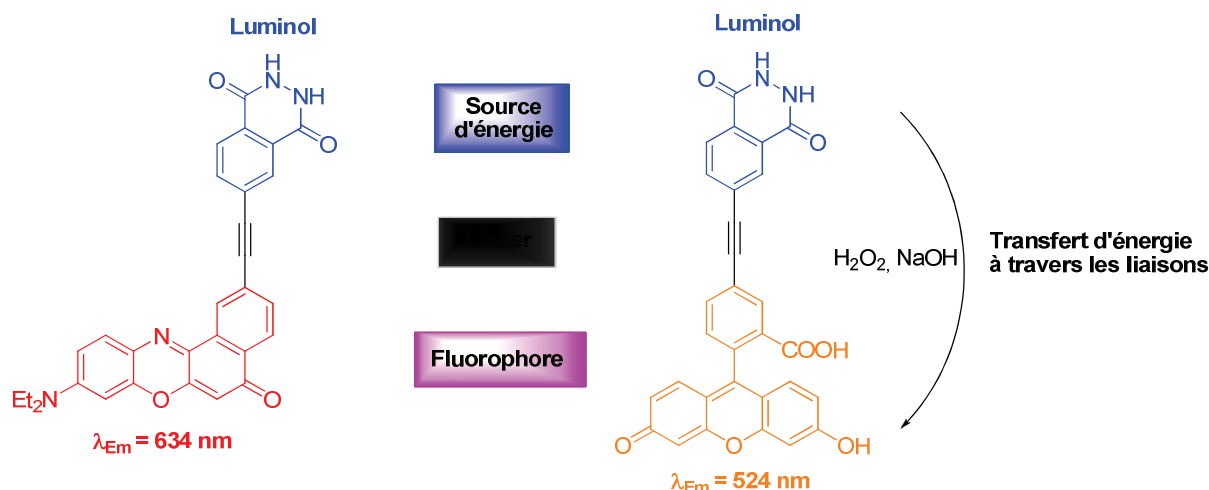


Figure 3 - 13 : Application des « cassettes » fluorescentes à la chémiluminescence

Les rendements quantiques de chémiluminescence ont ensuite pu être comparés à celui du luminol afin de vérifier que le transfert d'énergie est bien efficace. Ce dernier est de 61 % dans le cas de la fluorescéine et supérieur à 100% (en comparaison du luminol seul) dans le cas de la

²³⁰ Han, J., Jose, J., Mei, E. and Burgess, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *10*, 1684.

benzophénoxazine. Ceci prouve donc qu'il est possible de conserver un bon rendement quantique de chémiluminescence en émettant dans le rouge voire dans le proche infrarouge.

Nous avons utilisé ce système pour développer nos « cassettes » chémiluminescentes appliquées aux motifs 1,2-dioxétane. Celles-ci seront développées par la suite.

De plus, la suite de ce chapitre présentera également les diverses voies entreprises pour répondre à la problématique complexe de la chémiluminescence en milieux aqueux et donc à terme pour des applications *in vivo*.

II. Synthèse de nouveaux chémiluminophores

1 Synthèse et évaluation d'un hybride dioxétane-coumarine

1.1. Rappel du contexte

Dans le but d'améliorer le rendement quantique de chémiluminescence dans les milieux aqueux, une solution pourrait être la synthèse de cassettes à transfert d'énergie à travers l'espace. C'est dans cette optique que l'idée de lier directement un fluorophore organique à la partie chémiluminescente est née.²³⁰

Nous avons choisi d'utiliser comme précurseur de chémiluminophore le cycle dihydrofurane qui est à ce jour, un des plus stables et comme fluorophore, un dérivé du cœur 7-hydroxycoumarine (ou ombélliférone). Dans un premier temps, nous souhaitons obtenir une preuve de principe sur un modèle simple. Dans un second temps, nous souhaitons adapter ce modèle aux phénols fluorescents émettant dans le rouge et discutés au chapitre 2.

La 7-hydroxycoumarine présente l'avantage d'avoir un bon rendement quantique en milieu aqueux (76% à pH 7.5 dans le tampon PBS).²³¹ De plus, c'est un composé commercial et la synthèse a déjà été très étudiée (notamment *via* une réaction de Pechmann). Ce fluorophore possède également un caractère pro-fluorescent marqué. Enfin, le phénol de la coumarine a un pKa bas pour un phénol (7,8)²³² ce qui permet un déclenchement en milieu neutre ou dans un tampon modérément basique.

L'idée est donc de mimer la structure d'un 1,2-dioxétane classique **61** avec le phénol en position *mé*ta par rapport au chémiluminophore. C'est en effet dans cette position que l'efficacité de chémiluminescence est la meilleure (*vide supra*). Le squelette de la coumarine est bien adapté à cette substitution en *mé*ta. Nous souhaitons donc synthétiser cette coumarine **62** avec le cœur chémiluminescent substitué en position 5 de la coumarine (Figure 3 - 14).

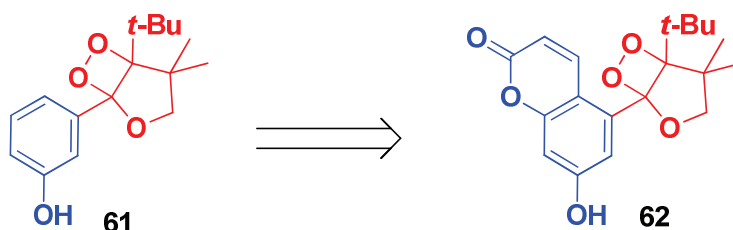


Figure 3 - 14 : Projet de cassettes chémiluminescentes

Nous espérons ainsi, par protection du phénol par un groupement acétylé (facilement éliminable chimiquement ou enzymatiquement), synthétiser le 1,2-dioxétane et déclencher la

²³¹ Setsukinai, K.-i., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 12, 2453.

²³² Adamczyk, M., Cornwell, M., Huff, J., Rege, S. and Rao, T. V. S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 15, 1985.

chémiluminescence en milieu aqueux au moyen d'une base ou mieux d'une estérase. Le transfert énergétique aurait alors lieu et nous aurions une émission de lumière à la longueur d'onde de la 7-hydroxycoumarine (~450 nm) (Figure 3 - 15). Si le spectre d'émission de chémiluminescence correspond au spectre d'émission de la coumarine, l'approche de cassette chémiluminescente sans transfert à travers les liaisons serait validée. De plus, l'ombélliférone étant fortement fluorescente en milieu aqueux, nous espérons nous affranchir de l'extinction de luminescence observée en milieu aqueux pour la plupart des chémiluminophores à phénol.

Ces travaux ont été effectués dans le cadre du stage post-doctoral du Dr. Jan Koci.²³³

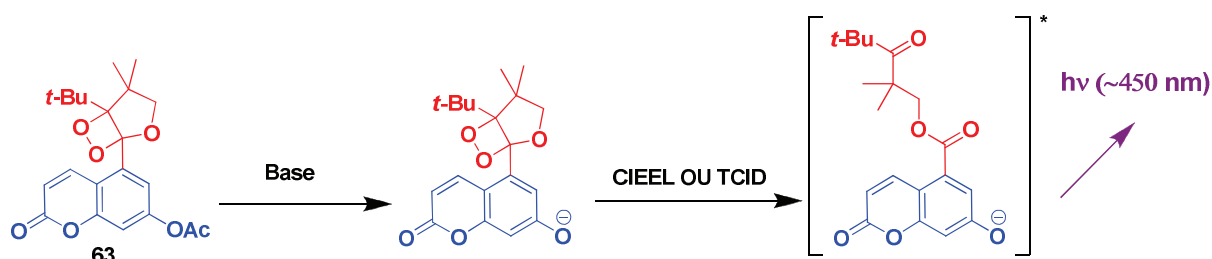


Figure 3 - 15 : Emission de chémiluminescence à la longueur d'onde de la 7-hydroxycoumarine

1.2. Synthèse

Le cycle dihydrofurane, précurseur du chémiluminophore, a pour la première fois été présenté par le groupe de M. Matsumoto.²¹⁹ A cette époque, il était synthétisé par une réaction de McMurry à partir du cétoester correspondant (Figure 3 - 16). La dernière étape étant toujours la formation du cycle 1,2-dioxétane à l'aide de l'oxygène singulet réactif vis-à-vis de la double liaison du cycle dihydrofurane.

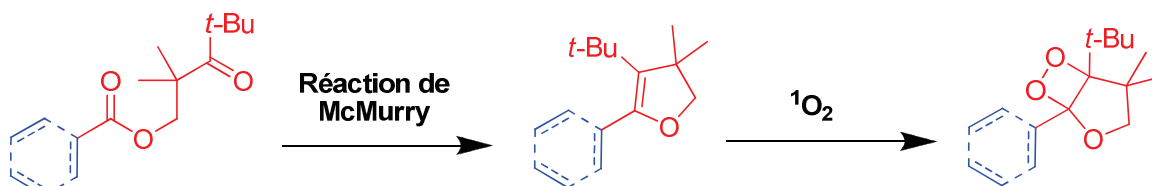


Figure 3 - 16 : Première voie de synthèse du cycle dihydrofurane

La synthèse a depuis été optimisée. L'étape clé est désormais une cyclisation intramoléculaire induite par un carbanion benzylique formé au moyen d'une base.²³⁴ L'étape suivante étant une réaction de déshydratation (Figure 3 - 17).

²³³ Stage Post-Doctoral de 12 mois financé par La Région Haute-Normandie (programme CRUNCH – CPER 2007-2013) puis CDD de 6 mois dans l'entreprise QUIDD

²³⁴ Matsumoto, M., Watanabe, N., Ishikawa, A. and Murakami, H., *Chem. Commun.*, **1997**, 24, 2395.

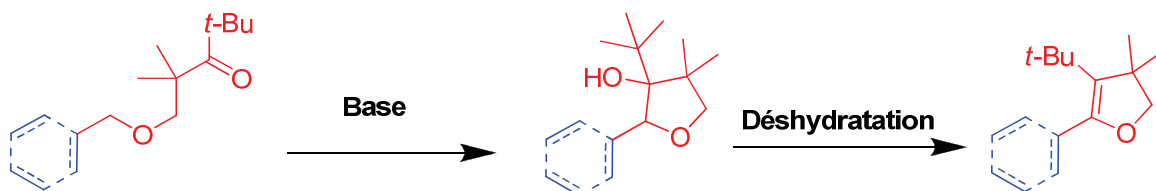


Figure 3 - 17 : Synthèse actuelle des cycles dihydrofurane

M. Matsumoto a montré que les meilleurs rendements de cyclisation étaient obtenus en utilisant comme base le dimsyle de potassium (obtenu par déprotonation du DMSO par le *tert*-butylate de potassium). Outre les très bonnes conversions (> 90%), cette méthode permet d'obtenir le seul diastéréoisomère *trans*. Ce contrôle de la stéréochimie nous intéresse peu car dans notre cas, nous recherchons à obtenir l'éther d'énol achiral (obtenu *via* la réaction d'élimination). En revanche, l'élimination (suivant un mécanisme E2) peut être facilitée si le groupement hydroxyle et le proton sont en position *trans* l'un par rapport à l'autre. Nous avons donc opté pour cette méthode de cyclisation (Figure 3 - 18).

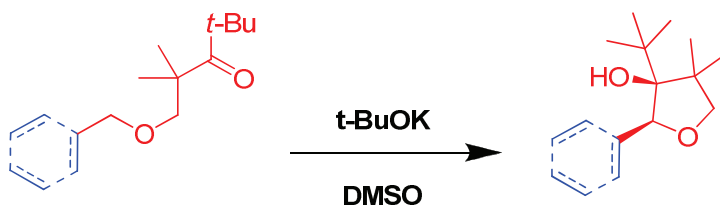


Figure 3 - 18 : Cyclisation à l'aide du dimsyle de potassium

Il faut noter que pour obtenir de bons rendements, cette méthode nécessite de contrôler très rigoureusement les conditions expérimentales. Le DMSO doit être parfaitement anhydre et le *t*-BuOK préalablement purifié (par sublimation).

Dans le but de synthétiser le composé **63**, nous avons choisi comme première voie de synthèse l'introduction d'une chaîne alcyne correctement fonctionnalisée directement sur la position 5 de la 7-méthoxycoumarine **66** préalablement obtenue *via* une condensation de Pechmann. La construction du cycle tétrahydrofurane **68** pourra alors s'effectuer dans un deuxième temps (Figure 3 - 19).

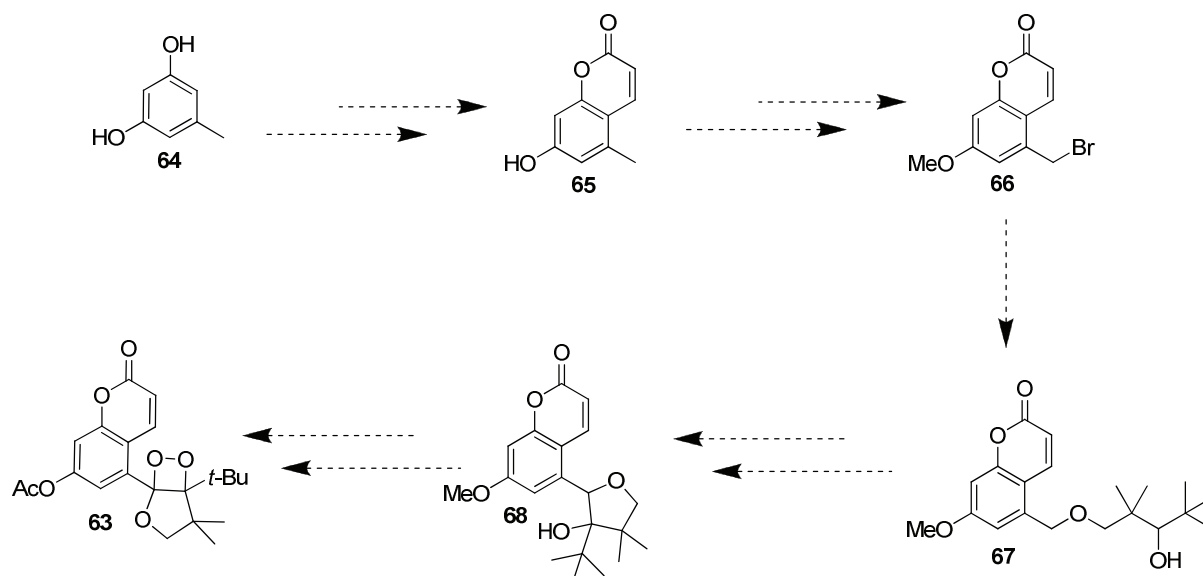


Figure 3 - 19 : Première voie de synthèse explorée pour la synthèse du chémiluminophore 63

La coumarine **65** a été synthétisée en deux étapes à partir du 5-méthylbenzène-1,3-diol **64** commercial. La première étape est une réaction de Vilsmeier-Haack au moyen du trichlorure de phosphore dans le DMF. Le composé **69** est obtenu avec un rendement moyen de 54%. La coumarine **65** est ensuite formée par l'addition d'un ylure de triphénylphosphonium sur le composé **69**, avec un bon rendement de 82%. Cette voie d'accès a été préférée à la formation directe de la coumarine **65** à partir du composé **64** au moyen d'une condensation de Pechmann, car cette dernière n'a pas donné de bons résultats (rendement de 23%) (Figure 3 - 20).

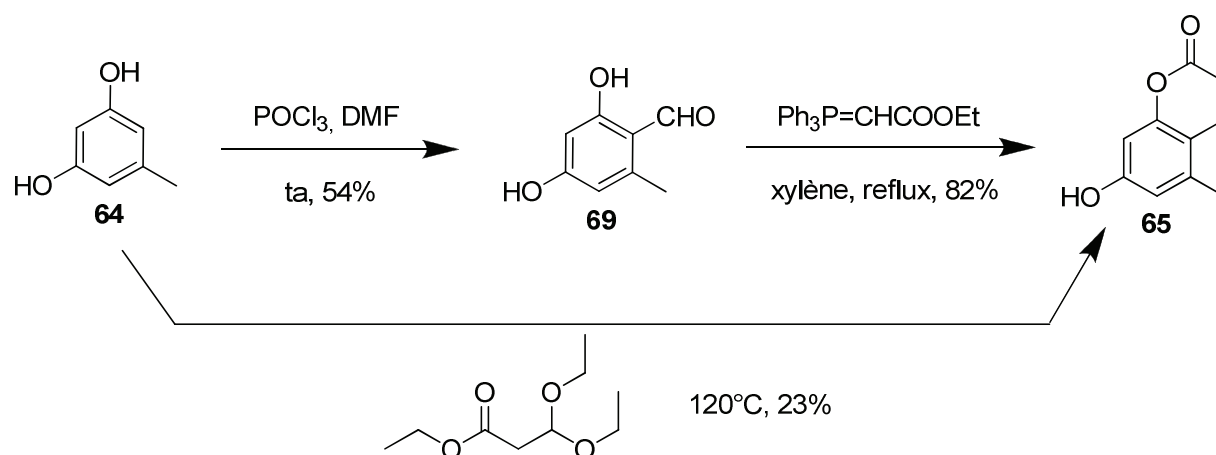


Figure 3 - 20 : Synthèse de la coumarine 65

Le phénol libre de la coumarine **65** a ensuite été protégé au moyen d'un groupement méthyle afin d'obtenir la coumarine **70**, avec un rendement faible (18%). Ce rendement n'a pas été optimisé car l'objectif premier était d'obtenir rapidement un substrat permettant de tester l'étape clé de cyclisation. La bromation radicalaire du méthyle en position 5 de la coumarine a eu lieu au moyen du

N-bromosuccinimide et du peroxyde de benzoyle dans le tétrachlorure de carbone. La coumarine bromée **66** est obtenue avec un rendement moyen de 53% (Figure 3 - 21).

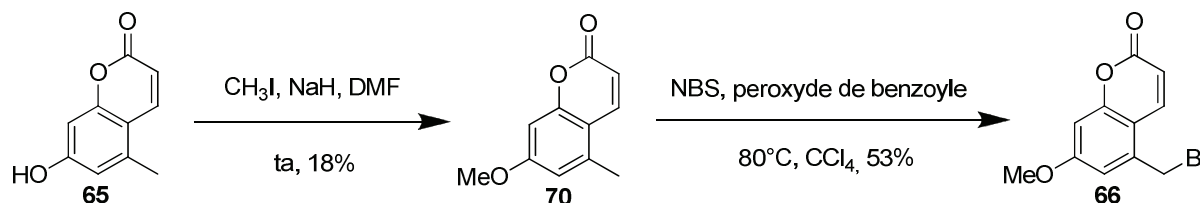


Figure 3 - 21 : Synthèse de la coumarine bromée **66**

La coumarine **66** a ensuite été engagée dans une étape de substitution nucléophile avec le diol **71** précédemment synthétisé en 3 étapes. Cette substitution a lieu en présence de NaH dans le DMF avec un rendement de 90%. L'alcool secondaire **67** est ensuite oxydé au moyen du chlorochromiate de pyridinium (PCC) en présence de célite dans le dichlorométhane. La coumarine **72** est obtenue avec un rendement de 67% (Figure 3 - 22). L'utilisation de la célite permet d'améliorer l'élimination ultérieure du PCC lors des étapes de traitement mais aussi d'éliminer les sels de chrome (III) provenant de la réduction de chrome (VI). De plus, la célite présente dans le milieu réactionnel permet de limiter la formation d'amalgame métal-alcool. Les autres méthodes plus douces et moins polluantes d'oxydation comme une réaction de Swern, l'utilisation de l'IBX ou bien le mélange TPAP/NMO (tétrapropylammonium perruthénate / *N*-méthylmorpholine-*N*-oxyde) n'ont pas permis d'obtenir des rendements suffisamment élevés pour être exploitables dans la suite de la synthèse.

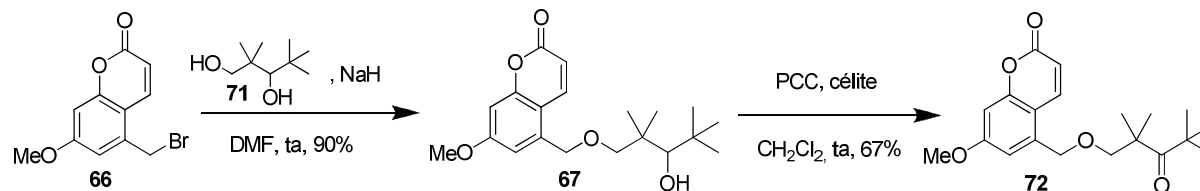


Figure 3 - 22 : Synthèse de la coumarine substituée **72**

Le diol **71** est l'intermédiaire que nous avons utilisé systématiquement pour la formation des cycles tétrahydrofurane. Il est synthétisé en trois étapes à partir de l'éthyle pivaloylacétate **73** commercial. Il est doublement méthylé en deux étapes au moyen de l'iodure de méthyle. La première méthylation est réalisée à l'aide du carbonate de potassium comme base pour obtenir le composé **74** avec un très bon rendement de 93%. La deuxième est faite en présence de *t*-BuOK qui est une base plus forte que le carbonate de potassium. Le cétoester **75** est obtenu avec un rendement de 78%. Nous obtenons un meilleur rendement quand la double méthylation est faite en deux étapes. La dernière étape est la réduction simultanée de l'ester et de la cétone au moyen de l'hydruure d'aluminium lithium (AlLiH₄). Le diol **71** est alors obtenu avec un bon rendement de 94% (Figure 3 - 23).

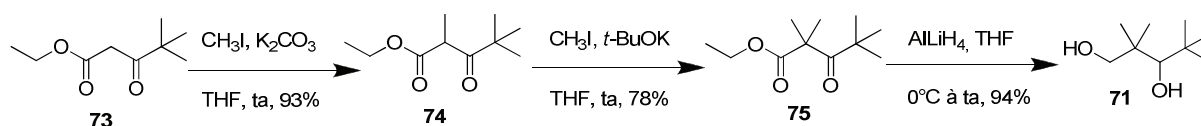
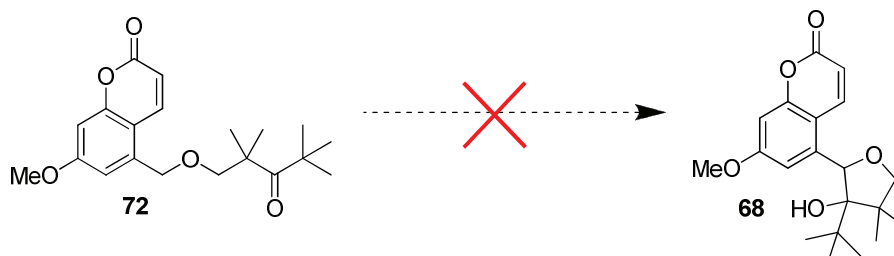


Figure 3 - 23 : Synthèse de l'intermédiaire diol 71

L'étape suivante est la cyclisation de la coumarine **72** au moyen d'une base forte (Figure 3 - 24).

Figure 3 - 24 : Essai de cyclisation du composé **72** en vue de l'obtention de la coumarine **68**

Les essais menés à l'aide de diisopropylamide de lithium (LDA) ou de diéthylamide de lithium n'ont pas permis d'obtenir le produit cyclisé. Les essais menés dans les conditions décrites par M. Matsumoto²³⁴ (*vide supra*) avec la formation *in situ* du dimsyle de potassium par la dissolution du *tert*-butylate de potassium dans le DMSO n'ont pas permis non plus d'obtenir une cyclisation menant au composé **68** (Tableau 3 - 2).

Entrée	Base	Solvant	Température	Résultats
1	LDA	THF	-78°C	Produit de départ
2	Diéthylamide de lithium	THF	-78°C	Produit de départ
3	<i>t</i> -BuOK	DMSO	10°C	Produit de départ

Tableau 3 - 2 : Essais de cyclisation de la coumarine **72**

Nous pouvons supposer que la délocalisation électronique de la structure coumarine abaisse de manière importante la nucléophilie du carbanion benzylique formé. La cyclisation ne peut donc pas avoir lieu. Des essais avec des bases encore plus fortes pourraient très certainement conduire à la destruction de la structure coumarine qui est en général instable dans des conditions fortement basiques.

La synthèse a donc été modifiée en conséquence. Le cycle tétrahydrofurane **77** serait synthétisé en premier à partir du composé commercial **76**. La coumarine **78** serait ensuite formée, afin d'obtenir dans un dernier temps, le 1,2-dioxétane **63** (Figure 3 - 25).

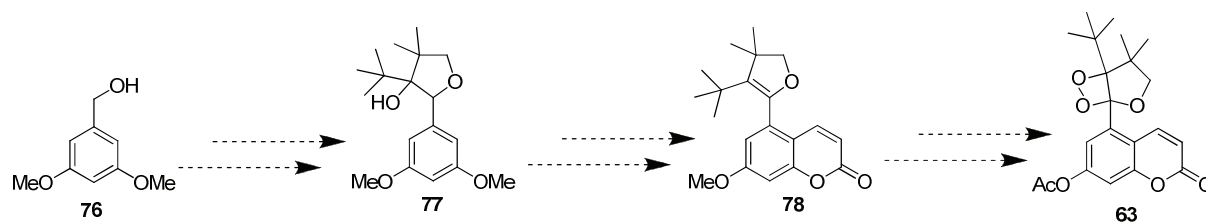
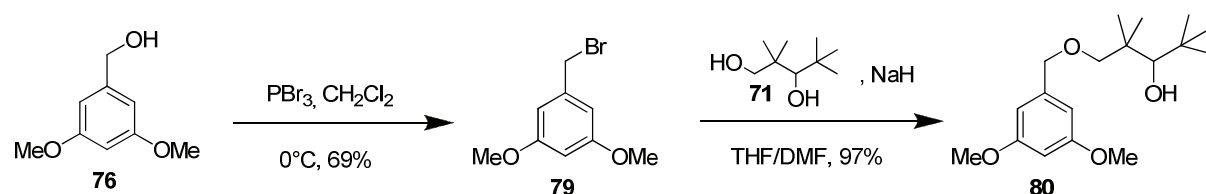
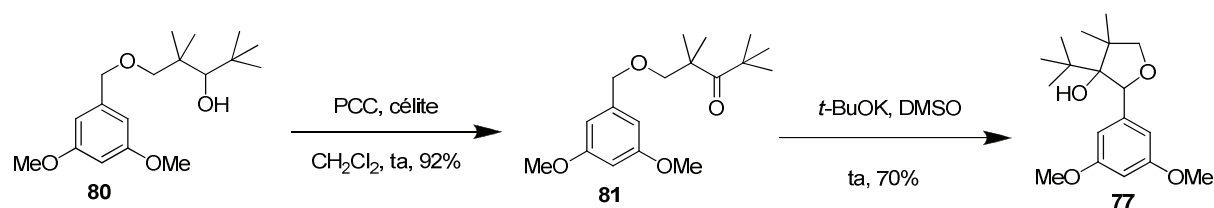


Figure 3 - 25 : Voie de synthèse alternative pour l'obtention de 3

Le 1,2-dioxétane coumarinique **63** a donc été synthétisé en partant du (3,5-diméthoxyphényl) méthanol commercial **76**. L'alcool primaire **76** a été bromé au moyen du tribromure de phosphore (PBr_3) pour obtenir le composé bromé **79** correspondant avec un rendement correct de 69%. Ce composé bromé **79** a ensuite été substitué au moyen du diol **71** précédemment décrit. La réaction a lieu en présence de NaH dans un mélange THF/DMF pour obtenir le composé **80** avec un excellent rendement de 97% (Figure 3 - 26).

Figure 3 - 26 : Synthèse de l'alcool **80**

L'alcool **80** a ensuite été oxydé au moyen du PCC en présence de célite. La cétone **81** est obtenue avec un très bon rendement de 92%. La cyclisation, qui posait problème dans la première voie de synthèse, est cette fois très efficace puisque le cycle tétrahydrofurane **77** est obtenu avec un bon rendement de 70%. La base utilisée dans ce cas est le dimsyle de potassium (Figure 3 - 27).

Figure 3 - 27 : Obtention du cycle tétrahydrofurane **77**

Afin d'obtenir la coumarine **78** à partir du résorcinol diméthylé **77**, un atome de brome a été introduit en position 1 du phényle. Par la suite, le but était de le substituer pour obtenir un motif carbonyle et de l'utiliser pour construire le cœur coumarine *via* une réaction de Wittig.

Après plusieurs essais infructueux, y compris d'acylation directe de l'aromatique en le formant avant ou après le cycle dihydrofurane, la manière la plus efficace que nous avons trouvée pour bromer sélectivement cette position a été d'utiliser le *N*-bromosuccinimide dans un mélange THF/eau (95:5 v/v). Le phényle bromé **82** est obtenu avec un bon rendement de 91%. Le cycle dihydrofurane **83** est ensuite formé par élimination d'une molécule d'eau. Cette réaction a lieu en présence de chlorure de

thionyle et de pyridine dans le dichlorométhane. L'alcool **82** est substitué par un atome de chlore ce qui entraîne une élimination immédiate et la formation du dihydrofurane **83**. Ce dernier est obtenu avec un rendement correct de 72% (Figure 3 - 28).

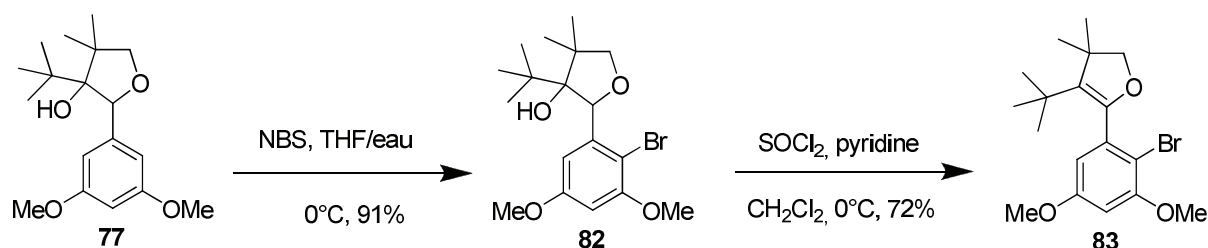


Figure 3 - 28 : Formation du cycle dihydrofurane **83**

Ensuite, nous avons réalisé un échange halogène/métal au moyen du *n*-BuLi dans le THF. Le lithien formé est ensuite piégé au moyen du chloroformate de méthyle pour donner l'ester **84** avec un rendement de 83%. Le benzaldéhyde **86** est alors obtenu en deux étapes. Tout d'abord, l'ester **84** est réduit en alcool primaire **85** en présence d'hydrure de diisobutylaluminium (DIBAL-H) avec un rendement de 73%. Puis, le benzaldéhyde **86** est formé par oxydation de l'alcool **85** au moyen de l'oxyde de manganèse (MnO₂) en solution dans le toluène anhydre. Nous avons constaté que cette réaction est très dépendante du fournisseur de l'oxyde de manganèse (Alfa Aesar dans notre cas).²³⁵ Le composé **86** a été obtenu avec un bon rendement de 73% (Figure 3 - 29).

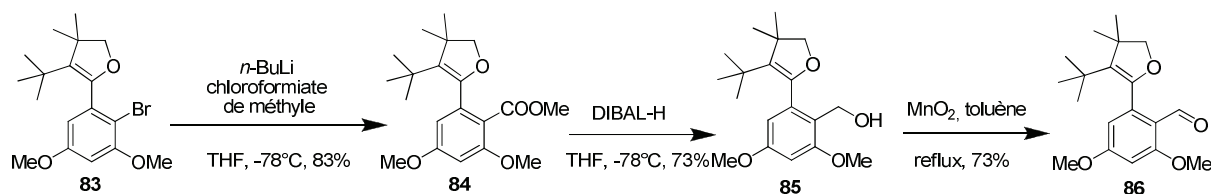


Figure 3 - 29 : Formation du benzaldéhyde **86**

L'accès final à la cible nécessite la déprotection des éthers méthyliques, et, si possible une déprotection sélective. Après plusieurs essais, la coumarine **78** a été formée en deux étapes à partir du benzaldéhyde **86** (Figure 3 - 30). La première étape est une déprotection sélective du groupement protecteur méthyle en position 2. Celle-ci s'effectue en présence de BCl₃ dans le dichlorométhane anhydre. La sélectivité est due à la présence de la fonction benzaldéhyde en *ortho* du groupement méthoxyle. Un effet de chélation sur l'oxygène du carbonyle favorise énergétiquement un méthoxyle par rapport à l'autre. Le précurseur de la coumarine **78** est obtenu avec un rendement de 78%. La coumarine **78** a ensuite pu être formée grâce à une réaction de Wittig et l'utilisation d'un sel de (2-éthoxy-2-oxoéthyl)triphenylphosphonium. La base *N,N*-diétylaniline est dans ce cas utilisée comme solvant. Les deux étapes suivantes consistent à changer le groupement protecteur du phénol afin de

²³⁵ Plus de détails sur ce problème dans la publication de :Clave, G., Ronco, C., Boutal, H., Kreich, N., Volland, H., Franck, X., Romieu, A. and Renard, P. Y., *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 3, 676.

le rendre labile en présence d'une base (ou d'une estérase) et de déclencher plus « facilement » la chémiluminescence. Le deuxième groupement méthoxyle a été enlevé dans des conditions plus dures, à savoir l'utilisation de trichlorure d'aluminium à reflux dans le dichlorométhane anhydre. Le rendement de déprotection pour obtenir la coumarine **88** est cependant quantitatif. Le groupement acétyle est ensuite ajouté dans des conditions classiques afin d'obtenir le composé **89** avec un bon rendement de 90% (Figure 3 - 30).

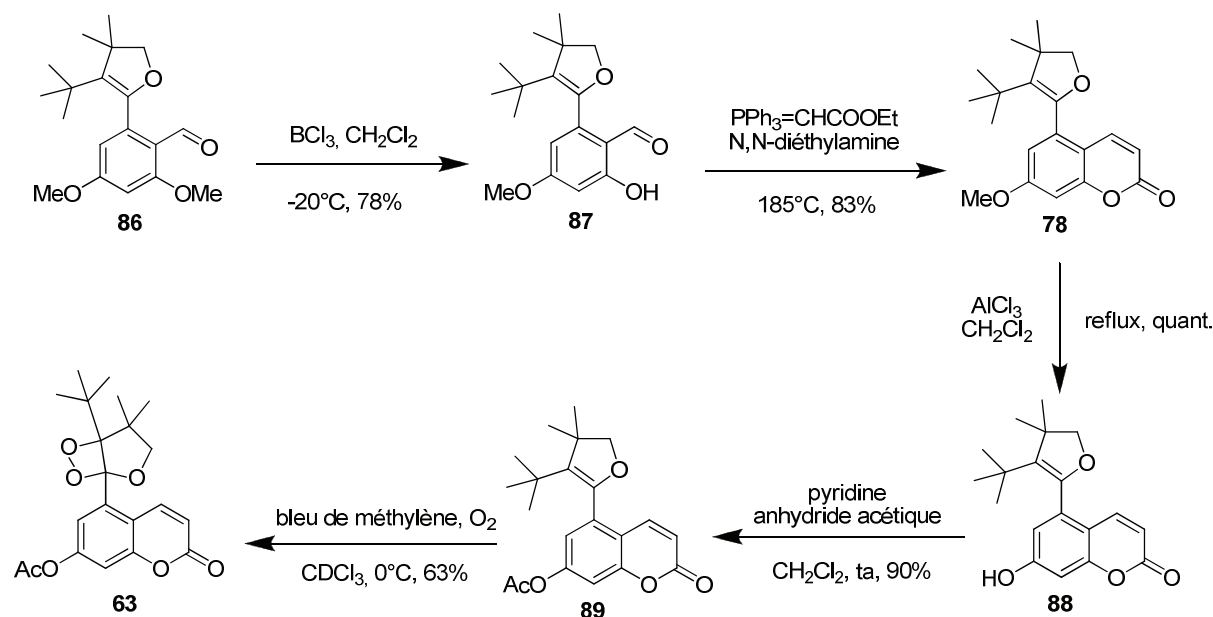


Figure 3 - 30 : Dernières étapes pour la synthèse du 1,2-dioxétane **63**

Le 1,2-dioxétane **63** est enfin obtenu par cycloaddition [2 + 2] au moyen de l'oxygène singulet généré *in situ*. Nous verrons par la suite qu'il existe principalement deux méthodes pour générer l'oxygène singulet *in situ*. Dans ce cas, nous avons utilisé la plus simple à mettre en œuvre, c'est-à-dire, l'utilisation d'un photosensibilisateur de type II.^{236,237} Du bleu de méthylène (~1% en masse par rapport au produit) est mis en solution dans le chloroforme deutéré en présence de la coumarine **89** sous une atmosphère d'oxygène. Le solvant est ensuite irradié à 0°C au moyen d'une lampe halogène, type « lampe de jardin » d'une puissance de 300 W, pendant une durée pouvant aller de 10 min à quelques heures (suivi de l'avancement de la réaction par CCM ou HPLC analytique). Dans ce cas, le produit final est récupéré après concentration du solvant et purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement particulièrement correct pour ce type de réaction de 63%.

Il est important de noter que l'oxygène singulet a une durée de vie plus importante dans les solvants ne comportant pas d'atomes d'hydrogène, c'est pourquoi nous utilisons le chloroforme deutéré. Il

²³⁶ Pour une explication sur les différences entre les réactions de photosensibilisation de type I et II : Greer, A., *Acc. Chem. Res.*, **2006**, *11*, 797.

²³⁷ Ogilby, P. R., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *8*, 3181.

est aussi possible d'utiliser le tétrachlorure de carbone (CCl_4). Il est cependant plus toxique et donc à déconseiller.

Il est possible d'utiliser d'autres photo-sensibilisateurs de type II pour cette réaction. Il existe notamment le rose bengale (analogue de fluorescéine poly-halogénés) ou encore la TPP (tétraphénylporphyrine). Dans notre cas, le bleu de méthylène était à notre disposition et la réaction a fonctionné avec ce photosensibilisateur. Cependant, il peut être utile de varier la nature du photosensibilisateur en fonction de la source lumineuse. Chacun ayant une gamme sur le spectre d'absorption bien déterminée. Le tableau suivant présente les caractéristiques des trois photosensibilisateurs couramment utilisés pour générer l'oxygène singulet *via* un processus photochimique (Tableau 3 - 3).

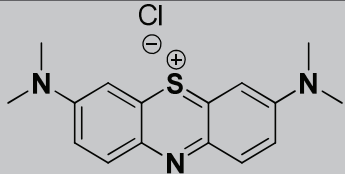
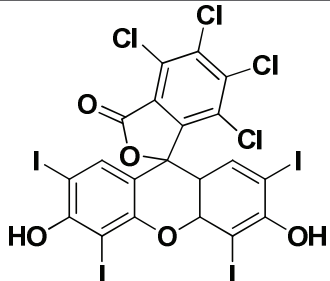
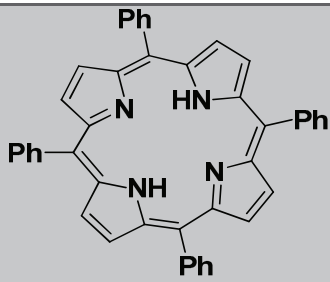
Nom et structure	Masse molaire (en g.mol^{-1})	Absorption (en nm)	Coefficient d'absorption molaire ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
 Bleu de méthylène	319,85	609 et 668	74 000 (668 nm)
 Rose Bengale	973,67	559	90 400
 Tétraphénylporphyrine	614,74	515	18 900

Tableau 3 - 3 : Caractéristiques des photo-sensibilisateurs couramment utilisés pour générer l'oxygène singulet

Les photosensibilisateurs fonctionnent à l'inverse des fluorophores. Leur structure doit favoriser au maximum les transferts d'énergie non-radiatifs afin de réaliser le passage de l'oxygène triplet à

l'oxygène singulet. C'est pourquoi, le rose Bengale comporte autant d'atomes de chlore et d'iode car ils sont connus pour favoriser les transferts d'énergie non-radiatifs.

Une fois la synthèse du dioxétane **63** effectuée, des analyses ont pu être faites par RMN du proton et du carbone ainsi que des analyses de masse électrospray (Figure 3 - 31). Celles-ci ont confirmé la structure de notre produit. Il a pu ensuite être étudié dans des tests de déclenchement de chémiluminescence.

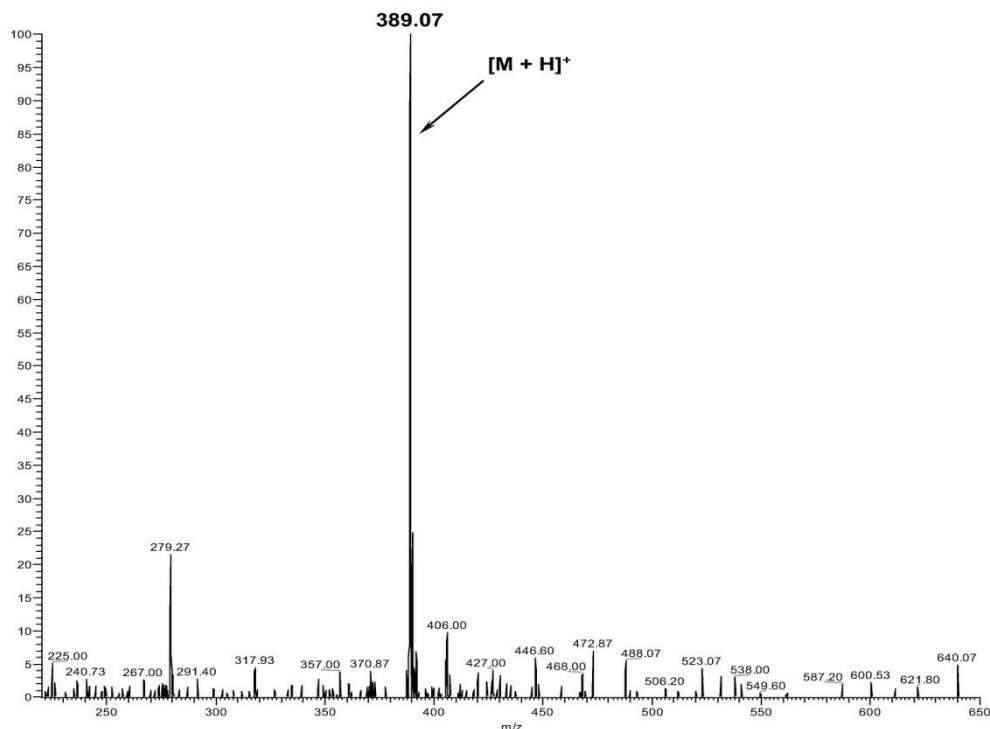


Figure 3 - 31 : Spectre de masse ESI (enregistré en mode positif) du composé finale

Un profil HPLC a de plus été enregistré afin de vérifier la pureté du composé **63**. La pureté est de 85%, les 15 % restants correspondent au produit d'ouverture du 1,2-dioxétane (Figure 3 - 32 et Figure 3 - 32).

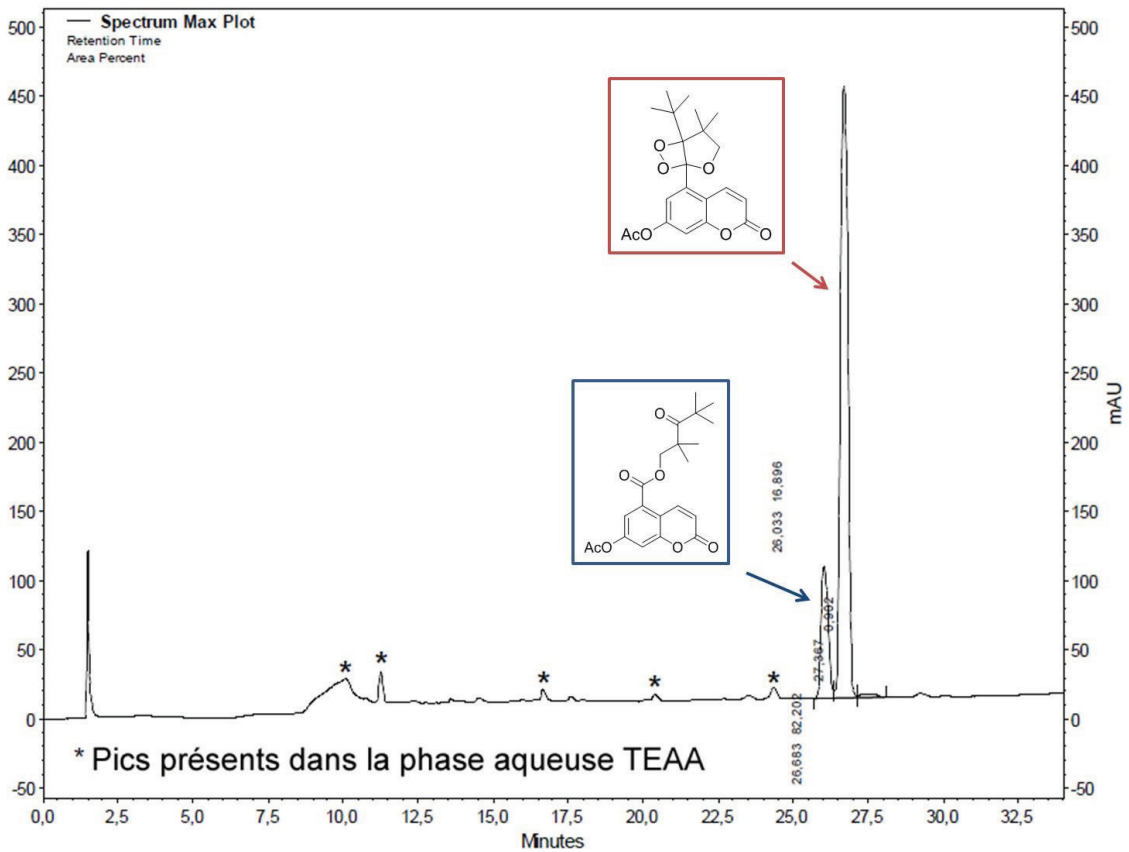


Figure 3 - 32 : Profil HPLC du composé final 63

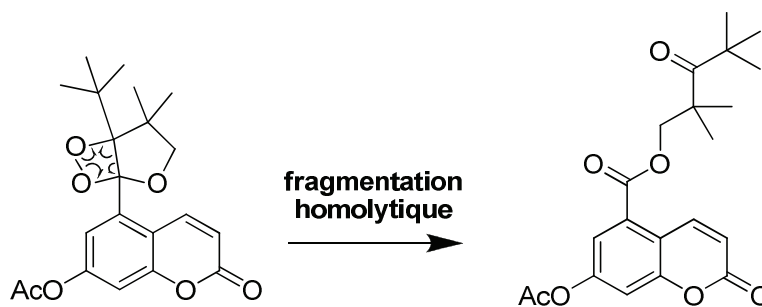


Figure 3 - 33 : Réaction de décomposition du produit final 63

1.3. Evaluation des propriétés de chémiluminescence

1.3.1 Tests de chémiluminescence en milieu aqueux

Le but de ces mesures est d'étudier le déclenchement de la chémiluminescence de la sonde **63** dans des conditions pseudo-physiologiques (tampon phosphate 100 mM, pH 7,5) *via* l'hydrolyse enzymatique de son motif acétate.

Du fait de sa disponibilité au laboratoire, nous avons choisi de travailler avec la lipase de *Mucor miehei* (fournisseur Fluka). Une étude bibliographique a montré que cette enzyme était compatible avec l'utilisation d'un co-solvant organique (de type DMSO ou isopropanol) ce qui permet d'envisager de travailler à des concentrations relativement élevées en sonde (10-50 μ M) tout en évitant les problèmes de précipitation.

Nous avons dans un premier temps enregistré le spectre d'émission de fluorescence (Ex. 320 nm) de la sonde **63** dans le tampon phosphate à 37°C (concentration : 30 μ M, concentration résiduelle en DMSO : 0,3%) afin de vérifier son caractère pro-fluorophore (Figure 3 - 34 – courbe bleue, à comparer avec après hydrolyse à la même concentration - courbe verte). Comme attendu une très faible émission résiduelle à 392 et 458 nm est observée.

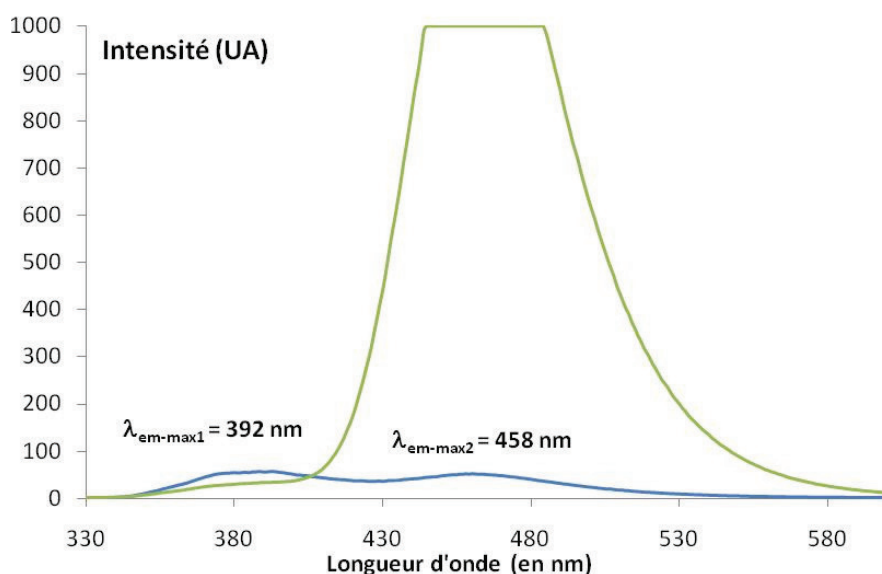


Figure 3 - 34 : Caractère pro-fluorescent du composé **63** – courbe bleue : avant hydrolyse, courbe verte : après hydrolyse

Ensuite, 0.72 U de lipase sont ajoutées et la réaction enzymatique est suivie entre 330 et 600 nm. Malheureusement, sur une période d'une heure, on ne constate aucune apparition de lumière se traduisant par une émission vers 460 nm.

Afin de confirmer que la réaction enzymatique a quand même bien eu lieu, nous avons enregistré à nouveau le spectre d'émission de fluorescence (Ex. 320 nm, Figure 3 - 34, courbe verte). Cette fois le

signal sature, ce qui confirme bien la libération dans le milieu de la 7-hydroxycoumarine fluorescente.

Une expérience similaire mais sans enzyme montre une légère hydrolyse non spécifique de la sonde **63**, donc la majeure partie de la coumarine libérée est due à l'action de la lipase.

Afin de vérifier si l'absence d'émission de lumière n'était pas due à une non déprotonation du 7-OH de la coumarine à pH 7,5 (ce qui est peu probable car à cette valeur de pH, la décomposition du dioxétane a du avoir lieu au moins en partie), le pH a été ajusté à 9,0 par ajout d'une solution aqueuse de potasse (aq. KOH) 1.0 M. Là encore, aucune émission de lumière n'a été enregistrée.

Pour vérifier que l'émission de chémiluminescence n'a pas lieu en milieu aqueux, des ajouts de sodés (1.0 M) ont été réalisés directement sur le composé **63** dans le tampon phosphate. Aucune chémiluminescence n'a été observée. Nous pouvons en conclure que dans notre système, l'émission de chémiluminescence est totalement « quenchée » en milieu aqueux.

1.3.2 Tests de chémiluminescence en milieu organique

Devant les échecs rencontrés avec le déclenchement de chémiluminescence en milieu aqueux, nous avons tout de même décidé d'étudier ses propriétés optiques en milieu organique afin de valoriser notre travail. Toutes les mesures suivantes ont été effectuées dans le DMSO.

Le spectre d'absorption a été mesuré à une concentration de 17 μM . Les coefficients d'absorption molaire ont pu être mesurés au maximum d'absorption à 278 nm ($9700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 321 nm ($8200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le spectre d'absorption est présenté sur la figure suivante (Figure 3 - 35).

