



**HAL**  
open science

# Synthèse et évaluation biologique de sondes fluorogènes pour la détection d'activités enzymatiques

Mathieu Bordy

► **To cite this version:**

Mathieu Bordy. Synthèse et évaluation biologique de sondes fluorogènes pour la détection d'activités enzymatiques. Chimie organique. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSEN072 . tel-03934683

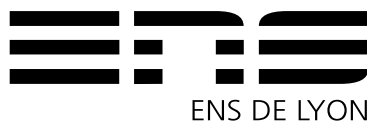
**HAL Id: tel-03934683**

**<https://theses.hal.science/tel-03934683>**

Submitted on 11 Jan 2023

**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.



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN072

## **THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**

opérée au sein de

**l'École Normale Supérieure de Lyon**

**École Doctorale N° 206**

**École Doctorale de Chimie de Lyon**

**(Chimie, Procédés, Environnement)**

**Spécialité de doctorat : Chimie**

Soutenue publiquement le 31/10/2019, par :

**M. Mathieu BORDY**

---

# **Synthèse et évaluation biologique de sondes fluorogènes pour la détection d'activités enzymatiques**

---

Devant le jury composé de :

Monsieur Arnaud GAUTIER	Professeur des Universités Sorbonne Université, Paris	<b>Rapporteur</b>
Monsieur Andrei KLYMCHENKO	Directeur de Recherche CNRS Université de Strasbourg	<b>Rapporteur</b>
Madame Chantal ANDRAUD	Directrice de Recherche CNRS École Normale Supérieure de Lyon	<b>Examinatrice</b>
Monsieur Gilles ULRICH	Directeur de Recherche CNRS Université de Strasbourg	<b>Examineur</b>
Monsieur Jens HASSERODT	Professeur des Universités École Normale Supérieure de Lyon	<b>Directeur de thèse</b>



## Détails pratiques

Ces travaux de thèse (01/09/2016 - 31/08/2019) se sont déroulés sous la direction du Professeur Jens Hasserodt, au sein de l'axe Chimie Supramoléculaire et Chimie Biologique dans le Laboratoire de Chimie de l'École Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Les expériences biologiques ont été réalisées au sein de l'équipe de Génétique des Variations Intra-Espèce, dirigée par le Docteur Gaël Yvert, au Laboratoire de Biologie et Modélisation de la Cellule, 46 allée d'Italie, 69007 Lyon, France. Tous les travaux expérimentaux rapportés dans ce manuscrit relèvent de mon travail personnel, sauf mention explicite contraire. Ces travaux sont répertoriés dans les cahiers de laboratoire n°Z033218, Z055376, Z06422, Z055400 et Z082266.

Ces travaux de thèse ont été financés par un contrat doctoral spécifique normalien délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon.

## Mots-clefs

Imagerie moléculaire, sondes fluorogènes, activité enzymatique, fluorescence proche-infrarouge

## Keywords

Molecular imaging, fluorogenic probes, enzymatic activity, near-infrared fluorescence

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>v</b>
<b>Résumé</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des acronymes</b>	<b>xiii</b>
<b>Glossaire</b>	<b>xix</b>
<b>Liste des symboles</b>	<b>xxi</b>
<b>Introduction</b>	<b>3</b>
1 L'imagerie au service de la médecine . . . . .	3
1.1 Progrès du domaine médical — la médecine personnalisée . . . .	3
1.2 De l'imagerie à l'imagerie moléculaire . . . . .	4
1.3 Différentes modalités d'imagerie moléculaire . . . . .	6
1.3.1 Imagerie par rayons X et tomodensitométrie . . . . .	6
1.3.2 Médecine nucléaire : scintigraphie, PET, SPECT . . . .	9
1.3.3 Imagerie par résonance magnétique nucléaire . . . . .	13
1.3.4 Autres modalités d'imagerie . . . . .	15
1.4 L'imagerie optique et comparaison . . . . .	17
2 Les enzymes – pourquoi et comment les détecter . . . . .	23
2.1 Des outils indispensables . . . . .	23
2.2 Détecter la présence d'une enzyme . . . . .	28
2.3 Détecter l'activité d'une enzyme . . . . .	34
2.3.1 Sondes ratiométriques . . . . .	35
2.3.2 Sondes fluorogènes/luminogènes . . . . .	37
3 Diffusion du signal et solutions : ELF-97 . . . . .	41
3.1 La diffusion du signal – un handicap pour la résolution . . . . .	41