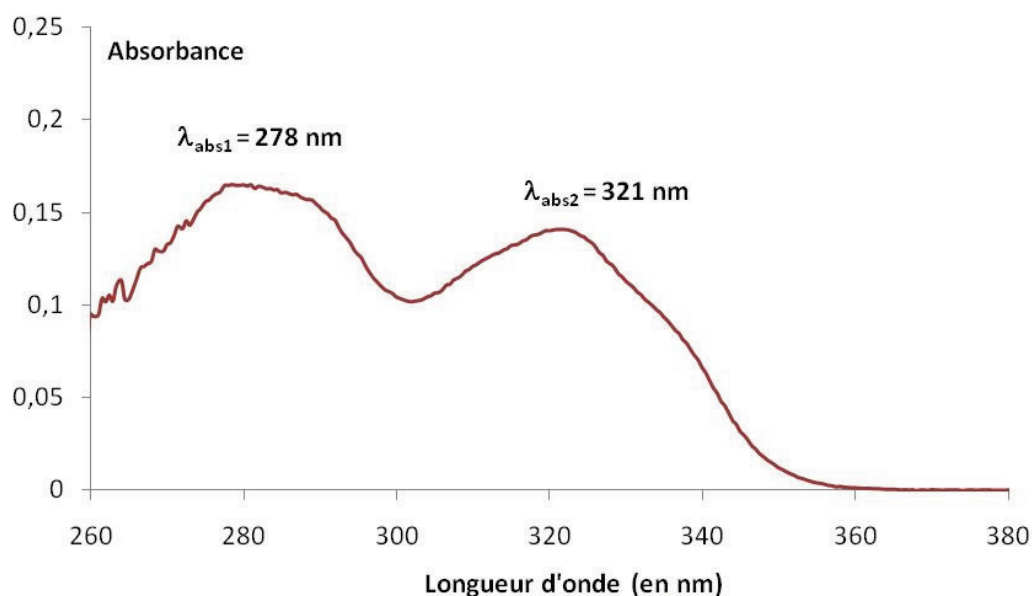


Figure 3 - 35 : Spectre d'absorption du dioxétane **63** (DMSO, 25°C, 17 μM)

En accord avec la littérature, ce composé n'est pas ou très faiblement fluorescent. Comme nous l'avons vu précédemment, cela est dû à la substitution du phénol de la coumarine par un groupement acétyle qui est électro-attracteur.²³⁸

Des déclenchements de chémiluminescence ont ensuite été réalisés. Les essais ont été effectués au moyen d'une solution de fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) dans le THF (1.0 M) directement dans la cuve de mesure. Un spectre d'émission de chémiluminescence a été enregistré ainsi qu'une cinétique au maximum d'émission.²³⁹

Le spectre d'émission présente un maximum à 470 nm correspondant à la longueur d'onde d'émission de fluorescence de la coumarine dans le DMSO. Le transfert a donc bien lieu du chémiluminophore vers la coumarine (Figure 3 - 36).

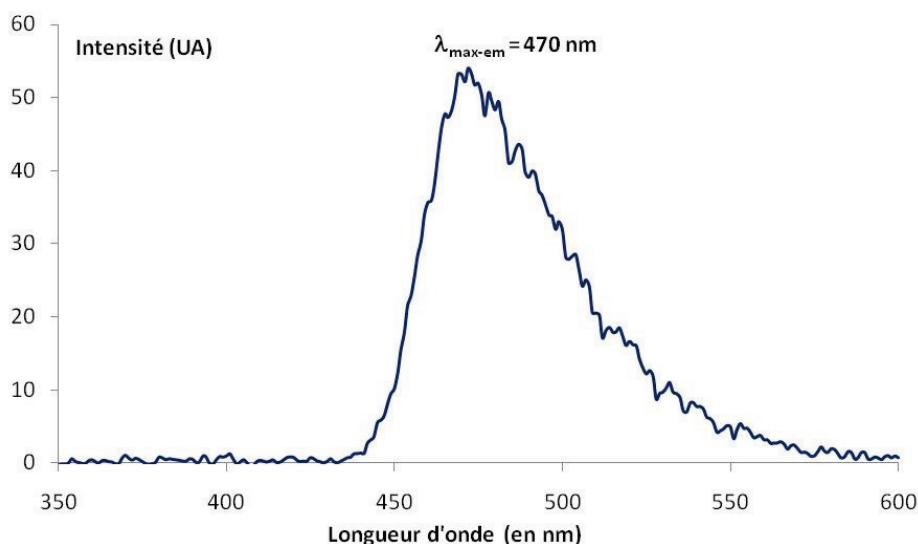


Figure 3 - 36 : Spectre d'émission de chémiluminescence (DMSO, 25°C, 170 μM, déclenchement avec addition d'une solution de TBAF dans le THF (1M – 3% v/v))

La cinétique de déclenchement a été, par la suite, enregistrée à la longueur d'onde maximale d'émission de chémiluminescence, c'est-à-dire 470 nm (Figure 3 - 37).

²³⁸ Chen, X. Q., Sun, M. and Ma, H. M., *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *4*, 477.

²³⁹ Il faut noter que l'élimination du groupement acétyle peut être induite par les ions F⁻ ou OH⁻ présents dans les solutions vieilles de TBAF.

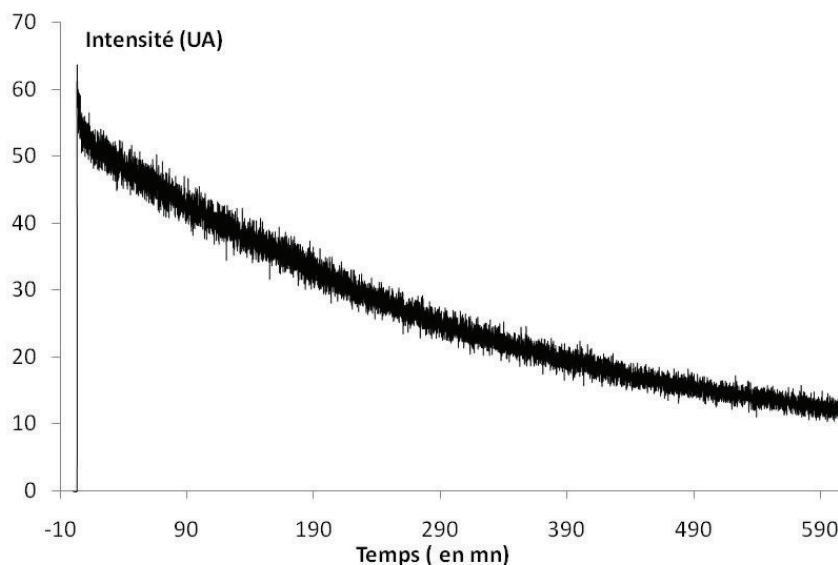


Figure 3 - 37 : Cinétique de chémiluminescence (DMSO, 25°C, 170 μ M, déclenchement avec addition d'une solution de TBAF dans le THF (1.0 M – 3% v/v))

Nous avons alors eu la surprise de constater que l'émission de chémiluminescence intervenait pendant plus de 6 heures à des niveaux d'intensité restant dans la même gamme que le signal observé lors des premières minutes suivant le déclenchement. La chémiluminescence décroît régulièrement pour revenir à zéro au bout d'une dizaine d'heures. A l'œil nu, la solution brille d'une couleur bleue très caractéristique de la fluorescence des 7-hydroxycoumarines.

Une fois déclenché, le spectre d'absorption et d'émission du produit d'ouverture du 1,2-dioxétane **90** a donc été enregistré afin de vérifier que l'émission de chémiluminescence correspondait avec l'émission de fluorescence du fluorophore (Figure 3 - 39 et Figure 3 - 40).

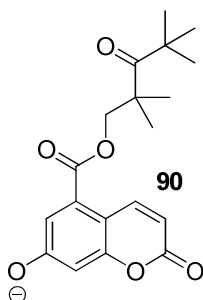


Figure 3 - 38 : Produit d'ouverture du 1,2-dioxétane

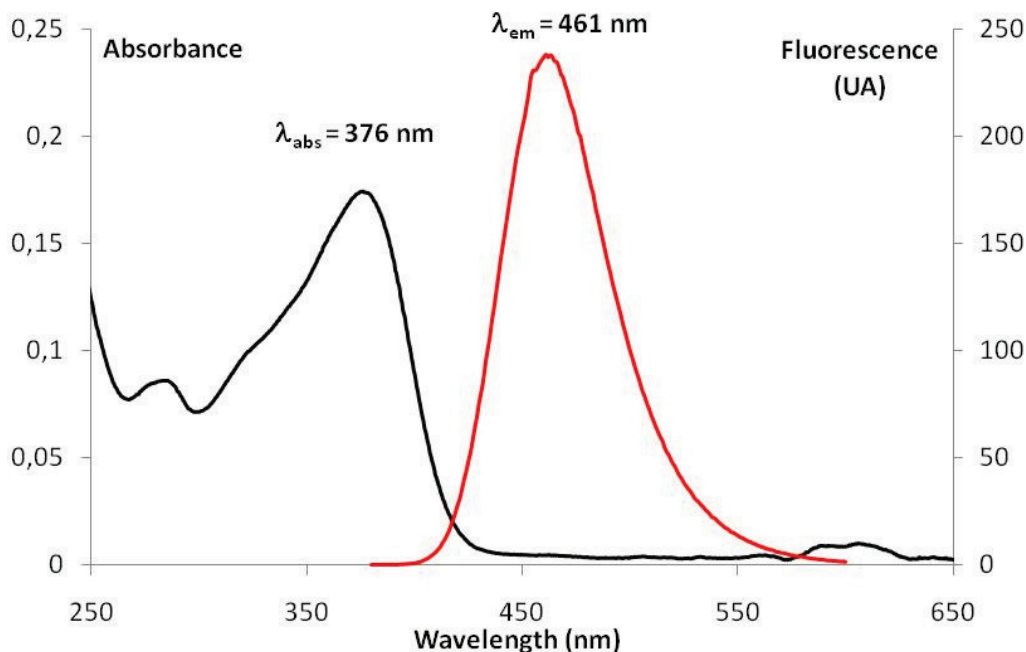


Figure 3 - 39 : Spectre d'absorption et d'émission du composé **90** (DMSO, 25°C, 17 μ M)

L'émission de fluorescence du composé **90** correspond bien à l'émission de chémiluminescence du 1,2-dioxétane **63** (Figure 3 - 36). Le rendement quantique a été déterminé (57%) en prenant comme référence la 7-hydroxycoumarine (78 % dans le PBS).

Il est intéressant de noter que si le déclenchement a lieu avec une base forte, type hydroxyde de sodium, la coumarine **63** a tendance à se dégrader également par ouverture de la lactone. Ceci induit un spectre d'émission de chémiluminescence beaucoup plus large correspondant aux émissions de la coumarine et de l'aryle substitué **91** (Figure 3 - 40).

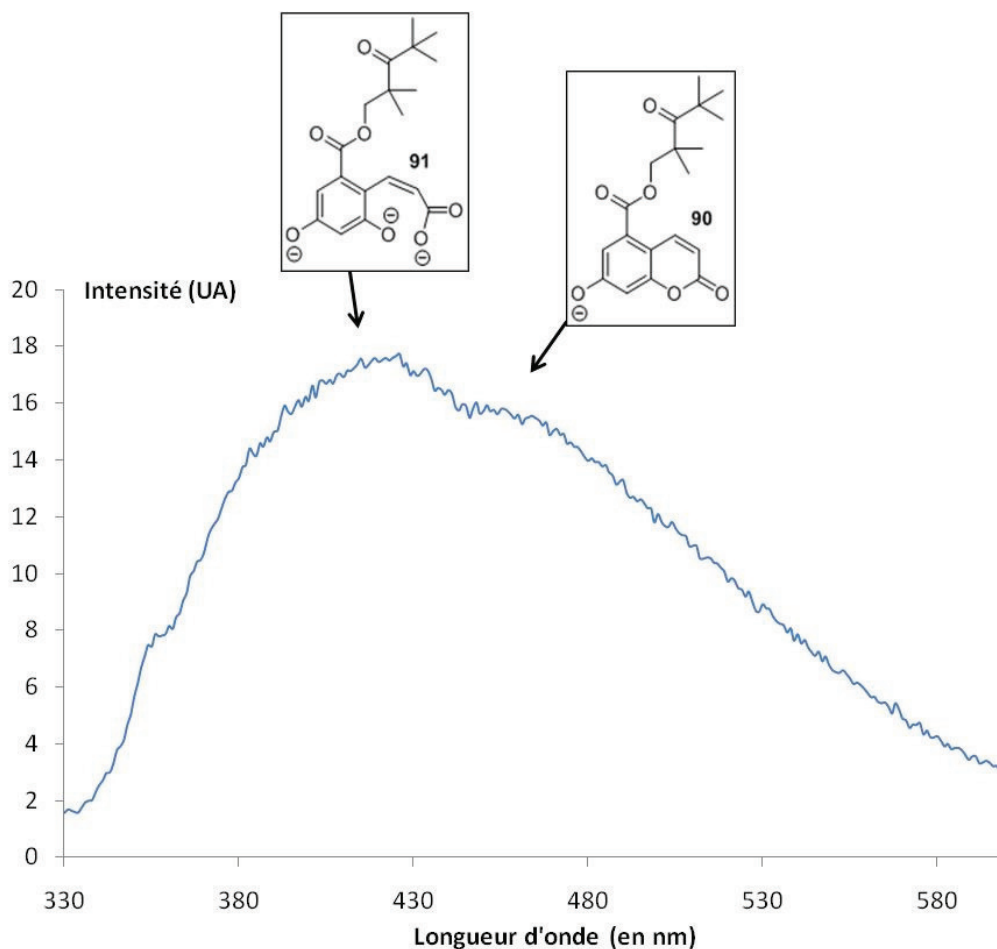


Figure 3 - 40 : Emission de fluorescence avec un déclenchement avec NaOH (1.0 M, 3% v/v), (DMSO, 25°C, 170 μ M)

1.4. Conclusion

Bien que le composé ne présente aucune émission en milieu aqueux, nous avons pu valoriser les travaux effectués en milieu organique. Le 1,2-dioxétane **63** synthétisé présente une émission de chémiluminescence à la longueur d'onde du fluorophore ce qui était l'objectif initialement visé. Ainsi, le système pourrait être adapté à d'autres phénols fluorescents afin d'émettre de la chémiluminescence à une longueur d'onde préalablement choisie.

De plus, l'émission de chémiluminescence a lieu pendant plus de 10 heures ce qui n'était pas décrit jusque-là. Cela peut s'avérer très utile pour de potentielles applications biologiques car cela permet d'imager des phénomènes de longue durée avec des intensités comparables avec l'intensité initiale. Nous pouvons imaginer faire par la suite, la fonctionnalisation de la coumarine afin de marquer des protéines ou des anticorps, et son hydrosolubilisation dans des conditions apparentées à celles décrites pour les autres coumarines (chapitre 2). Ce travail a fait l'objet d'une publication sous forme

de communication dans le périodique « Chemical communication » en 2011, dont le manuscrit est présenté à la fin de ce chapitre.²⁴⁰

2 Synthèse d'un dioxétane thiophénolique

2.1. Intérêt d'un déclenchement thiophénolique

Les 1,2-dioxétanes que nous avons développés au laboratoire sont basés sur des structures phénoliques. La chémiluminescence est déclenchée au moyen d'une base ou d'une coupure enzymatique. Le succès de l'émission de chémiluminescence réside dans la déprotonation du phénol qui va transférer les électrons depuis le phénolate vers le cycle 1,2-dioxétane. Il y a coexistence entre la forme phénol et la forme phénolate si le pH n'est pas suffisamment élevé. L'émission de chémiluminescence n'est alors pas efficace.

Le problème réside donc dans le fait que le pKa d'un phénol (environ 10) ne lui permet pas d'être complètement déprotonné à pH physiologique. Il faut alors trouver un moyen d'abaisser le pKa afin de maximiser le nombre d'espèces phénolate par rapport aux phénols.

Outre le remplacement du phénol « simple » par une coumarine réalisé au paragraphe précédent, deux solutions s'offrent alors à nous : soit abaisser le pKa du phénol au moyen de groupements électro-attracteurs substitués en *ortho* du phénol (un chlore par exemple, ou une méthylamine qui forme une liaison hydrogène comme décrit sur la coumarine au chapitre 2), soit remplacer le phénol par un thiophénol ou un sélénophénol.²⁴¹

En effet, comme nous l'indique la figure suivante (Figure 3 - 41), le pKa du 2-chlorophénol est de 8,5 ce qui fait gagner 1,5 unité par rapport au phénol seul. Cette valeur est encore un peu à la limite de ce que nous désirons. Le thiophénol, en revanche, a un pKa de 6,5 légèrement inférieur au pH physiologique. Cela représente donc la meilleure option pour notre système.

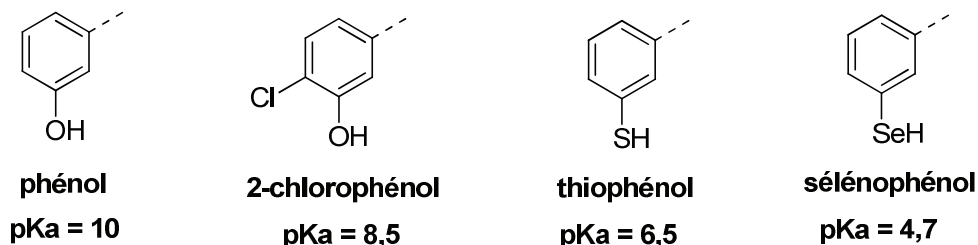


Figure 3 - 41 : Comparaison des pKa

²⁴⁰ Koci, J., Grandclaude, V., Massonneau, M., Richard, J.-A., Romieu, A. and Renard, P.-Y., *Chem. Commun.*, **2011**, 23, 6713.

²⁴¹ En dépit d'un pKa très prometteur d'environ 4.70, ce dernier n'a pas été exploré en raison des difficultés de synthèse et de la toxicité de ces dérivés.

Notre choix de développer un chémiluminophore 1,2-dioxétane thiophénolique est de plus renforcé par la publication de C. Mioskowski²¹⁶ décrite précédemment (*vide supra*) et l'expérience du Pr. Pierre-Yves Renard dans ce domaine.²⁴² La différence principale avec le système décrit serait le chémiluminophore, basé sur une structure dihydrofurane plus stable que la version adamantane précédemment décrite (Figure 3 - 42). Nous aurions alors à notre disposition un outil que nous pourrions ensuite adapter à d'autres systèmes chémiluminescents, le tout en déclenchant la chémiluminescence à pH physiologique et donc dans des milieux compatibles avec la stabilité de la plupart des enzymes hydrolytiques.

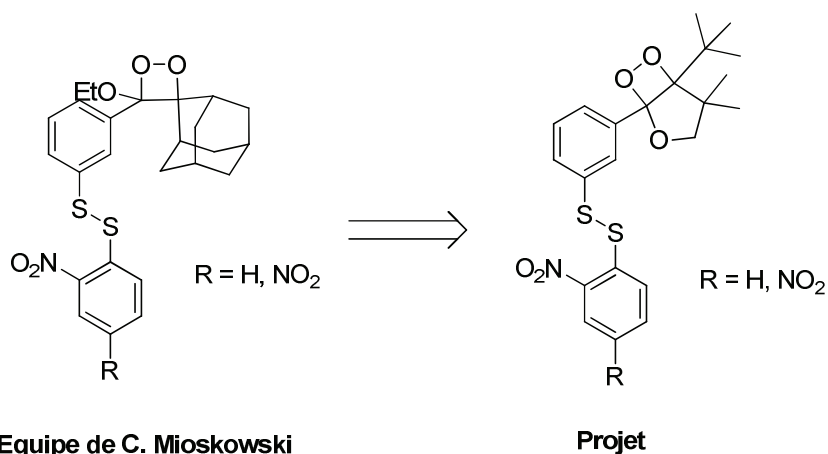


Figure 3 - 42 : Projet de 1,2-dioxétane stable et déclenchable à pH physiologique

Ce travail a été effectué par le Dr. Christophe Portal, chef de projet au sein de l'entreprise QUIDD de janvier 2007 à avril 2010.

2.2. Synthèse

La synthèse des 1,2-dioxétanes **92** et **93** suit le plan synthétique suivant : le thiophénol est mis en place en début de synthèse au moyen d'une réaction pallado-catalysée.^{216,243} Le thiophénol est protégé pendant toute la synthèse par un groupement *tert*-butyle. Le cycle dihydrofurane est ensuite construit *via* le schéma synthétique vu précédemment. Pour finir, le groupement *tert*-butyle est déprotégé et le thiophénol est masqué sous forme d'un disulfure mixte activé (Figure 3 - 43).

²⁴² Stage Post-doctoral dans le laboratoire du Pr. C. Mioskowski

²⁴³ Sabelle, S., Hydrio, J., Leclerc, E., Mioskowski, C. and Renard, P.-Y., *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 20, 3645.

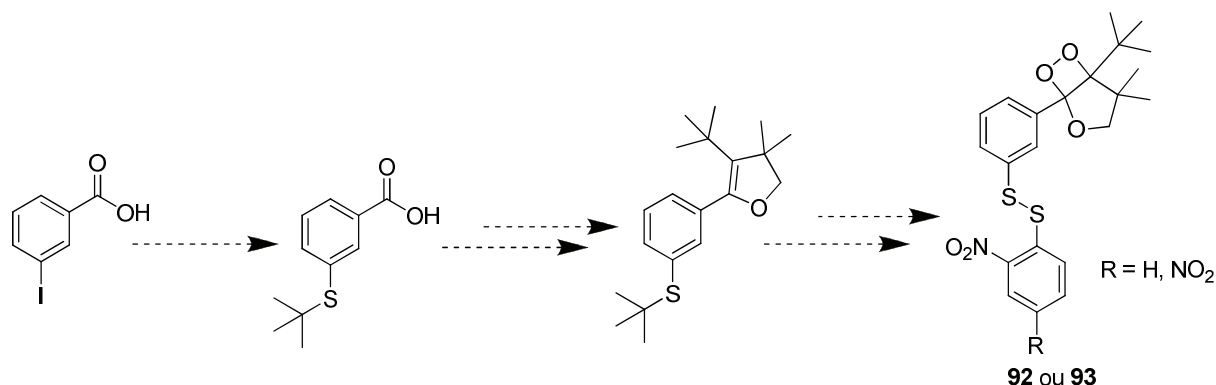


Figure 3 - 43 : Plan synthétique pour l'obtention des dioxétanes thiophénoliques **92** et **93**

L'acide 3-iodobenzoïque commercial **94** est estérifié au moyen du méthanol dans l'acide sulfurique avec un rendement quantitatif pour fournir l'ester **95**. La réaction pallado-catalysée a lieu en présence de palladium tétrakis(triphénylphosphine) pour former avec un bon rendement (87%) le thiophénol protégé **96**. Cette réaction s'apparente à un couplage de Stille non usuel notamment au niveau du stannylé.²⁴⁴ La suite de la synthèse fait intervenir l'hydrure double de lithium et d'aluminium afin de réduire l'ester **96** en alcool **97** avec un rendement de 70%. L'alcool **97** est ensuite substitué au moyen du chlorure de thionyle en présence de pyridine pour donner le dérivé chloré **98** avec un rendement quasi-quantitatif (96%). Ce dernier est alors substitué avec le diol **71** précédemment synthétisé (*vide supra*) pour fournir l'alcool **99** avec un rendement de 98% (Figure 3 - 44).

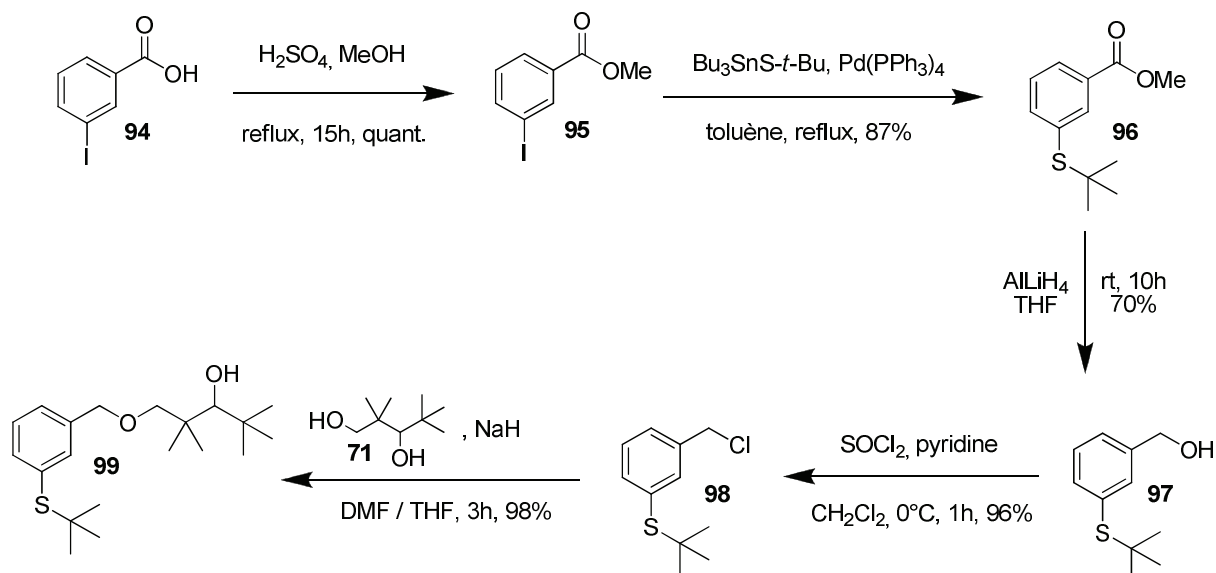


Figure 3 - 44 : Synthèse de l'alcool **99**

Dans la suite de la synthèse, l'alcool **99** est oxydé au moyen du PCC, en présence de célite dans le dichlorométhane. La cétone **100** est obtenue avec un rendement de 73%, sans oxydation du

²⁴⁴ Mitchell, T. N., *Synthesis*, **1992**, 09, 803.

thioéther. Cette dernière est engagée dans l'étape de cyclisation au moyen du dimsyle de potassium précédemment présenté. La réaction fournit l'alcool tertiaire **101** avec un bon rendement de 80%. Le cycle dihydrofurane **102** est ensuite formé par déshydratation du tétrahydrofurane **101** au moyen du chlorure de thionyle (rendement : 70%). Le thiophénol **102** est ensuite substitué afin d'obtenir les disulfures mixtes **103** et **104** avec des rendements respectifs de 46% et 22%. La dernière étape est bien sûr l'étape de formation du 1,2-dioxétane. Les composés **92** et **93** sont respectivement obtenus avec des rendements de 34% et 31% en utilisant la réaction de photo-oxygénation précédemment présentée (Figure 3 - 45).

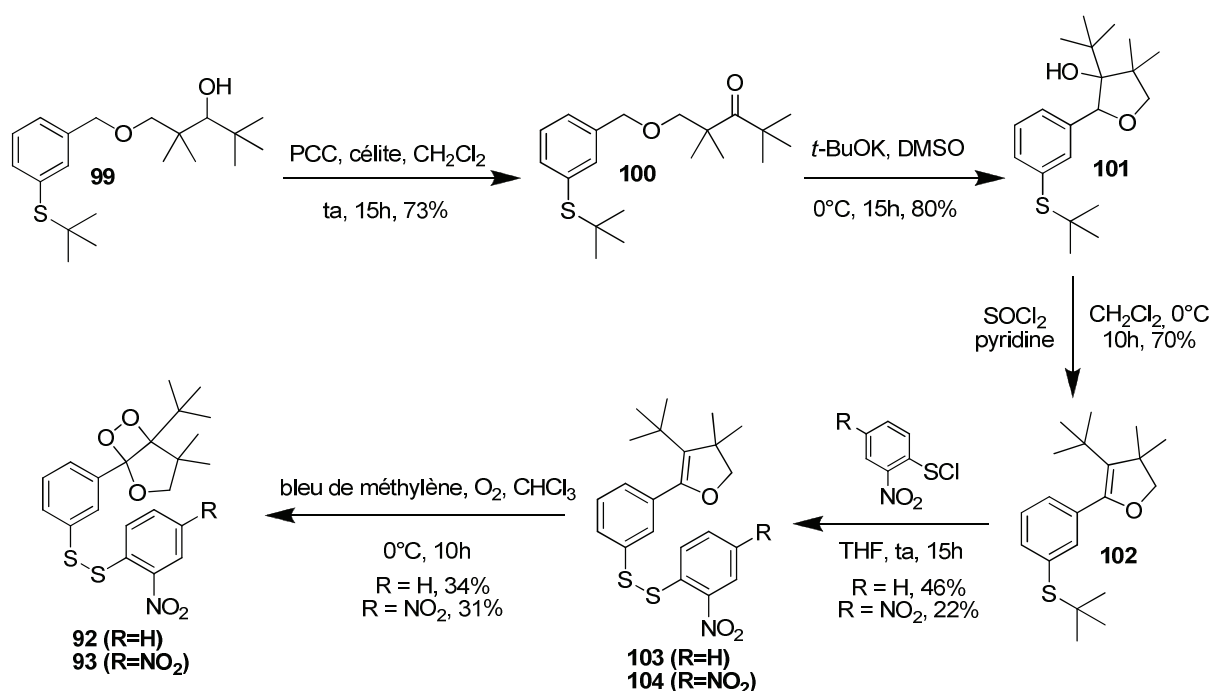


Figure 3 - 45 : Synthèse des dioxétanes thiophénoliques **92** et **93**

La structure et la pureté des 1,2-dioxétanes **92** et **93** ont été vérifiées par analyse RMN du proton et du carbone ainsi que par spectre de masse. De plus, avant chaque essai de déclenchement de chémiluminescence, l'intégrité du produit a été vérifié afin de valider de manière sûre les tests effectués.

2.3. Résultats et discussions

Les tests de chémiluminescence ont ensuite été menés dans différents milieux en présence d'un réducteur afin de couper le pont disulfure et de générer le thiophénolate à l'origine du déclenchement de la chémiluminescence.

Les résultats obtenus sont identiques pour le composé **92** et le composé **93**, c'est pourquoi dans le tableau suivant (Tableau 3 - 4), seulement ceux du composé **92** seront présentés.

Entrée	Milieu utilisé	Réducteur	Résultat
1	Tampon EIA, Fluorescéine/CTAB Conc. dioxétane : 0,2 mM	TCEP (125 eq.)	Pas d'émission (ni du dioxétane, ni de la fluorescéine)
2	Tampon EIA, Fluorescéine/CTAB (pH : 7,4) Conc. dioxétane : 0,2 mM	TCEP (125 eq.)	Pas d'émission (ni du dioxétane, ni de la fluorescéine)
3	Tampon EIA, Fluorescéine/CTAB (pH : 8,5) Conc. dioxétane : 0,2 mM	TCEP (125 eq.)	Pas d'émission (ni du dioxétane, ni de la fluorescéine)
4	Tampon EIA, Fluorescéine/CTAB (pH : 8,5) Conc. dioxétane : 0,6 mM	TCEP (42 eq.)	Pas d'émission (ni du dioxétane, ni de la fluorescéine)
5	Ethanol + fluorescéine/CTAB Conc. dioxétane : 0,2 mM	TCEP (125 eq.)	Pas d'émission (ni du dioxétane, ni de la fluorescéine)
6	Ethanol Conc. dioxétane : 0,2 mM	TPP (125 eq.)	Pas d'émission du dioxétane
7	Acétone/H ₂ O	DTE (100 eq.)	Pas d'émission du dioxétane
8	CHCl ₃	DTE (100 eq.)	Pas d'émission du dioxétane
9	DMSO	DTE (100 eq.)	Pas d'émission du dioxétane
10	CDCl ₃	Ethanthiol (100 eq.)	Pas d'émission du dioxétane

Tableau 3 - 4 : Résultats des tests de déclenchement de chémiluminescence de **92**
 Tampon EIA : 100 ml de tampon phosphate, 0,01 % NaN₃, 0,15 M NaCl, 10⁻³ M EDTA, 0,1% BSA
 CTAB : bromure de cétyl triméthylammonim
 TCEP : Tris(2-Carboxyéthyl) phosphine, TPP : triphénylphosphine, DTE : Dithioérythritol

Le mélange fluorescéine/CTAB utilisé sur les entrées 1 à 4 permet de former une cage hydrophobe autour du chémiluminophore et d'utiliser la fluorescéine comme relais de chémiluminescence. Comme les tests en milieu aqueux n'ont pas donné de résultat, des tests en milieux organiques ont été effectués (entrée 5 à 10). De plus, des réducteurs de plus en plus forts, connus pour couper des ponts disulfure ont été utilisés mais sans succès.

Ces résultats préliminaires n'ont pas permis pour le moment d'obtenir un déclenchement de chémiluminescence à pH physiologique. Une explication à ces résultats pourrait être le nombre d'équivalents élevé de réducteur utilisé. Le cycle 1,2-dioxétane pourrait être réduit de façon concomitante au disulfure mixte et ainsi aucune émission de lumière ne pourrait être observée. Nous allons procéder prochainement à de nouvelles expériences en utilisant un nombre limité d'équivalents de réducteur (n'excédant pas 2).

La synthèse d'un thioester pourrait aussi être envisagée afin de libérer le thiophénolate au moyen d'une base. Nous pourrions aussi utiliser la thiocholine comme agent déclencheur de la même manière que dans la publication de C. Mioskowski²¹⁶ sur laquelle notre travail est basé.

Les études sont toujours en cours sur ce projet pour mettre au point le meilleur système afin de valider ou non le déclenchement de chémiluminescence en milieu physiologique.

III. Synthèse de chémiluminophores de type « TBET »

1 Synthèse et évaluation d'une cassette chémiluminescente soluble uniquement en milieu organique

1.1. Objectifs

Dans le but de développer des sondes chémiluminescentes utilisables en milieux aqueux, les cassettes « TBET » (Through-Bond Electron Transfer) ont été étudiées au laboratoire, à l'image des travaux du groupe de K. Burgess qui a décrit le transfert énergétique à travers les liaisons comme plus efficace qu'à travers l'espace.²³⁰ Dans ce cas, si nous lions un fluorophore organique à un chémiluminophore dans un système de cassettes « TBET », nous pourrions avoir un transfert rapide de l'énergie de chémiluminescence lors du déclenchement vers le fluorophore avec peu ou pas de perte énergétique dû au « quenching » du solvant et en particulier de l'eau.

Dans un second temps, si le fluorophore choisi a de bonnes propriétés spectrales dans l'eau, nous pourrions alors obtenir, théoriquement, une bonne émission de chémiluminescence en milieu physiologique.

Le troisième avantage que pourrait avoir ce type de ce système est la longueur d'onde d'émission de chémiluminescence. En effet, si l'efficacité du transfert est proche de 100%, l'émission de chémiluminescence a lieu quasi-exclusivement à la longueur d'onde d'émission du fluorophore. Ceci pourrait présenter une alternative afin d'émettre de la chémiluminescence dans le proche infrarouge et ainsi synthétiser des sondes utilisables en imagerie *in vivo*.²⁴⁵ Ces systèmes présentent aussi l'avantage de pouvoir disposer d'un jeu de cassettes chémiluminescentes émettant à des longueurs d'onde différentes (en fonction du fluorophore associé). Une finalité possible serait donc le multiplexage pour la détection simultanée de plusieurs analytes et/ou enzymes en mode multi-couleur.

Le système que nous souhaiterions développer est donc le suivant (Figure 3 - 46):

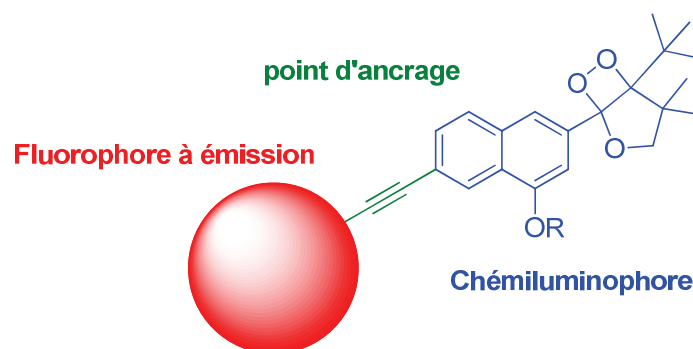
un système chémiluminescent constitué d'un 1,2-dioxétane basé sur un cycle dihydrofurane,

un point d'ancrage afin de réaliser une réaction de Sonogashira pour fixer une triple liaison sur le motif aryle,

un fluorophore organique émettant dans le rouge ou le proche infrarouge afin de constituer un relais énergétique efficace.

²⁴⁵ Weissleder, R. and Ntziachristos, V., *Nat. Med.*, **2003**, 123.

Dans un premier temps, nous synthétiserions uniquement une espèce hydrophobe, la plus proche structurellement des composés décrits par le groupe de K. Burgess, afin d'apporter une preuve de concept à notre projet. Dans un deuxième temps, nous pourrions imaginer des versions hydrosolubles afin de déclencher la chémiluminescence en milieu aqueux.



dans le proche infrarouge

Figure 3 - 46 : Projet de synthèse de « cassettes » chémiluminescentes

Le choix d'un naphthalène comme support de notre cœur chémiluminescent a été fait afin de faciliter les fonctionnalisations chimiques imposées par le cahier des charges structurel de la cassette. Un cycle constitué uniquement d'un phényle pourrait nous poser des problèmes synthétiques. Cependant, par la suite, nous pourrions étudier la possibilité d'un système de taille et d'hydrophobie plus réduites.

Le défi synthétique réside donc dans la préparation du cœur naphthalénique correctement substitué.

1.2. Travaux antérieurs

Une première voie de synthèse avait été développée au laboratoire.²⁴⁶ Elle consistait à fonctionnaliser deux fonctions hydroxyle sur le naphthalène : une conservée pour servir de déclencheur de chémiluminescence et l'autre utilisée comme précurseur d'un dérivé triflate impliqué dans la réaction de Sonogashira, choisie pour fixer le marqueur fluorescent. Le produit **105** avait été obtenu. Malheureusement, malgré un grand nombre de conditions testées, le groupement méthoxyle, protecteur du phénol n'avait pas pu être enlevé sans altérer la triple liaison (Figure 3 - 47).

²⁴⁶ Thèse de Jean-Alexandre Richard

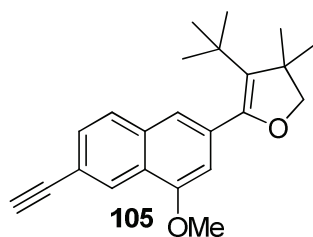


Figure 3 - 47 : Produit obtenu dans une précédente synthèse

Ainsi, le groupement méthoxyle 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 dont la réactivité s'apparente à celle d'un accepteur de Michael. Devant cette impasse, la stratégie de synthèse devait être repensée afin d'utiliser des groupements protecteurs suffisamment labiles mais résistants à la totalité des conditions expérimentales imposées par la synthèse. Il faudrait donc introduire à la place du méthoxyle un groupement protecteur dont la stabilité serait intermédiaire entre les groupements protecteurs silylés (instable dans les conditions basiques utilisées lors de la formation du cycle tétrahydrofurane) et un méthoxyle qui est trop stable pour être retiré dans des conditions compatibles avec la présence d'un alcyne vrai.

Cependant, cela implique la refonte de la synthèse depuis le départ afin d'intégrer les nouveaux groupements protecteurs. Nous avons donc développé un nouveau schéma synthétique (*vide infra*).

1.3. Stratégie choisie

Afin de valider notre concept, nous avons choisi de synthétiser la cassette chémiluminescente **106** (Figure 3 - 48). Le fluorophore choisi est la benzophénoxazine utilisée dans la publication de K. Burgess *et al.* (dérivé de Nile red). Cela nous permet de nous rapprocher au plus près des conditions de cette publication. De plus, elle présente l'avantage d'émettre dans le proche infrarouge (630 nm), d'être facilement synthétisable sur grosses échelles (2 étapes) et d'avoir des analogues hydrosolubles déjà reportés par le groupes de K. Burgess.^{247,248,249} Ce dernier point a pour objectif, d'adapter notre système à d'autres fluorophores permettant une chémiluminescence dans un milieu aqueux.

²⁴⁷ Jose, J. and Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **2006**, *20*, 7835.

²⁴⁸ Jose, J., Ueno, Y. and Burgess, K., *Chem. Eur. J.*, **2009**, *2*, 418.

²⁴⁹ Ho, N.-h., Weissleder, R. and Tung, C.-H., *Tetrahedron*, **2006**, *4*, 578.

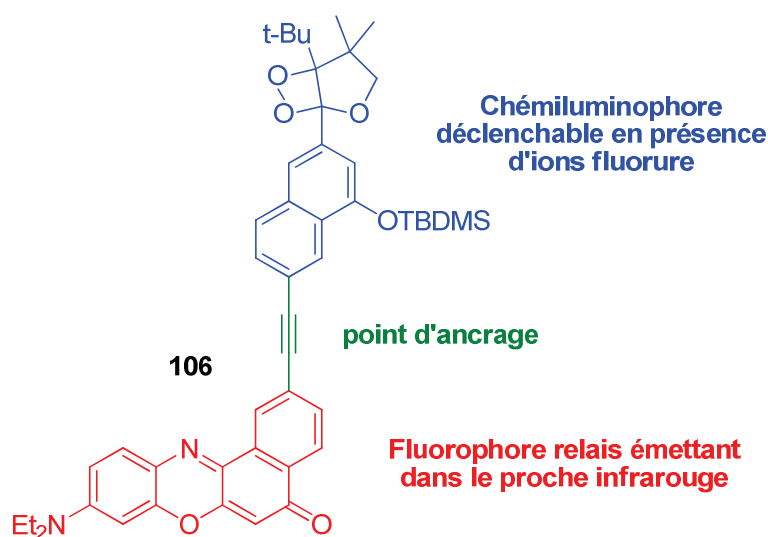


Figure 3 - 48 : Cassette chémiluminescente visée

Le naphtol serait protégé avec un groupement silylé TBDMS (*tert*-butyldiméthylsilyle), facilement éliminable en présence d'ions fluorures. La chémiluminescence pourrait ainsi être déclenchée en milieu organique au moyen du TBAF par exemple.

La partie la plus complexe de la synthèse est donc l'obtention de l'intermédiaire clé naphthalénique **111** comportant une triple liaison en position 6, un phénol en position 4 et le cycle dihydrofurane précurseur du chémiluminophore en position 2 (Figure 3 - 49).

La synthèse proposée démarre avec le 4-bromobenzaldéhyde commercial **107**. Le cycle naphthalène est ensuite formé pour obtenir l'ester **108**. Le groupe protecteur du phénol est changé par un benzyle. Celui-ci est plus résistant qu'un acétyle car il résiste aux conditions basiques et acides ainsi qu'aux conditions oxydantes. Il pourra à la fin de la synthèse être retiré par une hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon. Le composé **108** est aussi aménagé fonctionnellement pour obtenir le dérivé chloré **109**. Le cycle dihydrofurane **110** peut ensuite être formé par le schéma synthétique déjà vu précédemment. Il ne reste plus qu'à déprotéger le phénol et réaliser une première réaction de Sonogashira pour obtenir le composé clé **111** (Figure 3 - 49).

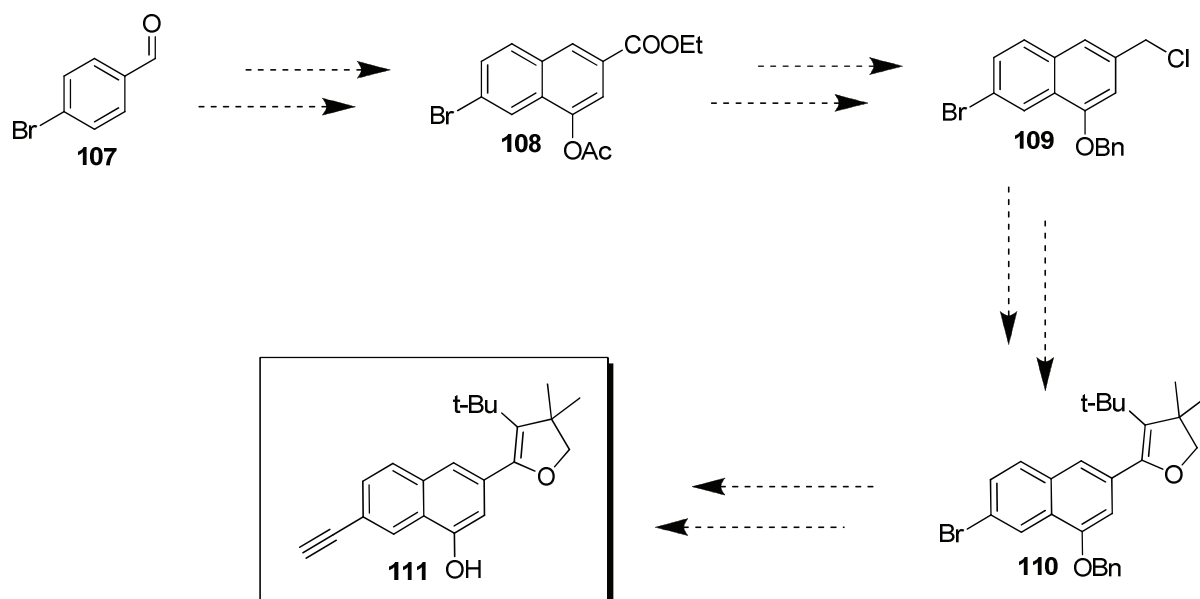


Figure 3 - 49 : Stratégie de synthèse choisie pour l'obtention de l'intermédiaire clé 111

Cette synthèse présente l'avantage d'utiliser un groupement protecteur plus labile tout en gardant une bonne stabilité de celui-ci au cours des différentes étapes de synthèse.

1.4. Synthèse

La première étape fait intervenir le 4-bromobenzaldéhyde commercial **107** dans une réaction de Stobbe²⁵⁰ par addition des réactifs sur une suspension de NaH dans le toluène. La température de cette réaction doit être rigoureusement contrôlée pendant toute l'addition pour avoir un rendement optimal. L'acide **112** est ensuite directement engagé dans l'étape suivante qui permet la cyclisation et l'obtention du dérivé naphthalénique **108** avec un rendement de 43% sur deux étapes.

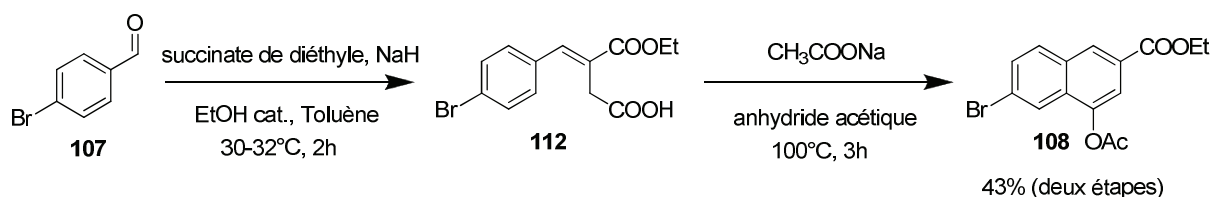


Figure 3 - 50 : Obtention du cycle naphtalène 108

La réaction de Stobbe est un peu particulière, la figure suivante explique plus en détails son mécanisme (Figure 3 - 51). Dans un premier temps, un hydrure arrache un proton au succinate de diéthyle **113** pour former un énolate **114**. Celui-ci réagit ensuite sur le benzaldéhyde **107** selon une réaction d'aldolisation pour former l'espèce **115**. Par la suite, une réaction intramoléculaire conduit à l'espèce **116** qui va directement éliminer un éthanolate pour former la lactone **117**. L'éthanolate éliminé va ensuite ouvrir la lactone pour fournir le carboxylate **118**. Après hydrolyse en milieu acide,

²⁵⁰ Procédure expérimentale directement inspirée de : Wright, B. J. D., Hartung, J., Peng, F., Van de Water, R., Liu, H., Tan, Q.-H., Chou, T.-C. and Danishefsky, S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *49*, 16786.

le composé **112** est récupéré avec cette géométrie particulière de la double liaison carbone-carbone (En E par rapport à l'ester).

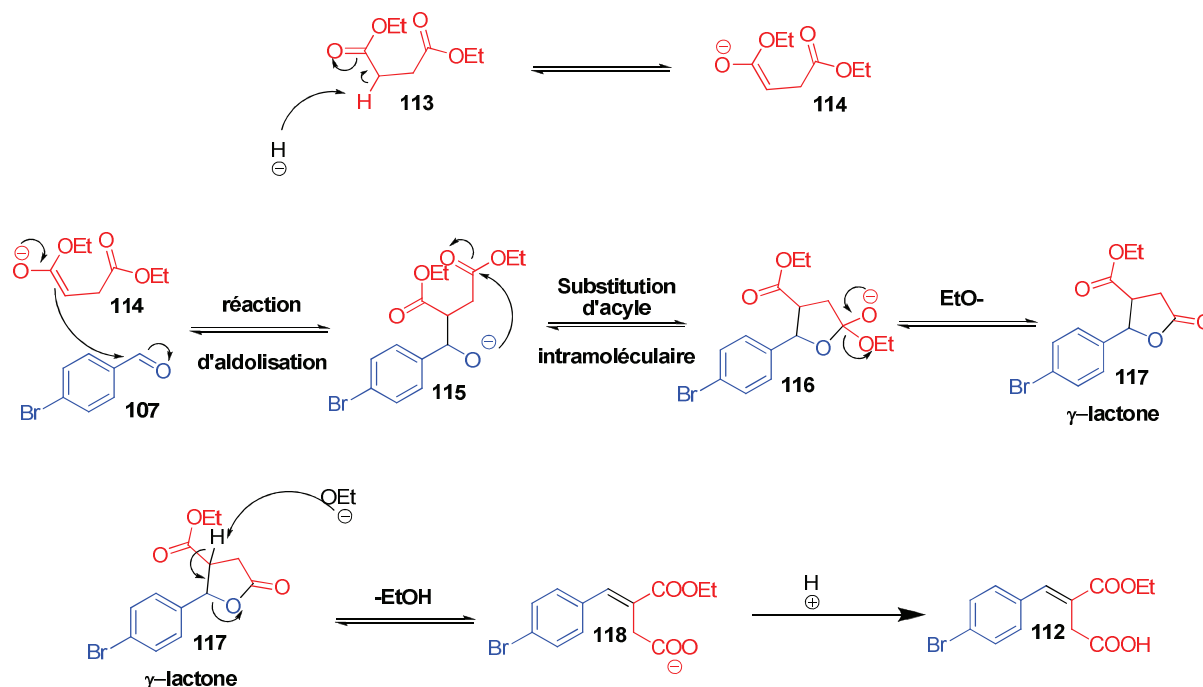


Figure 3 - 51 : Mécanisme de la réaction de Stobbe appliquée à notre molécule 107

Dans la suite de la synthèse, le phénol du naphthalène **108** est protégé, en deux étapes, par un groupement benzyle. Le groupement acétyle est déprotégé par une hydrolyse acide dans l'acétone pour fournir le phénol **119** avec un rendement quantitatif. Le phénol est ensuite alkylé avec le bromure de benzyle en présence de carbonate de potassium toujours dans l'acétone. Le phénol protégé **120** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif (97%). Des essais de déprotection (en conditions basiques) et de protection en une seule étape ont été effectués mais le rendement obtenu est plus faible que le rendement global sur deux étapes (Figure 3 - 52).

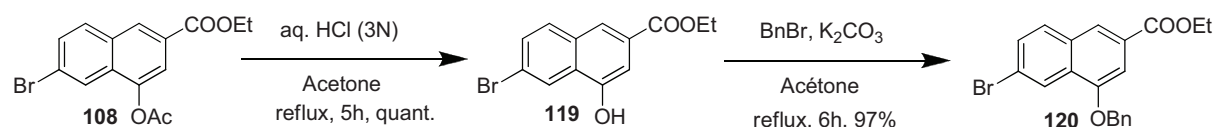


Figure 3 - 52 : Synthèse du dérivé naphthalène protégé 120

L'ester **120** est alors réduit en l'alcool **121** au moyen de AlLiH_4 dans le THF anhydre avec un bon rendement (85%). L'alcool **121** subit ensuite une chloration à l'aide du chlorure de thionyle dans le dichlorométhane pour donner le dérivé naphthalénique chloré **109** avec un rendement quantitatif. Notre dérivé naphthalénique est maintenant obtenu, il faut alors synthétiser le cycle tétrahydrofurane **124**. La synthèse est la même que décrite précédemment. Le dérivé chloré **109** est substitué avec le diol **71** déjà décrit. Le rendement est de 90%. Puis l'alcool **122** subit une oxydation au moyen du PCC en présence de célite dans le dichlorométhane. La cétone **123** est obtenue avec un très bon

rendement de 86%. Le composé **123** est cyclisé dans les conditions décrites précédemment, c'est-à-dire l'utilisation de diméthyle de potassium comme base. Le tétrahydrofurane **124** est obtenu avec un rendement de 63% (Figure 3 - 53).

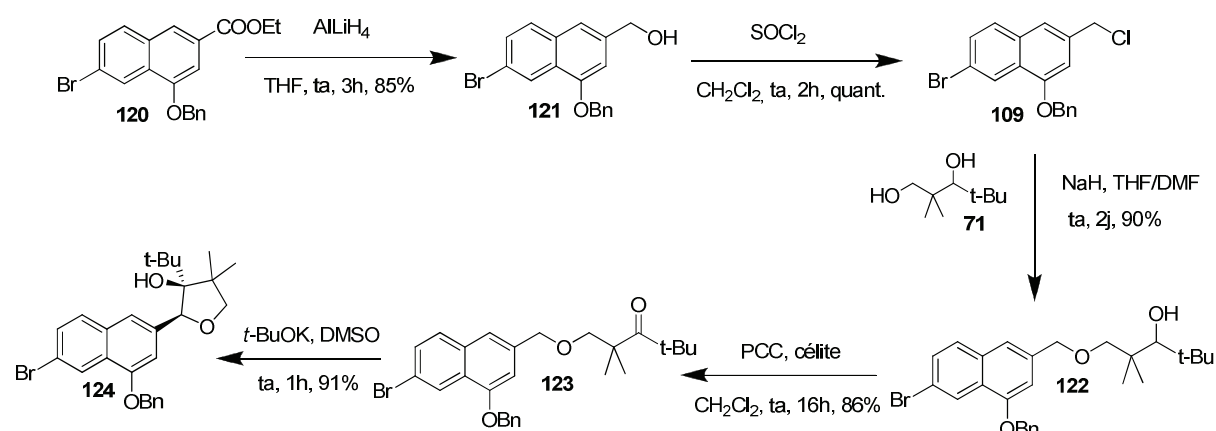


Figure 3 - 53 : Synthèse du cycle tétrahydrofurane **124**

Le diastéréoisomère **124** n'a pas été clairement identifié, cependant nous pouvons fortement supposer qu'il correspond à celui décrit (alcool en *cis* par rapport au cycle naphthalénique). En effet, comme expliqué précédemment,²³⁴ un seul diastéréoisomère est obtenu avec cette méthode de cyclisation et il s'agit du diastéréoisomère thermodynamique, favorisé par l'encombrement entre le cycle naphthalénique et le groupement *tert*-butyle. Ces deux groupements sont donc en position *trans* l'un par rapport à l'autre. Les études structurales visant à préciser le stéréoisomère obtenu n'ont pas été menées car la stéréochimie est perdue lorsque le cycle dihydrofurane est formé.

Nous avons choisi ensuite de déprotéger le groupement benzyle à cette étape afin d'éviter la réduction du cycle dihydrofurane une fois qu'il serait formé (Figure 3 - 54). Nous avons voulu déprotéger le composé **124** dans les conditions classiques de déprotection des groupements benzyle, c'est-à-dire en utilisant du palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Comme attendu, le benzyle a bien été enlevé mais au cours de cette réaction, la substitution de l'atome de brome par un hydrogène a également été observée. Nous obtenons donc de manière inattendue le composé **126** en quantités importantes (rendement de 67%).

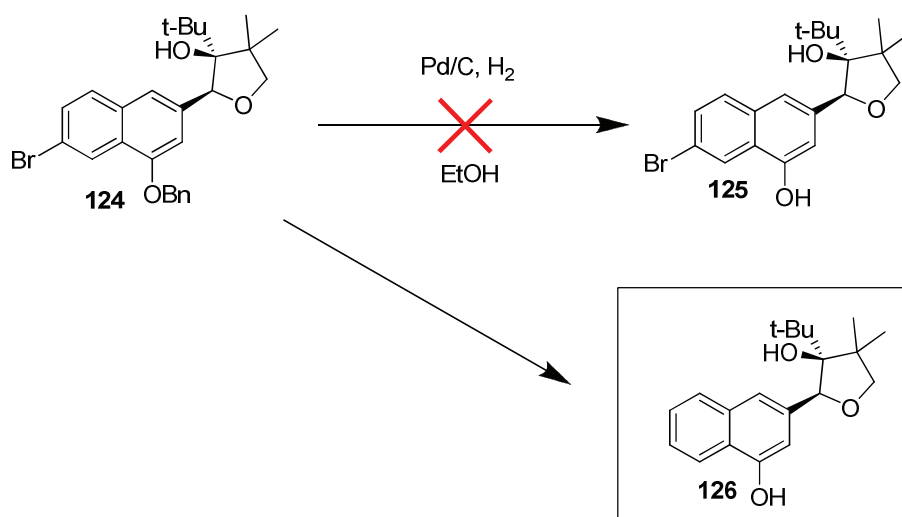


Figure 3 - 54 : Déprotection du groupement benzyle et obtention du composé **126**

Le composé **126** a été valorisé comme composé modèle pour la mise au point des conditions de formation des 1,2-dioxétanes. Pour se faire, le composé **126** a été déshydraté en présence de chlorure de thionyle et de pyridine pour fournir le composé **127** avec de bons rendements (75%). Il pourrait ensuite être utilisé comme chémiluminophore modèle en protégeant la fonction phénol par un groupement acétyle ou un groupement trialkylsilyle et en formant par la suite le dioxétane (Figure 3 - 55).

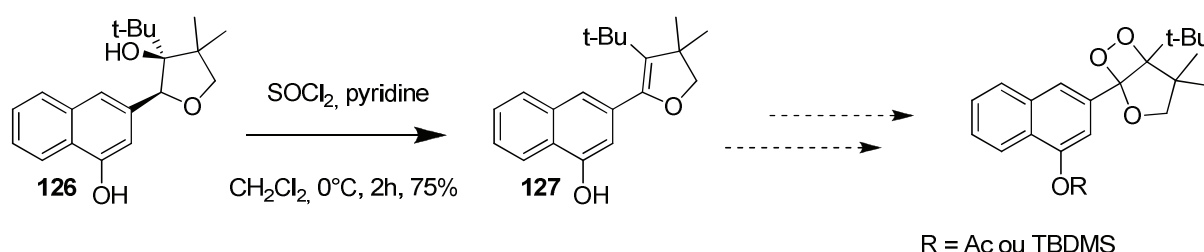
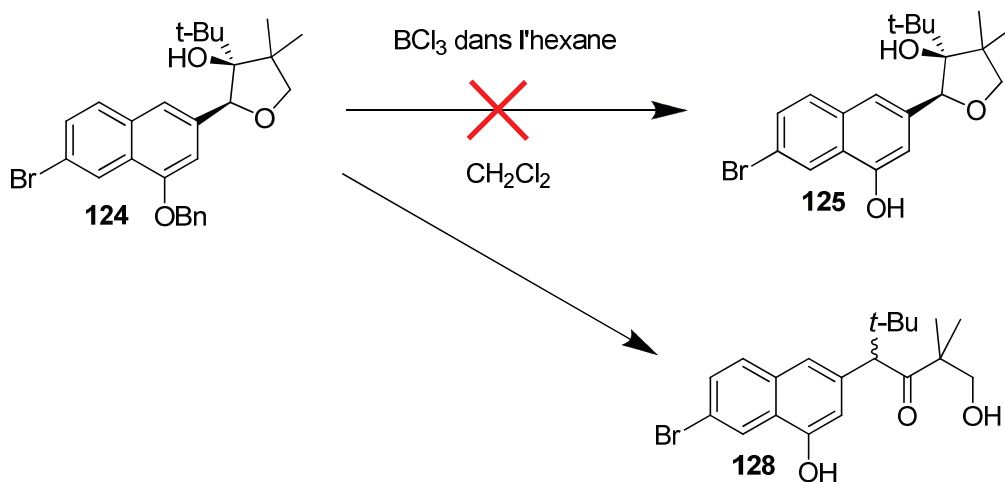
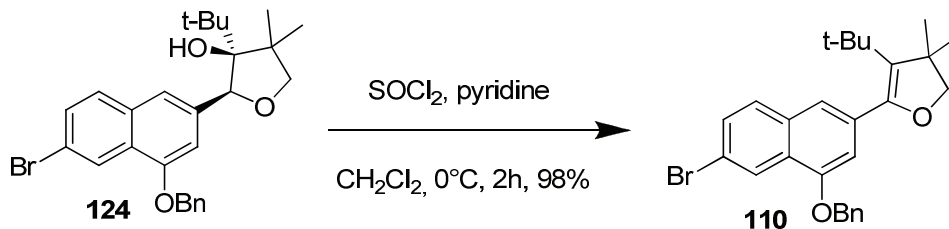


Figure 3 - 55 : Valorisation du composé **127** pour synthétiser des dioxétanes modèles

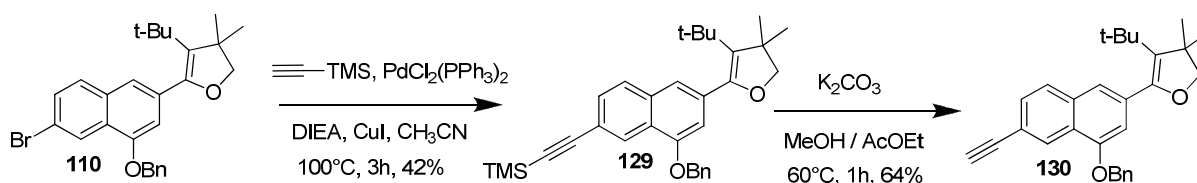
Après re-synthèse en grosses quantités du composé **124**, nous avons choisi de déprotéger le groupement benzyle par une autre méthode : le trichlorure de bore à 0°C . L'oxophilie du bore a tendance à favoriser sa complexation à l'éther de phénol et ainsi à faciliter la coupure du lien éther benzylique. Malheureusement, le cycle tétrahydrofurane **124** s'ouvre et un réarrangement a lieu ce qui conduit majoritairement au produit **128**. Des études RMN 2D ont permis de préciser la structure du composé **128** qui comporte le même nombre de carbones, de protons et d'hétéroatomes que le composé **124** (Figure 3 - 56).

Figure 3 - 56 : Essais de déprotection en présence de BCl_3

Ces résultats remettent en cause la stratégie de synthèse et en particulier le choix du groupement protecteur. Heureusement et de manière un peu surprenante, le cycle dihydrofurane n'est pas sensible à cet acide de Lewis. En effet, des essais de déprotection du benzyle sur le composé témoin **127** ont été effectués. Nous avons donc choisi d'effectuer la déprotection du phénol après formation du motif dihydrofurane. Celui-ci est obtenu par chloration de l'alcool **124** à l'aide du chlorure de thionyle suivi d'une élimination spontanée pour former le dihydrofurane **110**, précurseur du dioxétane, avec un rendement quantitatif (98%) (Figure 3 - 57).

Figure 3 - 57 : Obtention du dihydrofurane **110**

La réaction de Sonogashira avec l'introduction d'un alcyne vrai est ensuite menée en deux étapes. Premièrement, le dérivé bromé **110** est mis à réagir en présence de triméthylsilylacétylène dans un mélange de DIEA et d'acétonitrile. La source de palladium est le palladium dichlorure bistriphénylphosphine et du cuivre (I) est rajouté sous forme de iodure de cuivre. Le dérivé alcyne **129** est obtenu avec un rendement modéré de 42%. Le groupement TMS est ensuite retiré par un traitement au carbonate de potassium dans un mélange méthanol/acétate d'éthyle. L'alcyne vrai **130** est obtenu avec un rendement de 64% (Figure 3 - 58).

Figure 3 - 58 : Synthèse du composé **130**

Le groupement benzyle est cette fois enlevé avec succès, mais avec un rendement modeste dû à la réactivité trop forte du trichlorure de bore. En effet, le bore se complexe aussi sur l'éther d'énol et ce dernier s'ouvre pour former des produits secondaires non-valorisables. Le naphthalène désiré **111** est cependant obtenu à l'échelle de quelques grammes avec un rendement de 38% (Figure 3 - 59).

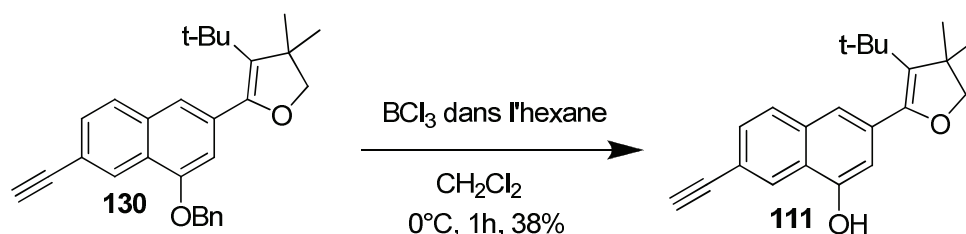


Figure 3 - 59 : Synthèse de l'intermédiaire clé **111**

Une fois l'intermédiaire clé synthétisé, nous avons pu l'utiliser pour la synthèse de nos cassettes chémiluminescentes. Nous avons tout d'abord couplé notre intermédiaire clé **111** au dérivé triflate du 2-hydroxy Nile red **131**. Celui-ci a été préalablement synthétisé et activé en groupement triflate en trois étapes, suivant un protocole déjà décrit dans la publication du groupe de K. Burgess.²³⁰ Le couplage a eu lieu en présence de palladium tétrakis(triphénylphosphine), de DIEA, de iodure de cuivre, le tout dans le DMF. Après 3h à 100°C , la cassette **132** a été obtenue avec un très bon rendement de 90% (Figure 3 - 60).

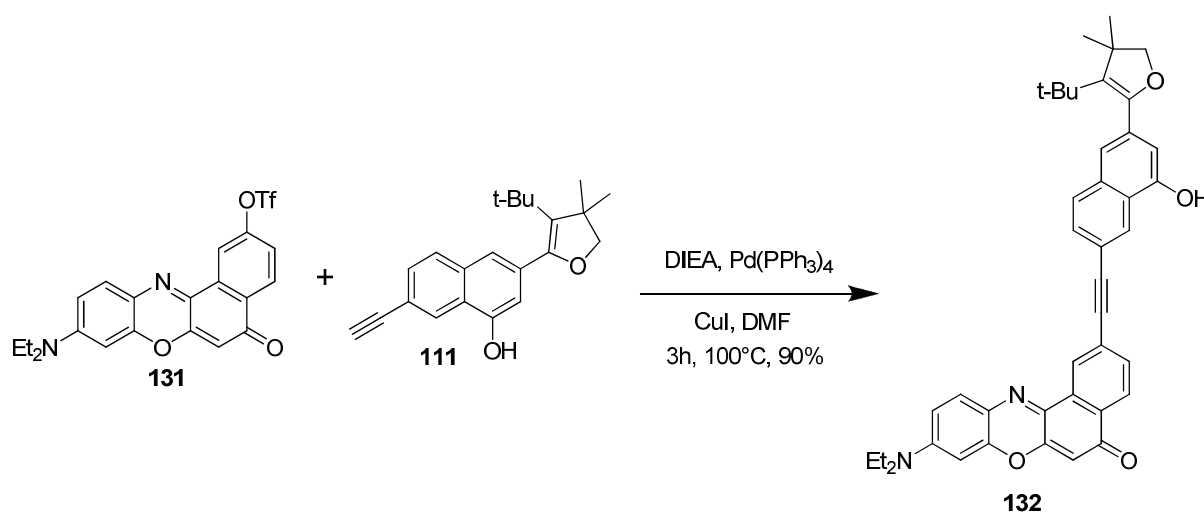


Figure 3 - 60 : Couplage de Sonogashira et obtention de la cassette **132**

Le phénol **132** a ensuite été protégé au moyen d'un groupement TBDMS. Afin de faciliter les purifications et la synthèse, il est plus facile de protéger le phénol avant de préparer le 1,2-dioxétane car dans ce cas l'espèce formée est extrêmement sensible aux conditions légèrement basiques. La protection a lieu avec un rendement moyen de 50% qui s'explique par la très faible échelle de synthèse (<50 mg). Par ailleurs, le fluorophore benzophénoxazine a tendance à s'adsorber de façon non-spécifique à la silice lors des purifications chromatographiques et des quantités importantes de produits sont perdues. Le composé **133** est toutefois obtenu en quantité suffisante pour la suite de la

synthèse. La dernière étape est comme toujours la formation du 1,2-dioxétane. Celui-ci a été obtenu en utilisant du bleu de méthylène comme photosensibilisateur sous atmosphère d'oxygène et sous irradiation lumineuse. Le dioxétane final **106** est obtenu avec un rendement de 50 % (Figure 3 - 61).

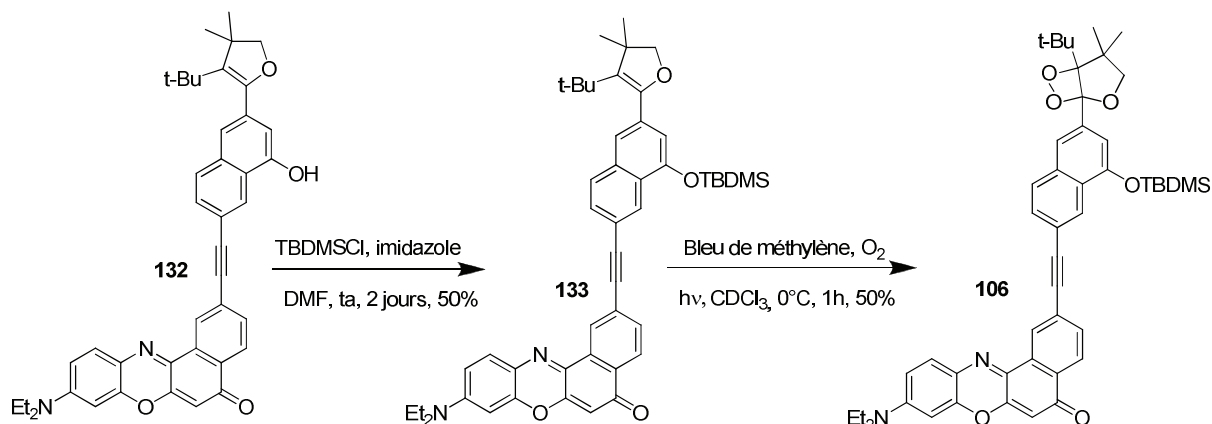


Figure 3 - 61 : Obtention de la cassette chémiluminescente **106**

Cependant, le produit n'est pas obtenu pur mais dans un mélange 55/45 avec le produit d'ouverture du 1,2-dioxétane **134** (Figure 3 - 62). Malgré nos divers efforts de purifications et de modifications des conditions expérimentales, le produit n'a pas pu être obtenu de manière plus propre. Ceci est dû au caractère instable du produit formé soit lors de la réaction, soit lors de la purification. Différentes silices ont été utilisées (grosse et petite granulométrie) et chacune a été neutralisée au moyen de triéthylamine ; des colonnes à base d'alumine ont également été essayées. L'acidité du chloroforme deutéré utilisé pour les analyses RMN a aussi été préalablement neutralisée par filtration sur carbonate de potassium. Les conditions optimales pour obtenir le composé **106** pur n'ont pas encore été trouvées à ce jour. Malgré ce résultat, notre preuve de concept est uniquement qualitative, nous avons donc décidé de déterminer les propriétés spectrales de chémiluminescence de notre composé afin de vérifier que la cassette chémiluminescente fonctionne.

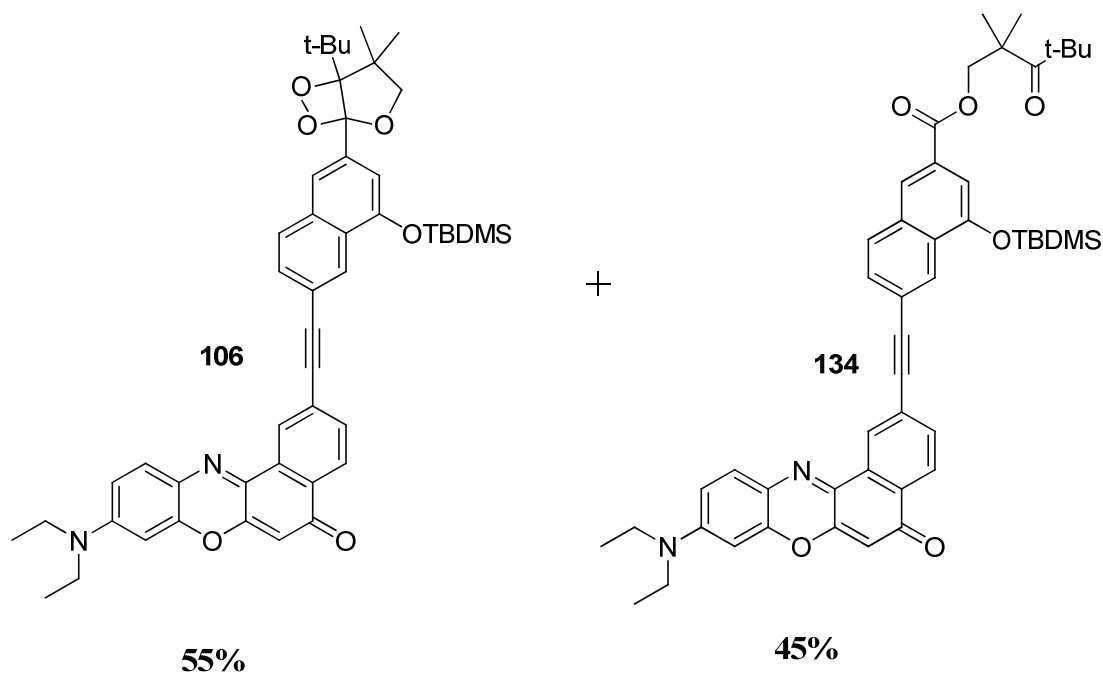


Figure 3 - 62 : Mélange obtenu après la réaction de photo-oxydation

1.5. Propriétés spectrales

Les mesures de chémiluminescence ont été effectuées dans le DMSO. Une solution du composé **106** à 1mg/mL a été préparée. Puis, des dilutions successives ont été entreprises pour mesurer et évaluer les propriétés. Aux concentrations de l'étude (mmol/L), le composé **106** est complètement soluble dans le DMSO. Le spectre d'absorption et d'émission de fluorescence du mélange a donc été enregistré. Nous pouvons supposer que l'ouverture du cycle dioxétane ne modifie pas le spectre d'absorption et d'émission du composé **106**. En effet, la partie de la molécule à l'origine de la fluorescence n'est pas structurellement modifiée.

Le spectre d'absorption présente un maximum à 571 nm. Le spectre d'émission de fluorescence est centré autour de 645 nm (excitation 570 nm). Ces valeurs sont dans la même gamme que la cassette publiée par le groupe de K. Burgess qui affiche une absorption à 558 nm et une émission à 628 nm.²³⁰ La différence peut s'expliquer par le fait que, dans leur cas, le solvant de mesure était le DMF (Figure 3 - 63).

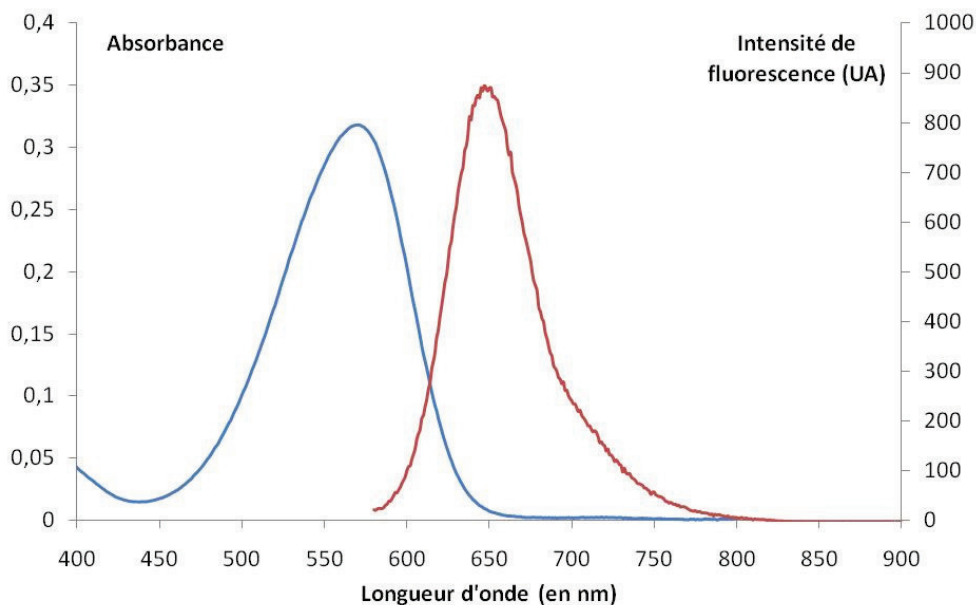


Figure 3 - 63 : Spectre d'absorption et d'émission du mélange de **106** et **134** (55/45) DMSO, 25°C, 12,8 μ M (Abs.), 128 nM (Em.), excitation : 570 nm

La chémiluminescence du mélange de **106** et de **134** a ensuite été déclenchée au moyen d'une solution de TBAF (0.01 M) directement dans la cuve de mesure. Des spectres d'émission de chémiluminescence ont été enregistrés (Figure 3 - 64). Le maximum d'émission est à 630 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde d'émission du fluorophore Nile Red couplé à notre chémiluminophore. Le transfert d'énergie vers le fluorophore semble donc avoir lieu. En revanche, nous pouvons remarquer une deuxième bande d'émission ayant pour maximum 560 nm.

Cette bande pourrait être interprétée comme un transfert imparfait de l'énergie du chémiluminophore vers le fluorophore et donc une émission propre du chémiluminophore (la partie naphthalénique). Ce phénomène pourrait aussi être expliqué par une deuxième bande d'émission de la cassette (Figure 3 - 64).²²⁵

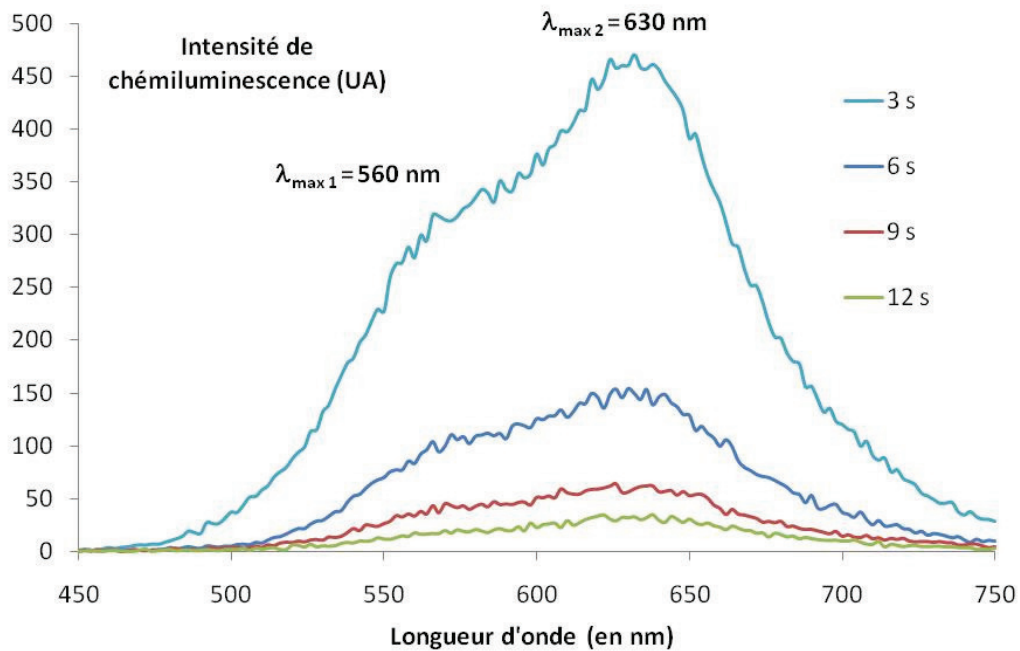


Figure 3 - 64 : Spectre d'émission de chémiluminescence (DMSO, 25°C, 1,28 mM (2ml) + solution de TBAF à 10^{-2} M dans le DMSO (1ml))

Une cinétique d'émission a aussi été entreprise à différentes concentrations en chémiluminophore. Nous pouvons remarquer que la chémiluminescence est de type « flash » puisque l'émission disparaît en moins d'une minute (Figure 3 - 65).

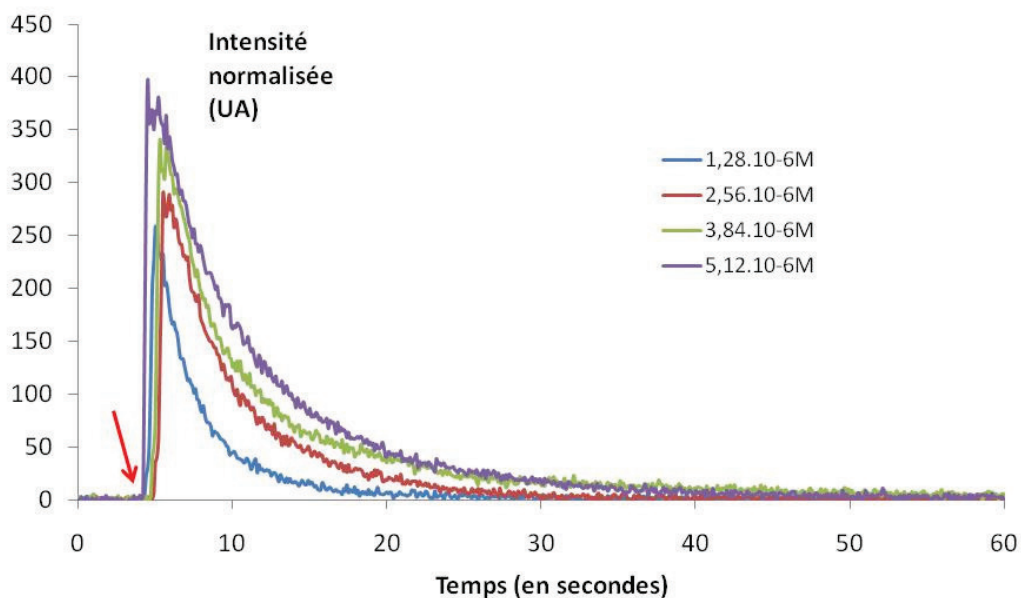


Figure 3 - 65 : Cinétiques de déclenchement à différentes concentrations (DMSO, 25°C, 630 nm) – flèche rouge : introduction du fluorure

Par la suite, une normalisation des courbes a permis de vérifier la proportionnalité de l'émission de lumière en fonction de la concentration (Figure 3 - 66).

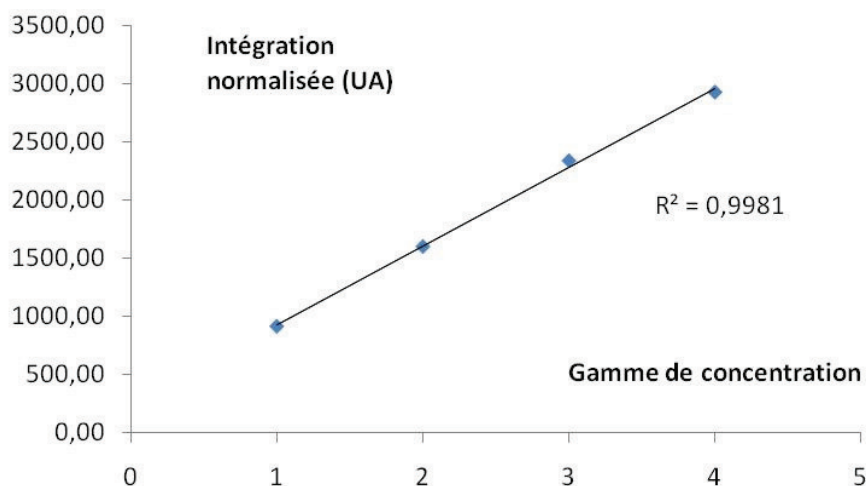


Figure 3 - 66 : Quantité totale de lumière en fonction de la concentration

Ces essais permettent de montrer que notre système fonctionne et qu'il existe une proportionnalité entre la concentration de notre sonde chémiluminescente et la quantité de lumière émise à une longueur d'onde fixée (600 nm).

1.6. Conclusion

Cette étude qualitative a permis de montrer que la cassette fonctionnait en émettant de la lumière à la longueur d'onde du fluorophore conformément à ce que le groupe de K. Burgess avait réalisé avec le luminol.

L'étape suivante consiste donc à étendre ce système pour un déclenchement de chémiluminescence en milieu aqueux.

2 Synthèse et évaluation d'une cassette chémiluminescente hydrosoluble

2.1. Stratégie choisie

Dans le but de déclencher la chémiluminescence dans un milieu aqueux, nous avons choisi dans un premier temps de ne pas modifier la synthèse de notre intermédiaire clé **111**. En revanche, le couplage avec des fluorophores hydrosolubles est une option intéressante. Cela a l'avantage de ne modifier que les dernières étapes de la synthèse à partir de notre intermédiaire **111**. L'idée est donc de synthétiser la cassette chémiluminescente hydrosoluble **135** (Figure 3 - 67).

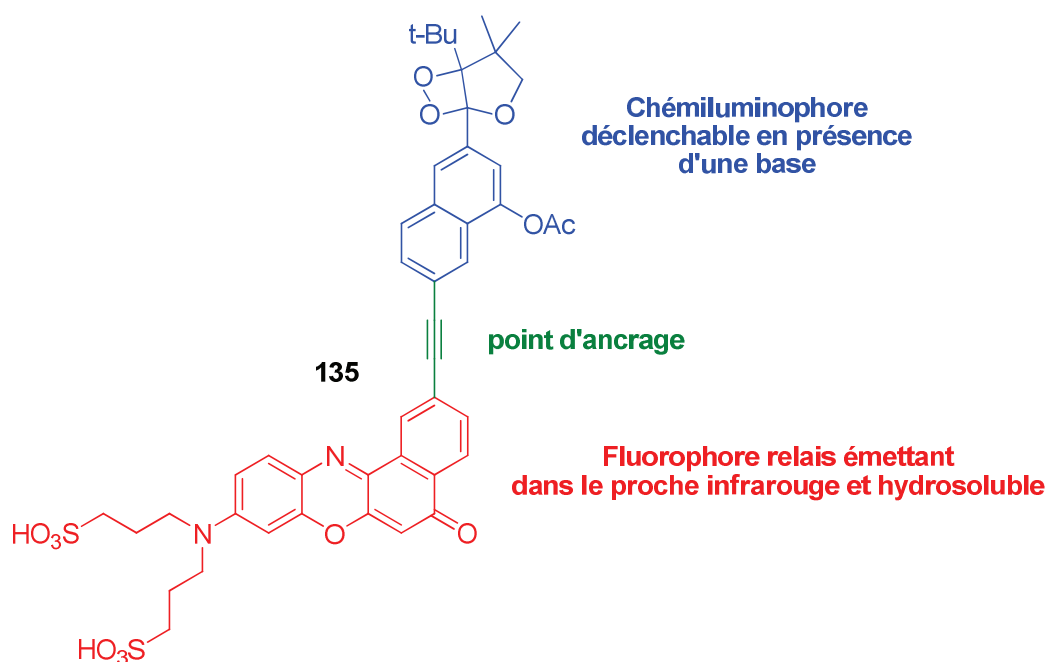


Figure 3 - 67 : Projet de cassettes chémiluminescentes hydrosoluble

Ce composé est constitué de notre intermédiaire **111**. Il a été protégé par un groupement acétyle afin de permettre le déclenchement au moyen d'une base (NaOH par exemple). Le fluorophore-relais est très proche de la benzophénoxazine précédemment utilisée. Elle comporte cependant deux chaînes hydrosolubilisantes (sulfonates) sur son motif aniline. Le fluorophore ciblé a déjà été synthétisé au laboratoire²⁵¹ en se basant sur les travaux d'hydrosolubilisation des benzophénoxazines du groupe de K. Burgess.^{247,248} La synthèse du fluorophore **139** a lieu en trois étapes sans purification intermédiaire. Le 3-aminophénol commercial **136** est doublement alkylé avec la 1,3-propanesultone pour fournir le phénol **137**. Celui-ci subit une nitrosation pour fournir le composé **138**. Ce produit est directement engagé dans l'étape de formation du fluorophore **139** en présence du 1,6-dihydroxynaphtalène. Les propriétés spectrales ont été mesurées dans le tampon PBS et le DMSO. Ce fluorophore affiche un rendement quantique modeste de 13% dans le PBS mais dans la même gamme que les dérivés précédemment synthétisés du groupe de K. Burgess (Figure 3 - 68).

²⁵¹ Travaux du Dr. Christophe Portal (Chef de Projet Quidd, janvier 2007-avril 2010)

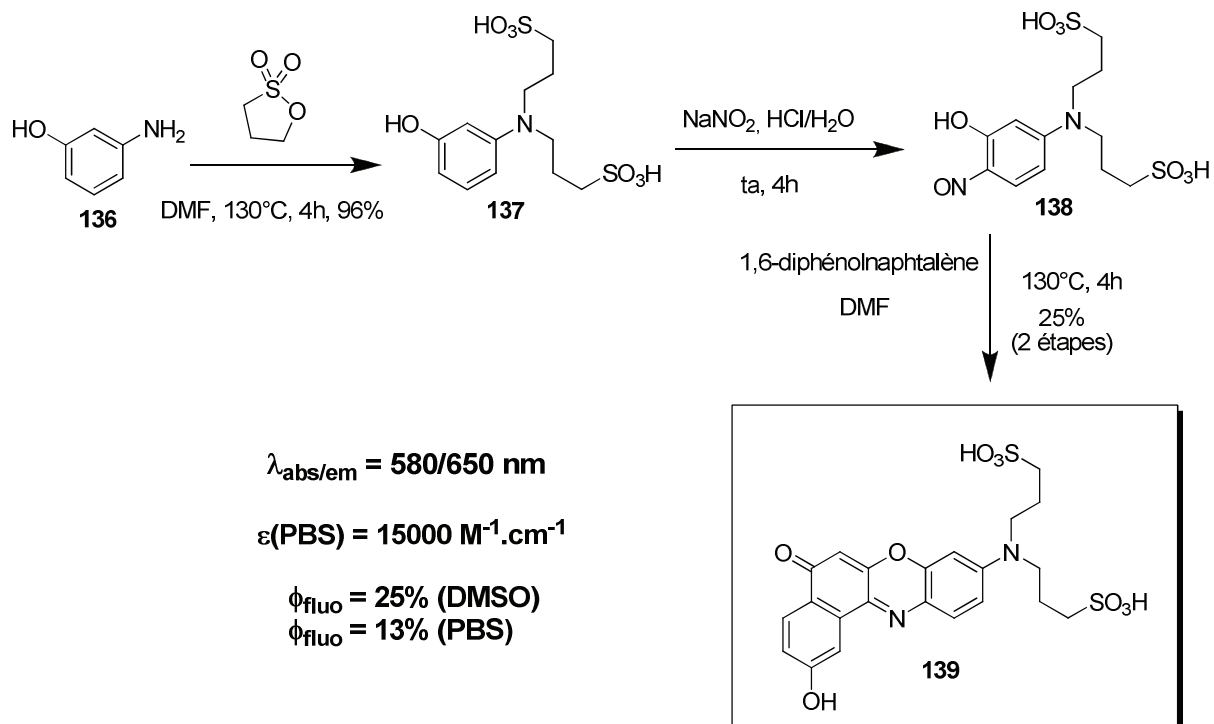


Figure 3 - 68 : Synthèse et propriétés spectrales de la benzophénoxazine hydrosoluble 139

Ce fluorophore a ensuite été converti en dérivé triflate approprié pour les réactions de Sonogashira. Le fluorophore **140** est obtenu avec un rendement de 70% (Figure 3 - 69).

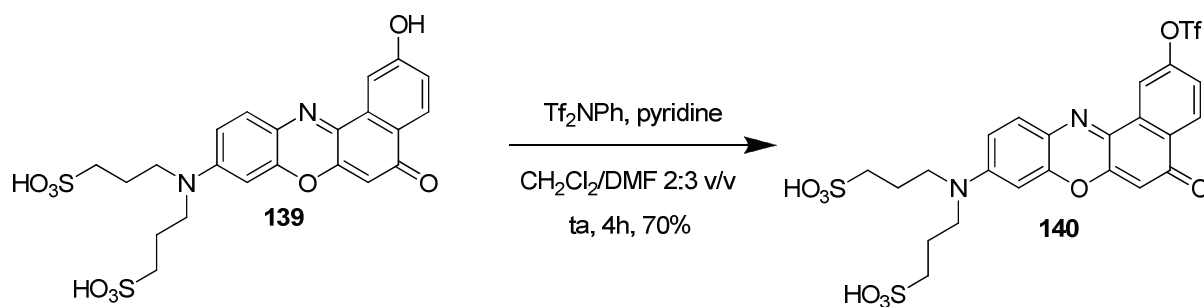


Figure 3 - 69 : Préparation du fluorophore activé 140

2.2. Synthèse

Le fluorophore **140** a donc été couplé à l'intermédiaire clé **111** grâce à une réaction de Sonogashira, en utilisant le palladium tétrakis(triphénylphosphine) comme catalyseur. La cassette **141** est obtenue avec un rendement de 48% (Figure 3 - 70).

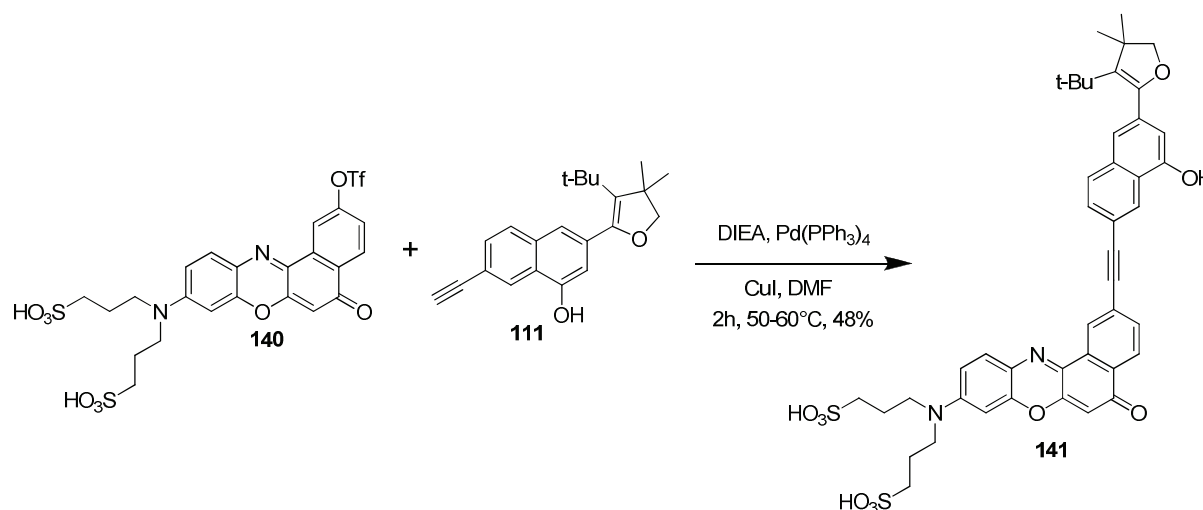


Figure 3 - 70 : Synthèse de la cassette **141**

Nous souhaitons ensuite acétyler le phénol libre afin de le protéger avant de synthétiser le 1,2-dioxétane correspondant. Malheureusement, d'autres fonctions de la molécule (quaternarisation de l'azote, fonction carbonyle de la BPO) sont aussi acétylées pendant la réaction. Pour mieux contrôler les conditions, nous avons donc préféré acétyler d'abord l'intermédiaire clé **111** avant de le coupler. Le produit **142** est obtenu en utilisant le chlorure d'acétyle, en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane anhydre avec un rendement moyen de 40% (Figure 3 - 71).

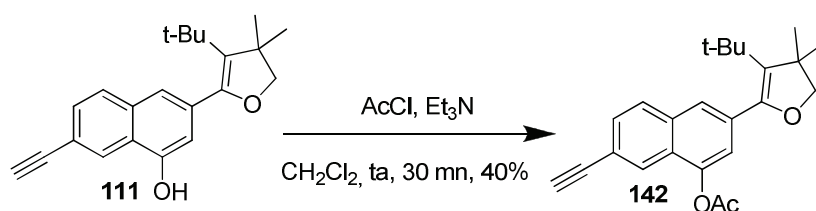


Figure 3 - 71 : Synthèse du phénol protégé **142**

Le phénol protégé **142** a été ensuite engagé dans une réaction de Sonogashira avec le fluorophore **140** dans les mêmes conditions que précédemment. Nous avons choisi de ne pas trop chauffer le mélange pour éviter la déprotection du phénol. En effet, les traces d'eau ou les amines secondaires pourraient déprotéger le phénol car l'ester d'aryle est très fragile. La cassette **143** est obtenue avec un rendement moyen de 48% (Figure 3 - 72), identique à celui obtenu pour la cassette **141**.

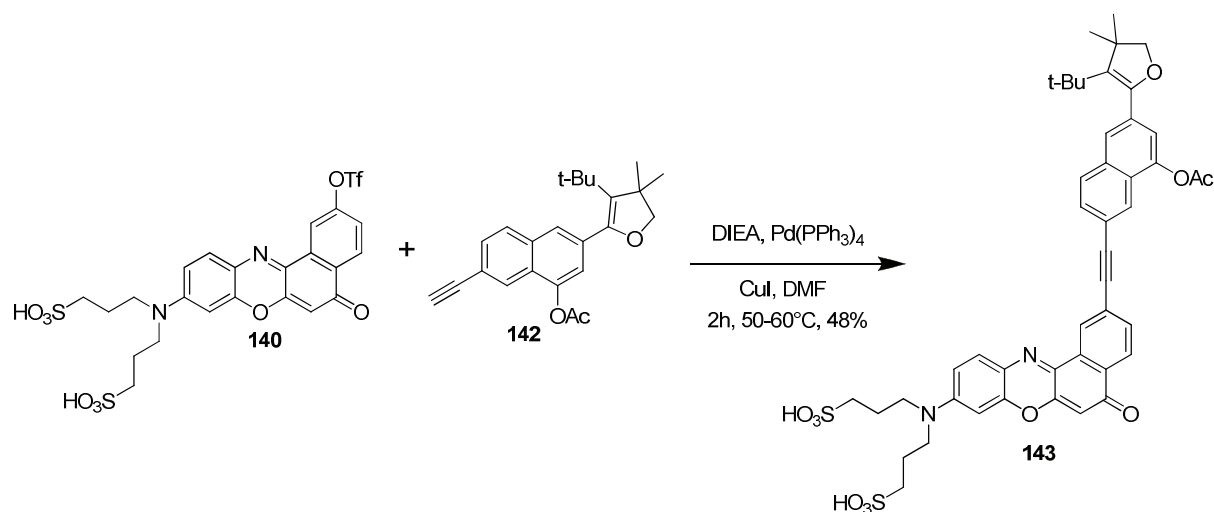


Figure 3 - 72 : Synthèse de la cassette 143

La dernière étape de synthèse est l'obtention du 1,2-dioxétane au moyen d'une réaction de cycloaddition [2+2] en présence d'oxygène singlet, celui étant généré *in situ*. Dans les réactions précédentes que nous avons présentées, l'oxygène singlet était généré par un photosensibilisateur, le bleu de méthylène.

Dans notre cas, cette réaction pose cependant problème. Si le 1,2-dioxétane se forme bien, en revanche, la présence d'un fluorophore sur notre structure induit une déstabilisation (photo)chimique du produit résultant. Après l'analyse, le produit récupéré est le produit d'ouverture du cycle 1,2-dioxétane déjà décrit plus tôt pour la cassette hydrophobe.

En effet, nous supposons que le fluorophore sous irradiation lumineuse peut transférer des électrons vers le chémiluminophore et déstabiliser le cycle 1,2-dioxétane. Dans ces conditions, il nous a été impossible d'isoler correctement le chémiluminophore souhaité.

Nous avons donc dû modifier notre méthode de génération d'oxygène singlet. Nous utilisons cette fois-ci de l'ozone et le triphénylphosphite. A basse température (-78°C), l'ozone réagit sur le triphénylphosphite pour former une espèce trioxaphosphétane. L'oxygène singlet est généré en réchauffant le mélange (-20°C), ce qui provoque la décomposition du trioxaphosphétane en phosphate et oxygène singlet (Figure 3 - 73).

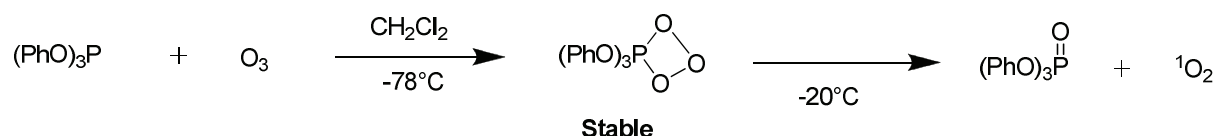


Figure 3 - 73 : Génération d'oxygène singlet via une approche non photochimique

Cette méthode présente l'avantage de ne pas faire intervenir d'excitation lumineuse. De plus, le 1,2-dioxétane est généré à basse température et donc, dans des conditions où il serait potentiellement

plus stable. Toutefois, cette méthode nécessite l'utilisation d'un excès de triphénylphosphite (> 10 équiv.) ce qui complique les purifications du composé final.

Cette méthode a donc été appliquée à la synthèse du dioxétane **135** (Figure 3 - 74). Ce dernier a été obtenu après purification (HPLC phase inverse – phase mobile TEAB/CH₃CN), puis lyophilisation sous la forme d'une poudre amorphe (quantité : ~1 mg). Cette phase mobile non usuelle (TEAB) est utilisée en raison de l'instabilité des espèces dioxétanes en conditions acides (TFA 0,1%). Du fait de la faible quantité de produit obtenu, il n'a pu être analysé par RMN. En revanche, les analyses HPLC couplées à des analyses de masse ESI montrent l'obtention d'un produit ayant la même masse mais n'ayant pas le même temps de rétention que le produit de dégradation d'ouverture de cycle (précédemment identifié). Le spectre HPLC a été enregistré avec une pureté de 85% (Figure 3 - 75).