3.1.1	Solutions rudimentaires . . . . .	41
3.1.2	Création de liaisons covalentes . . . . .	43
3.1.3	Précipitation . . . . .	45
3.2	L'ELF-97, un champion à dompter . . . . .	47
3.2.1	<i>Molecular Probes</i> – les origines . . . . .	47
3.2.2	Maîtriser l'instabilité – l'arrivée des espaceurs auto- effondrables . . . . .	50
3.2.3	Récents avancées – sondes pour glycosidases . . . . .	56
3.3	Objectifs de la thèse . . . . .	58
<b>I</b>	<b>Développement de sondes à activités glycosidases</b>	<b>61</b>
I.1	Optimisation de la sonde $\beta$ -gal . . . . .	62
I.1.1	Étude <i>in vitro</i> . . . . .	63
I.1.2	Étude <i>in cellulo</i> . . . . .	67
I.1.2.1	Étude sur bactéries . . . . .	67
I.1.2.2	Microscopie de cultures cellulaires . . . . .	70
I.1.2.3	Cytométrie en flux . . . . .	72
I.1.3	Variation de l'espaceur pour le greffage de groupements ciblant	76
I.2	Nouvelles sondes pour glycosidases . . . . .	82
I.2.1	Objectifs et nouvelles cibles . . . . .	82
I.2.2	Synthèse des nouvelles sondes glycosidases . . . . .	85
I.2.3	Évaluation des nouvelles sondes glycosidases . . . . .	89
I.3	Développement d'un nouvel espaceur pour l'étude de la sénescence . . .	92
I.3.1	Contexte de la sénescence cellulaire . . . . .	92
I.3.2	Synthèse . . . . .	97
I.3.3	Résultats et perspectives . . . . .	99
I.4	Conclusions et perspectives du chapitre I . . . . .	104
<b>II</b>	<b>Une nouvelle classe d'enzymes - sondes pour <math>\beta</math>-lactamases</b>	<b>109</b>
II.1	Les $\beta$ -lactamases, de la résistance bactérienne à l'étude du diabète . . .	110
II.1.1	Les $\beta$ -lactamases, une arme de défense des bactéries . . . . .	110
II.1.2	Un outil de choix pour la biologie moléculaire . . . . .	117
II.1.3	Application à l'étude de l'internalisation du glucose : localisation de la protéine GLUT4 . . . . .	118
II.2	Synthèse d'une sonde modèle pour la $\beta$ -lactamase . . . . .	121
II.3	Évaluation biologique et séjour d'étude . . . . .	125

II.3.1	Première évaluation biologique de la sonde $\beta$ -lactamase . . . . .	125
II.3.2	Séjour de recherche dans l'équipe japonaise . . . . .	128
II.4	Étude de variantes structurales . . . . .	134
II.5	Conclusions et perspectives du chapitre II . . . . .	141
<b>III</b>	<b>Fluorophore rouge et NIR, en route vers l'<i>in vivo</i></b>	<b>145</b>
III.1	Feu vert ? On ne traverse pas... . . . .	146
III.1.1	Les fenêtres de transparence biologique . . . . .	146
III.1.2	Une solution : les fluorophores NIR . . . . .	151
III.1.3	L'ELF-97 et l' <i>in vivo</i> , un mariage quasiment impossible . . . . .	153
III.1.4	Pour traverser, on passe au rouge . . . . .	155
III.2	Synthèse et étude de nouveaux fluorophores ESIPT émettant dans le rouge	159
III.2.1	La famille Stefani . . . . .	159
III.2.2	La famille des chalcones . . . . .	160
III.2.3	La famille Akutagawa . . . . .	166
III.3	Projet exploratoire de développement d'un fluorophore NIR I . . . . .	170
III.3.1	Un faux espoir . . . . .	170
III.3.2	Un nouvel espoir . . . . .	171
III.4	Tentative d'incorporation dans des sondes pour activités enzymatiques	175
III.4.1	La méthode traditionnelle . . . . .	175
III.4.2	Autres solutions et nouvelles possibilités . . . . .	177
III.5	Conclusions et perspectives du chapitre III . . . . .	180
	<b>Conclusion générale</b>	<b>185</b>
	<b>Partie expérimentale</b>	<b>191</b>
	General consideration about Chemistry . . . . .	191
	General consideration about Biology . . . . .	192
	General procedures and common intermediates . . . . .	194
	Partie expérimentale du chapitre 1 . . . . .	200
	Partie expérimentale du chapitre 2 . . . . .	216
	Partie expérimentale du chapitre 3 . . . . .	224
	<b>Annexes</b>	<b>245</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>253</b>