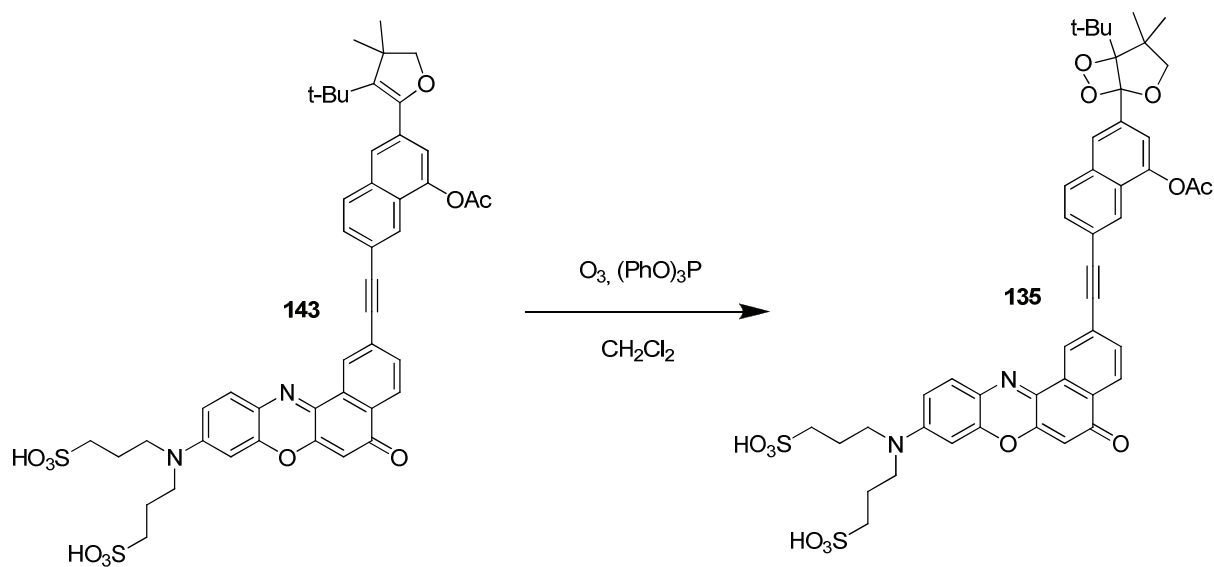


Figure 3 - 74 : Synthèse du 1,2-dioxétane final **144**

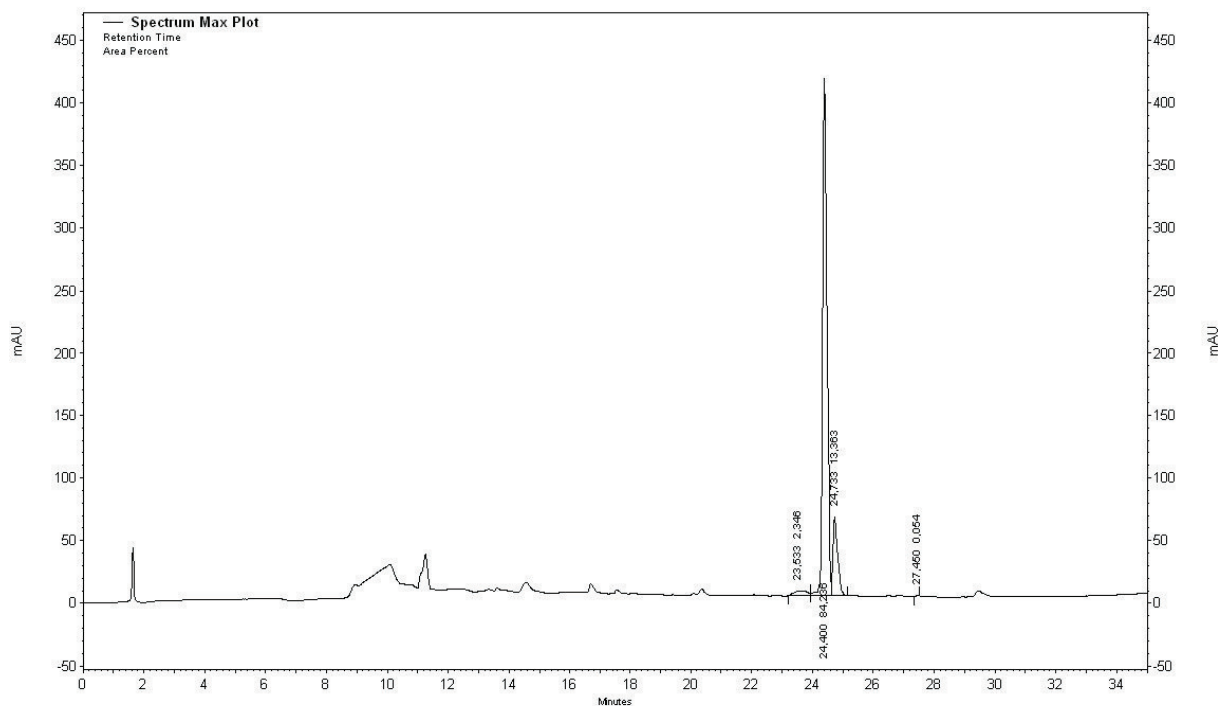


Figure 3 - 75 : Spectre HPLC du composé final supposé **135** (TEAA – CH₃CN – de 100/0 à 0/100 – 3% par minutes)

Le spectre de masse (ESI-) confirme l'obtention d'un produit possédant la même masse que le composé **135** (Figure 3 - 76).

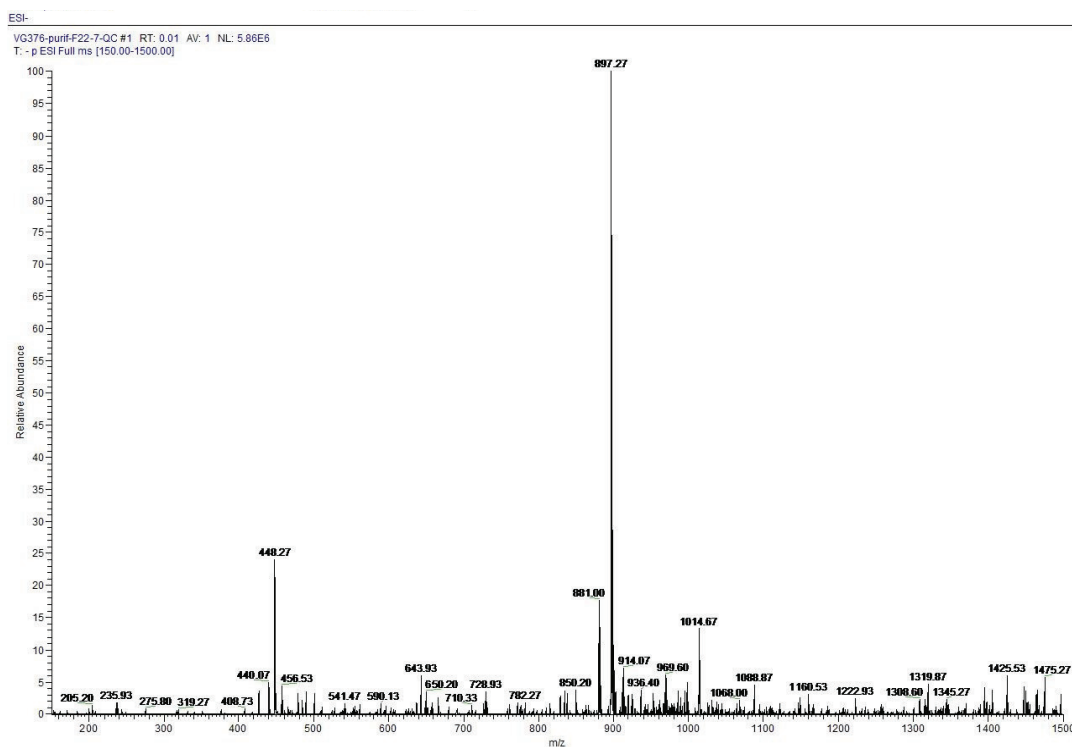


Figure 3 - 76 : Spectre de masse (ESI -) du composé purifié et isolé **135**

2.3. Résultats et discussions

Nous avons voulu vérifier si notre composé supposé **135** produisait une chémiluminescence. Nous avons testé des déclenchements de chémiluminescence aussi bien en milieu organique qu'en milieu aqueux. Le déclencheur étant une solution d'hydroxyde de soude (1.0 M).

Dans tous les cas, à des concentrations égales voire supérieures à celles utilisées dans les tests menés avec la version lipophile, aucune chémiluminescence n'a pu être observée que ce soit en milieu aqueux ou en milieu organique (DMSO).

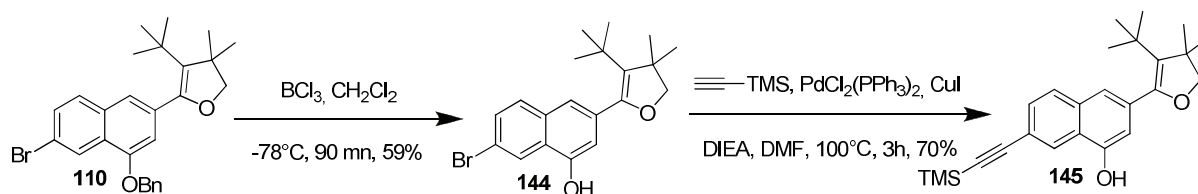
Cela remet en cause l'obtention du produit **135**. Il faut noter cependant que devant les faibles quantités de produit obtenues et cela après une longue mise au point des conditions de synthèse, il n'y a pas eu confirmation par analyse RMN que le produit isolé est bien le produit attendu.

Des études dans ce sens sont actuellement en cours pour synthétiser le composé en plus grosses quantités afin de valider la structure sans ambiguïté.

3 Synthèse et évaluation de dioxétane dimérique

3.1. Synthèse

Dans le cadre de l'optimisation de la synthèse de l'intermédiaire clé **111**, nous avons souhaité vérifier la possibilité de déprotéger dans un premier temps le phénol puis de réaliser la réaction de Sonogashira. Nous souhaitons également vérifier que cette voie était plus efficace en termes de rendement. Le phénol libre **144** a donc été synthétisé à partir du composé **110** précédemment décrit. La déprotection a lieu en présence de trichlorure de bore à -78°C dans le dichlorométhane anhydre et affiche un rendement correct de 59%. Le couplage de Sonogashira a ensuite été réalisé en présence de triméthylsilylacétylène dans les mêmes conditions précédemment utilisées. Le naphthalène **145** est obtenu avec un bon rendement de 70% (Figure 3 - 77).



Il est important de noter que le composé **145** a été purifié par chromatographie sur gel de silice. En effet, l'étape suivante consiste à déprotéger le groupement TMS au moyen d'un traitement basique (K_2CO_3 dans le méthanol). De manière surprenante, un produit secondaire **146**, obtenu en quantité importante (33%) est récupéré en plus de l'intermédiaire clé **111** (Figure 3 - 78).

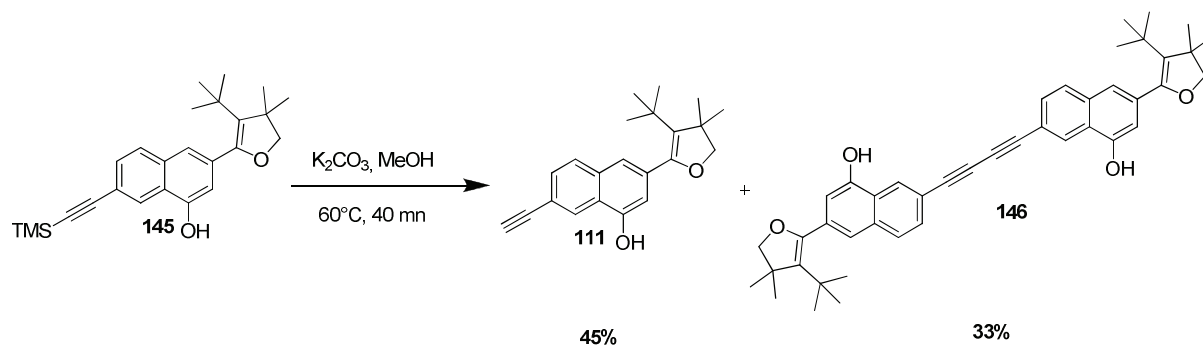


Figure 3 - 78 : Réaction de déprotection du groupement TMS et obtention des composés **111** et **146**

Ce composé est issu d'un couplage de Glaser.²⁵² Cette réaction a lieu en présence d'une base, de dioxygène et de cuivre (I). Le mécanisme passe par l'échange du proton acétylénique avec le cuivre (I). En présence d'oxygène, le cuivre est oxydé en cuivre (II), puis il y a une rupture homolytique de la liaison carbone-cuivre. Le cuivre (I) est récupéré et un radical acétylénique est formé. Celui réagit sur un autre monomère et forme le dimère (Figure 3 - 79).

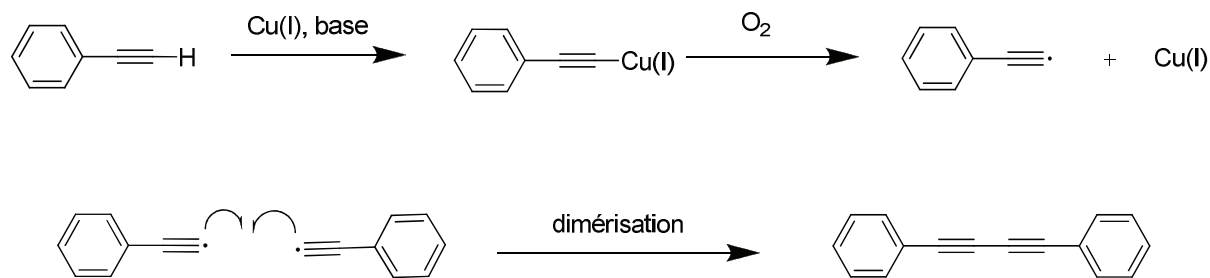
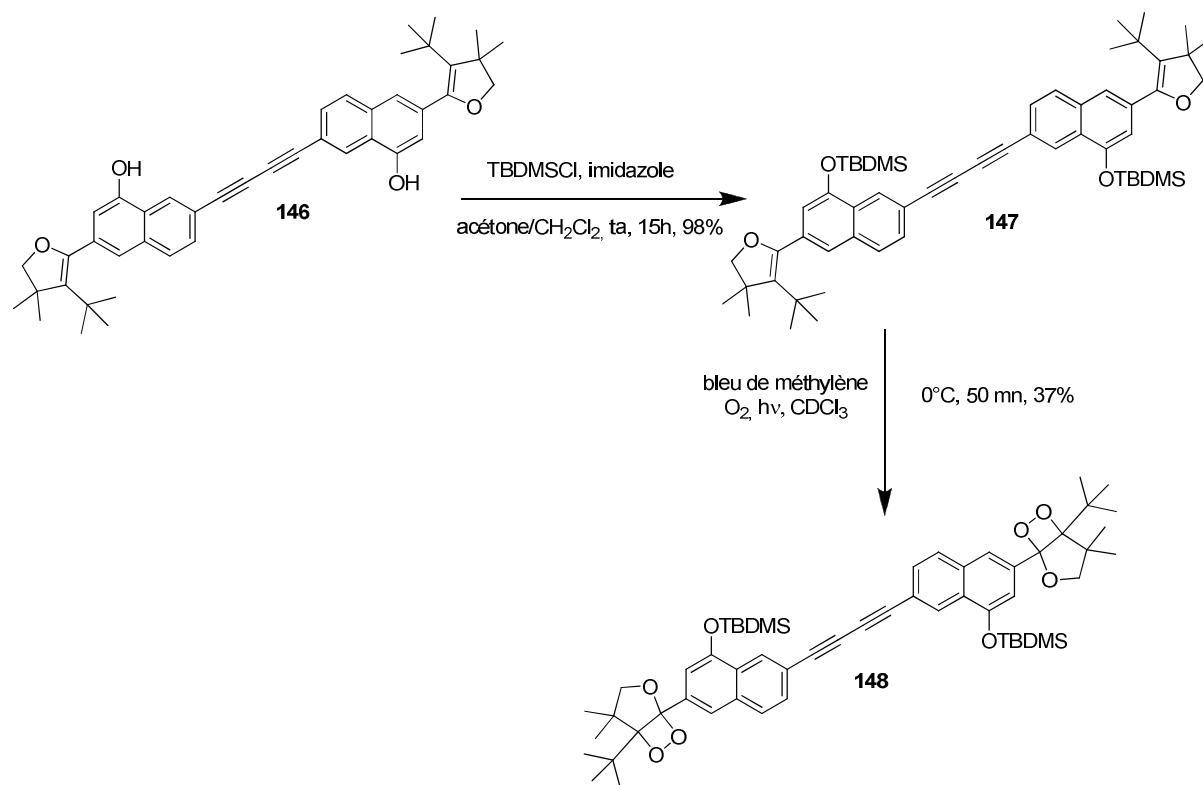


Figure 3 - 79 : Mécanisme de homocouplage oxydatif de Glaser

Dans notre cas, nous pouvons supposer que des traces de cuivre (I) étaient encore présentes dans le produit purifié **145** après la réaction de Sonogashira. En présence de base et étant donné que le solvant de réaction n'a pas été dégazé, le couplage de Glaser a pu avoir lieu.

Nous avons choisi de valoriser ce dimère **146** en synthétisant le dioxétane dimérique correspondant. Nous avons tout d'abord protégé les deux phénols par un groupement silylé TBDMS. Le produit protégé **147** est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif (98%). La formation des deux 1,2-dioxétanes est réalisée au moyen du bleu de méthylène comme photosensibilisateur sous irradiation lumineuse. Le dioxétane double **148** est obtenu après purifications sur gel de silice avec un rendement moyen de 37% (Figure 3 - 80).

²⁵² Siemsen, P., Livingston, R. C. and Diederich, F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *15*, 2632.

Figure 3 - 80 : Synthèse du dioxétane dimérique **148**

Le composé final **148** a entièrement été caractérisé par RMN du proton et du carbone et par analyses de masse. Nous avons pu ensuite évaluer ses propriétés de chémiluminescence.

3.2. Résultats spectroscopiques

Le composé **148** est soluble dans le DMF et partiellement soluble dans le DMSO dans la gamme de concentration du millimolaire. Une solution à 1mg/mL a donc été préparée dans le DMF. Les mesures d'absorption, de fluorescence et de chémiluminescence ont été faites dans le DMSO en tenant compte d'un pourcentage de DMF correspondant à la dilution à partir de la solution stock.

Le spectre d'absorption et d'émission ont tout d'abord été enregistrés (Figure 3 - 81). Le spectre d'absorption présente une large bande entre 310 et 410 nm avec 4 maxima : 331 nm (ϵ 20 600 M⁻¹.cm⁻¹), 349 nm (ϵ 24 400 M⁻¹.cm⁻¹), 377 nm (ϵ 23 000 M⁻¹.cm⁻¹) et 391 nm (ϵ 22 300 M⁻¹.cm⁻¹). Le composé **148** présente une fluorescence importante avec un déplacement de Stokes de 57 nm et un maximum d'émission centré à 437 nm (excitation à 380 nm). Le rendement quantique de fluorescence de ce composé a été calculé en prenant la 7-hydroxycoumarine comme référence (76 % dans le PBS). Ce composé affiche un rendement quantique de 44% (DMSO).

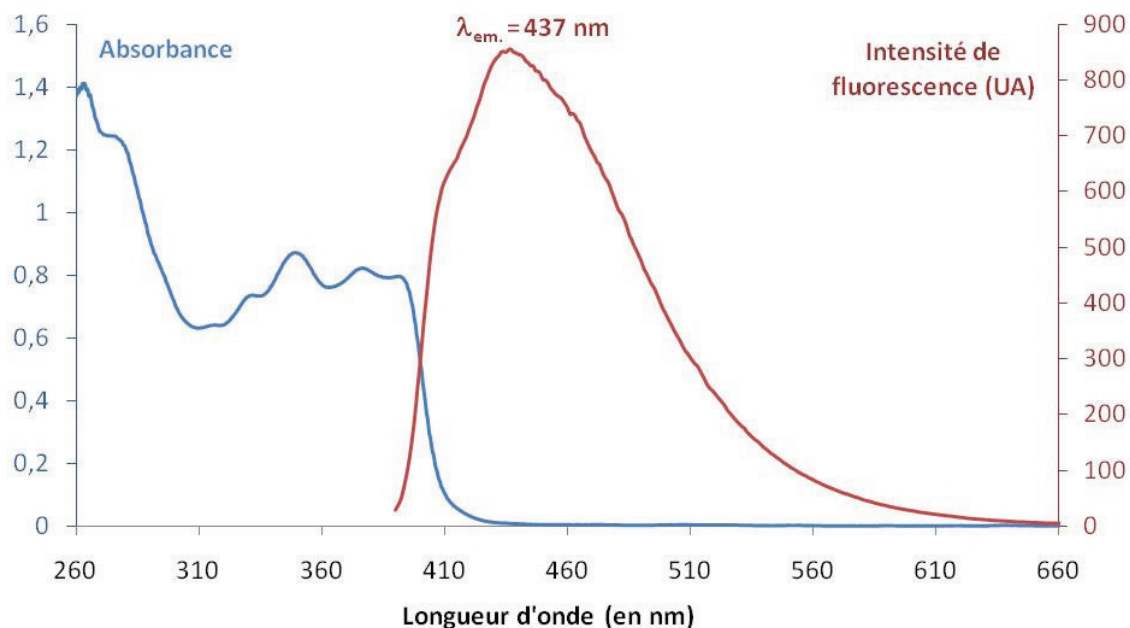


Figure 3 - 81 : Spectre d'absorption et d'émission du composé 148 (DMSO, 25°C, 35 μ M (Abs.), 1,07 μ M (Fluo.), Exc : 380 nm)

La chémiluminescence a ensuite été déclenchée au moyen d'une solution de TBAF (1.0 M dans le THF). Le spectre d'émission de chémiluminescence a été enregistré (Figure 3 - 82). Il présente une bande large entre 560 et 630 nm avec un maximum à 583 nm.

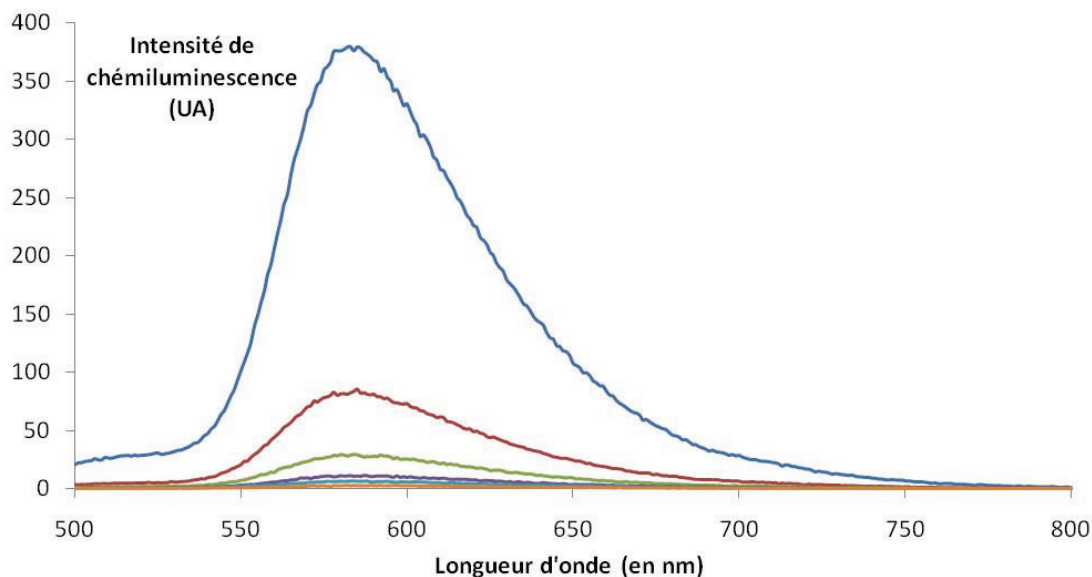


Figure 3 - 82 : Spectre d'émission de chémiluminescence du composé 148 (DMSO, 25°C) 3,58 μ M de 88 (2,9 ml), déclenchement solution de TBAF (1.0 M dans le THF, 100 μ l) Les courbes sont enregistrées à 1.5 secondes d'intervalle

La cinétique de chémiluminescence a ensuite été enregistrée à 583 nm (Figure 3 - 83). Cette dernière montre une chémiluminescence de type « flash » avec une durée totale d'émission de 10 secondes.

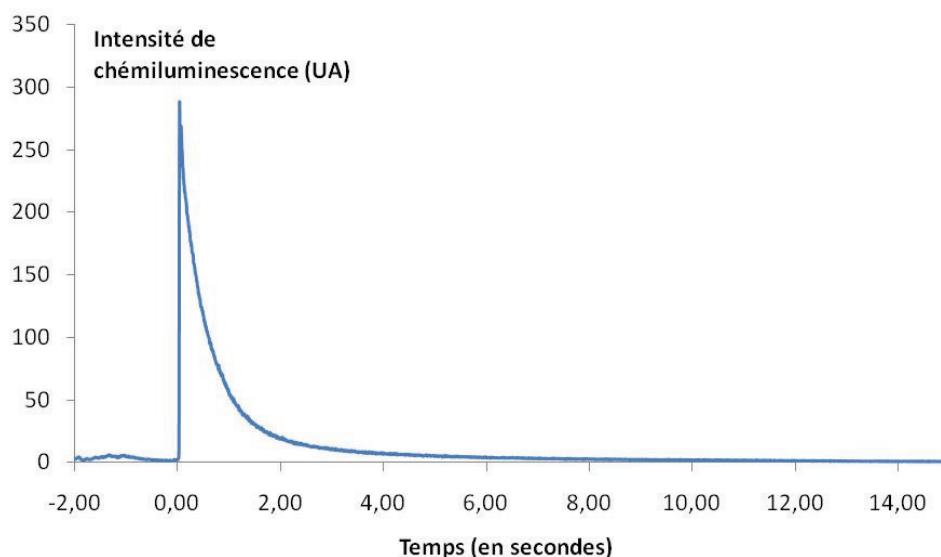


Figure 3 - 83 : Cinétique d'émission de chémiluminescence du composé 148 (DMSO, 25°C) 3,58 μ M de 88 (2,9 ml), déclenchement solution de TBAF (1.0 M dans le THF, 100 μ l)

Une fois la réaction de déclenchement effectuée, nous avons voulu vérifier les propriétés spectrales du composé d'ouverture des 1,2-dioxétanes **149**. Celui-ci est en fait un double cétoester (Figure 3 - 84).

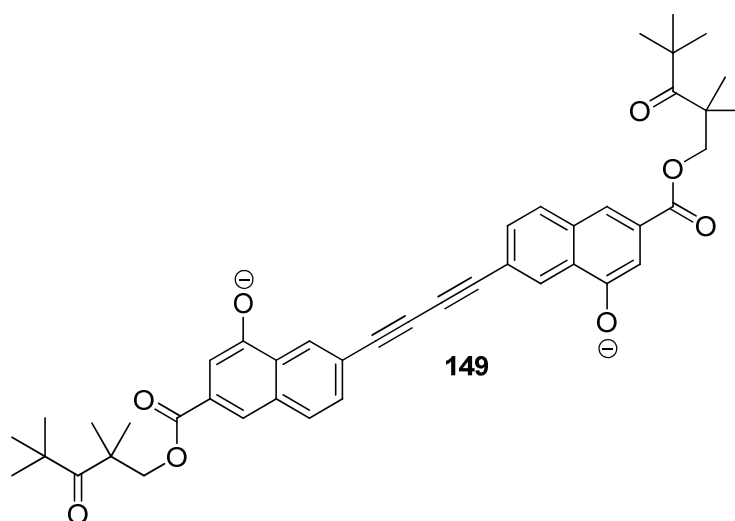


Figure 3 - 84 : Structure du composé 149 (composé 148, une fois déclenché)

Nous avons déterminé les propriétés d'absorption et de fluorescence de ce composé. Les spectres d'absorption et de fluorescence ont été enregistrés dans le DMSO avec ajout de 1% en volume d'une solution de TBAF (1.0 M dans le THF). En effet, il faut maintenir un milieu basique pour garder les phénols sous forme phénolate car nous avons pu remarquer que les propriétés de fluorescence étaient diminuées si les phénols étaient sous forme natives.

Le composé **149** présente un maximum d'absorption à 529 nm mais une bande large comprise entre 490 et 550 nm. Le coefficient d'absorption molaire est de 27 200 $M^{-1}.cm^{-1}$ (529 nm). La fluorescence a

ensuite été mesurée et le rendement quantique calculé. Le maximum de fluorescence est à 588 nm avec une bande large entre 570 et 640 nm. Le rendement quantique est de 15% dans le DMSO en utilisant la rhodamine 6G comme référence (76% dans l'eau).

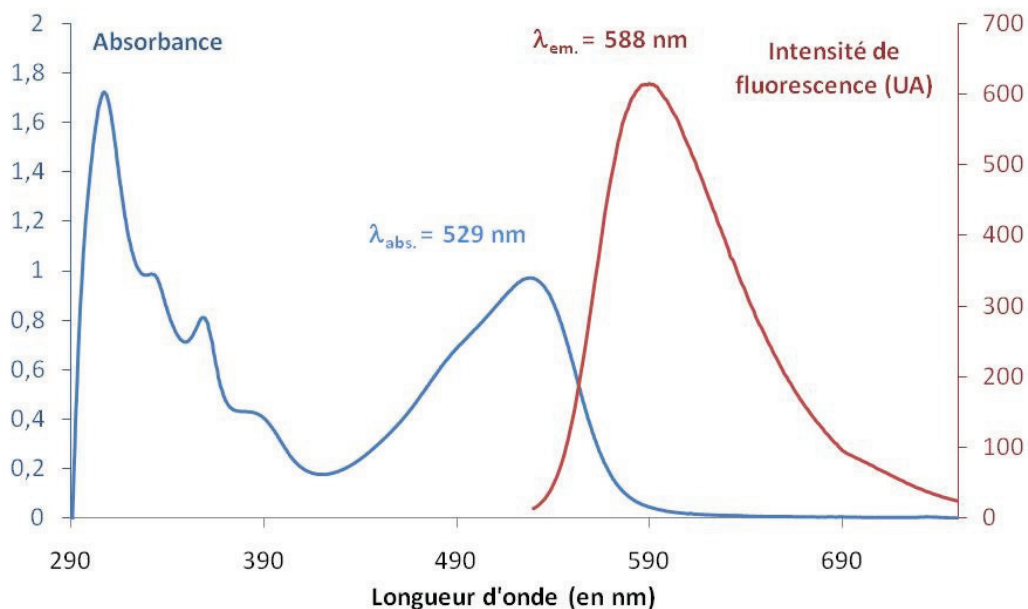


Figure 3 - 85 : Spectre d'absorption et d'émission du composé **149** (DMSO, 25°C, 35 μ M (Abs.), 1.07 μ M (Fluo.), Exc : 510 nm)

Le spectre de chémiluminescence recouvre parfaitement le spectre de fluorescence du composé **149** ce qui confirme que l'espèce excitée qui émet de la chémiluminescence est bien le composé **149**. La modification importante de l'absorption et de l'émission entre les composés **148** et **149** est due à la formation de fonctions ester qui sont attractrices d'électrons. On a donc l'apparition d'un double effet « push-pull » entre le phénolate (donneur) et les fonctions ester (acceptrices). Nous pouvons nous demander si nous sommes en présence d'une cassette « TBET » car deux triples liaisons carbone-carbone lient deux parties naphthaléniques. Les propriétés de fluorescence sont de plus, modifiées si le milieu est basique ou non. Si les phénols ne sont pas sous forme phénolates, l'émission de fluorescence est la même que lorsque les phénols étaient protonnés.

Nous pouvons faire un parallèle avec les travaux récents du groupe de K. Burgess qui décrit des cassettes « TBET » présentant un transfert énergétique ou non, suivant le pH de la mesure.²⁵³

Nous avons toutefois synthétisé un exemple intéressant de chémiluminophore/pro-fluorophore émettant dans le rouge. Ces travaux seront prochainement valorisés par une publication.

²⁵³ Thivierge, C., Han, J., Jenkins, R. M. and Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **2011**, *13*, 5219.

4 Conclusions et discussions

Ce composé conclut les travaux menés pendant la thèse sur les « cassettes » chémiluminescentes. Nous avons pu démontrer que le principe de la cassette chémiluminescente fonctionne. Il est possible de transférer l'énergie de la chémiluminescence vers un fluorophore organique préalablement sélectionné pour son maximum d'émission dans le proche infrarouge. Ceci présente l'avantage de pouvoir moduler la longueur d'onde d'émission de la chémiluminescence et notamment d'émettre de la chémiluminescence dans le rouge et le proche infrarouge.

Dans la version hydrosoluble de la cassette, nous n'avons pas pu pour le moment observer de chémiluminescence dans l'eau, l'un des objectifs principal de ce projet. Cependant, nous ne pouvons pas conclure quant à l'infaisabilité du projet. Le composé final n'est pas fini d'être complètement caractérisé.

La synthèse fortuite du composé **146** nous a permis de développer un nouveau type de chémiluminophore pas encore reporté dans la littérature. Le 1,2-dioxétane qui en résulte présente un comportement spectroscopique intéressant et permet d'émettre de la chémiluminescence dans le rouge. Une publication dans le journal Tetrahedron Letters, résumant ces travaux, est en cours de rédaction.

Cite this: *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 6713–6715

www.rsc.org/chemcomm

A novel and unusually long-lived chemiluminophore based on the 7-hydroxycoumarin scaffold†

Jan Kočí,^{ab} Virgile Grandclaude,^{ab} Marc Massonneau,^b Jean-Alexandre Richard,^{ab} Anthony Romieu^{*ac} and Pierre-Yves Renard^{*acd}

Received 4th April 2011, Accepted 21st April 2011

DOI: 10.1039/c1cc11919b

Synthesis and chemiluminescent properties of a new 1,2-dioxetane chemiluminophore bearing a 7-hydroxycoumarin moiety are presented. The 1,2-dioxetane decomposition ended up with strong and long-lived emission of light. This new structure opens way to the development of a new generation of bright chemiluminescent bio-probes.

Over the past decade, based on the strained and unstable intermediate polyoxygenated rings formed in the bioluminescence processes, many 1,2-dioxetane structures have been developed as convenient tools for chemiluminescence (CL) studies¹ and to design chemoluminogenic probes suitable for sensitive detection and quantitation of various bio-analytes in complex biological mixtures.² The origin of the CL for these 1,2-dioxetanes is a Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence phenomenon (CIEEL): the deprotonation of a hydroxyaryl group bearing a 1,2-dioxetane unit (preferentially at the *meta* position of the aromatic relative to the phenolate) generates an unstable oxidoaryl-substituted 1,2-dioxetane which undergoes intramolecular charge-transfer-induced decomposition (CTID) to produce a singlet-excited carbonyl fragment while effectively emitting light.³

Among the required stabilising moieties, the dihydrofuran ring has been described in the late 90's as a convenient scaffold to obtain 1,2-dioxetanes exhibiting a remarkable thermal stability.⁴ Thus, many examples of such oxy-substituted dioxetanes have been synthesised during these last few years.⁵

The main drawback of these structures is their light emission wavelengths, which are too close to the UV region for their

successful use in some bioanalyses and bioimaging applications due to the significant absorption of the emitted light by some biomaterials.⁶ The use of relay fluorophores can be an alternative to red-shift this short-wavelength emission. Thus, two different strategies are generally adopted to transfer the energy released by the chemiluminescent reaction to the fluorophore moiety. The first strategy relies on the connection of chemiluminophore and fluorescent dye by a linker which allows an efficient chemiluminescence resonance energy transfer (CRET)⁷ or through bond energy transfer (TBET).^{8,9} The second strategy is based on the concomitant encapsulation of chemiluminophore and fluorescent dye within the same confined environment of nanoparticles or micelles.¹⁰

To expand the scope of the first strategy to a wider range of fluorescent reporter molecules, we wish to describe in this communication the challenging synthesis and luminescent properties of a new chemiluminophore **1** based on a dihydrofuran ring directly bound at the 5-position to a pro-fluorescent 7-hydroxycoumarin unit (Fig. 1).

Indeed, the 7-hydroxycoumarin moiety is well-known for its pro-fluorescent properties: substitution of its phenol by any electron-withdrawing group completely abolishes its fluorescence.^{11,12} By attaching a 1,2-dioxetane moiety at the 5-position of a 7-acetoxycoumarin unit (*i.e.*, in the *meta* position to the 1,2-dioxetane required for efficient CIEEL), it will be possible to study the unveiling luminescence associated to the phenol deprotection reaction which should end up with a simultaneous release of the fluorescent properties of the 7-hydroxycoumarin and of the electron exchange based luminescence.

7-Hydroxycoumarins are usually synthesised by the Pechmann reaction, starting from the corresponding resorcinol and β -keto acid (or ester) and involving acidic conditions.¹³

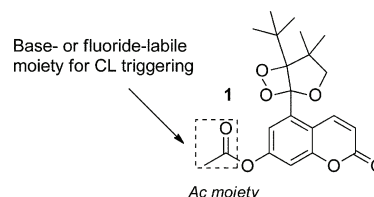


Fig. 1 Chemiluminophore–fluorophore hybrid studied in this work, whose CL reaction is based on the phenol deprotection.

^a Equipe de Chimie Bio-Organique, COBRA-CNRS UMR 6014 & FR 3038, rue Lucien Tesnière, 76131 Mont-Saint-Aignan, France. E-mail: anthony.romieu@univ-rouen.fr,

pierre-yves.renard@univ-rouen.fr; Web: <http://ircof.crihan.fr>;

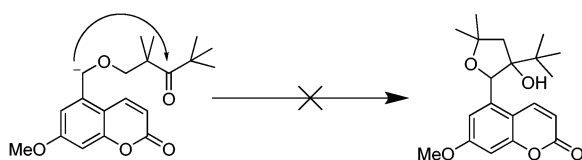
Fax: +33 2-35-52-29-71; Tel: +33 2-35-52-24-27 or 24-76

^b QUIDD, Pharmaparc II, bâtiment D, Voie de l'innovation, 27100 Val-de-Reuil, France. E-mail: mcm@quidd.com; Web: <http://www.quidd.com>; Fax: +33 2-32-59-67-65; Tel: +33 2-32-63-46-91

^c Université de Rouen, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

^d Institut Universitaire de France, 103 Boulevard Saint-Michel, 75005, Paris, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed synthetic procedures and characterisation/spectral data for compounds **1–11**. See DOI: 10.1039/c1cc11919b



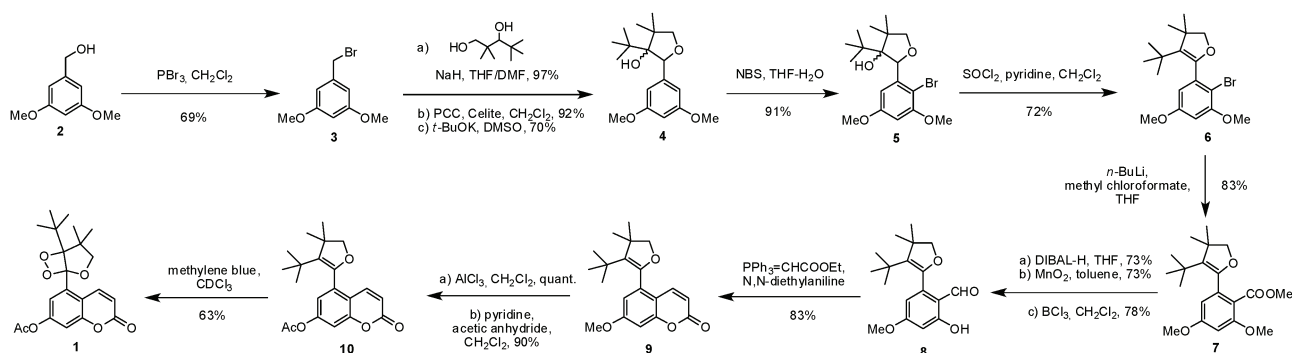
Scheme 1 Failure of the first synthetic route.

Thus, we first planned the preparation of **1** through the introduction of the functionalised alkyl chain required for the formation of the 1,2-dioxetane moiety, on the 5-position of a 7-methoxycoumarin derivative readily obtained from standard condensation (*vide supra*), and to build the tetrahydrofuran ring thereafter (Scheme 1).

Unfortunately and despite our efforts, the crucial synthetic step which consists of the intramolecular cyclisation of the benzylic anion to the ketone to form the tetrahydrofuran ring, which requires strongly basic conditions, did not generate the expected compound. Contrary to our expectations, the lactone ring did not suffer much from these conditions (especially ring opening), but we suspected that the electron delocalisation within the coumarin ring dramatically lessens the nucleophilicity of the formed benzyl-type carbanion, thus preventing the desired ring cyclisation. Using harsher reaction conditions eventually destroyed the coumarin unit. To overcome this failure, we turned our attention to an alternative and more challenging approach which involves: (1) the synthesis of the tetrahydrofuran ring, (2) the construction of the coumarin ring under unusual conditions and finally (3) the formation of the fragile 1,2-dioxetane moiety (Scheme 2).

The coumarinic 1,2-dioxetane **1** has been synthesised from commercially available (3,5-dimethoxyphenyl)methanol **2**. This latter primary alcohol was brominated with PBr_3 to obtain the corresponding benzyl bromide derivative **3** in 69% yield. Substitution reaction with 2,2,4,4 tetramethylpentane-1,3-diol provided quantitatively the intermediate hydroxyl ether which was oxidised with pyridinium chlorochromate (PCC) to afford the corresponding ketone in 92% yield. Use of this rather drastic oxidant was required, since all attempts using milder conditions: Swern oxidation, IBX or TPAP/NMO system gave poor yields. Next, we found that the best conditions for the cyclisation involved the use of freshly prepared dimethyl sulfoxide anion (potassium dimsyl) as a strong base to form the corresponding tetrahydrofuran ring **4** in 70% yield.¹⁴ In order to convert the resorcinol dimethyl ether **4** into the corresponding coumarin, we decided to generate the

required lactone through a less commonly used Wittig reaction, which involved the introduction of a carbonyl moiety at the 1-position of the phenyl ring. Direct metallation of this position gave low yields. However, an efficient and selective bromination using *N*-bromosuccinimide in THF–water (95 : 5) gave the product **5** with a high yield (91%). This bromination reaction was best performed prior to the elimination process leading to the dihydrofuran derivative **6**. This latter reaction involved standard chlorination of the tertiary alcohol followed by spontaneous (and/or pyridine-mediated) elimination to form **6** with a good yield (72%). Thereafter, bromine–lithium exchange was performed using *n*-BuLi, and the aryllithium intermediate was trapped by methyl chloroformate to give methyl ester **7** in 83% yield. Further conversion into aldehyde was obtained by using a two-step reduction–oxidation sequence. Thus, methyl ester **7** was firstly treated with DIBAL-H and the resulting primary alcohol was oxidised with MnO_2 in suspension in anhydrous toluene under reflux to give the expected benzaldehyde in 53% overall yield. The formation of the lactone ring has required the selective deprotection of one of the two methoxy groups. We were pleased to observe that the presence of the *ortho*-aldehyde allowed the selective removal of the desired methyl group with BCl_3 to afford the key benzaldehyde derivative **8**. This product was directly submitted to a Wittig reaction, involving the ylide derived from (2-ethoxy-2-oxoethyl)triphenylphosphonium salt, in anhydrous *N,N*-diethylaniline as solvent. The lactone ring was readily formed to obtain 7-methoxycoumarin **9** in a good yield (83%). As expected, since the first methoxy group was very selectively removed, the second demethylation reaction of the 7-position of the coumarin core was by far trickier. We found that it could be achieved in quantitative yield by treatment of **9** with a large excess of AlCl_3 in dry CH_2Cl_2 under reflux. Subsequent protection of the released phenol with an acetyl group under standard conditions afforded the 7-acetoxycoumarin **10**. Finally, the 1,2-dioxetane moiety was generated through a [2+2] cycloaddition reaction between singlet oxygen and the enol ether of **10**. $^1\text{O}_2$ was generated under mild conditions by standard type II photosensitisation (*i.e.*, oxygen, visible light and methylene blue as photosensitiser). The 1,2-dioxetane **1** was found to be stable enough to be purified by chromatography on a silica gel column and finally recovered in 63% yield. All spectroscopic data, in particular NMR and mass spectrometry, are in agreement with the structure assigned (see ESI†). Interestingly, this chemilumiphore



Scheme 2 Synthesis of coumarinic chemilumiphore **1**.

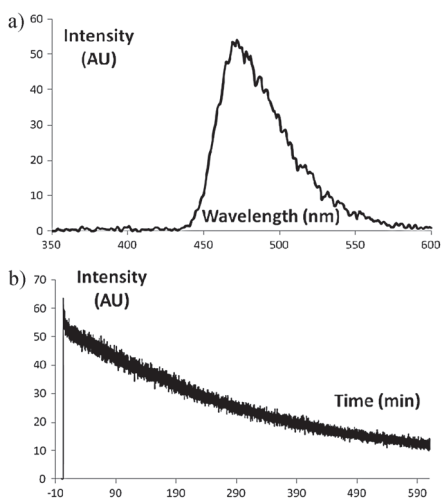
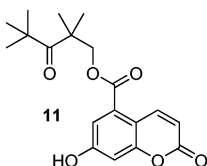


Fig. 2 CL spectra of **1** in DMSO (after adding 1.0 M TBAF in THF, 3% v/v) at 25 °C (concentration: 170 μ M): (a) scan mode, (b) kinetic mode at $\lambda = 470$ nm.

was found to be full-stable for few days at room temperature as inferred from ^1H NMR analyses.

The photophysical properties of 7-acetoxycoumarin–dioxetane hybrid **1** were evaluated in DMSO. The UV-vis absorption spectrum displayed a broad band between 260 and 340 nm with two maxima located at 278 (ϵ 9700 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) and 321 nm (ϵ 8200 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (see ESI †). The hypsochromic shift of this absorption spectrum relative to the free fluorophore (60 nm) is in agreement with the spectral behaviour currently observed for phenol-based pro-fluorescent probes.^{12,15,16} Furthermore, as expected, this compound was found to be virtually non-fluorescent and its quantum yield was too low to be accurately measured. The chemiluminescent characteristics of **1** were also determined in DMSO after adding 1.0 M TBAF in THF (basic fluoride ions) which acts as a CL triggering through the removal of the acetyl group and subsequent generation of the phenolate species.¹⁷ Fig. 2a shows the CL spectrum of **1**. This compound was confirmed to emit blue light with a single maximum at 470 nm. This luminescence peak apparently originated from the coumarin unit of **1**, as inferred from the similarity between Fig. 2a and the fluorescence emission spectrum of the coumarin **11** released by the TBAF-induced chemiluminescent reaction (see ESI †). Thus, the luminescence energy produced at the 1,2-dioxetane moiety was completely transferred to the energy acceptor coumarin.



Furthermore, light emission was very strong once the trigger was added, and its kinetic shape presents a long-lived decay, which is a significant advantage in biological assays (Fig. 2b). Indeed, significant light emission at 470 nm was still detected even 10 hours after the initial TBAF-mediated phenolate release.

We have successfully synthesised 7-hydroxycoumarin-attached 1,2-dioxetane **1** to develop a novel approach to

red-shift emission of such chemiluminophores. Indeed, the CL studies have revealed that the luminescence energy produced at the 1,2-dioxetane moiety is efficiently transferred to the coumarin unit to emit light at the maximum wavelength of this fluorophore. Interestingly, functionalisation of its 4-position with a bio-orthogonal “handle” (e.g., an acetic acid pendant arm) should make possible some applications in bio-labelling. Further efforts are also devoted to the implementation of this promising strategy to red-emitting fluorescent phenols such as conjugation-extended 7-hydroxycoumarin NIR dyes recently reported by us.¹⁵

This work was supported by La Région Haute-Normandie via the CRUNCH program (CPER 2007–2013) especially for a post-doctoral fellowship to Jan Kočí, and Institut Universitaire de France (IUF). We thank Annick Leboisselier (INSA de Rouen) for the determination of elemental analyses.

Notes and references

- For selected reviews, see: (a) M. Matsumoto, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2004, **5**, 27; (b) W. J. Baader and E. L. Bastos, in *Science of Synthesis: Houben–Weyl Methods of Molecular Transformations*, ed. A. Berkessel, Thieme-Chemistry, Stuttgart, 2008, vol. 38, p. 323.
- For selected recent examples, see: (a) L. Liu and R. P. Mason, *PLoS One*, 2010, **5**, e12024; (b) J.-A. Richard, L. Jean, A. Romieu, M. Massonneau, P. Noack-Fraissignes and P.-Y. Renard, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 4853.
- (a) F. McCapra, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1990, **51**, 21; (b) A. P. Schaap and S. D. Gagnon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 3504; (c) A. P. Schaap, R. S. Handley and B. P. Giri, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 935.
- M. Matsumoto, N. Watanabe, N. C. Kasuga, F. Hamada and K. Tadokoro, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 2863.
- M. Matsumoto, N. Watanabe, N. Hoshiya and H. K. Ijuin, *Chem. Rec.*, 2008, **8**, 213.
- G. A. Wagnières, W. M. Star and B. C. Wilson, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **68**, 603.
- X. Huang, L. Li, H. Qian, C. Dong and J. Ren, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 5140.
- J. Han, J. Jose, E. Mei and K. Burgess, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 1684.
- For the application of this concept to ROS-sensitive chemiluminescent probes, see: (a) R. Saito, A. Ohno and E. Ito, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 583; (b) M. Sekiya, K. Umezawa, A. Sato, D. Citterio and K. Suzuki, *Chem. Commun.*, 2009, 3047.
- (a) J. M. Baumes, J. J. Gassensmith, J. Giblin, J.-J. Lee, A. G. White, W. J. Culligan, W. M. Leevy, M. Kuno and B. D. Smith, *Nat. Chem.*, 2010, **2**, 1025; (b) M. Dasari, D. Lee, V. R. Erigala and N. Murthy, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2009, **89**, 561; (c) D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor and N. Murthy, *Nat. Mater.*, 2007, **6**, 765.
- X. Chen, M. Sun and H. Ma, *Curr. Org. Chem.*, 2006, **10**, 477.
- K.-I. Setsukinai, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi and T. Nagano, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2000, 2453.
- S. Sethna and R. Phadke, in *Org. React.*, ed. R. Adams, Wiley, New York, 1953, vol. VII, p. 1.
- M. Matsumoto, N. Watanabe, A. Ishikawa and H. Murakami, *Chem. Commun.*, 1997, 2395.
- J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard and A. Romieu, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 4175.
- (a) J. A. Richard, Y. Meyer, V. Jolivel, M. Massonneau, R. Dumeunier, D. Vaudry, H. Vaudry, P. Y. Renard and A. Romieu, *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 1707; (b) Y. Meyer, J. A. Richard, M. Massonneau, P. Y. Renard and A. Romieu, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 1517.
- When aq. 1.0 M NaOH (3% v/v) was employed as CL trigger, two emission maxima at 430 and 470 nm were observed, respectively, assigned to cinnamate derivative (resulting from lactone ring-opening) and compound **11** (see ESI †).

Chapitre 4

Conclusions et Perspectives

I. Conclusion générale

Lors des dix dernières années, l'imagerie optique a connu de grands bouleversements. Elle est devenue un outil essentiel dans la détection et le suivi de cellules vivantes que ce soit en utilisant simplement des agents de marquage ou avec le développement de sondes « intelligentes » spécifiques à un récepteur donné. Ses avantages sont nombreux : un caractère non-invasif, une grande sensibilité et des équipements de détection beaucoup moins chers que ceux requis par les autres modalités d'imagerie concurrentes (IRM, TEP). Aujourd'hui, sa mise en œuvre au niveau du petit animal est en train de révolutionner le diagnostic préclinique et le développement de médicaments. En effet, l'imagerie optique contribue de plus en plus fortement à l'amélioration de l'étude des modèles biologiques. L'espoir à plus long terme est aussi de pouvoir disposer d'outils spécifiques, stables et utilisables sur l'Homme afin d'avoir les moyens de réaliser des diagnostics précoces pour des maladies comme certains cancers ou encore pour la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, le travail effectué au cours de cette thèse a consisté à développer des outils synthétiques innovants, utilisables dans la conception de ces sondes luminescentes « intelligentes ». Nous avons travaillé sur deux techniques : la fluorescence et la chémiluminescence.

1 Les pro-fluorophores

Le travail dans ce domaine a consisté à synthétiser de nouvelles espèces pro-fluorescentes et plus précisément des fluorophores à phénol indispensables à la conception de pro-fluorophores originaux. Ces derniers sont moins développés que les pro-fluorophores à aniline et de ce fait plus facilement valorisables dans le cadre d'une démarche commerciale comme celle ciblée par QUIDD. Le laboratoire a de plus développé des stratégies pour la mise en place de bras espaceurs auto-immolables adaptés pour les pro-fluorophores à phénol, bras espaceurs qui sont protégés sous forme d'un brevet commun²⁵⁴ avec l'entreprise QUIDD. Notre choix a été de développer des phénols fluorescents émettant dans le rouge voire proche infrarouge, dérivés de la 7-hydroxycoumarine, en essayant d'étendre leur conjugaison.

Sur les trois nouveaux composés initialement visés, nous n'avons pu en obtenir qu'un seul. Cependant, cela nous a permis de vérifier que l'obtention de nouveaux phénols fluorescents à conjugaison étendue et dérivés d'un motif bis-coumarine ne pouvait être effective qu'en utilisant

²⁵⁴ Renard, P.-Y., Romieu, A., Richard, J.-A. and Massonneau, M. (QUIDD). Nouveaux composés pro-fluorescents, FR2910387, 2006

une double liaison ou deux triples liaisons²⁵⁵ comme lien covalent de jonction. Un nouveau fluorophore a néanmoins été obtenu et ses propriétés optiques ont été évaluées (Figure 4 - 1).

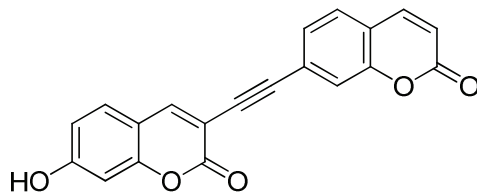


Figure 4 - 1 : Nouveau fluorophore synthétisé

Les analogues avec une double liaison ou un cycle triazole n'ont pas pu être encore obtenus.