# Remerciements

Alors que je commence à écrire ces mots, je réalise que cela fait maintenant 4 ans presque jour pour jour que je suis arrivé dans ce laboratoire, un 25 janvier 2016 pour être précis. Il y a ainsi de nombreuses personnes qui méritent d'être remerciées pour tout ce qu'elles ont pu apporter, de près ou de loin, à ces années de thèse.

Je n'ai pour une fois pas à trancher entre jury ou direction du laboratoire pour commencer ces remerciements, car une personne réunit les deux étiquettes. Je remercie ainsi Chantal Andraud de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon, mais également d'avoir accepté de faire partie et de présider mon jury de thèse. Un grand merci aux autres membres de ce jury, Arnaud Gauthier, Andrei Klymchenko et Gilles Ullrich m'ayant fait l'honneur de relire et juger ces travaux. J'ai beaucoup apprécié nos échanges avant, pendant et après la soutenance. Merci également à Olivier Maury et Yves Queneau pour le temps investi lors des comités de suivis de cette thèse.

Je tenais ensuite à exprimer toute ma gratitude à Jens Hasserodt, mon directeur de thèse, pour sa confiance, son soutien et l'immense liberté intellectuelle qu'il m'a laissée durant ses années. Il a su être présent quand il le fallait, me permettant en parallèle de développer une certaine autonomie. J'ai énormément appris à ses côtés et c'est un plaisir de pouvoir continuer de travailler ensemble.

Ces résultats de thèse sont également le fruit de collaborations avec d'autres équipes de recherche. Je remercie ainsi l'équipe de Sébastien Papot à Poitiers pour notre début de projet commun, mais également le laboratoire de Kazuya Kikuchi à Osaka et plus particulièrement l'équipe de Yuichiro Hori dans laquelle j'ai été chaleureusement accueilli pour un séjour de recherche d'un mois dans le cadre de l'ANR en commun autour d'un de mes projets de thèse. Merci également à Masafumi Minoshima pour sa précieuse aide durant cet échange.

Travailler au laboratoire de chimie est un plaisir quotidien, l'ambiance agréable qu'il y règne est à mettre au crédit de toutes ses membres, passés et présents. Une pensée particulière pour toutes les personnes de l'(anciennement) équipe de Chimie Bio-Organique et pour la première avec qui j'ai eu la chance de travailler. Corentin, tu m'as accueilli comme (petit) stagiaire M2 et tu as su me transmettre ta passion de la recherche et de l'encadrement, tu m'as permis de faire une belle transition entre Master et Thèse. Un immense merci pour tout ce temps passé ensemble. Je remercie ensuite Léa, Florence et Alix qui m'ont toléré comme encadrant de stage. J'ai beaucoup appris en travaillant à vos côtés. Merci pour les nombreuses avancées aux projets que vous avez permises. Alix, tu as pris mon relais en tant que "petite" M2 devenue doctorant(e). C'est un immense plaisir que de continuer de travailler avec toi jusqu'à maintenant. Même si certains disent que tu parles trop, tout le monde s'accordera pour te reconnaître comme la caution bonne humeur de l'équipe, ne change surtout pas! Jérémy, tu es arrivé quand je commençais à (presque) me sentir seul dans l'équipe, merci pour ta bonne humeur (parfois variable;) ), pour tous nos échanges entre fluo et magnéto, et surtout bon courage pour la rédaction à venir! Quentin, après m'avoir encadré en M1, nous voilà réunis dans la même équipe de nouveau. Merci pour ces mois passés ensemble et tout ce que tu m'as apporté en chimie et ailleurs. Je placerai bien quelques expressions, notamment québécoises mais je vais rester sobre. Charlie, nous voilà dans le même bateau maintenant, bravo pour avoir eu le courage de lire ce manuscrit dès ton arrivée et merci pour toutes tes corrections. Enfin, merci Jesse pour montrer l'exemple sur la propreté de la vaisselle et plus sérieusement pour nos discussions diverses sur les sondes et la chimie.