Dans un deuxième temps, nous avons exploré une autre approche moins originale mais qui semblait plus adaptée pour l'obtention à plus court terme d'un phénol fluorescent dérivé de l'ombelliférone. Ce fluorophore répondait au cahier des charges auquel doivent répondre les marqueurs fluorescents utilisables en imagerie *in vivo*. Nous avons choisi d'hydrosolubiliser un phénol fluorescent déjà décrit dans la littérature afin de fournir rapidement un marqueur optique pour la synthèse d'une sonde pro-fluorescente spécifique à la caspase-3 et imager le phénomène d'apoptose. Ce fluorophore présente une émission de fluorescence centrée sur 600 nm (Figure 4 - 2). Le développement d'analogues de ce fluorophore est donc un premier pas vers la synthèse de fluorophores plus complexes.

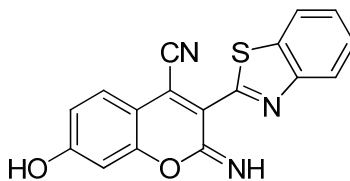


Figure 4 - 2 : Fluorophore à phénol présentant une émission à 600 nm

Les propriétés spectrales de ce fluorophore ont été évaluées en milieu physiologique puis différentes tentatives d'hydrosolubilisation directes et indirectes ont été menées. Malgré nos efforts, une sulfonation « post-synthétique » et contrôlée (*i.e.*, totalement chimio- et régiosélective) du fluorophore n'a pas pu être développée. Une synthèse viable d'un analogue de ce fluorophore n'a pas abouti.

Enfin, nous avons travaillé sur de nouvelles méthodes généralisables d'hydrosolubilisation de fluorophores de manière post-synthétique. En effet, l'hydrosolubilisation en fin de synthèse permet de faciliter les étapes de purification et les synthèses. Les réactions en milieu aqueux ou semi-aqueux nécessitent en général des conditions non-usuelles. Le choix des conditions et des réactions est en

²⁵⁵ Batsanov, A. S., Collings, J. C., Fairlamb, I. J. S., Holland, J. P., Howard, J. A. K., Lin, Z., Marder, T. B., Parsons, A. C., Ward, R. M. and Zhu, J., *J. Org. Chem.*, **2004**, 2, 703.

effet rapidement limité lorsque l'on travaille avec l'eau comme solvant. Il est donc plus facile d'hydrosolubiliser dans les dernières étapes.

Nous avons choisi de développer un bras hydrosolubilisant comportant deux fonctions acide sulfonique. Celui-ci pourrait être introduit par une réaction de Mannich sur des composés de type 7-hydroxycoumarine (Figure 4 - 3). L'avantage de cette stratégie est qu'elle est adaptable à tous les fluorophores à phénol non substitués en position *meta* du phénol. Le bras disulfonaté a été obtenu et les conditions de purification restent à être mise au point pour pouvoir le récupérer de manière propre et efficace. Cette approche Mannich a déjà été utilisée pour introduire divers bras azotés en *alpha* du phénol de coumarine et de fluorescéine, afin notamment de concevoir des sondes pour la détection de cations métalliques.²⁵⁶ Elle n'a cependant jamais été utilisée dans le contexte de l'hydrosolubilisation. Cette approche originale est donc toujours explorée au laboratoire mais dans d'autres contextes.²⁵⁷

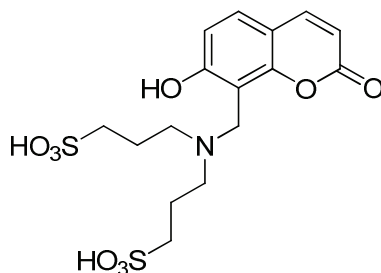


Figure 4 - 3 : Projet d'hydrosolubilisation de 7-hydroxycoumarine

2 Les chémiluminophores

Le sujet principal de cette thèse était le développement de nouveaux chémiluminophores avec pour objectif l'utilisation de cette technique dans le contexte *in vivo*. Cet ambitieux programme s'est décliné en plusieurs projets.

Tout d'abord, nous avons travaillé sur le transfert de chémiluminescence vers un fluorophore organique. Nous espérons que cela permette, d'une part, d'améliorer l'émission de lumière en milieu aqueux et d'autre part, d'émettre à la longueur d'onde du fluorophore choisi et donc de moduler aisément l'émission du chémiluminophore.

Un nouveau chémiluminophore hybride d'une coumarine a été synthétisé (Figure 4 - 4). Ce composé n'émet pas de chémiluminescence en milieu aqueux. En revanche, il présente des propriétés de chémiluminescence très intéressantes en milieu organique avec notamment la superposition du spectre de chémiluminescence avec le spectre de pro-fluorescence, et une émission persistante sur

²⁵⁶ Nolan, E. M., Ryu, J. W., Jaworski, J., Feazell, R. P., Sheng, M. and Lippard, S. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *48*, 15517.

²⁵⁷ Thèse de Cédrik Massif (2009-2012), ANR FluoMag

une période de plus de 10 heures. La synthèse et les propriétés spectrales de ce composé ont fait l'objet d'une publication.²⁵⁸

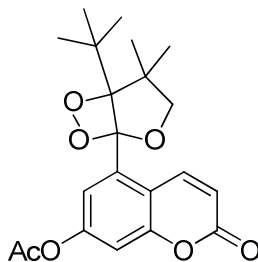


Figure 4 - 4 : Nouveau chémiluminophore synthétisé

Nous avons aussi travaillé sur la synthèse de cassettes chémiluminescentes. Ce domaine est très récent et découle des travaux de plusieurs groupes académiques sur les cassettes fluorescentes, tels que les équipes du Dr. Raymond Ziessel à Strasbourg²⁵⁹ et du Pr. Kevin Burgess à College Station.²⁶⁰ Elles présentent l'avantage d'avoir un transfert d'énergie à travers les liaisons ce qui permettrait d'améliorer l'efficacité de transfert. De plus, une modulation plus importante des fluorophores est possible afin d'obtenir différentes émissions de lumière en fonction de l'application souhaitée. Nous avons donc par analogie avec les travaux du groupe de K. Burgess, travaillé sur deux versions de cassettes chémiluminescentes. La première, qui constitue une preuve de concept, est uniquement soluble en milieu organique (Figure 4 - 5). Elle a été synthétisée et ses propriétés spectrales ont été évaluées. Nous avons pu observer une émission de chémiluminescence dans le rouge à la longueur d'onde du fluorophore choisi à savoir un dérivé de benzophénoxazine. Ceci nous a permis d'obtenir notre preuve de concept et donc de confirmer la viabilité de notre projet. Le produit final n'est pas encore totalement caractérisé mais devrait faire prochainement l'objet d'une publication. En effet, il est nécessaire de souligner le défi synthétique de ce type de système très sophistiqué, à mettre en parallèle avec la stabilité très modérée du produit final.

²⁵⁸ Koci, J., Grandclaude, V., Massonneau, M., Richard, J.-A., Romieu, A. and Renard, P.-Y., *Chem. Commun.*, **2011**, 23, 6713.

²⁵⁹ Ulrich, G., Ziessel, R. and Harriman, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 7, 1184.

²⁶⁰ Loudet, A., Thivierge, C. and Burgess, K., *Dojin News*, **2011**, 137, 1.

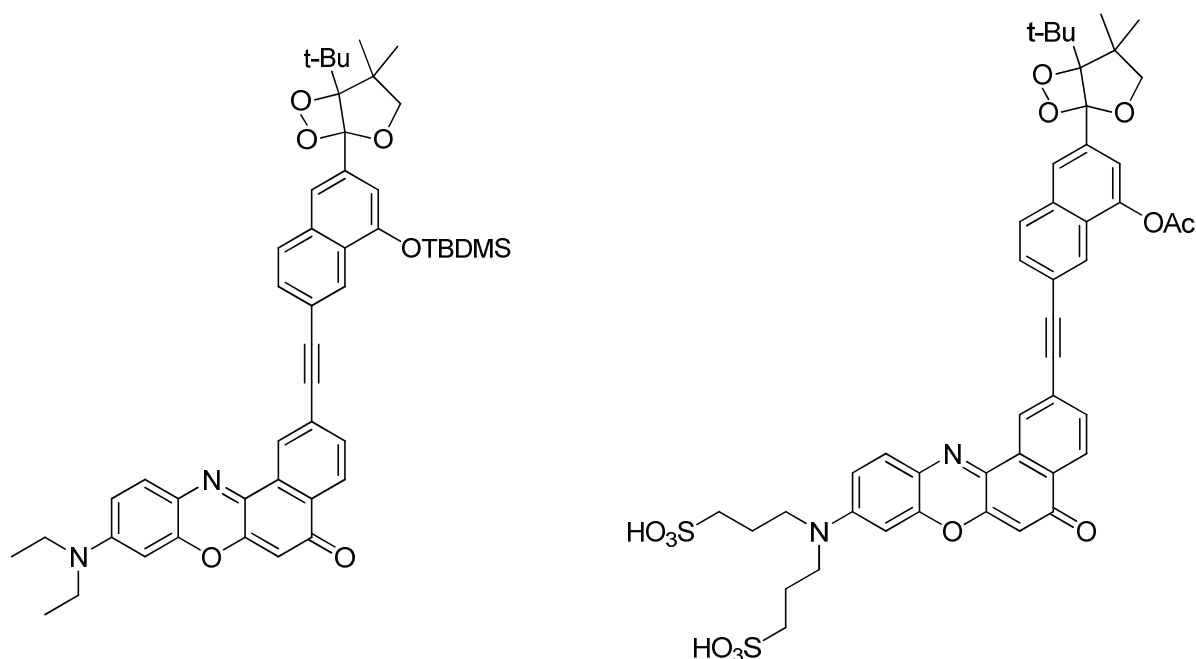


Figure 4 - 5 : Versions soluble en milieu organique et hydrosoluble de nos cassettes chémiluminescentes

Une version hydrosoluble a aussi été préparée (Figure 4 - 5). Elle n'a pas été complètement caractérisée et donc, ne permet pas encore de conclure définitivement quant à l'émission ou non de chémiluminescence en milieu aqueux.

Des essais sont actuellement toujours en cours pour synthétiser ce composé en quantités plus importantes afin de pouvoir le caractériser de façon univoque.

En parallèle de ces travaux, nous avons tenté de résoudre le problème de l'émission de chémiluminescence à pH physiologique. Pour ce faire, nous avons mis en place une synthèse viable permettant l'obtention d'un chémiluminophore de type thiophénol. Nous souhaitons accroître la proportion d'espèce déprotonnée (*i.e.*, thiophénolate) à l'origine de la chémiluminescence des motifs 1, 2-dioxétane, grâce aux valeurs de pKa plus faibles de ces analogues soufrés (Figure 4 - 6).

Cependant, les essais préliminaires n'ont pas permis d'obtenir une émission de chémiluminescence aussi bien en milieu physiologique qu'en milieu organique. Des analyses complémentaires seront menées prochainement pour valider ou non le concept revendiqué. Nous contrôlerons notamment le nombre d'équivalents de réducteur utilisé comme réactif de déclenchement de la chémiluminescence.

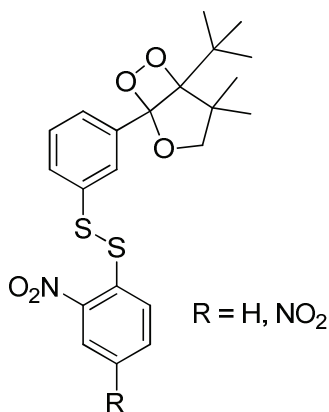


Figure 4 - 6 : Chémiluminophore de type thiophénol

A titre plus anecdotique, nous avons aussi étudié la synthèse d'un chémiluminophore dimérique (Figure 4 - 7) issu d'une réaction secondaire. Celui-ci présente des propriétés de chémiluminescence très intéressantes. En plus d'une émission de chémiluminescence à 600 nm, il présente des propriétés de pro-fluorescence originales. Une publication sera prochainement soumise sur la synthèse et les propriétés spectrales de ce réactif pro-chémiluminescent original.

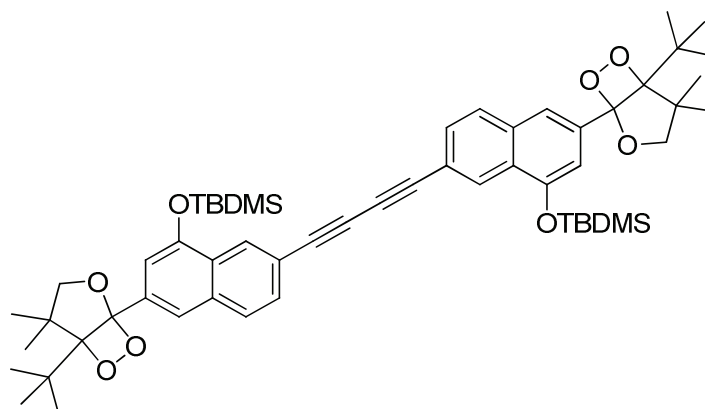


Figure 4 - 7 : Chémiluminophore dimérique

Cette conclusion illustre les difficultés pour concevoir des sondes totalement stables et utilisables *in vivo*. Une étude récente montrant les contraintes à prendre en compte pour obtenir une sonde FRET, concept pourtant relativement ancien et maîtrisé, utilisable *in vivo*, illustre la difficulté de travailler sur des organismes entiers.²⁶¹

²⁶¹ Linder, K. E., Metcalfe, E., Nanjappan, P., Arunachalam, T., Ramos, K., Skedzielewski, T. M., Marinelli, E. R., Tweedle, M. F., Nunn, A. D. and Swenson, R. E., *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 1287.

II. Perspectives

Comme le montre clairement ces travaux de thèse et en particulier le chapitre 2, l'obtention de nouveaux phénols fluorescents répondant au cahier des charges requis pour des applications *in vivo* (en particulier, une parfaite solubilité en milieu aqueux, une absorbance et une émission centrées dans le rouge ou le proche infrarouge et une brillance élevée en milieu physiologique) n'est pas chose aisée. Depuis 2005 et le début de la collaboration entre l'équipe de Chimie Bio-Organique et la société QUIDD, très peu de composés de ce type ont été développés et/ou publiés par des laboratoires académiques ou des sociétés de biotechnologies. Ceci met bien en exergue les nombreux verrous technologiques à surmonter pour atteindre cet objectif ambitieux. Notre contribution est loin d'être négligeable avec notamment les hybrides coumariniques qui, dans certains contextes convenablement sélectionnés, pourraient être utilisés en dépit de valeurs de brillance modestes. Toutefois, depuis le début de l'année 2011, deux publications ont fait état d'approches radicalement différentes pour l'obtention de phénols fluorescents *in vivo* compatibles.

L'une est le développement d'analogues de fluorescéine, « TokyoMagenta » où l'oxygène est remplacé par un silicium (Figure 4 - 8) mais la synthèse est cependant très complexe.²⁶²

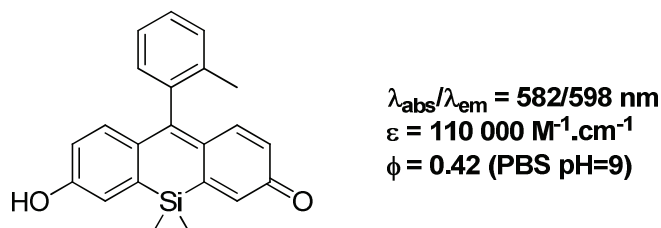


Figure 4 - 8 : Fluorophore à phénol développé par le groupes de T. Nagano

L'autre est la synthèse du premier BODIPY à phénol présentant des propriétés de pro-fluorescence.²⁶³ En fonction de l'état de charge du phénol (et donc du pH), l'émission de fluorescence maximale passe de 565 nm à 630 nm (Figure 4 - 9).

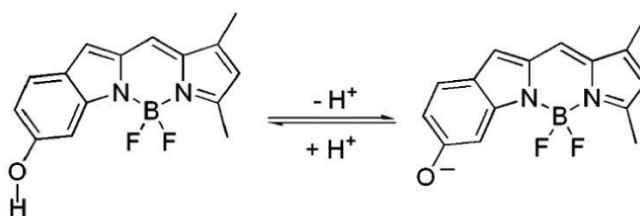


Figure 4 - 9 : BODIPY à phénol présentant des propriétés de pro-fluorescence

²⁶² Egawa, T., Koide, Y., Hanaoka, K., Komatsu, T., Terai, T. and Nagano, T., *Chem. Commun.*, **2011**, 14, 4162.

²⁶³ Zhao, C., Zhou, Y., Lin, Q., Zhu, L., Feng, P., Zhang, Y. and Cao, J., *The Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, 4, 642.

Ainsi, l'avenir est sans doute à la modulation des propriétés physico-chimiques de ces composés (en particulier la solubilité dans l'eau et la résistance à l'auto-agrégation). Néanmoins, ceci ne pourra se faire que si ces composés sont libres de droit (ce qui semble être le cas) ou dans le cadre de collaboration avec les laboratoires à l'origine de ces molécules. En effet, les synthèses envisagées restent complexes et donc sans doute peu rentables du point de vue économique, pour des sociétés telles que QUIID. En ce qui concerne la fluorescence, une perspective pourrait être l'obtention d'un nouveau pro-fluorophore à phénol hydrosoluble. Nous pourrions pour ce faire, utiliser notre bras bisulfonaté **59** (développé précédemment) dans la solubilisation du pro-fluorophore **44** qui a une longueur d'onde d'émission dans le rouge.

Dans le domaine de la chémiluminescence, notre expérience nous incite à penser que le haut degré de sophistication de nos systèmes va à l'encontre de leur stabilité chimique et photochimique. Il est donc nécessaire de se tourner vers des systèmes d'encapsulation pour stabiliser le dioxétane et surtout le « protéger » du milieu aqueux. Comme expliqué dans le chapitre d'introduction, des systèmes d'encapsulation par co-évaporation pourraient être une solution.²⁶⁴ Les travaux du groupe de B. D. Smith, présentant la protection du dioxétane au moyen de cycle anthracénique, sont également très intéressants.²⁶⁵

Dans un avenir plus proche, nous pourrions continuer à développer notre principe de cassette chémiluminescente en ajoutant à notre structure hydrosoluble, un deuxième linker hydrosolubilisant pour éviter la formation de micelle. De plus, l'adjonction d'un bras réactif auto-immolable (PABA) et d'un peptide pourrait constituer une sonde chémiluminescente à peptidase avec une longueur d'onde d'émission de chémiluminescence dans le rouge (Figure 4 - 10).

Par la suite, il serait également intéressant de modifier le fluorophore utilisé, par une naphthofluorescéine qui a une longueur d'onde d'émission de 660 nm.

²⁶⁴ Lee, D., Khaja, S., Velasquez-Castano, J. C., Dasari, M., Sun, C., Petros, J., Taylor, W. R. and Murthy, N., *Nat. Mater.*, **2007**, *10*, 765.

²⁶⁵ Baumes, J. M., Gassensmith, J. J., Giblin, J., Lee, J.-J., White, A. G., Culligan, W. J., Leevy, W. M., Kuno, M. and Smith, B. D., *Nat. Chem.*, **2010**, *12*, 1025.

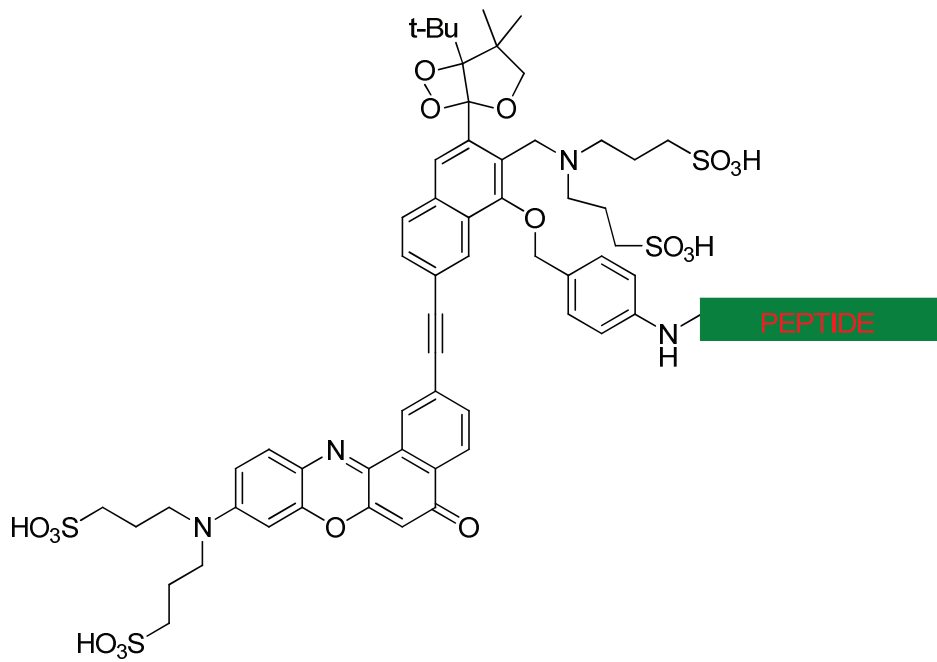


Figure 4 - 10 : Sonde chémiluminescente pour la détection d'une peptidase

Chapitre 5

Experimental section

I. General procedures

Chemicals and Reagents. All solvents were dried following standard procedures (**CH₃CN**: distillation over CaH₂, **CH₂Cl₂** stabilized over amylene: distillation over P₂O₅, **DMF**: distillation over BaO, **THF**: distillation over Na°/benzophenone, **toluene**: distillation over Na°, **pyridine**: distillation over KOH, **DMSO**: distillation over CaH₂ and keep on molecular sieves (4Å), **CCl₄**: distillation and keep on molecular sieves (4Å), **N,N-diethylaniline**: reflux with acetic anhydride for 4 h then fractionally distillation), **diisopropylethylamine**: distillation then stored on KOH, **triethylamine**: distillation on CaH₂ then stored on KOH.

Flash column chromatography purifications were performed on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 µm) from Merck or on Geduran® Si 60 silica gel (63-200 µm) from Merck. Filtrations were performed on Celite® SDS 545 from Acros organics. TLC was carried out in Hellendahl staining jars (50x30x90 mm), using Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualised by illumination with UV lamp (λ = 254 nm or 365 nm) and/or staining with KMNO₄ solution and/or staining with a FeCl₃ solution (5 g in 0.5 M aq. HCl). Activated MnO₂ (tech., Mn 58% min) was obtained from Alfa Aesar. 7-acetoxy-3-formylcoumarin **34**,²⁶⁶ 2-hydroxy Nile Red,²⁶⁷ 2-triflic Nile Red **131**,²⁶⁸ Water-soluble Nile Red **139**²⁶⁹ and IBX²⁷⁰ were prepared according syntheses reported in the literature. The HPLC-gradient grade CH₃CN and CH₃OH were obtained from VWR. Phosphate Buffered Saline (PBS, 100 mM phosphate + 150 mM NaCl, pH 7.5) and aq. mobile phases for HPLC was prepared using deionised water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MΩ.cm). Triethylammonium acetate (TEAA, 2.0 M) and triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0 M) buffers were prepared from distilled triethylamine and glacial acetic acid or CO₂ gas.

²⁶⁶ Lim, N. C., Schuster, J. V., Porto, M. C., Tanudra, M. A., Yao, L., Freake, H. C. and Brückner, C., *Inorg. Chem.*, **2005**, *6*, 2018.

²⁶⁷ S. J. Briggs, M., Bruce, I., N. Miller, J., J. Moody, C., C. Simmonds, A. and Swann, E., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, *7*, 1051.

²⁶⁸ Han, J., Jose, J., Mei, E. and Burgess, K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *10*, 1684.

²⁶⁹ Jose, J. and Burgess, K., *J. Org. Chem.*, **2006**, *20*, 7835.

²⁷⁰ Frigerio, M., Santagostino, M. and Sputore, S., *J. Org. Chem.*, **1999**, *12*, 4537.

Instruments. ^1H , ^{13}C NMR and ^{19}F spectra were recorded on a Bruker DPX 300 spectrometer (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) and relative to tetramethylsilane from CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$), acetone- d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.09$, $\delta_{\text{C}} = 30.60$ and 205.87), DMSO- d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.54$, $\delta_{\text{C}} = 40.45$), CD_3OD ($\delta_{\text{H}} = 3.34$, $\delta_{\text{C}} = 49.86$) and D_2O ($\delta_{\text{H}} = 4.79$)^{271,272}. J values are in hertz (Hz). The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, bs = broad singlet. Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. The elemental analyses were carried out with a Flash 2000 Organic Elemental Analyzer (Thermo Scientific). Analytical HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC was performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-visible 2000 detector. Low-resolution mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with either an atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) or an electrospray (ESI) probe. UV-visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, 10 x 10 mm, 3.5 ml). Fluorescence and chemiluminescence spectroscopic studies were performed with a Varian Cary 50 Eclipse spectrophotometer using a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 x 4 mm, 1400 μl). Melting points were obtained on a Kofler bench device (Wagner and Munz). Commercial 7-hydroxycoumarin was obtained from Alfa Aesar. Rhodamine 6G (R6G) was purchased from Aldrich.

Fluorophore number	Solvent	λ_{exc}	Standard	$\text{QY}_{\text{standard}}$	$\text{QY}_{\text{fluorophore}}$
44	PBS	485 nm	R6G	0,76 ²⁷³ (water)	0,059
90	DMSO	380 nm	7-hydroxycoumarine	0,78 (PBS) ²⁷⁴	0,57
143	DMSO	540 nm	Sulforhodamine 101	0,90 (EtOH)	0,58
143	PBS-BSA	540 nm	Sulforhodamine 101	0,90 (EtOH)	0,034

Tableau 5 - 1 : Measurements of relative quantum yield

²⁷¹ Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. and Nudelman, A., *J. Org. Chem.*, **1997**, *21*, 7512.

²⁷² Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. and Goldberg, K. I., *Organometallics*, **2010**, *9*, 2176.

²⁷³ Olmsted, J., *J. Phys. Chem.*, **1979**, *20*, 2581.

²⁷⁴ Setsukinai, K.-i., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T. and Nagano, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, *12*, 2453.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\phi_x = \frac{(A_s)(F_x)\left(\frac{n_x}{n_s}\right)^2}{(A_x)(F_s)} \phi_F(s)$$

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 and water and 1.479 for DMSO), and the subscripts s and x represent standard and unknown respectively. 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, n = 1.477 for DMSO), and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

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.

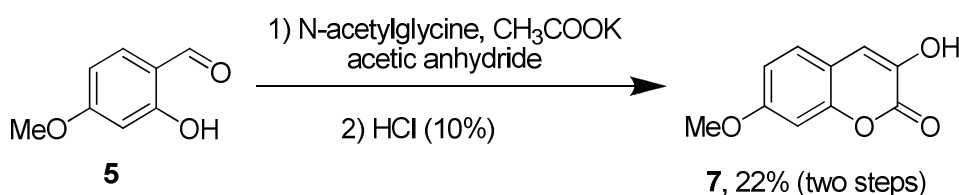
System A: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 4.6 x 150 mm) with CH₃CN and aq. triethylammonium acetate buffer (TEAA 25 mM, pH 7.0) as eluents [100% aq. TEAA (5 min), then linear gradient from 0% to 100% (33 min) of CH₃CN] at a flow rate of 1.0 ml/min. Triple UV-visible detection was achieved at 280, 360 and 580 nm.

System B: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10 x 100 mm) with CH₃CN and aq. triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB 50 mM, pH 7.5) as eluents [80% aq. TEAB (5 min), then linear gradient from 20% to 50% (10 min) then from 50% to 70% (20 min) then from 70% to 100% (10 min) of CH₃CN] at a flow rate of 5.0 ml/min. Dual UV detection was achieved at 366 and 450 nm.

System C: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column, 5 µm, 10 x 100 mm) with CH₃CN and aq. TEAB as eluents [90% aq. TEAB (5 min), then linear gradient from 10% to 46% (18 min) then from 46% to 65% (19 min) then from 65% to 100% (8 min) of CH₃CN] at a flow rate of 4.0 ml/min. Dual UV detection was achieved at 250 and 300 nm.

II. Synthesis of pro-fluorophores

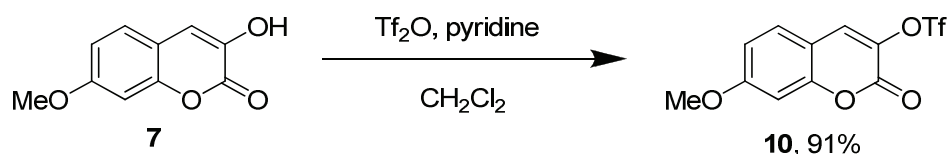
3-Hydroxy-7-methoxycoumarin (**7**)²⁷⁵



In a solution of 1-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (5.00 g, 32.9 mmol, 1.0 equiv.) in acetic anhydride (25 ml), N-acetylglycine (4.62 g, 39.4 mmol, 1.2 equiv.) and potassium acetate (9.68 g, 98.6 mmol, 3.0 equiv.) was sequentially added. The resulting solution was stirred at reflux (140°C) for 14 h and monitoring by TLC. The crude was allowed to cool to rt then CH₂Cl₂ was added (100 ml) and the precipitate was filtrated to afford 775 mg of 3-acetamido-7-methoxycoumarin as a brown solid. The organic phase of the filtrate was washed with 10% aq.HCl (3 x 100 ml), deionized water (2 x 100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum affording the acetamide derivative as a brown oil. The two batches were hydrolyzed with an aq. solution of HCl (1.0 M, 350 ml) at reflux for 15 h. The crude was filtrated and purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (10-50%) as the mobile phase to afford 3-hydroxy-7-methoxycoumarin as a bright yellow solid (1.4 g, overall yield for the two steps 22 %).

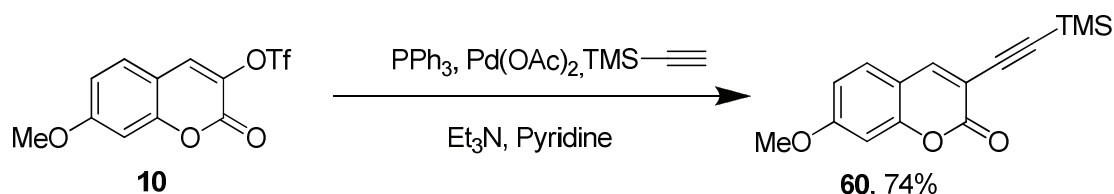
R_f (cyclohexane-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.4; mp 180 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3359, 1695, 1650, 1616, 1510; δ_{H} (300 MHz, acetone-*d*₆) 3.92 (s, 3H, OCH₃), 6.94 (s, 1H), 6.95 (d, *J* 9.2 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.49 (d, *J* 9.2 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H); δ_{C} (75 MHz, acetone-*d*₆) 55.7, 100.9, 112.9, 114.2, 115.5, 127.8, 139.7, 151.4, 159.6, 160.5; MS (ESI⁻): *m/z* 191.16 [M - H]⁻, calcd for C₁₀H₈O₄ : 192.04

²⁷⁵ Pavé, G., Chalard, P., Viaud-Massuard, M.-C., Troin, Y. and Guillaumet, G., *Synlett*, **2003**, 07, 0987.

7-Methoxy-3-(trifluoromethylsulfonyloxy)coumarin (10)

In a solution of 3-hydroxy-7-methoxycoumarin (550 mg, 2.86 mmol, 1.0 equiv.) in dry dichloromethane (32 ml), pyridine (472 μ l, 5.79 mmol, 2.0 equiv.) was added. The solution was cooled at 0°C then triflic anhydride (586 μ l, 3.47 mmol, 1.2 equiv.) was slowly added. The mixture was stirred at rt for 15 h. CH₂Cl₂ (30 ml) was added and the organic phase was washed with an aq. solution of HCl (10%, 2 x 100 ml), deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum affording 7-methoxy-3-(trifluoromethylsulfonyloxy) coumarin as an off-white solid (844 mg, yield 91 %).

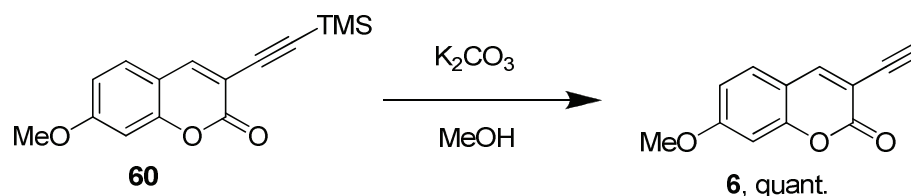
R_f (cyclohexane-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.7; mp 112 \pm 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3076, 1728, 1608, 1513; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 3.91 (s, 3H, OCH₃), 6.88(d, J 2.4 Hz, 1H), 6.95 (dd, J 8.7 Hz, J 2.4 Hz, 1H), 7.45 (d, J 8.7 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 56.3, 101.4, 110.7, 114.3, 116.8 and 121.0 (CF₃ coupling), 130.1, 132.5, 133.9, 154.8, 156.0, 164.3; δ_F (282.5 MHz, CDCl₃) -73.1; MS (ESI-): m/z 323.27 [M - H]⁻, calcd for C₁₁H₇F₃O₆S : 323.99.

7-Methoxy-3-((trimethylsilyl)ethynyl)coumarin (60)

In a solution of 7-methoxy-3-(trifluoromethylsulfonyloxy) coumarin (200 mg, 0.62 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of anhydrous triethylamine (6 ml) and pyridine (600 μ l), triphenylphosphine (210 mg, 0.80 mmol, 1.3 equiv.), Pd(OAc)₂ (14 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) and trimethylsilylacetylene (176 μ l, 1.23 mmol, 2.0 equiv.) were sequentially added. The mixture was stirred at 120°C for 5 h under an Ar atmosphere. The crude mixture was allowed to cool at rt and dissolved in EtOAc (50 ml). The organic phase was washed with 10% aq. HCl (2 x 50 ml), deionized water (50 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (10-40%) as the mobile phase to afford 7-methoxy-3-((trimethylsilyl)ethynyl)coumarin as a bright yellow solid (124 mg, yield 74%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.75; mp 135 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3040, 2917, 2162, 1722, 1623, 1600, 1505; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 0.26 (s, 9H), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 6.80 (d, J 2.5 Hz, 1H), 6.85 (dd, J 8.5 Hz, J 2.5 Hz, 1H), 7.34 (d, J 8.5 Hz, 1H), 7.85 (s, 1H); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 0.1, 56.2, 98.7, 101.0, 109.4, 112.7, 113.5, 129.1, 135.3, 146.5, 155.7, 160.1, 163.7; MS (ESI+): m/z 273.32 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Si}$: 272.09.

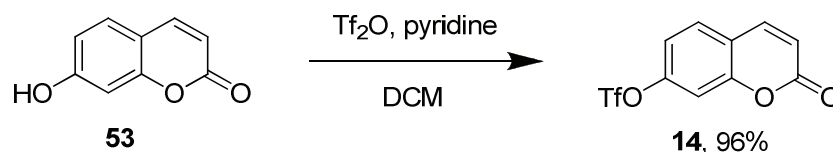
7-Methoxy-3-ethynylcoumarin (6)



In a solution of 7-methoxy-3-((trimethylsilyl)ethynyl)coumarin (60 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of MeOH (2.5 ml) and CH_2Cl_2 (2.5 ml), anhydrous K_2CO_3 (46 mg, 0.33 mmol, 1.5 equiv.) was added. The mixture was stirred at reflux for 30 min. Thereafter, the reaction mixture was allowed to cool to rt then the medium was concentrated under vacuum. The crude was dissolved in CH_2Cl_2 (75 ml) and the organic phase was washed with deionized water (25 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield 7-methoxy-3-ethynylcoumarin as a brown solid (45 mg, quantitative yield).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.6; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 3.32 (s, 1H), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 6.81(d, J 2.4 Hz, 1H), 6.86 (dd, J 8.7 Hz, J 2.4 Hz, 1H), 7.37 (d, J 8.7 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H); MS (ESI+): m/z 201.13 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_3$: 200.05.

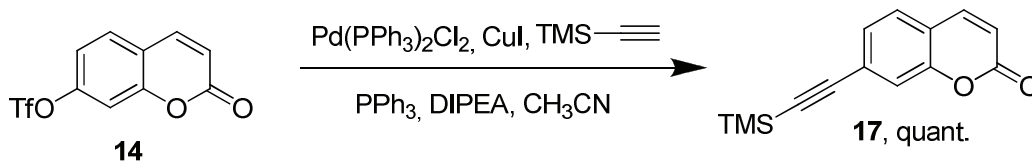
7-(Trifluoromethylsulfonyloxy)coumarin (14)



In a solution of commercially available 7-hydroxycoumarin (600 mg, 3.70 mmol, 1.0 equiv.) in CH_2Cl_2 (40 ml), dry pyridine (603 μl , 7.40 mmol, 2.0 equiv.) was added. The mixture was cooled at 0°C then triflic anhydride (750 μl , 4.44 mmol, 1.2 equiv.) was slowly added. The mixture was stirred at rt for 20 h. The organic phase was washed with deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford 7-(trifluoromethylsulfonyloxy)coumarin as an off-white powder (1.04 g, yield 96%).

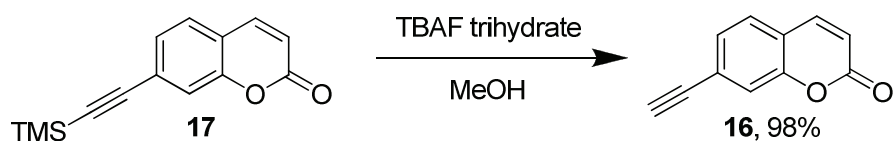
R_f (cyclohexane-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.6; mp 80 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3058, 1732, 1609, 1573, 1493; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 6.49 (d, J 9.6 Hz, 1H), 7.22 (dd, J 8.6 Hz, J 2.2 Hz, 1H), 7.28 (d, J 2.2 Hz, 1H), 7.59 (d, J 8.6 Hz, 1H), 7.72 (d, J 9.6 Hz, 1H); δ_{F} (282.5 MHz, CDCl_3) -72.6.

7-((Trimethylsilyl)ethynyl)coumarin (17)



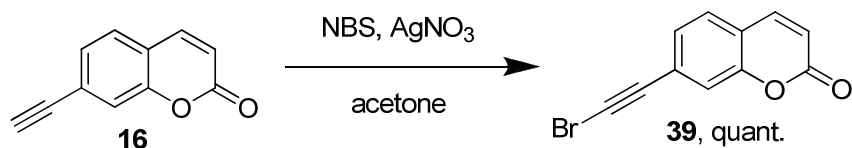
In a solution of 7-(trifluoromethylsulfonyloxy)coumarin (500 mg, 1.70 mmol, 1.0 equiv.) in dry acetonitrile (20 ml), DIPEA (1.09 ml, 6.29 mmol, 3.7 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (119 mg, 0.17 mmol, 0.1 equiv.) and PPh_3 (223 mg, 0.85 mmol, 0.5 equiv.) were sequentially added. The solution was then flushed with Ar and degassed by three freeze-thaw cycles. CuI (65 mg, 0.24 mmol, 0.2 equiv.) and trimethylsilylacetylene (1.21 ml, 8.5 mmol, 5.0 equiv.) were added and the resulting reaction mixture was stirred at 60°C for 7 h. The medium was concentrated then the crude was dissolved in EtOAc (300 ml) and washed with 10% aq. HCl (100 ml), deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (10-40%) as the mobile phase to afford 7-((trimethylsilyl)ethynyl) coumarin as a brown solid (431 mg, quantitative yield).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.5; mp 170 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3056, 2964, 2157, 1728, 1615; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 0.27 (s, 9H), 6.41 (d, J 9.6 Hz, 1H), 7.34 (dd, J 8.0 Hz, J 1.3 Hz, 1H), 7.39 (bs, 1H), 7.41 (d, J 8.0 Hz, 1H), 7.66 (d, J 9.6 Hz, 1H); MS (ESI+): m/z 243.18 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Si}$: 242.08.

7-Ethynylcoumarin (16)

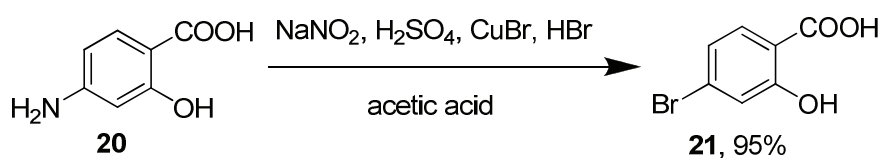
In a solution of 7-((trimethylsilyl)ethynyl)coumarin (200 mg, 0.82 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (40 ml), TBAF trihydrate (453 mg, 1.73 mmol, 2.1 equiv.) was added. The mixture was stirred at 60°C for 30 min. The medium was concentrated then the crude was dissolved in CH₂Cl₂ (300 ml). The organic phase was washed with deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to yield 7-ethynylcoumarin as a yellow solid (137 mg, yield 98%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.5; mp 134 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3294, 3079, 1728, 1610; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 3.27 (s, 1H), 6.44 (d, *J* 9.6 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* 8.0 Hz, *J* 1.2 Hz, 1H), 7.43 (bs, 1H), 7.44 (d, *J* 8.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* 9.6 Hz, 1H); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 81.0, 82.4, 117.6, 119.4, 120.6, 126.0, 128.1, 128.4, 143.0, 153.9, 160.5.

7-Bromoethynylcoumarin (39)

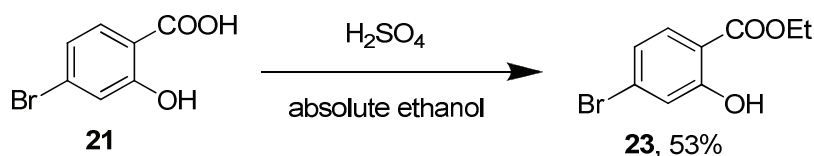
In a solution of 7-ethynylcoumarin (50 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv.) in synthesis-grade acetone (3 ml), N-bromosuccinimide (NBS, 58 mg, 0.32 mmol, 1.1 equiv) and AgNO₃ (5 mg, 0.03 mmol, 0.1 equiv.) were sequentially added. The resulting mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction medium was concentrated then the crude was dissolved with CH₂Cl₂ (75 ml). The organic phase was washed with deionized water (25 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford 7-bromoethynylcoumarin as a brown solid (74 mg, quantitative yield).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.5; mp 115 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2921, 2195, 1711, 1612, 1398, 1257, 1136, 1103; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 6.43 (d, *J* 9.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* 8.0 Hz, *J* 1.3 Hz, 1H), 7.38 (bs, 1H), 7.42 (d, *J* 8.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* 9.4 Hz, 1H); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 54.7, 79.0, 117.4, 119.3, 120.3, 124.9, 126.4, 128.1, 143.0, 153.9, 160.5; MS (ESI+): *m/z* 249.16 and 251.09 [M + H]⁺, calcd for C₁₁H₅BrO₂ : 247.95 and 249.95.

4-Bromosalicylic acid (21)²⁷⁶

A solution of commercially available 4-aminosalicylic acid (1.0 g, 6.53 mmol, 1.0 equiv.) in glacial acetic acid (22 ml) was added dropwise into a stirred solution of NaNO₂ (541 mg, 7.84 mmol, 1.2 equiv.) in conc. sulfuric acid (6.5 ml). After stirring for 40 min, a solution of CuBr (937 mg, 6.53 mmol, 1.0 equiv.) in HBr (8 ml, 48% in water) was slowly added at the mixture which was then heated at 80°C for 1 h. The reaction mixture was then poured into ice and extracted with diethyl ether (3 x 100 ml). The organic phase was washed with deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The compound was then dissolved in deionized water (10 ml) and lyophilized to remove residual amounts of acetic acid to afford 4-bromosalicylic acid as a brown solid (1.34 g, yield 95%).

mp 160-165°C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3459, 3086, 1900, 1679, 1608, 1567; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD})$ 7.09 (dd, J 8.5 Hz, J 1.8 Hz, 1H), 7.17 (d, J 1.8 Hz, 1H), 7.78 (d, J 8.5 Hz, 1H); MS (ESI+): m/z 215.06 and 217.06 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for C₇H₅BrO₃ : 215.94 and 217.94.

Ethyl 4-bromo-2-hydroxybenzoate (23)

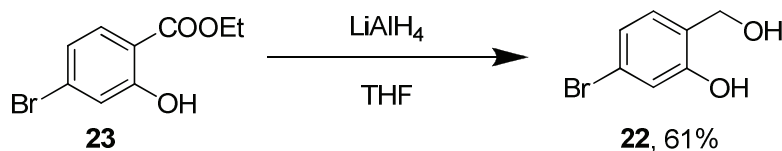
In a solution of 4-bromosalicylic acid (4.36 g, 20.09 mmol, 1.0 equiv.) in absolute ethanol (100 ml), catalytic amount of conc. sulfuric acid (208 μl , 2.01 mmol, 0.1 equiv.) was added. The mixture was stirred at 110°C for 5 days. 1.0 M aq. NaOH (4 ml) was added and the reaction medium was concentrated under vacuum. The crude was dissolved in CH₂Cl₂ (300 ml) and the organic phase was washed with a sat. solution of NaHCO₃ (100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford ethyl 4-bromo-2-hydroxybenzoate as a brown liquid (2.61 g, yield 53%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.8; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3151, 2983, 1674, 1607, 1584, 1480; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz}, \text{CD}_3\text{OD})$ 1.43 (t, J 7.1 Hz, 3H), 4.44 (q, J 7.1 Hz, 1H), 7.08 (dd, J 8.5 Hz, J 1.9 Hz, 1H), 7.17 (d, J 1.9 Hz,

²⁷⁶ Tashiro, M., Tsuzuki, H., Matsumoto, J.-i., Mataka, S., Nakayama, K. and et al., *J. Chem. Res.*, **1989**, 12, 2826

1H), 7.75 (d, *J* 8.5 Hz, 1H); MS (ESI-): *m/z* 243.18 and 245.17 [*M* + H]⁺, calcd for C₉H₉BrO₃ : 243.97 and 245.97.

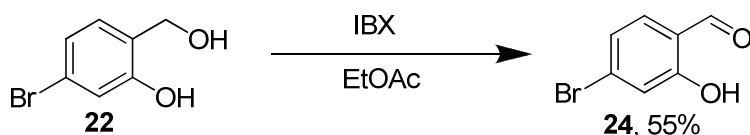
5-Bromo-2-(hydroxymethyl)phenol (**22**)



A solution of ethyl 4-bromo-2-hydroxybenzoate (1.0 g, 4.08 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled THF (20 ml) was added dropwise to a suspension of LiAlH₄ (310 mg, 8.16 mmol, 2.0 equiv.) in dry THF (20 ml) at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting mixture was stirred at rt for 3 h. Thereafter, the excess of LiAlH₄ was carefully destroyed by sequentially addition of deionized water (310 μl), 1.0 M aq.NaOH (310 μl) and finally deionized water (930 μl). The crude was filtrated on Celite® 545 pad then the filtrate was extracted with deionized water (100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford 5-bromo-2-(hydroxymethyl)phenol as a off-white powder (506 mg, yield 61%).

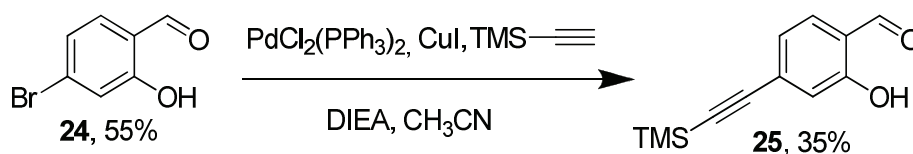
R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.4; mp 115 ± 2 °C; *v*_{max}/cm⁻¹ 3182, 2922, 1593, 1482, 1459, 1421, 1362, 1318, 1262, 1180; *δ*_H(300 MHz, CD₃OD) 4.59 (s, 2H), 4.94 (bs, 1H, OH), 6.93(s, 1H), 6.94(d, *J* 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* 8.7 Hz, 1H); *δ*_C (75 MHz, CD₃OD) 60.4, 118.8, 122.1, 123.3, 128.2, 130.6, 157.2; MS (ESI-): *m/z* 201.20 and 203.27 [*M* - H]⁻, calcd for C₇H₇BrO₂ : 201.96 and 203.96.

4-Bromo-2-hydroxybenzaldehyde (**24**)



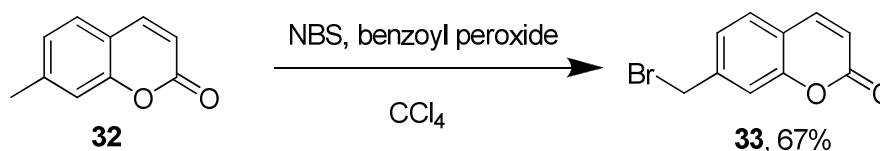
In a solution of 5-bromo-2-(hydroxymethyl)phenol (150 mg, 0.74 mmol, 1.0 equiv.) in EtOAc (5.5 ml), 2-iodoxybenzoic acid (IBX, 621 mg, 2.22 mmol, 3.0 equiv.) was added at rt. The mixture was stirred at 80°C for 6 h. The reaction medium was then cooled at rt, filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-25%) as the mobile phase to afford 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde as a yellow solid (81 mg, yield 55%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.9; *δ*_H(300 MHz, CDCl₃) 7.16 (dd, *J* 8.1 Hz, *J* 1.7 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* 1.7 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* 8.3 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H), 11.1 (s, 1H).

2-Hydroxy-4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyde (25)

In a solution of 4-bromo-2-hydroxybenzaldehyde (72 mg, 0.36 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled diisopropylethylamine (1 ml), PdCl₂(PPh₃)₂ (25 mg, 0.036 mmol, 0.1 equiv.), CuI (14 mg, 0.072 mmol, 0.2 equiv.) and trimethylsilylacetylene (229 μl, 1.61 mmol, 3.0 equiv.) were sequentially added. The mixture was stirred at 100°C for 2 h. The reaction medium was concentrated then the crude was dissolved with EtOAc (75 ml). The organic phase was washed with an aq. solution of HCl (10% - 25 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) as the mobile phase to afford 2-hydroxy-4-((trimethylsilyl)ethynyl)benzaldehyde (12 mg, yield 35%) as a brown solid.

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.8; mp decomposition before melting; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2964, 2921, 2856, 2157, 1658, 1620, 1435, 1249, 1118; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 0.07 (s, 9H), 7.37 (dd, *J* 8.1 Hz, *J* 1.7 Hz, 1H), 7.70 (s, *J* 1.7 Hz, 1H), 7.71(d, *J* 8.1 Hz, 1H), 9.87 (s, 1H), 12.0 (s, 1H); MS (ESI⁻): *m/z* 217.43 [M - H]⁻, calcd for C₁₂H₁₄O₂Si : 218.08.

7-Bromomethylcoumarin (33)²⁷⁷

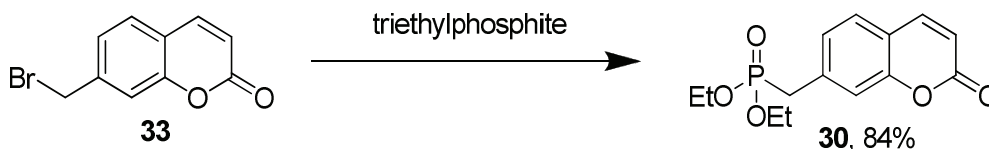
7-Methylcoumarin (1.0 g, 6.24 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry CCl₄ (75 ml). Then, NBS (1.29 g, 6.56 mmol, 1.05 equiv.) and benzoyl peroxide (151 mg, 0.624 mmol, 0.1 equiv.) were sequentially added at rt and an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was heated at 85°C for 15 h. The reaction medium was then concentrated and the crude was directly purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-40%) as the mobile phase to afford 7-bromomethylcoumarin as a brown solid (1.0 g, yield 67%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.3; mp 180 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1716, 1617, 1555, 1419, 1398, 1213, 1192, 1132, 1100; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 4.52 (s, 2H), 6.43 (d, *J* 9.5 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* 7.7 Hz, *J* 1.5 Hz

²⁷⁷ Hill, B., Liu, Y. and Taylor, S. D., *Org. Lett.*, **2004**, 23, 4285.

1H), 7.35 (bs, 1H), 7.47 (d, *J* 7.7 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* 9.5 Hz, 1H); δ_c (75 MHz, CDCl₃) 2.2, 117.5, 117.6, 119.0, 125.5, 128.6, 142.3, 143.2, 154.3, 160.8.

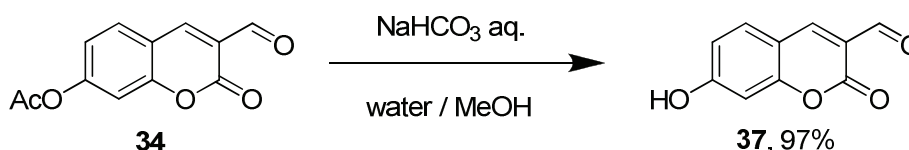
Diethyl 7-methylphosphonatecoumarin (30)²⁷⁸



7-Bromomethylcoumarin (500 mg, 2.09 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in deaerated triethylphosphite (5 ml, 28.83 mmol, 13.8 equiv.). The mixture was refluxed at 165°C for 2 h. The reaction medium was then concentrated under reduced pressure and purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-10%) as the mobile phase to afford diethyl 7-methylphosphonatecoumarin as a pale yellow solid (520 mg, yield 84%).

R_f (CH₂Cl₂-EtOAc, 1 : 1, v/v) 0.4; mp 82 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3469, 2992, 1718, 1620, 1555, 1398, 1229, 1042, 1014; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1.27 (t, *J* 7.0 Hz, 6H), 3.23 (d, ²*J*_{P-H} 22 Hz, 2H), 4.06 (q, *J* 7.0 Hz, 4H), 6.40 (dd, *J* 9.5 Hz, *J* 1.0 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* 7.7 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.43 (d, *J* 7.7 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* 9.5 Hz, 1H); δ_c (75 MHz, CDCl₃) 16.6 (d, *J* 6.0 Hz, 2C), 34.1 (d, *J* 138.0 Hz, 1C), 62.6 (d, *J* 6.6 Hz, 2C), 116.5 (d, *J* 1.1 Hz, 1C), 117.8 (d, *J* 3.3 Hz, 1C), 118.1 (d, *J* 7.1 Hz, 1C), 126.3 (d, *J* 6.0 Hz, 1C), 128.1 (d, *J* 2.7 Hz, 1C), 136.9 (d, *J* 9.3 Hz, 1C), 143.4 (d, *J* 1.7 Hz, 1C), 154.2 (d, *J* 3.3 Hz, 1C), 160.9 (s, 1C); δ_P (121.5 MHz, CDCl₃) 24.57; MS (ESI+): *m/z* 297.07 [M + H]⁺, calcd for C₁₄H₁₇O₅P : 296.08.

3-Formyl-7-hydroxycoumarin (37)

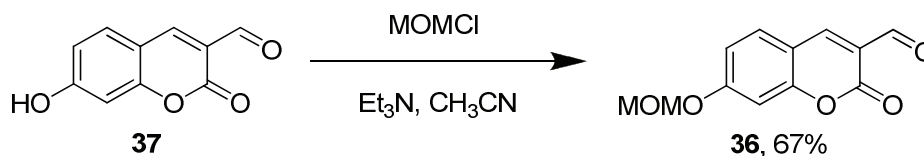


A sat. aq. solution of NaHCO₃ (9.2 ml) was added to a suspension of 7-acetoxy-3-formylcoumarin (300 mg, 1.29 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of deionized water (9.2 ml) and MeOH (18.4 ml). The mixture was stirred at rt for 24 h. The reaction medium was evaporated then the desired compound was extracted with EtOAc (3 x 100 ml). The organic phase was washed with an aq. solution of HCl (10% - 100 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to afford 3-formyl-7-hydroxycoumarin as a brown solid (238 mg, yield 97%).

²⁷⁸ Ianni, A. and Waldvogel, S. R., *Synthesis*, **2006**, 13, 2103.

mp >250°C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3246, 2916, 1734, 1658, 1588, 1430, 1376, 1190, 1163; δ_{H} (300 MHz, DMSO- d_6) 6.82 (d, J 1.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, J 8.7 Hz, J 1.9 Hz, 1H), 7.86 (d, J 8.7 Hz, 1H), 8.63 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 11.35 (bs, 1H); MS (ESI-): m/z 189.27 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_4$: 190.03.

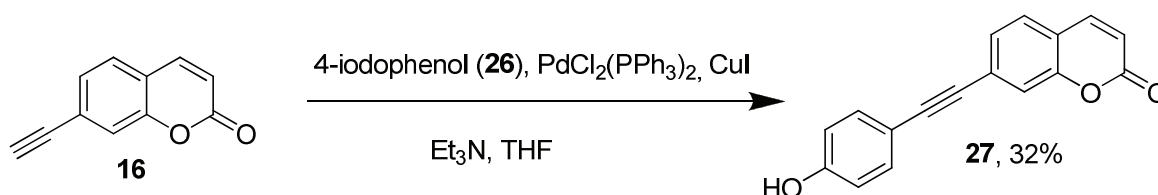
3-Formyl-7-(methoxymethoxy)-coumarin (36)



In a solution of methyl chloromethyl ether (2.1 M solution in toluene, 376 μl , 0.789 mmol, 1.5 equiv.) in dry acetonitrile (5 ml), anhydrous triethylamine (160 μl , 1.58 mmol, 3.0 equiv.) and 3-formyl-7-hydroxycoumarin (100 mg, 0.53 mmol, 1.0 equiv.) were sequentially added. A yellow gas was formed (HCl). The mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction medium was concentrated under vacuum then the crude was dissolved in EtOAc (150 ml). The organic phase was washed with an aq. solution of Na_2CO_3 (10% w/v - 50 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield 3-formyl-7-(methoxymethoxy)-coumarin as a yellow solid (82 mg, yield 67%).

R_f (CH_2Cl_2 -MeOH, 97 : 3, v/v) 0.8; mp 120 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 2921, 1723, 1680, 1597, 1555, 1495, 1354, 1241, 1150, 1076; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 3.50 (s, 3H), 5.28 (s, 2H), 7.03 (dd, J 8.5 Hz, J 2.3 Hz, 1H), 7.06 (d, J 2.3 Hz, 1H), 7.59 (d, J 8.5 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 10.21 (s, 1H); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 52.6 (CH_3), 94.4 (CH_2), 94.5 (Cq), 103.6 (CH), 113.7 (Cq), 114.9 (CH), 123.0 (Cq), 132.2 (CH), 145.8 (CH), 152.4 (Cq), 164.24 (Cq), 187.9 (CH). MS (ESI-): m/z 249.27 (oxidative conversion into carboxylic acid was occurred into ESI source during mass analysis), calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_6$: 234.05.

7-((4-Hydroxyphenyl)ethynyl)coumarin (27)

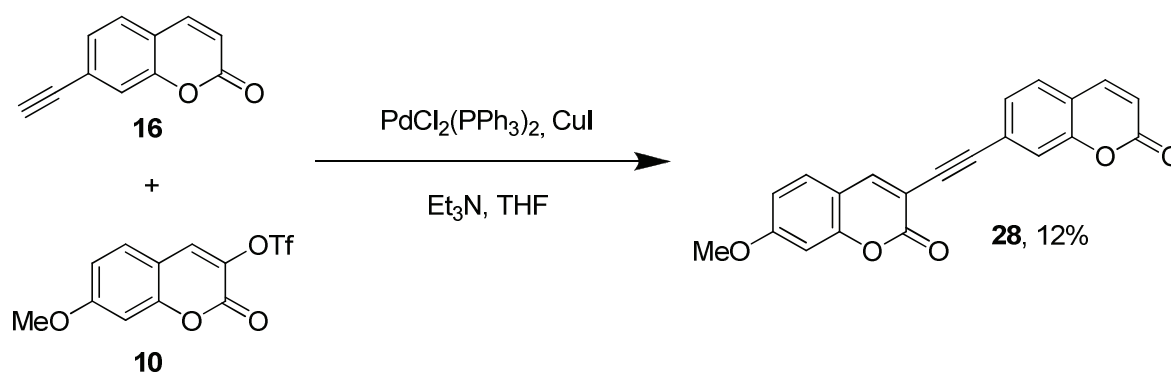


In a solution of 7-ethynylcoumarin (50 mg, 0.294 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (6 ml), 4-iodophenol (129 mg, 0.588 mmol, 2.0 equiv.), triethylamine (416 μl , 2.94 mmol, 10 equiv.), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (21 mg, 0.03 mmol, 0.1 equiv.) and CuI (11 mg, 0.06 mmol, 0.2 equiv.) were sequentially added under an Ar atmosphere at rt. The mixture was heated at 55°C for 2 h. A sat. aq. solution of NH_4Cl (5 ml) and EtOAc (5 ml) were added and the organic phase was washed with brine (5 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash-chromatography

on a silica gel column but using a mixture of cyclohexane and EtOAc (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) as the mobile phase to afford 7-((4-hydroxyphenyl)ethynyl)coumarin as a yellow solid (25 mg, yield 32%).

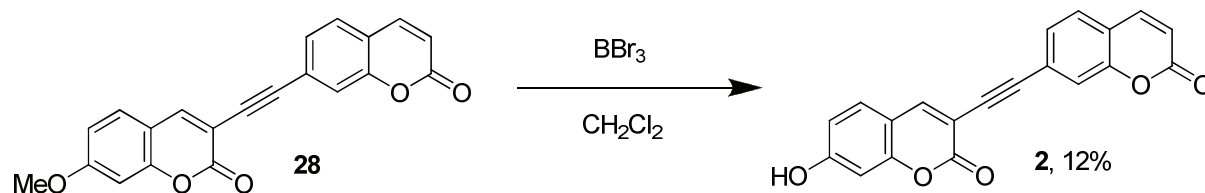
R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.3; mp 240°C (decomposition); $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3393, 2916, 2205, 1698, 1596, 1511, 1273, 1212, 1115; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, DMSO-}d_6)$ 6.51 (d, J 9.4 Hz, 1H), 6.82 (d, J 8.7 Hz, 2H), 7.40-7.50 (m, 4H), 7.73 (d, J 7.9 Hz, 1H), 8.08 (d, J 9.6 Hz, 1H), 10.05 s, 1H); MS (ESI-): m/z 261.41 [$M - H$]⁻, calcd for $C_{17}H_{10}O_3$: 262.06; $\lambda_{\text{abs/em}} = 344/472 \text{ nm}$, $\epsilon = 38\,600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (CH_3CN).

7-(7-Methoxy-3-ethynylcoumarin)-coumarin (28)



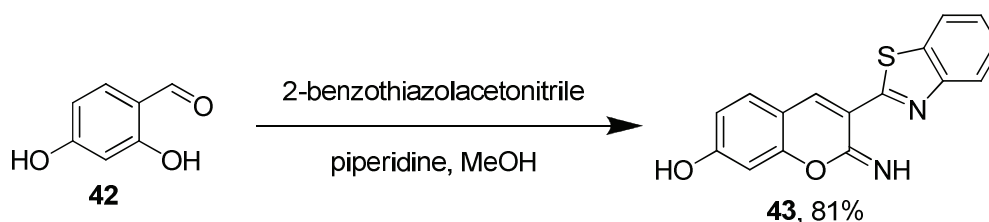
7-Ethynylcoumarin (50 mg, 0.294 mmol, 1.0 equiv.) and 3-hydroxy-7-methoxycoumarin (68 mg, 0.353 mmol, 1.2 equiv.) were dissolved in a mixture of dry THF (6 ml) and dry Et_3N (416 μl). Then, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (21 mg, 0.029 mmol, 0.1 equiv.) and CuI (11 mg, 0.059 mmol, 0.2 equiv.) were sequentially added at rt and under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was heated at 55°C for 2 h. Thereafter, an aq. sat. solution of NH_4Cl (5 ml) and EtOAc (5 ml) were added. The phases were separated and the organic phase was washed with a sat. solution of NaCl (10 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a mixture of cyclohexane and EtOAc (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) as the mobile phase to afford 7-(7-methoxy-3-ethynylcoumarin)-coumarin as a yellow solid (12 mg, yield 12%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.3; mp $238 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (decomposition); $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3078, 2925, 2848, 1718, 1610, 1399, 1127, 1101, 1020; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 3.90 (s, 3H), 6.44 (d, J 9.6 Hz, 1H), 6.46 (d, J 9.6 Hz, 1H), 6.84 (d, J 2.1 Hz, 1H), 6.89 (dd, J 8.6 Hz, J 2.1 Hz, 1H), 7.42 (d, J 8.6 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.47 (d, J 9.6 Hz, 1H), 7.70 (d, J 9.6 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H); $\delta_{\text{C}}(75 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 56.1, 81.7, 101.0, 106.6, 111.3, 112.6, 113.6, 117.3, 117.8, 119.8, 119.9, 124.0, 125.0, 127.9, 128.0, 140.9, 142.9, 143.3, 147.0, 152.4, 153.8; MS (ESI+): m/z 345.20 [$M + H$]⁺, calcd for $C_{21}H_{12}O_5$: 344.07.

7-(7-Hydroxy-3-ethynylcoumarin)-coumarin (2)

In a solution of 7-(7-methoxy-3-ethynylcoumarin)-coumarin (50 mg, 0.145 mmol, 1.0 equiv.) in CH_2Cl_2 (1 ml), BBr_3 (50 μl , 0.29 mmol, 2.0 equiv.) was added at -60°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at -60°C for 2 h then MeOH was slowly added (2 ml). The reaction medium was concentrated under vacuum then the crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-10%) to afford 7-(7-hydroxy-3-ethynylcoumarin)-coumarin as a yellow solid (6.0 mg, yield 12%).

R_f (CH_2Cl_2 -EtOAc, 2 : 1, v/v) 0.5; mp 250°C (decomposition); $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3350, 1691, 1609, 1301, 1204, 1136; δ_{H} (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 6.54 (d, J 9.4 Hz, 2H), 6.77 (d, J 2.3 Hz, 1H), 6.87 (dd, J 8.6 Hz, J 2.3 Hz, 1H), 7.49 (d, J 7.9 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.60 (d, J 8.5 Hz, 1H), 7.78 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.10 (d, J 9.4 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 10.93 (s, 1H); MS (ESI-): m/z 329.40 [$\text{M}-\text{H}$], calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_5$: 330.05; $\lambda_{\text{abs/em}}$ = 375/442 nm, ϵ = 22 600 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (CH_3CN).

7-Hydroxy-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin (43)²⁷⁹

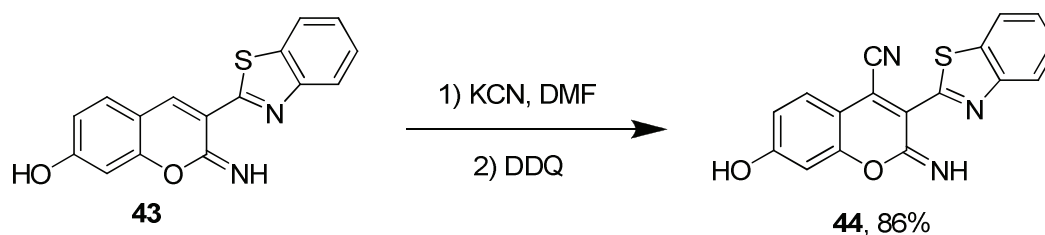
In a solution of 2-benzothiazoleacetonitrile (1.26 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (125 ml), piperidine (7.17 ml, 72.4 mmol, 10.0 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 5 min then 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.0 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv.) was added under an Ar atmosphere and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 7 h. Thereafter, the reaction medium was then cooled at 0°C and filtrated. The recovered solid was washed with MeOH and 7-hydroxy-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin was obtained as a yellow solid (1.71 g, yield 81%).

R_f (CH_2Cl_2 -EtOAc, 9 : 1, v/v) 0.5; mp $>250^\circ\text{C}$; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3241, 2580, 1618, 1449, 1387, 1273, 1247, 1198, 1118, 1081; δ_{H} (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 6.59 (d, J 2.1 Hz, 1H), 6.70 (dd, J 8.3 Hz, J 1.9 Hz, 1H), 7.39-

²⁷⁹ Khilya, O. V., Frasinuk, M. S., Turov, A. V. and Khilya, V. P., *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2001**, 8, 1029.

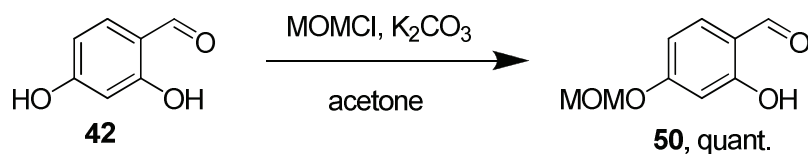
7.55 (m, 3H), 7.65 (d, J 8.4 Hz, 1H), 8.00 (dd, J 8.1 Hz, J 3.7 Hz, 1H), 8.10 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.65 (bs, 1H), 8.87 (bs, 1H); MS (ESI+): m/z 295.20 $[M+H]^+$, calcd for $C_{16}H_{10}N_2O_2S$: 294.05.

7-Hydroxy-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin-4-carbonitrile (44)



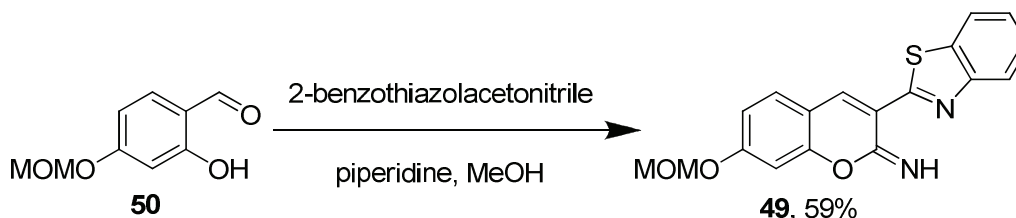
In a solution of KCN (443 mg, 6.8 mmol, 4.0 equiv.) in DMF (20 ml), 7-hydroxy-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin (500 mg, 1.7 mmol, 1.0 equiv) was added and the mixture was stirred at rt under an argon atmosphere for 15 h. 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ, 405 mg, 1.78 mmol, 1.05 equiv.) was then added at rt. The mixture was stirred for 5 min then 0.1 M aq. $NaHCO_3$ (, 100 ml) was added then the aq phase was extracted with EtOAc (2 x 200 ml). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford 7-hydroxy-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin-4-carbonitrile as a red solid (468 mg, yield 86%).

R_f (CH_2Cl_2 -EtOAc, 9 : 1, v/v) 0.6; mp > 250°C; ν_{max}/cm^{-1} 2592 (broad), 1618, 1444, 1381, 1275, 1131, 1087, 1021; δ_H (300 MHz, $DMSO-d_6$) 6.64 (d, J 2.2 Hz, 1H), 6.84 (dd, J 8.6 Hz, J 2.2 Hz, 1H), 7.49-7.62 (m, 2H), 7.67 (d, J 8.9 Hz, 1H), 8.09 (d, J 7.9 Hz, 1H), 8.18 (d, J 7.5 Hz, 1H), 9.67 (bs, 1H), 10.99 (bs, 1H); δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) 102.0, 108.5, 113.4, 114.4, 116.3, 121.9, 123.0, 123.1, 126.0, 126.6, 128.3, 127.3, 151.1, 153.9, 158.4, 163.3 (2C); MS (ESI-): m/z 318.47 $[M - H]^-$, calcd for $C_{17}H_9N_3O_2S$: 319.04.

2-Hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (50)

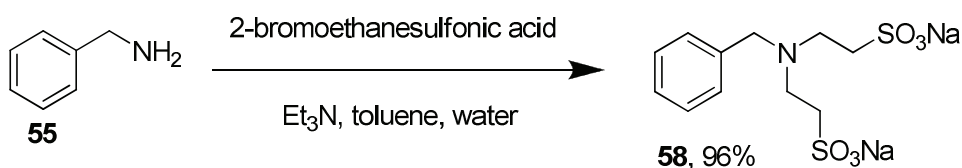
In a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.0 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv.) in synthesis grade acetone (70 ml), anhydrous K_2CO_3 (2.0 g, 14.48 mmol, 2.0 equiv.) and a 2.1 M solution of MOMCl (4.14 ml, 8.69 mmol, 1.2 equiv.) were sequentially added and the resulting reaction mixture was heated under reflux for 1 h. The reaction medium was then evaporated. The crude was dissolved in EtOAc (50 ml) then the organic phase was washed with brine (50 ml). The aq. phase was extracted with EtOAc (30 ml) then organic phases were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford 2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde as a beige powder (1.45 g, quantitative yield).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.8; δ_H (300 MHz, acetone- d_6) 3.45 (s, 3H), 5.30 (s, 2H), 6.56 (d, J 2.3 Hz, 1H), 6.71 (dd, J 8.7 Hz, J 2.3 Hz, 1H), 7.68 (d, J 8.7 Hz, 1H), 9.85 (s, 1H); MS (ESI-): m/z 181.17 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, calcd for $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$: 182.06.

7-(Methoxymethoxy)-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin (49)

In a solution of 2-benzothiazolacetonitrile (1.26 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (40 ml), piperidine (7.2 ml, 72.4 mmol, 10 equiv.) was added under an Ar atmosphere argon rt and stirred for 5 min. A solution of 2-hydroxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (1.44 g, 7.24 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (30 ml) was added and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 20 h. The reaction medium was then filtrated. 7-(Methoxymethoxy)-3-(benzothiazol-2-yl)-2-iminocoumarin was recovered as a yellow solid (1.45 g, yield 59%).

mp 164 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3199, 2899, 1719, 1670, 1603, 1503, 1474, 1433, 1321, 1244, 1214, 1153, 1124, 1074; δ_H (300 MHz, CDCl_3) 3.50 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.88 (d, J 7.9 Hz, 1H), 7.36-7.53 (m, 3H), 7.73 (s, 1H), 7.94 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.05 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H); δ_C (75 MHz, CDCl_3) 56.5, 94.5, 102.8, 113.0, 121.6, 122.7, 124.9, 126.2, 130.2, 135.8, 155.0 ; MS (ESI+): m/z 339.11 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 338.07.

Sodium 2,2'-(benzylazanediy)diethanesulfonate (58)

In a solution of benzylamine (1.00 g, 9.33 mmol, 1.0 equiv.) in toluene (15 ml), triethylamine (3.15 ml, 23.33 mmol, 2.5 equiv.), 2-bromoethanesulfonic acid (4.13 g, 19.59 mmol, 2.1 equiv.) and deionized water (1 ml) were sequentially added. The resulting reaction mixture was heated under reflux for 15 h. The progressive formation of a white solid was observed. It was filtrated and washed with a mixture of acetone- Et_2O (1 : 1, v/v, 100 ml). The crude was then triturated in CH_2Cl_2 , filtrated and dried under vacuum to afford sodium 2,2'-(benzylazanediy)diethanesulfonate as a white powder (3.28 g, yield 96%).

mp 222-230°C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1178, 1053; δ_{H} (300 MHz, D_2O) 2.99-3.04 (m, 4H), 3.15-3.18 (m, 4H), 3.78 (bs, 2H), 7.44 (bs, 5H); δ_{C} (75 MHz, D_2O) 46.9, 47.7, 57.0, 128.0, 128.7 (2C), 130.03 (2C), 136.0; MS (ESI-): m/z 322.13 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{S}_2$: 323.05.

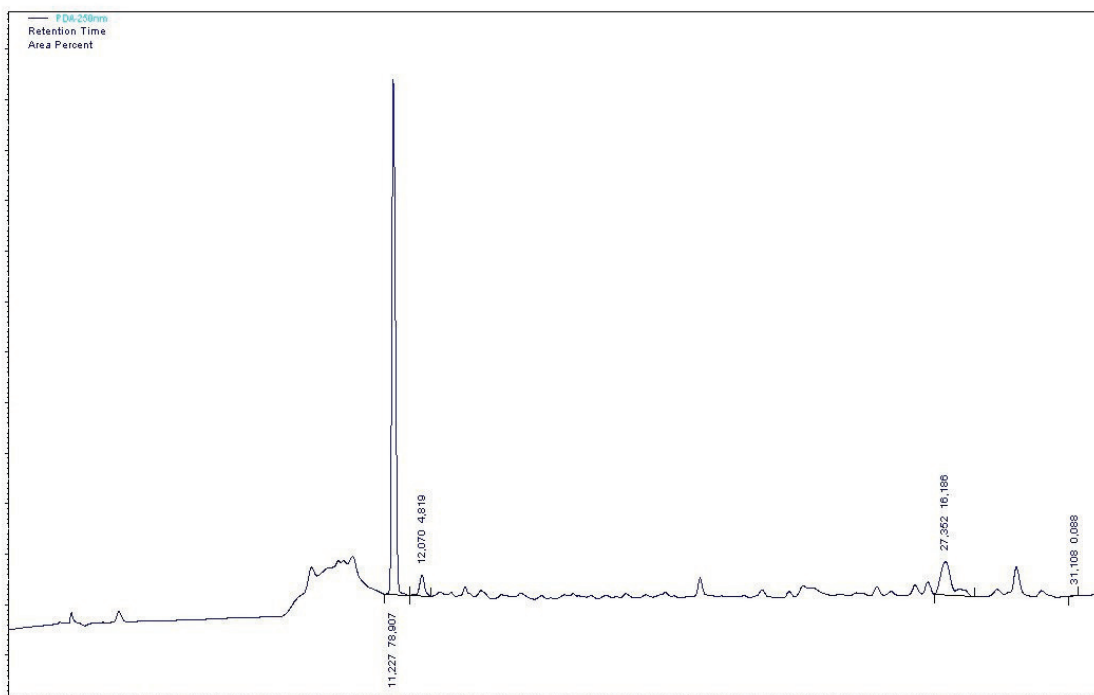
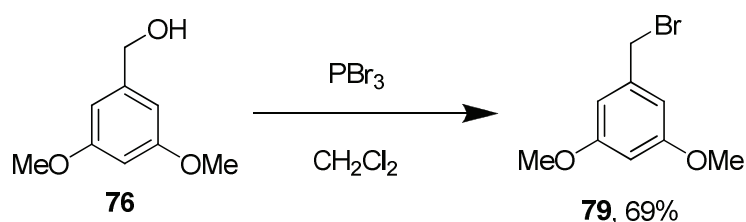


Figure 5 - 1 : QC-HPLC of compound 58

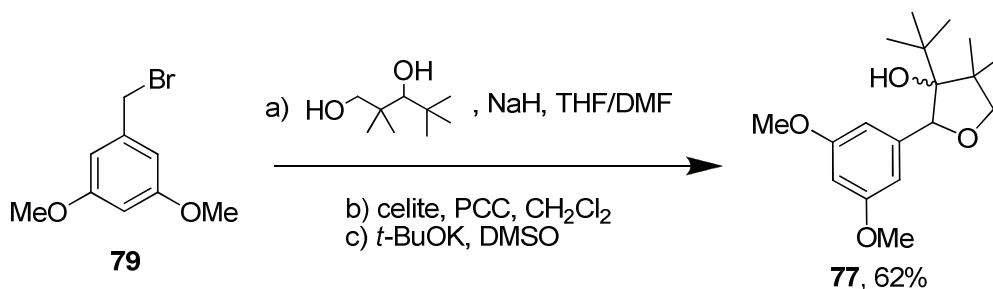
III. Synthesis of chemiluminophores

3,5-Dimethoxybenzyl bromide (**79**)



To an ice-cooled solution of 3,5-dimethoxybenzyl alcohol (18.7 g, 112 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (250 ml), PBr_3 (11.1 ml, 115 mmol, 1.05 equiv.) was added dropwise and the resulting reaction mixture was stirred under an Ar atmosphere. After stirring for 2 h at 0 °C, then 1 h at rt, the reaction mixture was poured into ice-cooled water (600 ml). CH_2Cl_2 layer was separated and aq. phase was extracted with Et_2O (3 × 100 ml). The combined organic layers were washed with sat. aq. NaHCO_3 (200 ml), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in petroleum ether (0-16%) as the mobile phase to yield the benzyl bromide derivative as white crystals (17.82 g, yield 69 %).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.7; mp 76 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1615 and 1592, 1474, 1456, 1431, 1327, 1206, 1154, 1069; $\delta_{\text{H}}^1(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 3.80 (s, 6H, OCH_3), 4.42 (s, 2H, CH_2Br), 6.40 (t, J 2.3 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.54 (d, J 2.3 Hz, 2H, Ar-2-H, Ar-6-H); $\delta_{\text{C}}^1(75 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 33.8 (CH_2Br), 55.5 (OCH_3), 100.7 (C-4), 107.1 (C-2, C-6), 139.9 (C-1), 161.0 (C-3, C-5); MS (APCI+): m/z 231.00 and 233.00 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrO}_2$: 229.99 and 231.99; elemental analysis (%) calcd: C, 46.78; H, 4.80; found: C, 46.22; H, 4.75.

3-*tert*-Butyl-2-(3,5-dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (**77**)

(a) *Alkylation*: A solution of 2,2,4,4-tetramethylpentane-1,3-diol (12.27 g, 76.6 mmol, 1.1 equiv.) in a mixture of dry THF-DMF (6 : 4, v/v, 47 ml) was added dropwise to a suspension of NaH (60% dispersion in oil, 3.20 g, 80 mmol, 1.15 equiv.) in a mixture of dry THF-DMF (1 : 1, v/v, 80 ml) at 0 °C under an Ar atmosphere and the resulting reaction mixture was stirred for 45 min. To this suspension, a solution of the previously synthesized benzyl bromide **79** (16.09 g, 69.2 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of dry THF-DMF (6 : 4, v/v, 60 ml) was added dropwise and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 5 h. Thereafter, the reaction mixture was poured into a solution of saturated aq. NH4Cl (200 ml) and then extracted with EtOAc (3 × 100 ml). The combined organic layers were washed with brine (2 × 100 ml), dried over anhydrous MgSO4, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (7 : 1, v/v) as the mobile phase to afford 1-(3,5-dimethoxybenzyloxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol as a clear oil (20.97 g, yield 97 %).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 5 : 1, v/v) 0.7; δ_1 (300 MHz, CDCl3) 1.02 (s, 9H, C(CH3)3), 1.07 (s, 6H, (CH3)2), 3.22 (d, J 0.8 Hz, 1H, HOCH), 3.24 (d, J 2.6 Hz, 1H, Ar-CH2OCH2), 3.38 (d, J 1.1 Hz, 1H, HOCH), 3.41 (d, J 2.6 Hz, 1H, Ar-CH2OCH2), 4.44 (s, 2H, Ar-CH2OCH2), 6.38 (t, J 2.3 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.47 (d, J 2.3 Hz, 2H, Ar-2-H, Ar-6-H); δ_2 (75 MHz, CDCl3) 22.0, 25.9 ((C-CH3)₂), 28.8 (C(CH3)3), 37.4 ((C(CH3)3), 40.7 ((C-CH3)₂), 55.4 ((OCH3)₂), 73.4 (Ar-CH2OCH2), 82.0 (Ar-CH2OCH2), 84.7 (OHCH), 99.7 (C-4), 105.3 (C-2, C-6), 140.4 (C-1), 161.0 (C-3, C-5); MS (ESI⁺): m/z 311.13 [$M + H$]⁺, calcd for C18H30O4: 310.21.

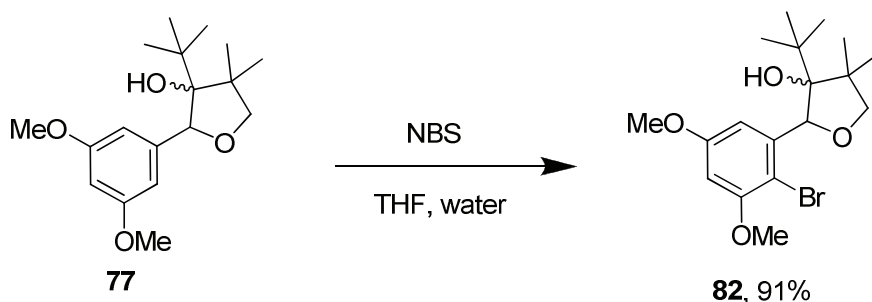
(b) *Oxidation*: A solution of 1-(3,5-dimethoxybenzyloxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol (20.97 g, 67.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH2Cl2 (60 ml) was added dropwise to a suspension of Celite® 545 (43 g) and PCC (21.84 g, 101 mmol, 1.5 equiv.) in dry CH2Cl2 (200 ml) at rt and under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred overnight. Then, 2-propanol (50 ml) was added and the mixture was stirred for further 30 min. Thereafter, Et₂O (300 ml) was added to the reaction mixture which was filtered through a Celite® 545 pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture

of petroleum ether-EtOAc (7 : 1, v/v) as the mobile phase to afford 1-(3,5-dimethoxybenzyloxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one as a clear oil (19.15 g, yield 92%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 5 : 1, v/v) 0.6; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1.23 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.28 (s, 6H, (CH₃)₂), 3.49 (s, 2H, Ar-CH₂OCH₂), 3.77 (s, 6H, OCH₃), 4.42 (s, 2H, Ar-CH₂OCH₂), 6.35 (t, J 2.2 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.54 (d, J 1.9 Hz, 2H, Ar-2-H, Ar-6-H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 24.1 ((C-CH₃)₂), 28.2 (C(CH₃)₃), 45.9 ((C(CH₃)₃), 50.2 ((C-CH₃)₂), 55.4 (OCH₃), 73.2 (Ar-CH₂OCH₂), 78.7 (Ar-CH₂OCH₂), 99.6 (C-4), 105.0 (C-2, C-6), 141.2 (C-1), 160.8 (C-3, C-5), 217.4 (C=O); MS (ESI+): m/z 309.07 [M + H]⁺, calcd for C₁₈H₂₈O₄: 308.20.

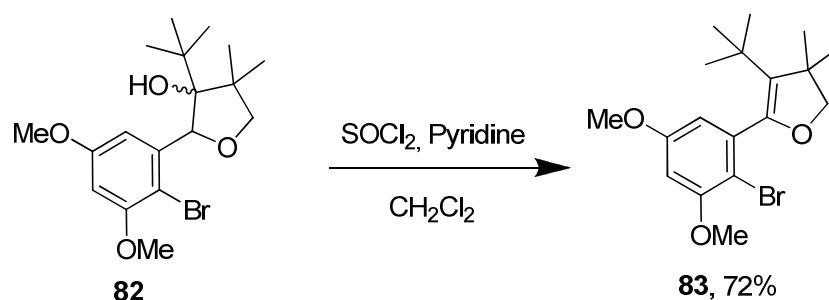
(c) *Cyclisation*: A solution of 1-(3,5-dimethoxybenzyloxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one (19.15 g, 62 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMSO (70 ml) was added dropwise to a suspension of freshly sublimed *t*-BuOK (13.93 g, 124 mmol, 2.0 equiv.) in dry DMSO (140 ml), pre-cooled to 10-15 °C. The resulting reaction mixture was stirred at rt under an Ar atmosphere for 7 h. The reaction mixture was poured into a solution of sat. aq. NH₄Cl (400 ml) and then extracted with EtOAc (3 × 150 ml). The combined organic layers were washed with brine (2 × 150 ml), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (7 : 1, v/v) as the mobile phase to afforded 3-hydroxy-tetrahydrofuran derivative **77** as yellowish crystals (13.37 g, yield 70%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 5 : 1, v/v) 0.4; mp 63 ± 2 °C; ν_{max}/cm^{-1} 3563, 3551, 2961 (broad), 1595, 1458, 1432, 1369, 1293, 1204, 1152, 1097, 1083, 1064, 1055, 1037, 1015, 1003; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 0.97 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.15 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃), 1.66 (s, 1H, OH), 3.48 (d, J 7.2 Hz, 1H, OCH₂C), 3.78 (s, 6H, (OCH₃)₂), 4.10 (d, J 7.2 Hz, 1H, OCH₂C), 5.33 (s, 1H, Ar-CH-O), 6.41 (t, J 2.3 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.62 (d, J 2.3 Hz, 2H, Ar-2,6-H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 20.3 ((C-CH₃)₂), 26.6 ((C-CH₃)₂), 28.0 (C(CH₃)₃), 38.1 ((C(CH₃)₂), 48.2 ((C-CH₃)₃), 55.5 ((OCH₃)₂), 82.1 (OCH₂C), 84.2 (Ar-CH-O), 85.0 (C-OH), 100.2 (C-4), 107.2 (C-2,6), 142.7 (C-1), 160.9 (C-3,5); MS (ESI+): m/z 309.06 [M + H]⁺, calcd for C₁₈H₂₈O₄: 308.20; elemental analysis (%) calcd: C, 70.10; H, 9.15; found: C, 68.27; H, 8.91.

2-(2-Bromo-3,5-dimethoxyphenyl)-3-*tert*-butyl-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (**82**)

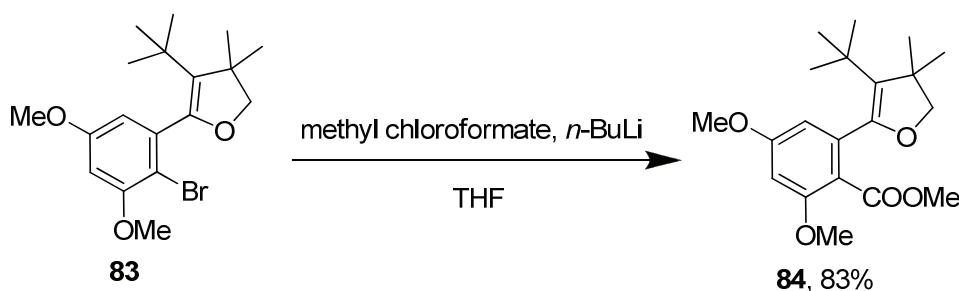
3-Hydroxy-tetrahydrofuran derivative (2.05 g, 6.66 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in THF (34 ml) and deionized water (1.8 ml) was added. The resulting solution was cooled to 0 °C, and recrystallized NBS (1.3 g 7.31 mmol, 1.1 equiv.) was added by portions. After 30 min, the cooled bath was removed and the reaction mixture was stirred at rt under an Ar atmosphere overnight. Thereafter, the reaction mixture was poured in brine (30 ml) and then extracted with EtOAc (3 × 150 ml). The combined organic layers were washed with sat. aq. sodium sulfite (30 ml) and brine (2 × 30 ml), dried over anhydrous MgSO₄, and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in petroleum ether (12-17%) as the mobile phase to afford bromobenzene derivative **82** as white crystals (2.35 g, yield 91%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 5 : 1, v/v) 0.5; mp 127 ± 2 °C; $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3512, 3000 (large), 1586, 1471, 1453, 1416, 1345, 1319, 1294, 1204, 1162, 1075, 1066, 1021, 1000; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1.03 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 1.40 (s, 3H, CH₃), 1.69 (s, 1H, OH), 3.46 (d, J 7.4 Hz, 1H, OCH₂C), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.14 (d, J 7.4 Hz, 1H, OCH₂C), 5.87 (s, 1H, Ar-CH-O), 6.45 (d, J 2.8 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.86 (d, J 2.8 Hz, 2H, Ar-6-H); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 20.3 ((C-CH₃)₂), 27.1 ((C-CH₃)₂), 28.0 (C(CH₃)₃), 38.5 ((C(CH₃)₂), 48.4 ((C-CH₃)₃), 55.6 ((C-3-OCH₃), 56.6 (C-5-OCH₃), 82.4 (OCH₂C), 82.4 (Ar-CH-O), 86.7 (C-OH), 99.7 (C-4), 105.9 (C-2), 107.3 (C-6), 142.3 (C-1), 156.5 (C-3), 159.5 (C-5); MS (ESI⁺): m/z 404.07 and 405.93 calcd [M + H₂O]⁺ (water cluster formed during the ionization process), calcd for C₁₈H₂₇BrO₄: 386.11 and 388.11. elemental analysis (%) calcd: C, 55.82; H, 7.03; found: C, 55.66; H, 7.04.

5-(2-Bromo-3,5-dimethoxyphenyl)-4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (**83**)

Thionyl chloride (4.28 ml, 58.6 mmol, 10.0 equiv.) was added dropwise to a solution of compound **82** (2.27 g, 5.86 mmol, 1.0 equiv.) and dry pyridine (4.74 ml, 58.6 mmol, 10.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (35 ml) at 0 °C under an Ar atmosphere. After stirring at rt for 2 h, the reaction mixture was poured cautiously into sat. aq. NaHCO_3 (200 ml) and then extracted with EtOAc (4 × 50 ml). The combined organic layers were washed with brine (2 × 50 ml), dried over anhydrous MgSO_4 , and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (7 : 1, v/v) as the mobile phase to afford dihydrofuran **83** as white crystals (1.55 g, yield 72%).

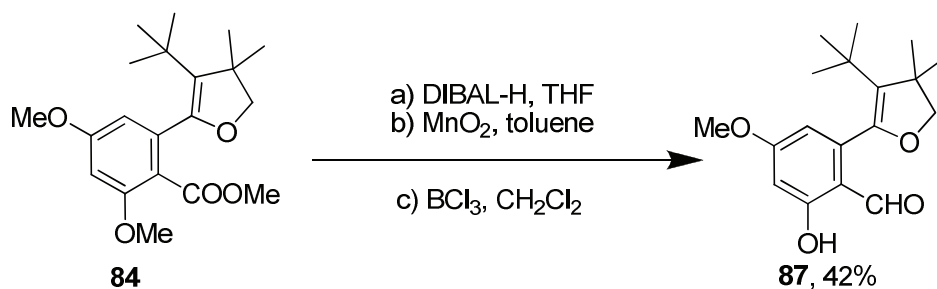
R_f (petroleum ether-EtOAc, 5 : 1, v/v) 0.7; mp 89 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2957 (broad), 1579, 1450, 1428, 1341, 1219, 1201, 1162, 1138, 1075, 1054, 1022; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 3H, CH_3), 1.37 (s, 3H, CH_3), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H, OCH_2C), 6.44 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, Ar-4-H), 6.47 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H, Ar-6-H); $\delta_{\text{C}}(75 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 27.1 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_2$), 27.2 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_2$), 31.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.7 ($(\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 47.2 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_3$), 55.8 (C-3- OCH_3), 56.4 (C-5- OCH_3), 83.5 (OCH_2C), 99.9 (C-4), 105.3 (C-2), 108.2 (C-6), 126.2 (Ar-C=C), 139.0 (Ar-C=C), 147.8 (C-1), 156.8 (C-3), 159.4 (C-5); MS (ESI⁺): m/z 369.01 and 371.01 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{BrO}_3$: 368.10 and 370.10; elemental analysis (%) calcd: C, 58.54; H, 6.82; found: C, 58.30; H, 6.81.

Methyl 2-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-4,6-dimethoxybenzoate (**84**)

To a stirred solution of dihydrofuran **83** (2.0 g, 5.43 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (50 ml), *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 4.07 ml, 6.51 mmol, 1.2 equiv.) was added dropwise at -78 °C under an Ar atmosphere. After stirring for 30 min, freshly distilled methyl chloroformate (1.5 ml, 19.0 mmol, 3.5 equiv.) was added dropwise. The resulting reaction mixture was allowed to warm up to -5 °C within 4 h. Thereafter, the reaction was quenched by addition of sat. aq. NH₄Cl (40 ml), extracted with EtOAc (3 × 30 ml), washed with brine (2 × 20 ml), dried over anhydrous MgSO₄, and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (5 : 1, v/v) as the mobile phase to afford methyl ester **84** as a colorless oil (1.57 g, yield 83%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 6 : 1, v/v) 0.2; mp 84 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2950 (broad), 1721, 1596, 1582, 1419, 1347, 1282, 1273, 1218, 1202, 1159, 1139, 1104, 1052, 1043, 1030, 1017; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1.04 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.29 (s, 6H, (CH₃)₂), 3.81-3.84 (m, 9H, Ar-OCH₃, COOCH₃), 3.88 (s, 2H, OCH₂C), 6.39 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, Ar-5-H), 6.45 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, Ar-3-H); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 27.1 ((C-CH₃)₂), 32.0 (C(CH₃)₃), 32.6 ((C(CH₃)₂), 47.1 ((C-(CH₃)₃), 52.1 (CH₃), 55.6 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 83.5 (OCH₂C), 99.0, 107.2, 116.7 (Ar-C=C), 126.5 (Ar-C=C), 137.0, 147.0, 158.4, 161.3, 167.3; MS (ESI⁺): *m/z* 349.12 [M + H]⁺, calcd for C₂₀H₂₈O₅: 348.19; elemental analysis (%) calcd: C, 68.94; H, 8.10; found: C, 68.43; H, 8.07.

2-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-6-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde (87)



(a) *Reduction*: To a stirred solution of methyl ester **84** (1.57 g, 4.49 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (50 ml), DIBAL-H (1.0 M in toluene, 11.2 ml, 11.2 mmol, 2.5 equiv.) was added dropwise at -78 °C under an Ar atmosphere. Then, the reaction mixture was warmed up gradually to rt within 6 h, and stirred at this temperature overnight. The reaction was quenched by addition of deionized water (20 ml), followed by addition of a 1.0 M aq. HCl (30 ml), stirred for 10 min and extracted with EtOAc (3 × 30 ml), washed with brine (2 × 35 ml), dried over anhydrous MgSO₄, and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (5 : 1, v/v) as the mobile phase to afford benzyl alcohol derivative as a colorless oil (1.05 g, yield 73%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.2; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.35 (s, 6H, (CH₃)₂), 2.54 (bs, 1H, CH₂OH), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.88 (d, 2H, OCH₂C), 4.61 (bm, 1H, CH₂OH), 6.42 (d, *J* 2.4 Hz, 1H, Ar-5-H), 6.46 (d, *J* 2.5 Hz, 1H, Ar-3-H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 27.6, 27.1, 32.2 ((C-CH₃)₂), 32.6 (C(CH₃)₃), 47.3 ((C(CH₃)₃), 55.6 (OCH₃), 55.7 (OCH₃), 58.2, 83.1, 99.0, 106.9, 121.3, 126.9, 137.4, 147.8, 159.0, 159.8; MS (ESI+): *m/z* 663.07 [2M + Na⁺] calcd for C₁₉H₂₈O₄: 320.20.

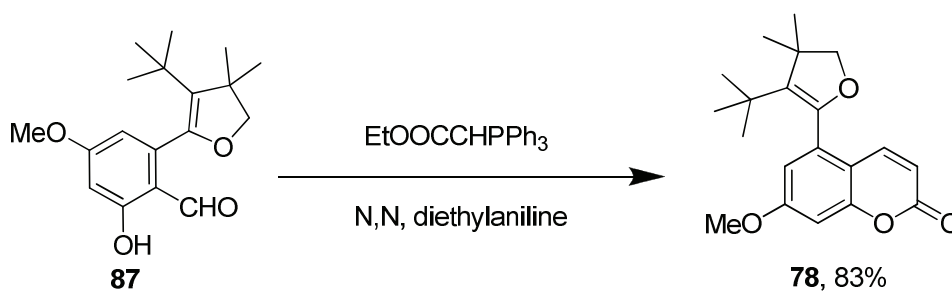
(b) *Oxidation*: Benzyl alcohol derivative (1.05 g, 4.49 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry toluene (35 ml) and MnO₂ (activated) (2.71 g, 11.2 mmol, 10 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was heated to reflux for 2 h, then cooled to rt, filtered through a Celite® 545 pad. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (4 : 1, v/v) as the mobile phase to afford benzaldehyde derivative as white crystals (1.05 g, yield 73%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.2; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 1.03 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.35 (s, 6H, (CH₃)₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 3H, OCH₃), 3.92 (s, 2H, CH₂), 6.44 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, Ar-5-H), 6.47 (d, *J* 2.3 Hz, 1H, Ar-3-H), 10.18 (1H, s, CHO); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 27.2 ((C-CH₃)₂), 32.1 (C(CH₃)₃), 32.6 ((C(CH₃)₂), 47.4 ((C-CH₃)₃), 55.8 (OCH₃), 56.1 (OCH₃), 83.7 (OCH₂C), 98.9 (C-5), 108.9 (C-3), 117.7 (Ar-

C=C), 127.1 (Ar-C=C), 142.8 (C-1), 146.3 (C-2), 162.8 (C-6), 164.5 (C-4), 189.6 (CHO); MS (ESI+): m/z 319.10 $[M + H]^+$, calcd for $C_{19}H_{26}O_4$: 318.18.

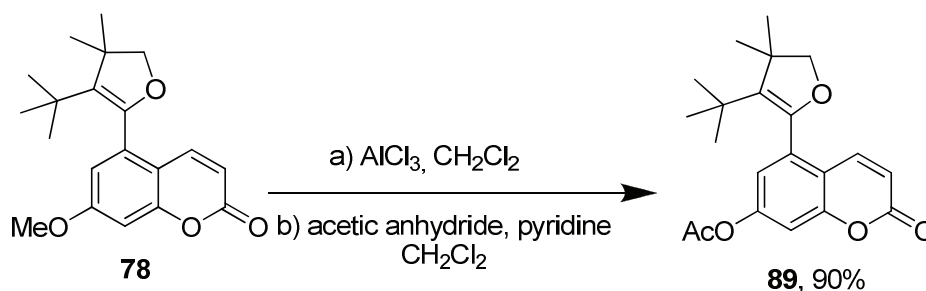
(c) *Removal of methoxy group*: BCl_3 (1.0 M in hexane, 3.1 ml, 3.12 mmol, 1.6 equiv.) was added dropwise during 15 min (*Boron trichloride should be used fresh and temperature should not exceeded $-5^\circ C$*) to a stirred solution of benzaldehyde derivative (0.62 g, 1.95 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (48 ml) and cooled to $-20^\circ C$, under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was warmed up to $-5^\circ C$ over 2 h, and then poured with stirring into brine (50 ml). The CH_2Cl_2 layer was separated and aq. layer extracted with further amount of CH_2Cl_2 (3×10 ml). The collected CH_2Cl_2 phases were combined, washed with brine (2×50 ml), dried over anhydrous $MgSO_4$, and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (5 : 1, v/v) as the mobile phase to afford phenol **87** as white crystals (0.46 g, yield 78%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.8; mp $80 \pm 2^\circ C$; ν_{max}/cm^{-1} 2950 (broad), 1617, 1373, 1301, 1261, 1218, 1202, 1160, 1128, 1103, 1054, 1038, 1018, 1007; δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 1.06 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.28 (s, 6H, $(CH_3)_2$), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 2H, CH_2), 6.40 (d, J 2.3 Hz, 1H, Ar-4-H), 6.42 (d, J 2.5 Hz, 1H, Ar-6-H), 9.83 (1H, s, CHO), 12.06 (s, 1H, OH); δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) 27.2 ($(C-CH_3)_2$), 27.6 ($(C-CH_3)_2$), 32.2 ($C(CH_3)_3$), 32.7 ($(C(CH_3)_2)$), 47.6 ($(C-(CH_3)_3)$), 55.9 (OCH_3), 83.6 (OCH_2C), 101.0 (C-4), 111.4 (C-6), 113.2 (Ar-C=C), 129.6 (Ar-C=C), 142.0 (C-1), 144.6 (C-2), 165.5 (C-6), 166.1 (C-4), 195.0 (CHO); MS (ESI+): m/z 305.12 $[M + H]^+$, (ESI-): m/z 303.32 $[M - H]^-$, calcd for $C_{18}H_{24}O_4$: 304.17; elemental analysis (%) calcd: C, 71.03; H, 7.95; found: C, 71.00; H, 7.93.

5-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one (**78**)

To a stirred solution of *ortho*-hydroxybenzaldehyde **87** (0.46 g, 1.52 mmol, 1.0 equiv.) in dry *N,N*-diethylaniline (10 ml), carbethoxymethylenetriphenylphosphorane (0.64 g, 1.83 mmol, 1.2 equiv.) was added and the reaction mixture was heated to 175 °C for 50 min and then to 185 °C for 30 min under an Ar atmosphere. Thereafter, the reaction mixture was cooled, poured into 1.0 M aq. HCl (20 ml) and extracted with EtOAc (3 × 20 ml). Combined organic phases were washed with 1.0 M aq. HCl (2 × 20 ml), brine (2 × 20 ml), dried over anhydrous MgSO₄, and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a mixture of petroleum ether-EtOAc (5 : 1, v/v) as the mobile phase to afford coumarin **78** as yellowish crystals (0.42 g, yield 83%).

R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.5; mp 128 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2950 (broad), 1742, 1596, 1464, 1384, 1360, 1355, 1314, 1234, 1212, 1161, 1154, 1120, 1095, 1034, 1012; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.02 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.38 (s, 6H, (CH₃)₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 2H, CH₂), 6.27 (d, J 9.6 Hz, 1H, Ar-3-H), 6.79 (s, 2H, Ar-6,8-H), 7.67 (d, J 9.6 Hz, 1H, Ar-4-H); $\delta_{\text{C}}(75 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 27.2 ((C-CH₃)₂), 27.4 ((C-CH₃)₂), 32.2 (C(CH₃)₃), 32.7 ((C(CH₃)₂), 47.6 ((C-(CH₃)₃), 56.0 (OCH₃), 83.6 (OCH₂C), 101.2 (C-6), 112.1 ((Ar-C=C), 113.5 (C-3), 114.9 (C-8), 129.7 ((Ar-C=C)), 135.9 (C-5), 141.8 (C-4), 145.0 (C-10), 156.1 (C-9), 161.2 (C-7), 162.1 (C-2); MS (ESI+): m/z 329.46 [M + H]⁺, calcd for C₂₀H₂₄O₄: 328.17; elemental analysis (%) calcd: C, 73.15; H, 7.37; found: C, 71.27; H, 7.28.

5-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate (**89**)

(a) *Removal of methoxy group*: To a stirred solution of coumarin **78** (0.376 g, 1.14 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (48 ml), AlCl_3 (1.22 g, 9.16 mmol, 8.0 equiv.) was added at 0 °C and stirred at the same temperature for 10 min. Then, the reaction mixture was heated to reflux for 30 h under an Ar atmosphere. During this time, further amounts AlCl_3 (4 equiv.) were added. Thereafter, the reaction mixture was cooled and quenched by adding dropwise of a 1.0 M aq. HCl (40 ml). The CH_2Cl_2 layer was separated and aq. layer extracted with EtOAc (4 × 20 ml). The combined organic phases were washed with brine (2 × 50 ml), dried over anhydrous MgSO_4 , and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in petroleum ether (25-33%) as the mobile phase to afford phenol derivative as yellowish crystals (0.357 g, quantitative yield).

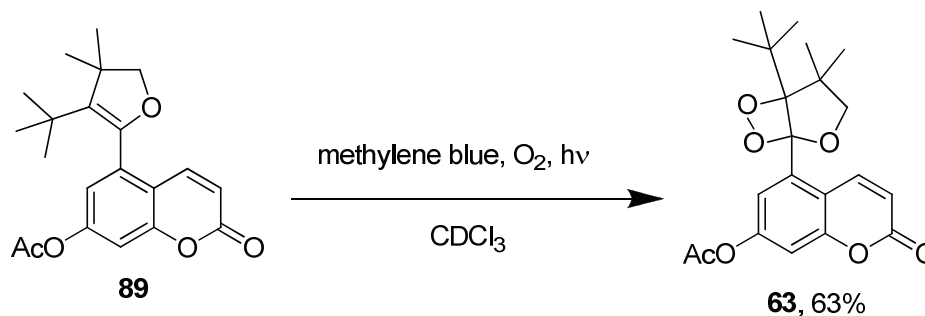
R_f (petroleum ether-EtOAc, 3 : 1, v/v) 0.2; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 1.02 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2$), 3.93 (s, 2H, CH_2), 6.27 (d, J 9.6 Hz, 1H, Ar-3-H), 6.82 (d, J 2.5 Hz, 1H, Ar-8-H), 6.96 (d, J 2.4 Hz, 1H, Ar-6-H), 7.73 (d, J 9.6 Hz, 1H, Ar-4-H); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 27.2 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_2$), 27.3 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_2$), 32.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.7 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_2$), 47.6 ($(\text{C}-\text{CH}_3)_3$), 83.5 (OCH_2C), 103.7 (C-6), 111.9 (Ar-C=C), 112.6 (C-3), 116.2, 129.9 (Ar-C=C), 136.3 (C-5), 142.9 (C-4), 144.7, 155.7 (C-9), 159.7 (C-7), 162.6 (C-2); MS (ESI+): m/z 315.33 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$: 314.15.

(b) *Acetylation*: Phenol derivative (150 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (6 ml). Then, dry pyridine (76 μl , 0.94 mmol, 2.0 equiv.) and acetic anhydride (58 μl , 0.62 mmol, 1.3 equiv.) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at rt overnight. Thereafter, 10% aq. citric acid (10 ml) was added. After decantation, the CH_2Cl_2 layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , and finally concentrated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-30%) as the mobile phase to afford 7-O-protected coumarin **89** as white crystals (151 mg, yield 90%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.5; mp $128 \pm 2^\circ\text{C}$; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2950 (broad), 1770, 1731, 1603, 1367, 1193, 1124, 1106, 1058, 1041, 1020, 1007; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 1.03 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 6H,

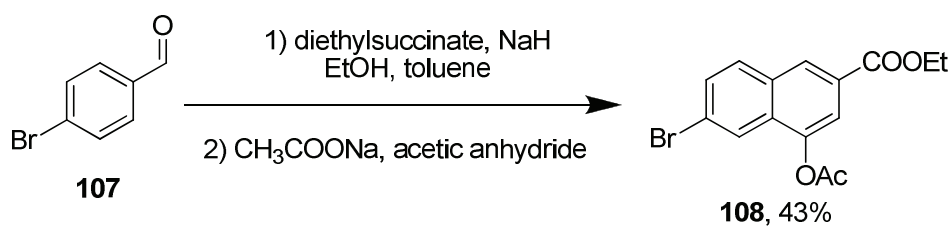
(CH₃)₂), 2.33 (s, 3H, COCH₃), 3.93 (s, 2H, CH₂), 6.81 (d, *J* 9.6 Hz, 1H, Ar-3-H), 7.02 (d, *J* 2.5 Hz, 1H, Ar-8-H), 7.11 (d, *J* 2.4 Hz, 1H, Ar-6-H), 7.72 (d, *J* 9.6 Hz, 1H, Ar-4-H); δ_c (75 MHz, CDCl₃) 21.2 (C=OCH₃), 27.2 ((C-CH₃)₂), 27.3 ((C-CH₃)₂), 32.3 (C(CH₃)₃), 32.7 ((C(CH₃)₂), 47.6 ((C-CH₃)₃), 83.5 (OCH₂C), 110.5, 116.0, 116.3, 120.7, 130.4, 135.7, 141.3, 144.3, 152.4, 154.7, 160.3, 168.5; MS (ESI+): *m/z* 357.33 [M + H]⁺, calcd for C₂₁H₂₄O₅: 356.16; elemental analysis (%) calcd: C, 70.77; H, 6.79; found: C, 70.92; H, 6.85.

5-(5-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptan-1-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl acetate (**63**)



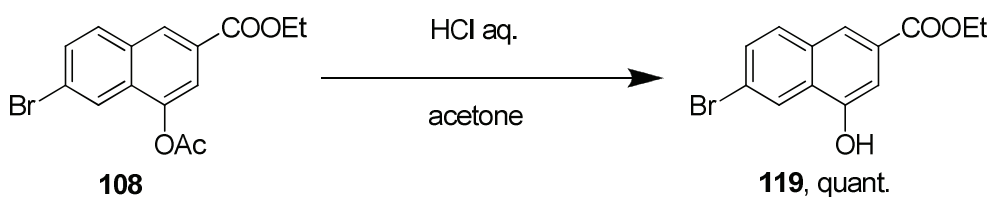
In a solution of coumarin **89** (42 mg, 0.118 mmol, 1.0 equiv) in CDCl₃ (1.5 ml), a point of spatula of methylene blue was added (< 1 mg) at 0 °C. The mixture was irradiated with a 300W-halogen-lamp under a flux of O₂ for 390 min and the reaction was checked to complete by TLC. Thereafter, volatiles were removed without heating thanks of a flux of N₂. The resulting crude was purified on a silica gel column (10 g) by means of an automated flash purification system (Biotage Isolera One), and by using a linear gradient of EtOAc (0-30%) in cyclohexane to give the targeted dioxetane **63** as a white solid (29 mg, yield 63%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.4; mp 142 ± 5 °C ; ν_{\max} /cm⁻¹ 2950 (broad), 1769, 1734, 1714, 1683, 1607, 1365, 1305, 1227, 1193, 1158, 1127, 1050, 1033, 1010 ; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 0.95 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.24 (s, 3H, (CH₃)₂), 1.41 (s, 3H, (CH₃)₂), 2.34 (s, 3H, COCH₃), 3.98 (d, *J* 8.5 Hz , 1H, CH₂), 4.61 (d, *J* 8.5 Hz , 1H, CH₂), 6.40 (d, *J* 9.6 Hz, 1H, Ar-3-H), 7.22 (d, *J* 9.6 Hz, 1H, Ar-4-H), 7.64 (bs, 1H, Ar-6-H), 8.51 (bs, 1H, Ar-8-H); δ_c (75 MHz, CDCl₃) 21.2 (C=OCH₃), 26.1 ((C-CH₃)₂), 26.7 (C(CH₃)₃), 28.2 ((C-CH₃)₂), 36.9 ((C(CH₃)₂), 45.7 ((C-CH₃)₃), 80.6 (OCH₂C), 106.1, 112.5, 115.5, 115.9, 121.7, 134.6, 141.2, 152.0, 155.8, 159.6, 168.6; MS (ESI+): *m/z* 389.07 [M + H]⁺, calcd for C₂₁H₂₄O₇: 388.15; elemental analysis (%) calcd: C, 64.94; H, 6.23; found: C, 64.68; H, 6.20.

Ethyl 4-acetoxy-6-bromo-2-naphthoate (108)

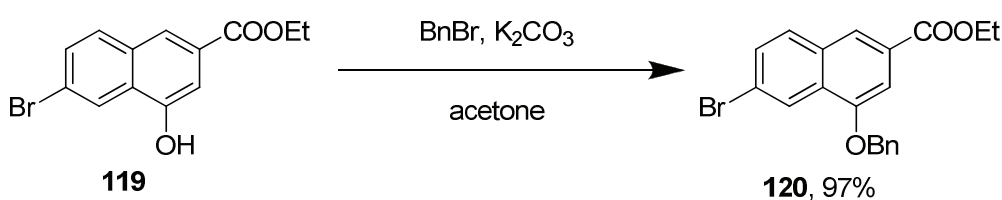
To a suspension of NaH (8.56 g, 357 mmol, 2.2 equiv.) in freshly distilled toluene (70 ml), absolute ethanol (300 μ l, 5.1 mmol, 0.03 equiv.) was added. Diethylsuccinate (78.5 ml, 470 mmol, 2.9 equiv.) and commercially available 4-bromobenzaldehyde (30.0 g, 162 mmol, 1 equiv.) dissolved in dry toluene (130 ml) were slowly added on the mixture under an Ar atmosphere. The temperature was maintained at 30-32°C during the addition (caution: exothermic reaction!). After the addition, the mixture was stirred at rt for 1 h. Conc. 37% HCl (60 ml,) was very slowly added then deionized water (70 ml). The organic phase was thrice extracted with 1.0 M aq K_2CO_3 (3 x 80 ml). The aq. phase was carefully acidified with conc. HCl (40 ml,) then thrice extracted with EtOAc (3 x 100 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield the Stobbe reaction product as a brown-yellow amorphous solid. This crude product was directly dissolved in acetic anhydride (500 ml). Sodium acetate (19.0 g, 231 mmol, 1.61 equiv.) was added at rt and the resulting reaction mixture was heated around 120°C for 2 h. The reaction medium was allowed to cooling at rt and poured in deionized water (1 l). The solid was recovered through filtration and dried by and lyophilization to give ethyl 4-acetoxy-6-bromo-2-naphthoate as a yellow-brown amorphous solid (23.5 g, yield 43%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.7; mp 116 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2986, 1754, 1709, 1450, 1411, 1365, 1289, 1241, 1199, 1069, 1054, 1023; δ_{H}^1 (300 MHz, CDCl_3) 1.42 (t, J 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 2.48 (s, 3H, COCH_3), 4.42 (q, J 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 7.61 (dd, J 8.7 Hz, J 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.80 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 7.85 (d, J 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 8.02 (bs, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$), 8.43 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$); δ_{C}^1 (75 MHz, CDCl_3) 14.4 (CH_2CH_3), 21.1 (COCH_3), 61.6 (CH_2CH_3), 118.9 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 123.6 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 123.9 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 128.3 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$), 128.7 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 130.0 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 130.9 ($\text{C}_{7 \text{ or } 8\text{-naph.}}$), 131.1 ($\text{C}_{7 \text{ or } 8\text{-naph.}}$), 132.1 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 145.7 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$), 165.7 (COOCH_2), 169.2 (OCOCH_3); MS (APCI+): m/z 353.87 and 355.93 [$\text{M} + \text{H}_2\text{O}$] $^{++}$ (water cluster formed during the ionization process), calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrO}_4$: 336.00 and 338.00.

Ethyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate (119)

To a solution of ethyl 4-acetoxy-6-bromo-2-naphthoate (10.6 g, 31.4 mmol, 1.0 equiv.) in synthesis-grade acetone (150 ml), 3.0 M aq. HCl (40 ml) was added and the resulting reaction mixture was stirred under reflux for 5 h. The reaction medium was allowed to cool to rt then concentrated. The crude was dissolved in 50 ml of EtOAc then washed with brine (50 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to yield ethyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate as an amorphous yellow solid (9.7 g, quantitative yield).

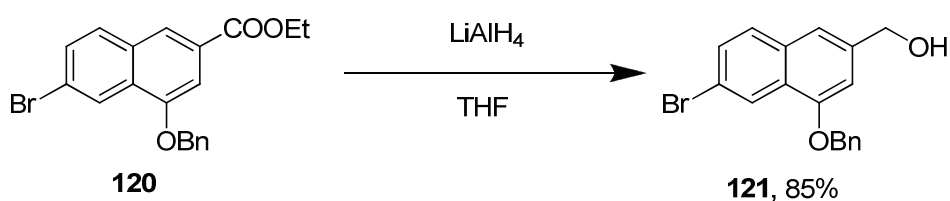
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.5; mp 162 ± 2 °C; ν_{max} / cm^{-1} 3407 (broad), 2979 (broad), 2528 (broad), 1682, 1579, 1473, 1413, 1375, 1295, 1244, 1203, 1118, 1022; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 1.39 (t, J 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 4.35 (q, J 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 7.34 (d, J 1.5 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.54 (dd, J 8.7 Hz, J 2.0 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.72 (d, 1H, J 8.7 Hz, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 7.96 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 8.31 (d, 1H, J 2.0 Hz, $\text{H}_{5\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 14.6 (CH_2CH_3), 62.2 (CH_2CH_3), 108.6 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 122.2 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 122.6 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 125.8 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 129.4 ($\text{C}_{4\text{a}}$ or 8a-naph), 129.8 ($\text{C}_{4\text{a}}$ or 8a-naph), 131.1 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 131.8 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 133.5 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 154.0 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$), 168.0 (COOCH_2); MS (ESI-): m/z 293.13 and 295.13 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrO}_3$: 293.99 and 295.99.

Ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate (120)

To a solution of ethyl 6-bromo-4-hydroxy-2-naphthoate (11.7 g, 39.6 mmol, 1.0 equiv.) in synthesis-grade acetone (350 ml), anhydrous K_2CO_3 (6.56 g, 47.5 mmol, 1.2 equiv.) was added then benzyl bromide (5.2 ml, 43.6 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was heated under reflux for 6 hs. The reaction medium was allowed to cool at rt then concentrated. The crude was dissolved in dichloromethane (300 ml) and washed with 3.0 M aq. HCl (300 ml) then dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate as a yellow amorphous solid (14.9 g, yield 97%).

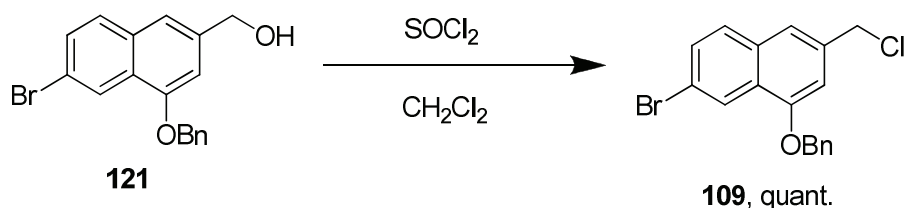
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.7; mp 116 ± 2 °C; ν_{\max} / cm^{-1} 2986 (large), 1754, 1711, 1588, 1449, 1409, 1365, 1289, 1240, 1200, 1070, 1052; δ_{H} (300 MHz, CD_3OD) 1.45 (t, J 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 4.44 (q, J 7.1 Hz, 2H, OCH_2CH_3), 5.29 (s, 2H, OCH_2C), 7.39-7.56 (m, 6H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$ + H_{benzyl}), 7.62 (dd, J 8.7 Hz, J 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.77 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.17 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$), 8.47 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CD_3OD) 14.5 (CH_2CH_3), 61.4 (CH_2CH_3), 70.6 (OCH_2C), 105.2 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 122.3 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 123.5 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 125.0 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 127.9 (2C, C_2 and 6-benzyl), 128.4 ($\text{C}_4\text{-benzyl}$), 128.5 ($\text{C}_{4\text{a}}$ or 8a-naph.), 128.8 (2C, C_3 and 5-benzyl), 128.9 ($\text{C}_{4\text{a}}$ or 8a-naph.), 130.7 (C_7 or 8-naph.), 130.8 (C_7 or 8-naph.), 132.0 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 136.4 ($\text{C}_1\text{-benzyl}$), 153.8 ($\text{C}_4\text{-naph}$), 166.7 (COOCH_2); MS (APCI-): m/z 383.07 and 385.07 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrO}_3$: 384.04 and 386.03.

(4-(Benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol (**121**)



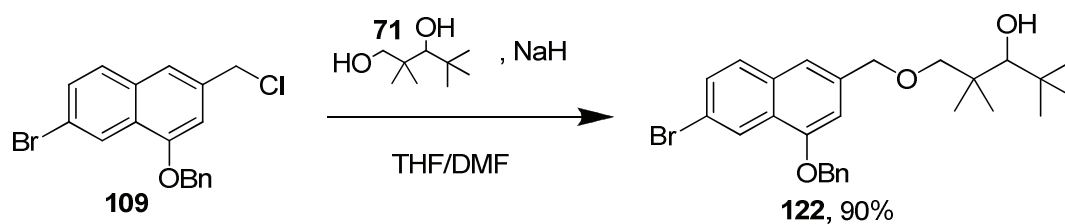
To a suspension of LiAlH_4 (1.98 g, 52.2 mmol, 2.0 equiv.) in freshly distilled THF (100 ml), a solution of ethyl 4-(benzyloxy)-6-bromo-2-naphthoate (10.1 g, 26.1 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (150 ml) was slowly added at 0°C under an Ar atmosphere. The mixture was stirred at rt for 3 h. Thereafter, q. solutions were sequentially and slowly added: deionized water (2 ml), 1.0 M aq. NaOH (4 ml), deionized water (6 ml). The crude was filtrated on a Celite® 545 pad then concentrated under vacuum. The crude was dissolved in EtOAc (100 ml) then washed with 3.0 M aq.HCl (150 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to yield (4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol as a beige solid (7.65 g, yield 85%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.3; mp 98 ± 2 °C; ν_{\max} / cm^{-1} 3298 (broad), 2864 (broad), 1631, 1586, 1495, 1453, 1416, 1362, 1276, 1320, 1276, 1228, 1109, 1055; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 2.02 (bs, 1H, CH_2OH), 4.76 (s, 2H, CH_2OH), 5.21 (s, 2H, OCH_2C), 6.91 (s, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.32 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 7.40-7.50 (m, 5H, H_{benzyl}), 7.54 (dd, J 9.6 Hz, J 1.7 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.61 (d, J 9.6 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.43 (d, J 1.7 Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 65.6 (CH_2OH), 70.3 (CH_2O), 105.1 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 117.7 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 119.5 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 124.8 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 126.4 ($\text{C}_{4\text{a-naph}}$), 127.7 (2C, C_2 and 6-benzyl), 128.3 ($\text{C}_4\text{-benzyl}$), 128.8 (2C, C_3 and 5-benzyl), 129.2 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 130.3 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 132.8 ($\text{C}_{8\text{a-naph}}$), 136.6 ($\text{C}_1\text{-benzyl}$), 139.3 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 154.0 ($\text{C}_4\text{-naph}$); MS (APCI+): m/z 325.07 and 327.05 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (dehydration reaction was occurred during the ionization process within APCI probe), calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{BrO}_2$: 342.03 and 344.02.

1-(Benzyloxy)-7-bromo-3-(chloromethyl)naphthalene (109)

To a solution of (4-(benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methanol (8.06 g, 23.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (100 ml), SOCl_2 (3.41 ml, 47 mmol, 2.0 equiv.) was slowly added at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at rt. The reaction was checked for completion by TLC. After 2 h, sat. aq. NH_4Cl (50 ml) was slowly added and after decantation, the recovered organic phase was sequentially washed with 0.1 M aq. NaOH (50 ml) and brine (50 ml). The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 then filtrated and concentrated under vacuum to yield benzyl chloride derivative **109** as a brown oil (8.52 g, quantitative yield).

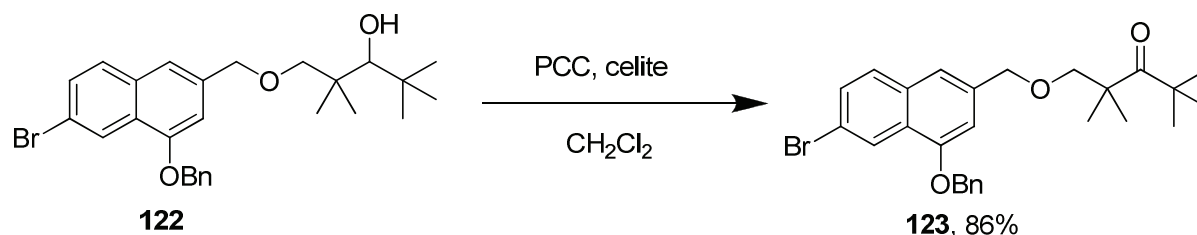
R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.7; $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ 3048 (broad), 1585, 1496, 1450, 1415, 1398, 1362, 1283, 1258, 1228, 1109, 1067; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 4.70 (s, 2H, CH_2Cl), 5.25 (s, 2H, OCH_2C), 6.95 (s, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.38 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.38-7.60 (m, 6H, $\text{H}_{\text{benzyl}} + \text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.63 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.44 (d, J 1.0 Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 47.0 (CH_2Cl), 70.4 (CH_2O), 106.2 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 119.9 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 120.2 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 124.8 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 126.7 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 127.7 (2C, C_2 and 6-benzyl), 128.3 ($\text{C}_4\text{-benzyl}$), 128.8 (2C, C_3 and 5-benzyl), 129.3 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 130.5 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 132.6 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 135.6 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 136.4 ($\text{C}_{1\text{-benzyl}}$), 154.2 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$); MS (EI+): m/z 362 (5%), 207 (5%), 127 (7%), 91 (100%), calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BrClO}$: 359.99 and 361.99.

1-((4-(Benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-ol (**122**)

To a suspension of NaH (1.32 g, 32.9 mmol, 1.4 equiv.), in a mixture of dry DMF-THF (75 : 25, v/v, 200 ml), a solution of 2,2,4,4-tetramethylpentane-1,3-diol (4.15 g, 25.9 mmol, 1.1 equiv.) in dry THF (50 ml) was slowly added at 0°C under an Ar atmosphere. After 15 min of stirring, a solution of benzyl chloride derivative **109** (8.50 g, 23.5 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (50 ml) was added and the resulting reaction mixture was stirred at rt for 2 days. Thereafter, sat. aq. NH₄Cl (50 ml) was slowly added (H₂ degassing!). The reaction medium was concentrated then dissolved in EtOAc (100 ml). The organic phase was sequentially washed with deionized water (100 ml) and 10% aq. HCl (100 ml) then dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to yield crude alcohol **122** (11.87 g). This latter compound was rapidly purified on a silica gel pad by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) as the mobile phase to give the expected pure compound as a brown oil (10.25 g, yield 90%).

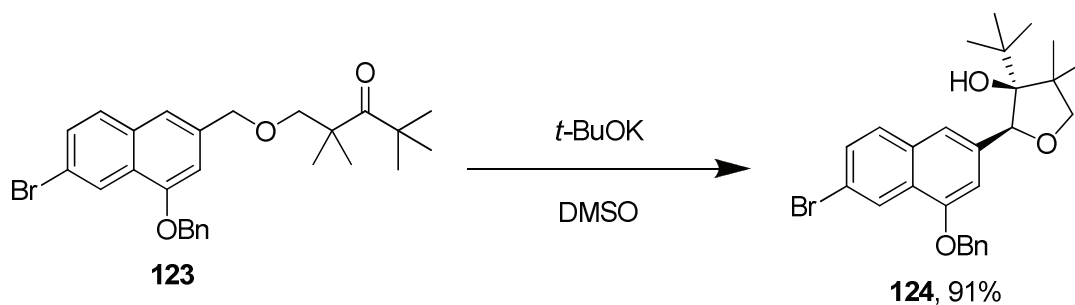
R_f (Cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.7; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2954 (broad), 2869 (broad), 1586, 1452, 1413, 1361, 1279, 1226, 1091 (large); δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1.05-1.08 (s, 15H, C(CH₃)₂ + C(CH₃)₃), 3.26 (s, 1H, CHOH), 3.27 (d, 1H, CH₂OCH₂), 3.41 (d, 1H, CH₂OCH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂OCH₂), 5.25 (s, 2H, OCH₂C), 6.92 (s, 1H, H_{3-naph.}), 7.30 (s, 1H, H_{1-naph.}), 7.38-7.60 (m, 6H, H_{benzyl} + H_{7-naph.}), 7.64 (d, J 8.7 Hz, 1H, H_{8-naph.}), 8.45 (d, J 1.0 Hz, 1H, H_{5-naph.}); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 21.9 (1C, C(CH₃)₂), 25.9 (1C, C(CH₃)₂), 28.8 (3C, C(CH₃)₃), 37.4 (C(CH₃)₂), 40.7 (C(CH₃)₃), 70.4 (CH₂O), 73.8 (CH₂OCH₂), 82.1 (CH₂OH), 84.9 (CH₂OCH₂), 105.5 (C_{3-naph.}), 118.8 (C_{1-naph.}), 119.6 (C_{6-naph.}), 124.8 (C_{5-naph.}), 126.6 (C_{4a-naph.}), 127.6 (2C, C₂ and 6-benzyl), 128.2 (C_{4-benzyl}), 128.8 (2C, C₃ and 5-benzyl), 129.3 (C_{8-naph.}), 130.3 (C_{7-naph.}), 132.7 (C_{8a-naph.}), 136.4 (C_{1-benzyl}), 136.7 (C_{2-naph.}), 154.1 (C_{4-naph.}); MS (ESI+): m/z 485.11 and 487.10 [M + H]⁺, 502.07 and 504.00 [M + H₂O]⁺⁺ (water cluster formed during the ionization process), calcd for C₂₇H₃₃BrO₃: 484.16 and 486.16.

**1-((4-(Benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)methoxy)-2,2,4,4-tetramethylpentan-3-one
123)**



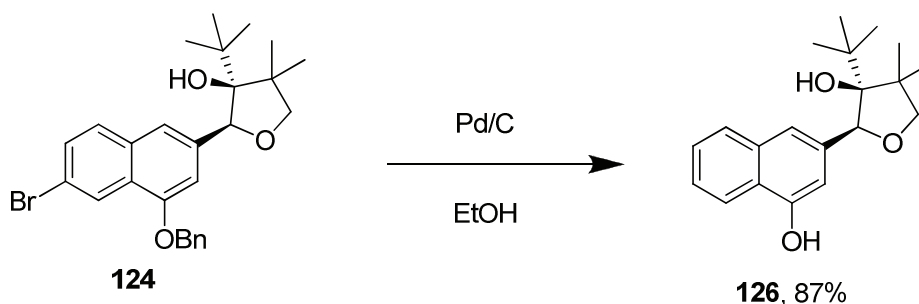
To a suspension of Celite® 545 (10 g) and PCC (8.97 g, 41.6 mmol, 2.0 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (150 ml), a solution of alcohol **122** (10.1 g, 20.8 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (50 ml) was added at rt under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred for 16 h. 2-Propanol (20 ml) was added and the reaction medium was stirred for further 30 min. The crude was filtrated, then concentrated and again filtrated twice on a Celite® 545 pad. After concentration, a further filtration on a silica gel pad by using a mixture cyclohexane-EtOAc (8 : 2, v/v) as the mobile phase provided ketone **123** as an orange oil (8.62 g, yield 86%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 8 : 2, v/v) 0.7; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2971 (broad), 2868 (broad), 1683, 1586, 1495, 1478, 1414, 1362, 1279, 1226, 1137, 1103, 1048; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.31 (s, 6H, C(CH₃)₂), 3.54 (s, 2H, CH₂OCH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂OCH₂), 5.25 (s, 2H, OCH₂C), 6.92 (s, 1H, H_{3-naph.}), 7.29 (s, 1H, H_{1-naph.}), 7.38-7.57 (m, 6H, H_{benzyl} + H_{7-naph.}), 7.63 (d, J 9.0 Hz, 1H, H_{8-naph.}), 8.46 (d, J 1.0 Hz, 1H, H_{5-naph.}); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 24.1 (2C, C(CH₃)₂), 28.2 (3C, C(CH₃)₃), 45.9 (C(CH₃)₂), 50.2 (C(CH₃)₃), 70.2 (CH₂O), 73.4 (CH₂OCH₂), 78.8 (CH₂OCH₂), 105.6 (C_{3-naph.}), 118.4 (C_{1-naph.}), 119.3 (C_{6-naph.}), 124.7 (C_{5-naph.}), 126.4 (C_{4a-naph.}), 127.6 (2C, C₂ and 6-benzyl), 128.1 (C_{4-benzyl}), 128.7 (2C, C₃ and 5-benzyl), 129.2 (C_{8-naph.}), 130.0 (C_{7-naph.}), 132.7 (C_{8a-naph.}), 136.7 (C_{1-benzyl}), 137.1 (C_{2-naph.}), 153.8 (C_{4-naph.}), 217.4 (C=O); MS(ESI+): m/z 500.00 and 502.07 [M + H₂O]⁺⁺ (water cluster formed during the ionization process), calcd for C₂₇H₃₁BrO₃: 482.15 and 484.14.

(2S,3S)-2-(4-(Benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)-3-tert-butyl-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (124)

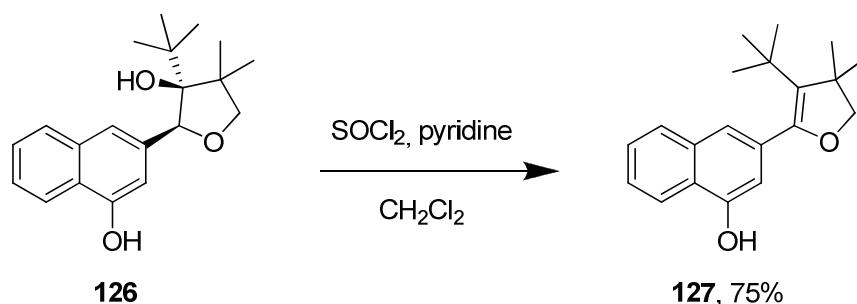
Potassium dimsyl was formed by complete dissolution of sublimated *t*-BuOK (5.92 g, 52.8 mmol, 3.0 equiv.) in freshly distilled DMSO (30 ml). A solution of ketone **123** (8.50 g, 17.6 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMSO (40 ml) was slowly added under an Ar atmosphere at 0°C. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 1 h. Thereafter, sat. aq. NH₄Cl (50 ml) was slowly added and the desired compound was extracted with EtOAc (100 ml). The organic phase was washed with brine (50 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to affording tetrahydrofuran **124** as orange oil. This crude product was rapidly purified on a silica gel pad by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) as the mobile phase to yield the expected compound as a brown oil (7.70 g, yield 91%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.6; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2963 (broad), 2875 (broad), 1683, 1627, 1586, 1451, 1400, 1364, 1225, 1110, 1079; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 0.90 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.20 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.42 (s, 3H, C(CH₃)₂), 3.57 (d, *J* 7.0 Hz, 1H, CHOCH₂), 4.21 (d, *J* 7.0 Hz, 1H, CHOCH₂), 5.30 (2s, 2H, OCH₂C), 5.49 (s, 1H, CHOCH₂), 7.04 (s, 1H, H_{3-naph.}), 7.36-7.53 (m, 5H, H_{benzyl} + H_{1-naph.}), 7.57 (dd, *J* 8.7 Hz, *J* 2.1 Hz, 1H, H_{7-naph.}), 7.66 (d, *J* 8.7 Hz, 1H, H_{8-naph.}), 8.47 (d, *J* 1.8 Hz, 1H, H_{5-naph.}); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) 20.2 (C(CH₃)₂), 26.6 (C(CH₃)₂), 27.9 (3C, C(CH₃)₃), 37.9 (C(CH₃)₃), 48.2 (C(CH₃)₂), 70.2 (CH₂O), 82.1 (CHOCH₂), 84.3 (CHOCH₂), 85.3 (C(OH)), 107.5 (C_{3-naph.}), 119.8 (C_{6-naph.}), 120.8 (C_{1-naph.}), 124.7 (C_{5-naph.}), 126.7 (C_{4a-naph.}), 127.5 (2C, C₂ and 6-benzyl), 128.2 (C_{4-benzyl}), 128.8 (2C, C₃ and 5-benzyl), 129.4 (C_{8-naph.}), 130.2 (C_{7-naph.}), 132.5 (C_{8a-naph.}), 136.7 (C_{1-benzyl}), 138.8 (C_{2-naph.}), 153.3 (C_{4-naph.}); MS(ESI⁺): *m/z* 482.93 and 485.15 [M + H]⁺, 500.00 and 502.07 [M + H₂O]⁺ (water cluster formed during the ionization process), calcd for C₂₇H₃₁BrO₃: 482.15 and 484.14.

(2S,3S)-3-tert-Butyl-2-(4-hydroxynaphthalen-2-yl)-4,4-dimethyltetrahydrofuran-3-ol (126)

In a suspension of Pd/C (10% w/w – 4.0 g) in absolute EtOH (350 ml), a solution of benzyl ether **124** (7.4 g, 15.3 mmol, 1.0 equiv.) in EtOH (50 ml) was added. The resulting reaction mixture was flushed with H₂ for 10 min then the reaction medium was stirred at rt for 2 h under an H₂ atmosphere. Few drops of 10% aq. HCl were added and the reaction medium was stirred for further 15 h. Thereafter, the mixture was flushed with Ar and the crude was filtrated on a Celite® 545 pad, washed with EtOAc and concentrated under vacuum to afford naphthol derivative **126** as a off-white solid (4.17 g, yield 87%).

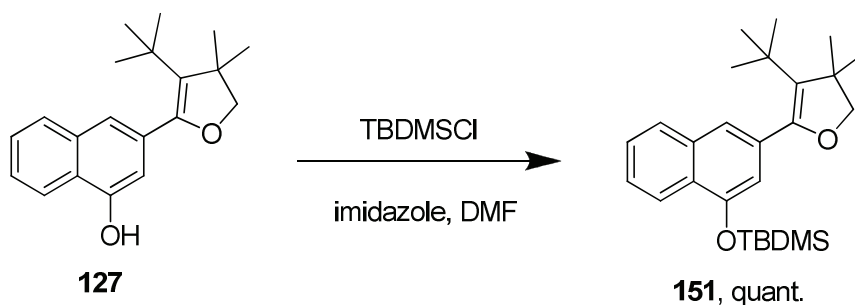
R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.4; mp 192 ± 2 °C; ν_{\max} /cm⁻¹ 3549, 3260 (broad), 2962, 1593, 1579, 1475, 1397, 1366, 1276, 1237, 1069, 1012; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 0.99 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.22 (s, 3H, C(CH₃)₂), 1.45 (s, 3H, C(CH₃)₂), 3.62 (d, J 7.0 Hz, 1H, CHOCH₂), 4.30 (d, J 7.0 Hz, 1H, CHOCH₂), 5.58 (1s, 2H, OCH₂C), 6.70 (s, 1H), 7.08 (d, J 1.1 Hz, 1H), 7.41-7.49 (m, 3H), 7.75 (dd, J 7.2 Hz, J 2.2 Hz, 1H), 8.12 (dd, J 7.0 Hz, J 2.4 Hz, 1H); δ_C (75 MHz, CDCl₃) 20.2 (C(CH₃)₂), 26.6 (C(CH₃)₂), 28.1 (3C, C(CH₃)₃), 38.2 (C(CH₃)₃), 48.3 (C(CH₃)₂), 82.0 (CHOCH₂), 84.7 (CHOCH₂), 85.7 (C(OH)), 108.8 (C_{3-naph.}), 120.9 (C_{6-naph.}), 122.2 (C_{1-naph.}), 124.8 (C_{5-naph.}), 125.5 (C_{4a-naph.}), 126.8 (C_{8-naph.}), 127.7 (C_{7-naph.}), 134.4 (C_{8a-naph.}), 137.4 (C_{2-naph.}), 152.7 (C_{4-naph.}); MS(ESI⁻): m/z 313.60 [M - H]⁻, calcd for C₂₀H₂₆O₃: 314.19.

3-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-1-ol (127)

In a solution of tertiary alcohol **126** (4.03 g, 12.8 mmol, 1.0 equiv) in freshly distilled CH_2Cl_2 (160 ml), dry pyridine (4.18 mmol, 51.2 mmol, 4.0 equiv.) and SOCl_2 (14.9 mmol, 16 equiv.) were sequentially and slowly added at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 6 h. Thereafter, sat. aq. NH_4Cl (15 ml) was slowly added and after decantation the organic phase was washed with brine (2 x 100 ml), dried over anhydrous MgSO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford dihydrofuran **127** as a brown solid (2.84 g, yield 75%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 7 : 3, v/v) 0.6; mp $168 \pm 2^\circ\text{C}$ (decomposition); $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3338 (broad), 1624, 1472, 1396, 1191, 1048; $\delta_{\text{H}}(300\text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.09 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.38 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.94 (s, 2H, COCH_2), 5.59 (bs, 1H, $\text{OH}_{\text{naphthol}}$), 6.77 (d, J 1.3 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.39 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 7.43-7.47 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-naph}}$ and $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.75-7.78 (m, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.12 (m, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.1 (CH_2O), 110.7 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 121.8 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 122.0 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 124.4 ($\text{OC}=\text{C}$), 125.5 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 126.6 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$), 126.6 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 127.9 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 133.3 ($\text{OC}=\text{C}$), 134.2 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 149.7 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 151.5 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$); MS(ESI⁻): m/z 295.42 [$\text{M} - \text{H}$]⁻, calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$: 296.18.

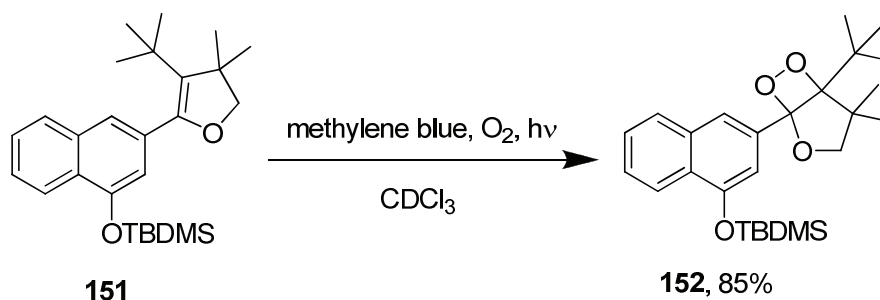
***tert*-Butyl(3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-1-yloxy)dimethylsilane (**151**)**



In a solution of naphthol **127** (300 mg, 1.0 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (10 ml), imidazole (206 mg, 3.03 mmol, 3.0 equiv.) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl, 304 mg, 2.02 mmol, 2.0 equiv.) were sequentially added at rt under an argon atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred for 2 days. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum. The crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-10%) as the mobile phase to give the TBDMS ether **151** as orange oil (418 mg, quantitative yield).

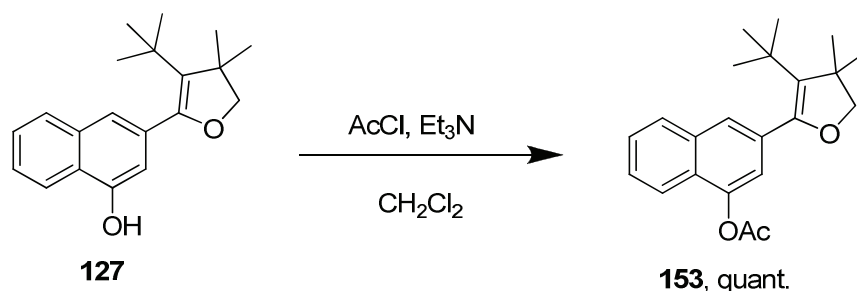
R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.8; ν_{\max} / cm^{-1} 2956 (broad), 2858, 1721, 1592, 1462, 1397, 1294, 1255, 1232, 1156, 1100, 1052, 1008; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 0.28 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.08 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 1.09 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.43 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.92 (s, 2H, COCH_2), 6.79 (d, J 1.3 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.41 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 7.44-7.48 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-naph}}$ and $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.76-7.79 (m, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.16 (m, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) -4.1 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.6 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.3 (CH_2O), 114.8 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 122.4 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 122.6 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 125.9 ($\text{OC}=\text{C}$), 125.5 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 127.7 ($\text{C}_{4\text{a-naph}}$), 126.5 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 128.0 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 134.0 ($\text{OC}=\text{C}$), 134.5 ($\text{C}_{8\text{a-naph}}$), 150.2 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 151.3 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$); MS(ESI⁺): m/z 411.27 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{Si}$: 410.26.

***tert*-Butyl(3-(5-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptan-1-yl)naphthalen-1-yloxy)dimethylsilane (**152**)**



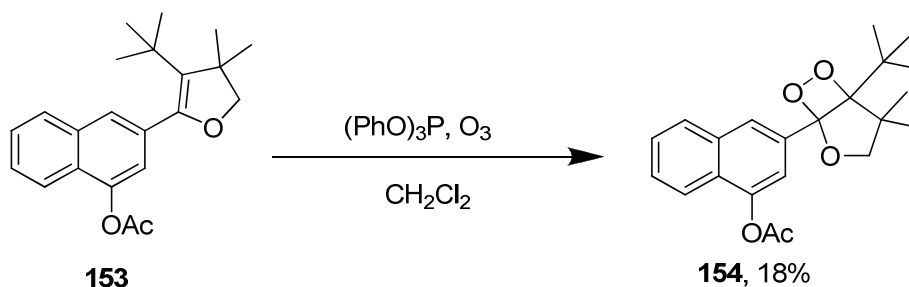
In a solution of enol ether **151** (50 mg, 0.17 mmol, 1.0 equiv.) in CDCl_3 (3.4 ml), a point of spatula of methylene blue was added. The mixture was then flushed with O_2 for 10 min. The reaction medium was maintained under a constant flux of O_2 and irradiated with a 300W-halogen-lamp at 0°C for 2 h. Thereafter, the reaction medium was then concentrated without heating. The crude was purified by flash-chromatography on a silica gel column with a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-10%) as the mobile phase to afford dioxetane **152** as white amorphous powder. (46 mg, yield 86%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 9 : 1, v/v) 0.6; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 0.27 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 0.30 (s, 3H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 1.10 (s, 12H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.19 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.87 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH_2), 4.63 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH_2), 7.06 (d, J 0.9 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.50-7.53 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-naph}}$ and $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.80 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 7.85-7.88 (m, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.18 (m, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) -4.3 (1C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), -4.1 (1C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.4 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 18.5 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.0 (1C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 25.9 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 26.9 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 36.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 80.3 (CH_2O), 105.0 (OCOOC), 112.0 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 116.7 (OCOOC), 121.6 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 122.5 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 126.3 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 126.7 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 128.2 ($\text{C}_{4\text{a-naph}}$), 128.6 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 133.6 ($\text{C}_{8\text{a-naph}}$), 133.9 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 151.5 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$);

3-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-1-yl acetate (153)

In a solution of naphthol **127** (100 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (3 ml), Et_3N (93 μl , 0.67 mmol, 2.0 equiv.) and acetyl chloride (AcCl , 36 μl , 0.51 mmol, 1.1 equiv.) were sequentially added at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at 0°C for 30 min. Thereafter, this organic medium was washed with 10% aq. HCl (3 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford acetate derivative **153** as a brown oil (120 mg, quantitative yield).

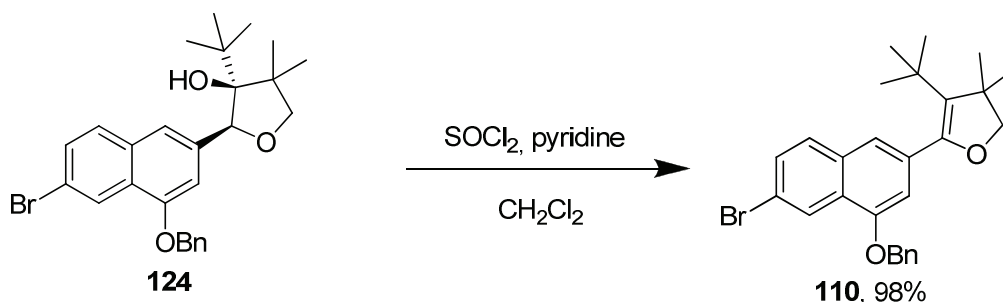
R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.6; mp $110 \pm 2^\circ\text{C}$; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2957 (broad), 1768, 1593, 1463, 1365, 1302, 1197, 1048, 1003; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.10 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.44 (s, 3H, COCH_3), 3.92 (s, 2H, COCH_2), 7.25 (d, J 0.9 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.50-7.53 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-naph}}$ and $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.71 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$), 7.84-7.88 (m, 2H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$ and $\text{H}_{8\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 21.1 (COCH_3), 27.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.3 (CH_2O), 120.2 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 121.1 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 126.4 ($\text{OC}=\text{C}$), 126.7 (2C, $\text{C}_{5\text{-naph}}$ and $\text{C}_{4a\text{-naph}}$), 126.8 ($\text{C}_{6\text{-naph}}$), 127.0 ($\text{C}_{7\text{-naph}}$), 128.3 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$), 133.5 ($\text{OC}=\text{C}$), 134.0 ($\text{C}_{8a\text{-naph}}$), 146.1 ($\text{C}_{4\text{-naph}}$), 149.0 ($\text{C}_{2\text{-naph}}$), 169.2 (COCH_3);

3-(5-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptan-1-yl)naphthalen-1-yl acetate (154)


A solution of triphenylphosphite (233 μl , 0.89 mmol, 10 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (9 ml), was cooled at -78°C . Ozone was then bubbled into the reaction medium for 20 min at -78°C . A blue coloration was appeared. Nitrogen was then bubbled into the reaction medium for 20 min. A solution of enol ether **153** (30 mg, 0.09 mmol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (300 μl) was added at -30°C under an Ar atmosphere. The mixture was stirred at -30°C for overnight. The reaction medium was then concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-chromatography on silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) containing 1% Et_3N as the mobile phase to afford dioxetane **154** as a yellow solid (6.0 mg, yield 18%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.4; $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ 2963 (broad), 1770, 1719, 1686, 1460, 1367, 1288, 1241, 1191, 1101, 1060, 1024, 1002; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3)$ 1.01 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.19 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.42 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.46 (s, 3H, COCH_3), 3.87 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH_2), 4.63 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH_2), 7.43 (bs, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph}}$), 7.55-7.58 (m, 2H, $\text{H}_{6\text{-naph}}$ and $\text{H}_{7\text{-naph}}$), 7.87-7.95 (m, 2H, $\text{H}_{5\text{-naph}}$ and $\text{H}_{8\text{-naph}}$), 8.09 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 18.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 21.1 (COCH_3), 25.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 26.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 49.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 80.4 (CH_2O), 117.9 ($\text{C}_{3\text{-naph}}$), 121.1 ($\text{C}_{1\text{-naph}}$), 126.4 ($\text{C}_{5\text{-naph}}$), 127.0, 127.6, 128.9, 129.9 ($\text{C}_{8\text{-naph}}$); MS(ESI+): m/z 371.00 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$: 370.18.

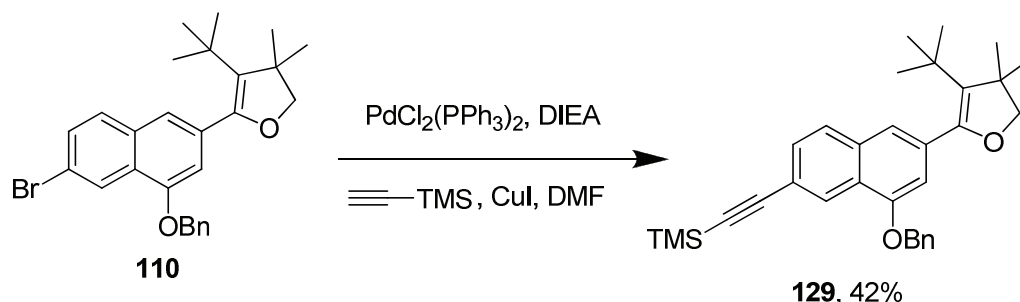
5-(4-(Benzyloxy)-6-bromonaphthalen-2-yl)-4-*tert*-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (110)



In a solution of tertiary alcohol **124** (3.34 g, 6.91 mmol, 1.0 equiv.) in freshly distilled CH_2Cl_2 , dry pyridine (2,80 ml, 34.6 mmol, 5 equiv.) was added. SOCl_2 (10.0 ml, 138 mmol, 20 equiv.) was then slowly added at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred for 15 h. Thereafter, sat. aq. NH_4Cl (20 ml) was added then deionized water (20 ml). The aq. phases were extracted with CH_2Cl_2 (10 ml). The combined organic phases were washed with brine (40 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford dihydrofuran derivative **110** as a brown oil (3.15 g, yield 98%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.7; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2955 (broad), 1868 (broad), 1583, 1485, 1449, 1406, 1362, 1297, 1268, 1225, 1173, 1111, 1082, 1051, 1011; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.03 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.92 (s, 2H, COCH_2), 5.25 (s, 2H, OCH_2C), 6.83 (d, J 1.0 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.39-7.52 (m, 5H, $\text{H}_{\text{benzyl}} + \text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.55 (dd, J 8.7 Hz, J 2.1 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.65 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.44 (d, J 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.5 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.3 (COCH_2), 108.2 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 119.9 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.7 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 124.6 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 126.3 ($\text{OC}=\text{C}$), 126.4 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 127.6 (2C, C_2 and 6-benzyl), 128.2 ($\text{C}_{4\text{-benzyl}}$), 128.7 (2C, C_3 and 5-benzyl), 129.5 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 130.1 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 132.4 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 134.3 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 136.6 ($\text{C}_{1\text{-benzyl}}$), 149.7 ($\text{OC}=\text{C}$), 153.2 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$); MS(ESI+): m/z 465.07 and 467.20 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{BrO}_2$: 464.14 and 466.13.

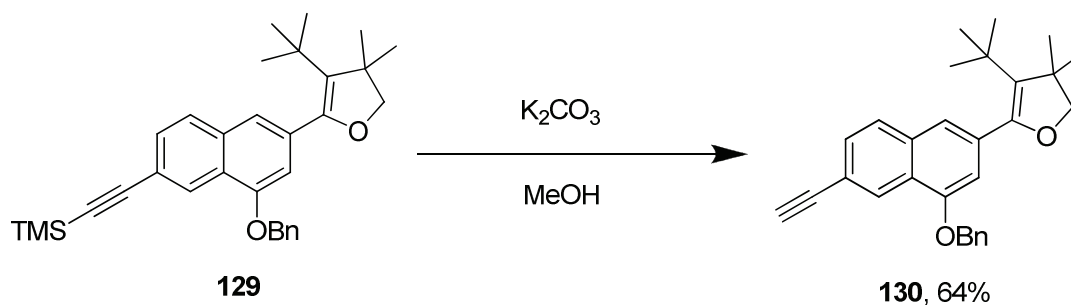
((8-(Benzyloxy)-6-(3-tert-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-2-yl)ethynyl)trimethylsilane (129)



Aryl bromide **110** (2.5 g, 5.4 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DMF (50 ml). Diisopropylethylamine (9.40 ml, 53.7 mmol, 10 equiv.), trimethylsilylacetylene (3.80 ml, 26.8 mmol, 5.0 equiv.) and $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (380 mg, 0.54 mmol, 0.1 equiv.) were sequentially added under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at 100°C for 3 h. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum and the resulting residue was directly purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of CH_2Cl_2 in cyclohexane (0-50%) as the mobile phase to yield the TMS-alkyne **129** as an orange oil (1.09 g, yield 42%).

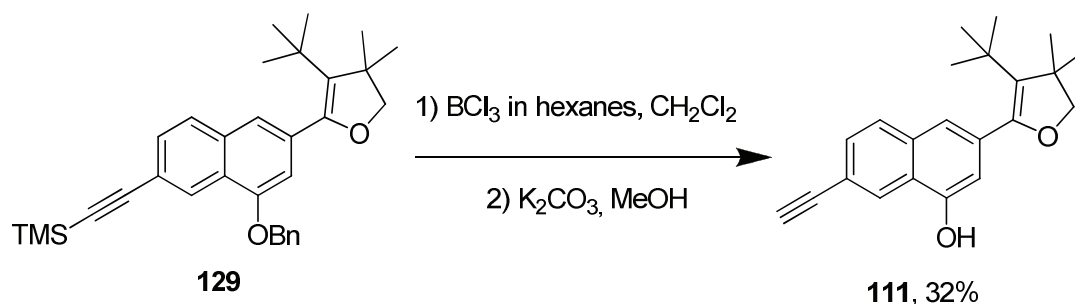
R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.7; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2954 (broad), 2146, 1722, 1683, 1577, 1456, 1410, 1366, 1288, 1233, 1204, 1099; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 0.30 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.39 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.94 (s, 2H, COCH_2), 5.28 (s, 2H, OCH_2C), 6.84 (s, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.36-7.56 (m, 5H, H_{benzyl} + $\text{H}_{1\text{-naph.}}$ + $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.72 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.46 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); $\delta_{\text{C}}(75 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 0.2 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ + $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 70.4 (CH_2O), 83.3 (COCH_2), 94.6 ($\text{TMSC}\equiv\text{C}$), 105.9 ($\text{TMSC}\equiv\text{C}$), 107.8 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 120.2 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.7 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 124.9 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 126.3 ($\text{OC}=\text{C}$), 126.4 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 127.8 (2C, C_2 and 6-benzyl), 128.0 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 128.2 ($\text{C}_{4\text{-benzyl}}$), 128.8 (2C, C_3 and 5-benzyl), 129.7 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 133.5 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 134.8 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 136.8 ($\text{C}_{1\text{-benzyl}}$), 149.9 ($\text{OC}=\text{C}$), 153.9 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$); MS(ESI+): m/z 483.20 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{Si}$: 482.26.

5-(4-(Benzyloxy)-6-ethynynaphthalen-2-yl)-4-tert-butyl-3,3-dimethyl-2,3-dihydrofuran (130)



In a suspension of TMS-alkyne **129** (2.30 g, 4.76 mmol, 1.0 equiv.) in MeOH (50 ml), K_2CO_3 (987 mg, 7.14 mmol, 1.5 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was stirred at 60°C for 1 h. Thereafter, the reaction medium was concentrated and the residue was dissolved in EtOAc (50 ml). This organic phase was sequentially washed with 10% aq. HCl (50 ml), brine (50 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of CH_2Cl_2 in cyclohexane (0-40%) as the mobile phase to yield alkyne **130** as a brown oil (1.26 g, yield 64%).

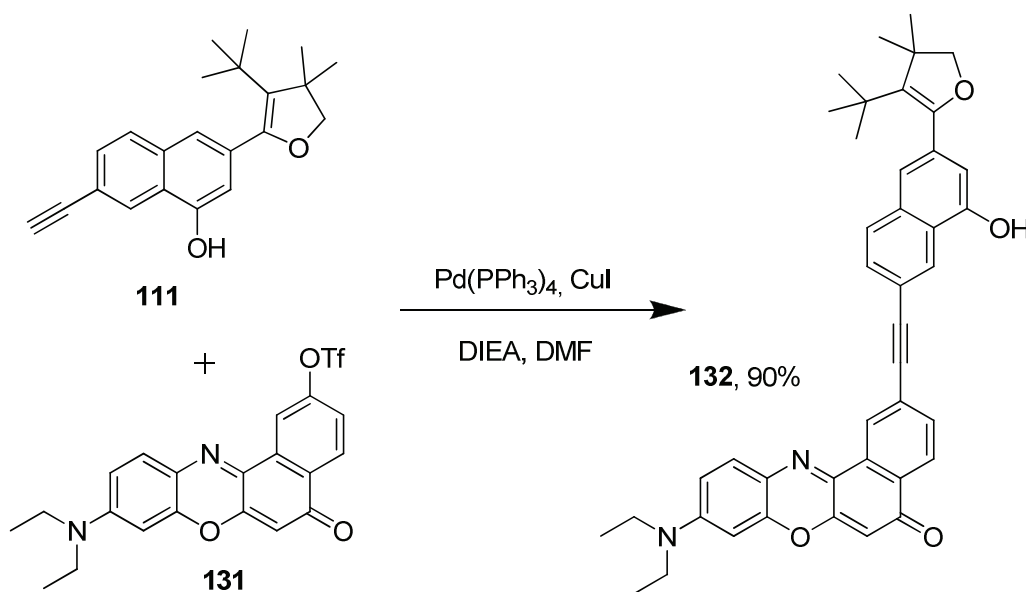
R_f (cyclohexane-EtOAc, 9 : 1, v/v) 0.5; δ_H (300 MHz, CDCl_3) 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.39 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.15 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.95 (s, 2H, COCH_2), 5.27 (s, 2H, OCH_2C), 6.85 (s, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.37-7.57 (m, 5H, $\text{H}_{\text{benzyl}} + \text{H}_{1\text{-naph.}} + \text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.74 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.50 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_C (75 MHz, CDCl_3) 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.5 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 70.3 (CH_2O), 79.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 83.2 (COCH_2), 84.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 107.8 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 119.0 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.7 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 124.8 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 126.3 ($\text{OC}=\text{C}$), 126.8 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 127.6 (2C, C_2 and 6-benzyl), 127.9 ($\text{C}_{4\text{-benzyl}}$), 128.1 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 128.7 (2C, C_3 and 5-benzyl), 129.5 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 133.6 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 135.0 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 136.7 ($\text{C}_{1\text{-benzyl}}$), 149.8 ($\text{OC}=\text{C}$), 153.8 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$); MS(ESI+): m/z 411.20 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{O}_2$: 410.22.

3-(3-*tert*-Butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-ethynynaphthalen-1-ol (**111**)

(a) *Benzyl removal* : TMS-alkyne **129** (900 mg, 1.86 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in freshly distilled CH_2Cl_2 (20 ml) and a 1.0 M solution of BCl_3 in hexanes (6.25 ml, 6.25 mmol, 3.36 equiv.) was slowly added at -78°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at -78°C for 4 h. Thereafter, 1.0 M aq. NaOH (10 ml) was added. After decantation, the organic phase was washed with brine (10 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 filtrated and concentrated under vacuum. The crude naphthol was directly used in the next step without further purification.

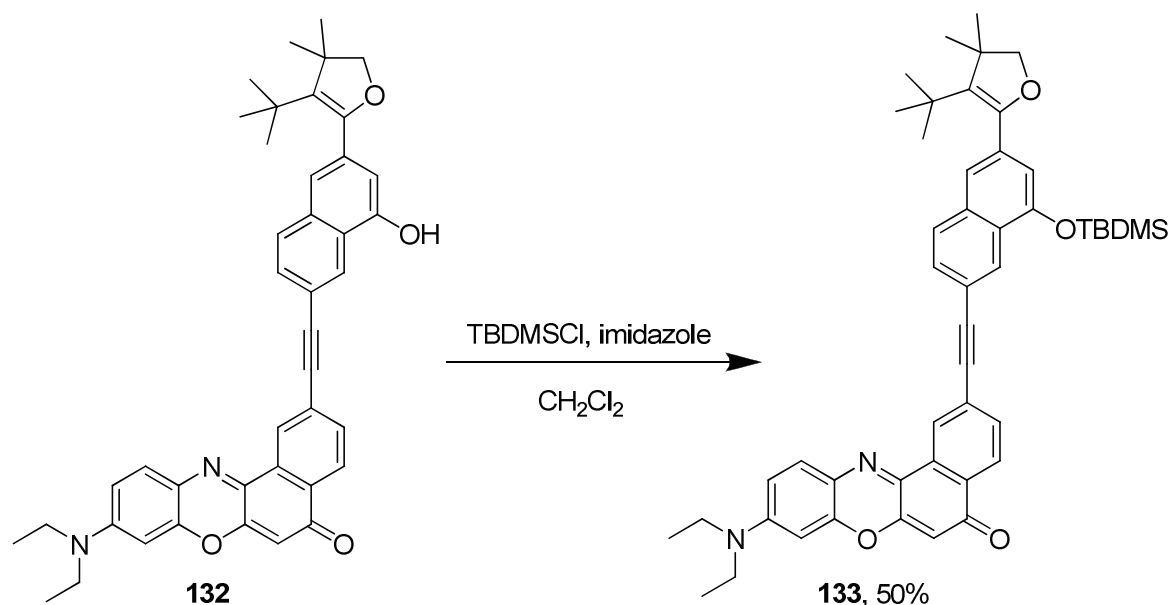
(b) *TMS removal* : Naphthol was dissolved in MeOH (20 ml) and K_2CO_3 (386 mg, 2.79 mmol, 1.5 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was stirred under reflux for 30 min. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum and the residue was purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) as the mobile phase to afford the alkyne **111** as a yellow solid (193 mg, overall yield for the two steps 32%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.5; $\nu_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ 3300 (broad), 2967 (broad), 1685, 1368, 1225, 1039; δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 1.07 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.36 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.13 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.93 (s, 2H, COCH_2), 6.74 (d, J 1.5 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.33 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.48 (dd, J 8.7 Hz, J 1.5 Hz, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.68 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.30 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 77.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 83.3 (COCH_2), 84.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 111.3 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 119.0 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.8 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 123.9 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 126.6 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 126.8 ($\text{OC}=\text{C}$), 128.0 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 129.4 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 133.8 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 134.8 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 149.4 ($\text{OC}=\text{C}$), 151.2 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$); MS(ESI-): m/z 319.40 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$, calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2$: 320.18.

BPO-naphthol hybrid (**132**)

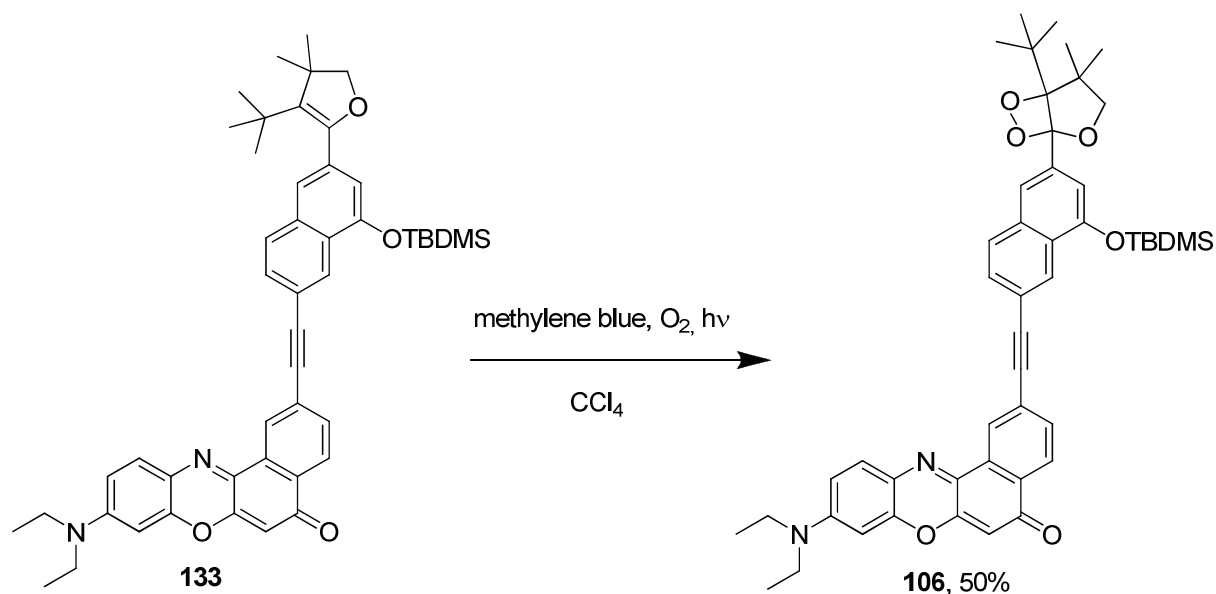
To a solution of alkyne **111** (193 mg, 0.60 mmol, 1.0 equiv.) in dry DMF (9 ml), a solution of BPO-triflate **131** (421 mg, 0.90 mmol, 1.5 equiv.) in dry DMF (2 ml) was added. Then, DIPEA (1.05 ml, 6.0 mmol, 10 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (69 mg, 0.06 mmol, 0.1 equiv.) and CuI (23 mg, 0.12 mmol, 0.2 equiv.) were sequentially added under an argon atmosphere. The resulting reaction mixture was degassed by three cycles of the freeze-pump-thaw method and was stirred at 100°C under an Ar atmosphere for 2h30. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum and the residue was directly purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a step gradient of MeOH in CH_2Cl_2 (0-3%) as the mobile phase to afford the BPO-naphthol hybrid **132** as a dark green amorphous powder (364 mg, yield 90%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.4; δ_{H} (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.16 (td, J 7.0 Hz, J 2.4 Hz, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 1.32 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.50 (bq, J 7.0 Hz, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.84 (s, 2H, COCH_2), 6.30 (s, 1H), 6.68 (d, J 2.1 Hz, 1H), 6.82 (d, J 7.5 Hz, 1H), 6.86 (dd, J 9.3 Hz, J 2.4 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.65-7.69 (m, 2H), 7.86 (dd, J 8.1 Hz, J 1.5 Hz, 1H), 7.94 (d, J 8.4 Hz, 1H), 8.13 (d, J 7.8 Hz, 1H), 8.38 (d, J 1.5 Hz, 1H), 8.67 (d, J 1.5 Hz, 1H), 10.57 (bs, 1H, $\text{OH}_{\text{phenol}}$), the complexity of the spectrum (rotamers, slow relaxation rate of some protons) for this compound makes a complete assignment impossible; δ_{C} (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 12.5 (2C, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 27.2 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.2 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 44.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 46.8 (2C, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 82.3 (COCH_2), 89.0, 92.6, 95.9, 104.7, 105.0, 110.5, 110.6, 118.2, 119.6, 123.7, 124.5, 125.3, 125.6, 126.1, 128.2, 128.4, 130.2, 131.7, 131.9, 133.3, 135.5, 137.1, 146.5, 148.6, 149.6, 151.1, 151.9, 152.7, 170.4, 181.1; MS(ESI+): m/z 637.40 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_4$: 636.30.

TBDMS protected BPO-naphtol hybrid (133)


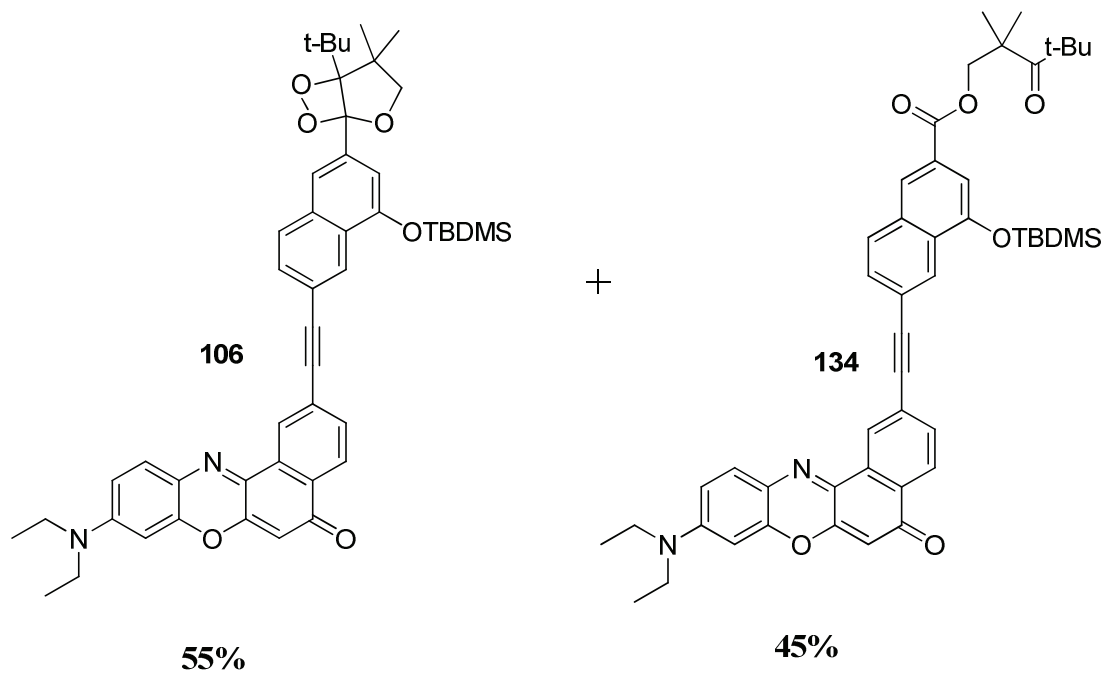
BPO-naphtol hybrid **132** (80 mg, 0.13 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (1.3 ml) and imidazole (26 mg, 0.38 mmol, 3.0 equiv.) and TBDMS-Cl (38 mg, 0.25 mmol, 2.0 equiv.) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 15 h. Thereafter, the reaction medium was concentrated under vacuum. The resulting residue was dissolved in CH_2Cl_2 (10 ml) and this organic phase was washed with deionized water (2 x 5 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by flash-chromatography on silica gel column by using a step gradient of EtOAc in CH_2Cl_2 (0-20%) as the mobile phase to afford the TBDMS ether **133** as a dark-green amorphous powder (47 mg, yield 50%).

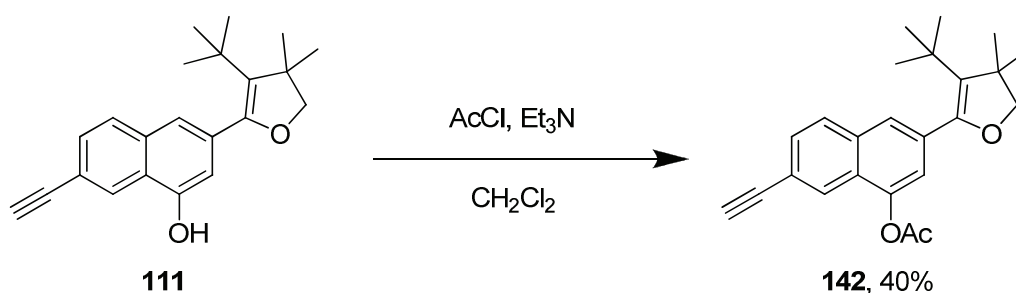
R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.4; δ_{H} (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 0.33 (s, 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.09 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.14 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (td, J 7.0 Hz, J 2.4 Hz, 6H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 1.38 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.49 (bq, J 7.0 Hz, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 3.92 (s, 2H, COCH_2), 6.42 (bs, 1H), 6.50 (d, J 2.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, J 9.0 Hz, J 2.4 Hz, 1H), 6.81 (d, J 2.1 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.61 (dd, J 8.4 Hz, J 1.8 Hz, 1H), 7.66 (d, J 9.0 Hz, 1H), 7.77 (d, J 8.4 Hz, 1H), 7.81 (tm, J 9.0 Hz, 1H), 8.31 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.37 (bs, 1H), 8.86 (d, J 1.5 Hz, 1H), the complexity of the spectrum (rotamers, slow relaxation rate of some protons) for this compound makes a complete assignement impossible; δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) -4.0 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 12.6 (2C, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 18.6 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 26.0 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.6 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 47.3 (2C, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}$), 83.2 (COCH_2), 89.3, 92.9, 96.2, 105.8, 110.0, 115.4, 119.7, 122.1, 125.1, 125.8, 126.1, 126.6, 127.0, 127.2, 128.2, 129.0, 130.8, 131.2, 132.0, 132.6, 133.9, 135.11, 139.0, 146.9, 149.7, 151.0, 151.2, 152.3, 162.6, 183.1; MS(ESI+): m/z 751.60 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$: 750.39.

1,2-dioxétane-BPO-hybrid (106)

Enol ether **133** (4 mg, 5.3 μm , 1.0 equiv.) was dissolved in freshly distilled CCl₄ (500 μl) and a point of spatula of methylene blue (< 1 mg) was added at -10°C and the mixture was stored under an O₂ atmosphere. The mixture was stirred at 0°C for 90 min under a constant flow of O₂ and irradiated by a 300W-halogen-lamp. The reaction medium was then concentrated under vacuum without heating and directly purified by flash-chromatography on a silica gel column by using a mixture of cyclohexane-EtOAc (7 : 3, v/v + 1% Et₃N) as the mobile phase to afford the 1,2-dioxetane-BPO hybrid **106** (2 mg, yield 50%, purity 55/45 expected compound/degradation compound **134**) as a dark-green solid.

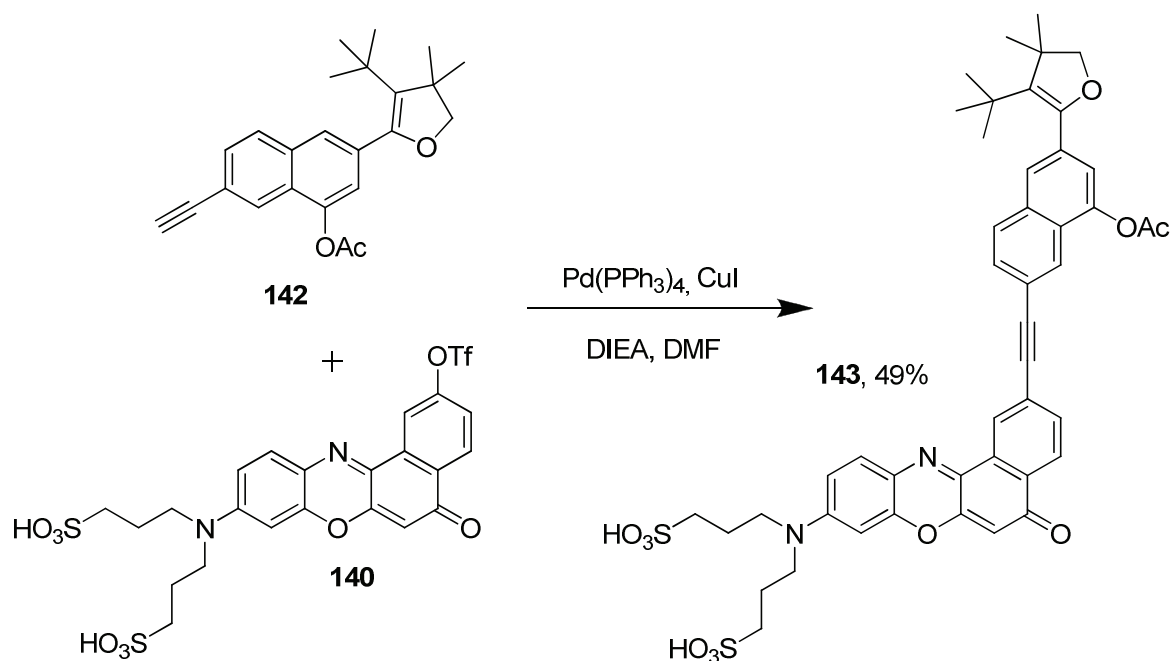
R_f (cyclohexane-EtOAc, 3 : 2, v/v) 0.4; δ_H (300 MHz, CDCl₃) 0.32-0.37 (m, 6H, Si(CH₃)₂), 1.03 (s, 9H, SiC(CH₃)₃), 1.13 (s, 12H, C(CH₃)₃ + C(CH₃)₂), 1.27 (td, J 7.0 Hz, J 2.4 Hz, 6H, (CH₃CH₂)₂N), 1.31 (s, 3H, C(CH₃)₂), 3.48 (bq, J 7.0 Hz, (CH₃CH₂)₂N), 3.87 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH₂), 4.63 (d, J 8.1 Hz, 1H, COCH₂), 6.41 (bs, 1H), 6.50 (d, J 2.4 Hz, 1H), 6.71 (dd, J 9.0 Hz, J 2.4 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.66 (d, J 9.0 Hz, 1H), 7.77-7.90 (m, 3H), 8.31 (d, J 8.1 Hz, 1H), 8.38 (bs, 1H), 8.87 (bs, 1H). The complexity of the spectrum (rotamers, slow relaxation rate of some protons) for this compound makes a complete assignment impossible; MS(ESI⁺): m/z 783.53 [M + H]⁺, calcd for C₄₈H₅₄N₂O₆Si: 782.38.



Acetate protected key naphthol (**142**)

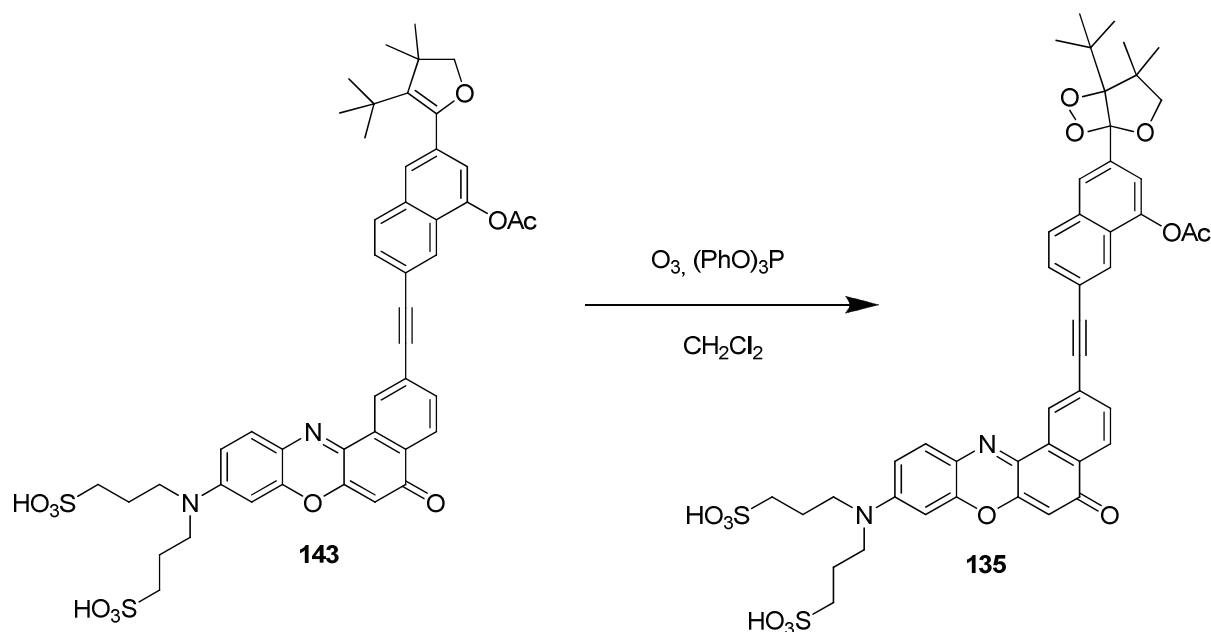
Naphthol **111** (284 mg, 0.886 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (5 ml) and Et_3N (246 μl , 1.77 mmol, 2.0 equiv.) and AcCl (95 μl , 1.329 mmol, 1.5 equiv.) were sequentially added at 0°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 30 min. Thereafter, this reaction medium was washed with 10% aq. citric acid (5 ml), brine (5 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. 323 mg of crude compound was recovered and subsequently purified by flash-chromatography on silica gel column by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-10%) as the mobile phase to afford acetate derivative **142** as a brown solid (128 mg, yield 40%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 4 : 1, v/v) 0.6; δ_H (300 MHz, CDCl_3) 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.44 (s, 3H, COCH_3), 3.18 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.89 (s, 2H, COCH_2), 7.24 (d, J 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.53 (dd, J 8.7 Hz, J 1.2 Hz, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.65 (bs, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.78 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.01 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_C (75 MHz, CDCl_3) 21.1 (COCH_3), 27.4 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.7 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 78.3 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 83.3 (COCH_2), 83.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 120.4 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.1 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 125.6 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 126.0 ($\text{C}_{4a\text{-naph.}}$), 126.8 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 127.1 ($\text{OC}=\text{C}$), 128.4 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 129.5 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 133.5 ($\text{C}_{8a\text{-naph.}}$), 134.7 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 145.7 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$), 148.7 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 169.1 (COCH_3).

Water-soluble-BPO-acetate-protected naphthol (**143**)

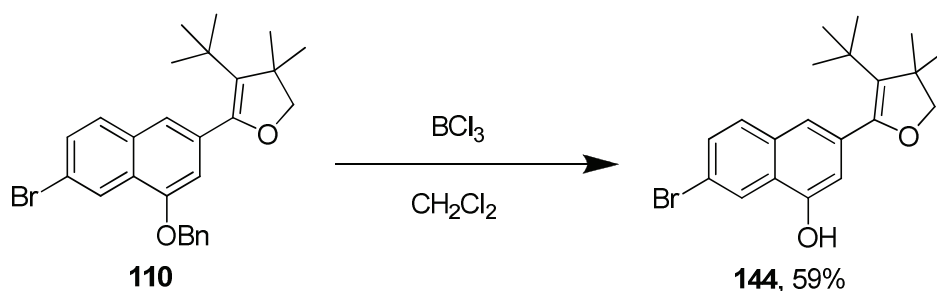
Water-soluble BPO-triflate **140** (30 mg, 0.046 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DMF (500 μl). Alkyne **142** (25 mg, 0.069 mmol, 1.5 equiv.), DIPEA (80 μl , 0.46 mmol, 10 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (6 mg, 5 μmol , 0.1 equiv.) and CuI (2 mg, 9 μmol , 0.2 equiv.) were sequentially added under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was degassed with three cycles of the freeze-Pump-Thaw method and then stirred at 50-60°C under an Ar atmosphere for 2 h. Thereafter, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the resulting solid residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system B, 3 injections, $t_{\text{R}} = 17.1\text{-}18.5$ min). The product-containing fractions were lyophilized to give the TEA salt of water-soluble BPO-naphthol hybrid **143** (19 mg, yield 48%).

MS(ESI-): m/z 865.27 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_2$: 866.25; HPLC (system A) : $t_{\text{R}} = 26.9$ mn (purity > 80%) $\lambda_{\text{abs.}} = 574$ nm.

Water-soluble 1,2-dioxetane-BPO hybrid (**144**)

A solution of triphenylphosphite (15 μ l, 0.058 mmol, 10 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (500 μ l) was cooled to $-78^\circ C$. Ozone was then bubbled into the reaction medium for 20 min at $-78^\circ C$. A blue coloration was appeared. N_2 was then bubbled into the reaction medium for 20 min. A solution of enol ether **143** (5 mg, 5.8 μ mol, 1.0 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (500 μ l) was stirred at $-30^\circ C$ under an Ar atmosphere. The solution of triphenylphosphite ozonide was slowly added for 70 min in this latter organic solution. Thereafter, the reaction medium was then concentrated under vacuum without heating and the resulting solid residue was purified by semi-preparative RP-HPLC (system C, 2 injections, $t_R = 16.5$ - 17.6 min). The product-containing fractions were lyophilised to give the TEA salt of water-soluble 1,2-dioxetane-BPO hybrid **135**.

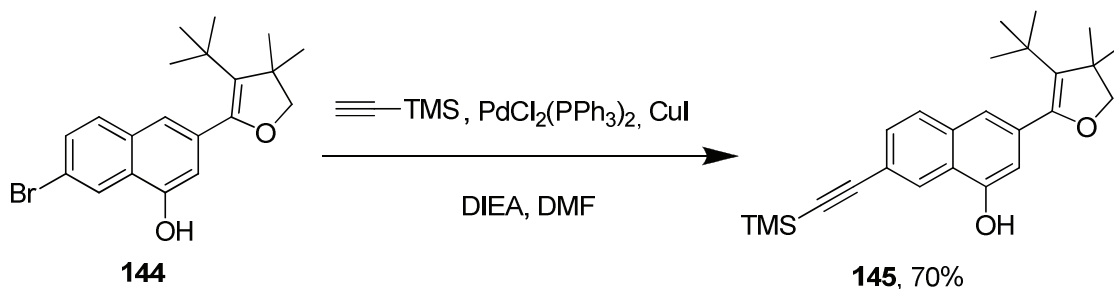
MS(ESI-): m/z 897.20 $[M - H]^-$, calcd for $C_{46}H_{46}N_2O_{13}S_2$: 898.24. HPLC (system A) : $t_R = 24.9$ mn (purity > 90%) $\lambda_{abs.} = 575$ nm.

7-Bromo-3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)naphthalen-1-ol (**145**)

Benzyl alcohol **110** (3.02 g, 6.50 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry CH_2Cl_2 (200 ml) and a solution of BCl_3 (16.2 ml, 16.22 mmol, 2.5 equiv.) in dry CH_2Cl_2 was slowly added at -78°C under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at -78°C for 90 min. Thereafter, 1.0 M aq. NaOH (40 ml) was slowly added at -78°C . The resulting mixture was warmed up to rt and deionized water was added (40 ml). The phases were separated and the organic one was washed with brine (40 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum to afford the crude compound. This crude product was purified with a Biotage automated flash purification system (cartridge: 300 g) by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (5-40%) as the mobile phase. The naphthol derivative **144** was obtained in a pure form as a brown oil (1.32 g, yield 59%).

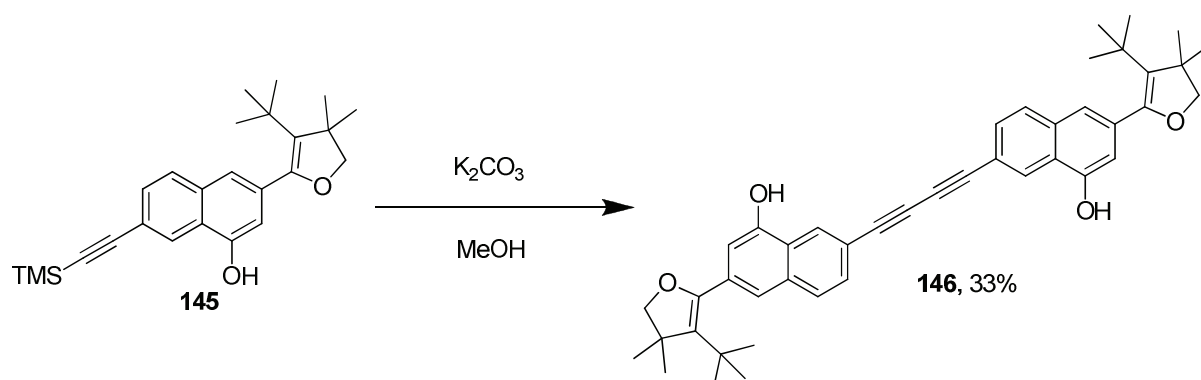
R_f (cyclohexane-EtOAc, 8 : 2, v/v) 0.5; mp $132 \pm 2^\circ\text{C}$; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3355, 2959, 2867, 1582, 1463, 1404, 1258, 1092, 1041; $\delta_{\text{H}}(300\text{ MHz, CDCl}_3)$ 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.94 (s, 2H, COCH_2), 5.88 (s, 2H, OCH_2C), 6.70 (d, J 1.0 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.31 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.49 (dd, J 8.7 Hz, J 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.58 (d, J 8.7 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.20 (d, J 1.8 Hz, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_{C} (75 MHz, CDCl_3) 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.3 (COCH_2), 111.9 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 119.8 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 122.0 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 124.5 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 125.4 ($\text{OC}=\text{C}$), 126.9 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 129.5 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 130.1 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 132.6 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 133.8 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 149.3($\text{OC}=\text{C}$), 150.4 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$). MS(ESI⁻): m/z 373.33 and 375.27 [$\text{M} - \text{H}$], calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{BrO}_2$: 374.09 and 376.09.

3-(3-*tert*-butyl-4,4-dimethyl-4,5-dihydrofuran-2-yl)-7-((trimethylsilyl)ethynyl)naphthalen-1-ol (**146**)



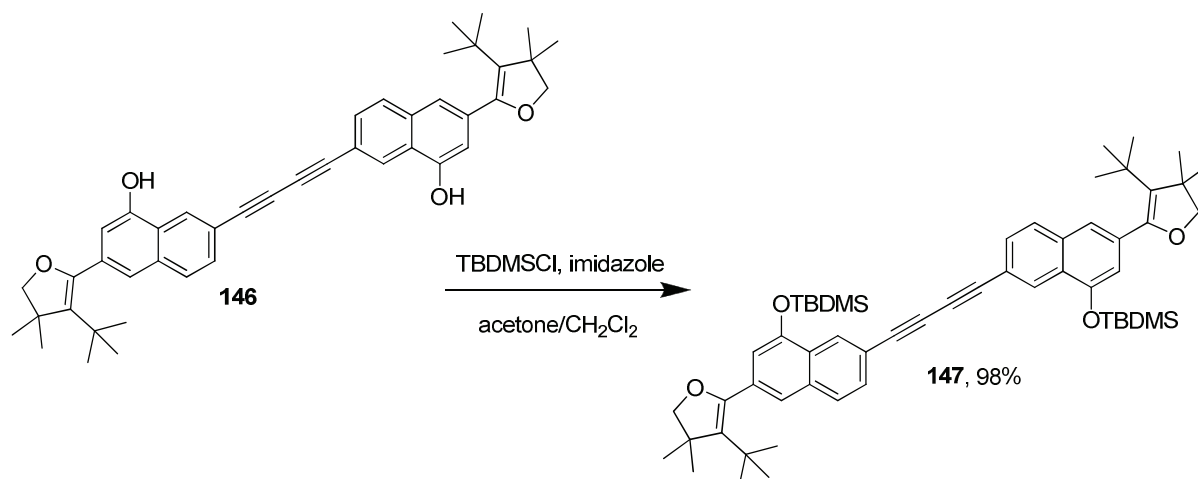
Aryl bromide **144** (1.20 g, 3.20 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in dry DMF (30 ml) and DIEA (5.6 ml, 32 mmol, 10 equiv.), trimethylsilylacetylene (2.28 ml, 16 mmol, 5.0 equiv.), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (225 mg, 0.32 mmol, 0.1 equiv.) and CuI (122 mg, 0.64 mmol, 0.2 equiv.) were sequentially added under an Ar atmosphere. The resulting reaction mixture was stirred at 100°C for 3 h. The reaction was checked for completion by TLC. Then, the reaction medium was concentrated under vacuum. The crude residue was dissolved in EtOAc (40 ml) and was washed with 10% aq. citric acid (20 ml), brine (20 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified with a Biotage automated flash purification system (cartridge: 100 g) by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (2-20%) as the mobile phase. The TMS-alkyne derivative **145** was obtained in a pure form as an orange oil (930 mg, yield 70%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 8 : 2, v/v) 0.5; δ_H (300 MHz, CDCl_3) 0.26 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$), 1.07 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.36 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.92 (s, 2H, COCH_2), 5.94 (bs, 1H, $\text{OH}_{\text{phenol}}$), 6.74 (d, J 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{3\text{-naph.}}$), 7.32 (s, 1H, $\text{H}_{1\text{-naph.}}$), 7.48 (dd, J 8.4 Hz, J 1.2 Hz, 1H, $\text{H}_{7\text{-naph.}}$), 7.66 (d, J 8.4 Hz, 1H, $\text{H}_{8\text{-naph.}}$), 8.26 (s, 1H, $\text{H}_{5\text{-naph.}}$); δ_C (75 MHz, CDCl_3) 0.14 (3C, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 (2C, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 32.6 (4C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3 + \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 47.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 83.3 (COCH_2), 94.5 ($\text{C}\equiv\text{TMS}$), 105.8 ($\text{C}\equiv\text{TMS}$), 111.3 ($\text{C}_{3\text{-naph.}}$), 120.1 ($\text{C}_{6\text{-naph.}}$), 121.9 ($\text{C}_{1\text{-naph.}}$), 123.8 ($\text{C}_{4\text{a-naph.}}$), 126.2 ($\text{C}_{8\text{-naph.}}$), 126.6 ($\text{OC}=\text{C}$), 127.9 ($\text{C}_{5\text{-naph.}}$), 129.4 ($\text{C}_{7\text{-naph.}}$), 133.6 ($\text{C}_{2\text{-naph.}}$), 134.8 ($\text{C}_{8\text{a-naph.}}$), 149.5 ($\text{OC}=\text{C}$), 151.1 ($\text{C}_{4\text{-naph.}}$). MS(ESI⁻): m/z 391.33 [$\text{M} - \text{H}$]⁻, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Si}$: 392.22.

Bis-alkynenaphthol (**147**)

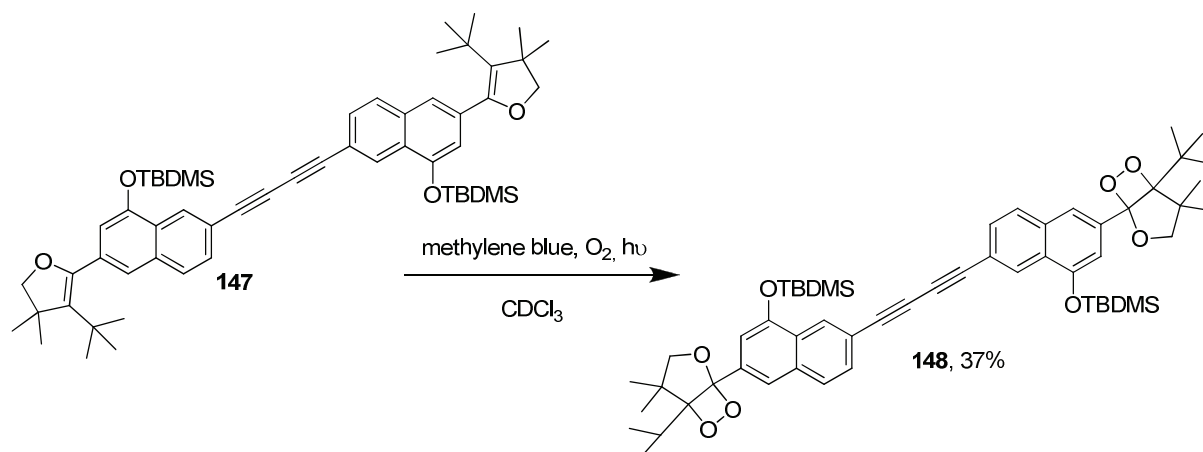
TMS-alkyne derivative **145** (883 mg, 2.25 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in MeOH (20 ml) and K_2CO_3 (466 mg, 3.37 mmol, 1.5 equiv.) was added. The resulting reaction mixture was stirred at 60°C for 40 min and monitored by periodic TLC analyses. Once the reaction was complete, two major products were formed. The reaction medium was concentrated and the crude residue was dissolved in a mixture of CH_2Cl_2 - H_2O -10% aq. citric acid (62 : 30 : 8, v/v/v, 65 ml). The organic phase was separated, washed with a mixture of brine (25 ml) and 10% aq. citric acid (5 ml), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated and concentrated under vacuum. Around 700 mg of crude product was recovered. It was purified with a Biotage automated flash purification system (cartridge: 50 g) by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (5-40%) as the mobile phase. The alkyne homocoupling Glaser-type product **146** was obtained in a pure form as an orange solid (238 mg, yield 33%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 8 : 2, v/v) 0.3; mp decomposition before melting; ν_{max} /cm^{-1} 3386 (broad), 2965, 1694 (broad), 1596, 1476, 1393, 1367, 1226 (broad), 1165, 1035; δ_H (300 MHz, $CDCl_3$) 1.06 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.36 (s, 6H, $C(CH_3)_2$), 3.94 (s, 2H, $COCH_2$), 6.75 (bs, 1H, $H_{3-naph.}$), 7.30 (s, 1H, $H_{1-naph.}$), 7.40 (bs, 1H, OH_{phenol}), 7.48 (d, J 8.4 Hz, 1H, $H_{7-naph.}$), 7.64 (d, J 8.4 Hz, 1H, $H_{8-naph.}$), 8.35 (s, 1H, $H_{5-naph.}$); δ_C (75 MHz, $CDCl_3$) 27.3 (2C, $C(CH_3)_2$), 32.5 (4C, $C(CH_3)_3 + C(CH_3)_3$), 47.2 ($C(CH_3)_2$), 74.4 ($\equiv C-C\equiv$), 82.6 ($C\equiv C-C$), 83.1 ($COCH_2$), 111.6 ($C_{3-naph.}$), 118.4 ($C_{6-naph.}$), 121.4 ($C_{1-naph.}$), 124.0 ($C_{4a-naph.}$), 126.7 ($C_{8-naph.}$), 127.5 ($OC=C$), 127.9 ($C_{5-naph.}$), 129.1 ($C_{7-naph.}$), 133.7 ($C_{2-naph.}$), 134.9 ($C_{8a-naph.}$), 149.3($OC=C$), 151.6 ($C_{4-naph.}$).

TBDMS protected bis-naphthol (**148**)

Bis-naphthol **146** (200 mg, 0.313 mmol, 1.0 equiv.) was dissolved in a mixture of synthesis-grade acetone-CH₂Cl₂ (3 : 1, v/v, 4 ml). Imidazole (85 mg, 1.25 mmol, 4.0 equiv.) and TBDMSCl (142 mg, 0.94 mmol, 3.0 equiv.) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at rt for overnight. Thereafter, the reaction medium was concentrated and dissolved in CH₂Cl₂ (15 ml). The organic phase was washed with 10% aq. citric acid (10ml), brine (10 ml), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum to give bis-TBDMS ether **147** as an orange solid (267 mg, yield 98%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 8 : 2, v/v) 0.7; mp 156 ± 2 °C; $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 2955, 2930, 2859, 1563, 1462, 1395, 1363, 1300, 1253, 1230, 1178, 1093, 1073, 1052, 1010; $\delta_{\text{H}}(300 \text{ MHz, CDCl}_3)$ 0.31 (s, 12H, Si(CH₃)₂), 1.08 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1.11 (s, 18H, SiC(CH₃)₃), 1.37 (s, 12H, C(CH₃)₂), 3.92 (s, 4H, COCH₂), 6.81 (d, J 1.5 Hz, 2H, H_{3-naph.}), 7.38 (bs, 2H, H_{1-naph.}), 7.55 (dd, J 8.4 Hz, J 1.8 Hz, 2H, H_{7-naph.}), 7.72 (d, J 8.4 Hz, 2H, H_{8-naph.}), 8.36 (bs, 2H, H_{5-naph.}); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) -4.0 (2C, Si(CH₃)₂), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 26.1 (3C, Si(CH₃)₃), 27.6 (2C, C(CH₃)₂), 32.7 (4C, C(CH₃)₃ + C(CH₃)₃), 47.4 (C(CH₃)₂), 74.5 (≡C-C≡), 77.3 (C≡C-C), 83.3 (COCH₂), 115.6 (C_{3-naph.}), 118.7 (C_{6-naph.}), 122.2 (C_{1-naph.}), 126.3 (C_{4a-naph.}), 127.2 (C_{8-naph.}), 127.9 (OC=C), 128.3 (C_{5-naph.}), 129.3 (C_{7-naph.}), 134.2 (C_{2-naph.}), 135.7 (C_{8a-naph.}), 149.8(OC=C), 151.3 (C_{4-naph.}). MS(APCI+): m/z 867.47 [M + H]⁺, calcd for C₅₆H₇₄O₄Si₂: 866.51.

Bis-dioxetane (**149**)

Bis-enol ether **147** (50 mg, 0.058 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in CDCl₃ (5 ml), a point of spatula of methylene blue (ca.1 mg) was added. The reaction medium was flushed with O₂ for 15 min and irradiated with a 300W-halogen-lamp through magnetic stirring at 0°C for 50 min. Thereafter, the reaction medium was concentrated without heating. The crude compound was purified with a Biotage automated flash purification system (cartridge: 10 g) by using a step gradient of EtOAc in cyclohexane (0-20%) as the mobile phase. Bis-dioxetane **148** was obtained in a pure form as a yellow solid (20 mg, yield 37%).

R_f (cyclohexane-EtOAc, 9 : 1, v/v) 0.5; mp decomposition before melting; ν_{\max} /cm⁻¹ 2961, 2935, 2858, 1722, 1687, 1569, 1461, 1390, 1365, 1291, 1227, 1199, 1080, 1048; δ_{H} (300 MHz, CDCl₃) 0.30 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 0.32 (s, 6H, Si(CH₃)₂), 1.02 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1.11 (s, 24H, SiC(CH₃)₃ + C(CH₃)₂), 1.19 (s, 6H, C(CH₃)₂), 3.87 (d, *J* 8.1 Hz, 2H, COCH₂), 4.62 (d, *J* 8.1 Hz, 2H, COCH₂), 7.08 (bs, 2H, H_{3-naph.}), 7.59 (dd, *J* 8.4 Hz, *J* 1.5 Hz, 2H, H_{7-naph.}), 7.76 (bs, 2H, H_{1-naph.}), 7.81 (d, *J* 8.7 Hz, 2H, H_{8-naph.}), 8.37 (bs, 2H, H_{5-naph.}); δ_{C} (75 MHz, CDCl₃) -4.0 (2C, Si(CH₃)₂), 18.4 (SiC(CH₃)₃), 26.1 (3C, SiC(CH₃)₃), 27.1 (2C, C(CH₃)₂), 28.4 (3C, C(CH₃)₃), 46.0 (C(CH₃)₃), 49.2 (C(CH₃)₂), 72.3 (≡C-C≡), 75.3 (C≡C-C), 82.8 (COCH₂), 105.3 (OCOOC), 112.9 (C_{3-naph.}), 116.6 (OCOOC), 119.6 (C_{6-naph.}), 121.4 (C_{1-naph.}), 127.8 (C_{8-naph.}), 127.8 (C_{2-naph.}), 129.0 (C_{5-naph.}), 129.6 (C_{7-naph.}), 129.8 (C_{4a-naph.}), 135.4 (C_{8a-naph.}), 151.5 (C_{4-naph.}). MS(ESI⁺): *m/z* 930.93 [M + H]⁺, calcd for C₅₆H₇₄O₈Si₂: 930.49.

Résumé : L'imagerie moléculaire optique joue maintenant un rôle essentiel dans le diagnostic pré-clinique et le développement de médicaments. En effet, c'est un outil précieux dans la détection et le suivi de cellules vivantes que ce soit en utilisant de simples agents de marquage ou des sondes plus développées, dites « intelligentes » et activées uniquement par une interaction spécifique avec le bio-analyte ciblé. Ce travail de thèse a consisté à développer des outils synthétiques innovants afin d'optimiser les paramètres physico-chimiques et les propriétés optiques des sondes luminescentes. Ceci dans le but de répondre à la problématique complexe de l'imagerie dans le contexte *in vivo*. Nous avons notamment travaillé sur des aspects de pro-fluorescence et de chémiluminescence. De nouveaux pro-fluorophores à phénol basés sur une architecture originale de type bis-coumarinique ont été développés. De plus, nous avons mis en place une méthode d'hydrosolubilisation généralisable aux fluorophores à phénol de type coumarine et xanthène. Nos recherches en chémiluminescence ont permis la synthèse de nouveaux chémiluminophores couplés à des fluorophores organiques afin d'augmenter l'efficacité d'émission de chémiluminescence dans le rouge. Enfin, nos travaux ont permis de mettre en place les premières « cassettes » chémiluminescentes basées sur une architecture de type 1,2-dioxétane.

Mots clés : imagerie moléculaire optique, imagerie *in vivo*, sonde pro-fluorescente, chémiluminescence, sondes « intelligentes », 1,2-dioxétane, cassettes à transfert d'énergie.

Abstract: Optical molecular imaging is now playing a pivotal role both in pre-clinical diagnosis and drug development. Indeed, this is a valuable tool for the real time detection and monitoring of living cells either through the use of structurally simple labels or more recently by means of sophisticated fluorescent probes, called “smart” probes and only activatable upon specific interaction with the targeted bio-analyte. The aim of this PhD work was the design of new synthetic tools aimed at optimizing physico-chemical and optical properties of fluorescent probes intended for challenging *in vivo* imaging applications. We have focused on the pro-fluorescence and chemiluminescence approaches. New phenol-based pro-fluorophores have been developed by using an original bis-coumarinic scaffold. In the context of the chemistry of fluorophores, we have also investigated a general method for the water-solubilisation of phenol-based fluorophore belonging to the coumarin and xanthene families. Our research in chemiluminescence has led the synthesis of new chemiluminophores covalently linked to fluorescent organic dyes aimed at increasing the emission efficiency in the red region of such chemiluminophores. Thus, the first chemiluminescent “energy transfer cassettes” based on a 1,2-dioxetane scaffold have been obtained.

Key words: optical molecular imaging, *in vivo* imaging, fluorogenic probes, chemiluminescence, smart probes, 1,2-dioxetane, energy transfer cassettes.