Merci également à ceux avec qui j'ai eu la chance de partager un bureau et que je n'ai pas encore cités. Maxime, pour tous tes conseils sur la fluo, pour m'avoir prêté un de tes jurys et pour ta bonne humeur toutes ses années. Guillaume, même si on te voit de moins en moins maintenant, merci pour le calme que tu apportes à ce bureau et pour nos discussions sur les couches lavables (entre autres). Alex, on a jamais vraiment partagé de bureau ni de labo mais c'est tout comme! Que d'années depuis cette réunion parrain/bizut... Merci pour ta bonne humeur permanente! Si on remonte un peu plus dans le temps (mais toujours d'actualité) Quentin en tant que super binôme de toutes nos années étudiantes à l'ENSL tu ne peux pas ne pas faire partie de ces lignes. Une pensée pour tout ceux avec qui j'ai partagé de bons moments dans le labo et en dehors : Jean, Maëlle, Sylvain, Laure-Lise, Caroline, Orsola, Romain, J-C., Thibault, Vincent, Martin, Shagor, Amandine, Ruben... Dans le désordre et j'en oublie sûrement!

Et toute cette chimie ne serait rien sans la bio qui va derrière. Un immense merci à Damien pour avoir participé à réaliser la majeure partie des résultats biologiques de ces travaux. Au-delà du professionnel, j'apprécie toujours autant ta bonne humeur et ton humour si particulier ;) Même si les résultats tardent parfois à arriver, j'ai beaucoup appris à tes côtés et cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Un grand merci également à l'équipe de Gaël Yvert et Gérard Triqueneau du LBMC pour nous accueillir dans leur laboratoire.

Mes remerciements vont également à l'équipe administrative (et particulièrement Damien) sans laquelle le labo ne pourrait pas tourner. Merci aussi à Christian pour tous ses secours informatiques et les posters de dernière minute ! Merci aux différents services de l'ENS qui accompagnent les doctorants pour leur efficacité. Je tenais également à remercier les départements de Chimie et de Biologie de l'ENS pour m'avoir confié des enseignements que j'ai pris plaisir à donner. Merci à Pulsalys pour leur accompagnement lors du dépôt de brevet.

On sort du labo mais on reste à l'ENS : une pensée pour l'équipe de basket de l'ENS, où se côtoient bonne humeur, compétition et amitiés. Mention spéciale pour Seb, le duo grimpe/basket infatigable !

Je ne m'aventure pas plus loin dans des listes nominatives au risque d'oublier quelqu'un mais je remercie tous mes amis qui ont participé d'une manière ou d'une autre à cette thèse, en me permettant de parler d'autre chose que de chimie et de réactions qui ne marchent pas.

Un énorme merci à toute ma famille et en premier lieu à mes parents, à ma sœur Manon et ma marraine Fabienne pour leur soutien inépuisable et leur amour de toujours. Une pensée spéciale pour mamie Juliette et sa gentillesse sans failles. Merci aussi à tous les oncles/tantes, cousins/cousines que je ne pourrais tous citer et à tous ceux qui se reconnaîtront dans ces lignes. Un grand merci également à ma (très) belle-famille et tous ces instants de bonheur partagés.

Comment ne pas finir par toi, Octavie, ma chérie, qui me supporte depuis plusieurs années déjà. Merci pour ton soutien de tous les jours et tes nombreuses relectures attentives, c'est une chance énorme et un bonheur infini que j'ai de partager ma vie avec toi. J'ai hâte de vivre toutes ces nouvelles aventures avec toi (et mini-nous). Je t'aime.





# Résumé

Cette thèse de doctorat traite de la conception et de l'évaluation de sondes fluorogènes pour la détection d'activités enzymatiques dans des contextes biologiques d'intérêt.

L'élaboration de sondes fluorogéniques stables incorporant l'ELF-97 est une des thématiques de recherche activement poursuivie par notre équipe. Le développement avec succès de sondes peptidases et glycosidases a ouvert de nombreuses perspectives. Un premier chapitre sera dédié à la diversification de ces sondes, tout d'abord par la variation de substrats pour la détection de nouvelles glycosidases, puis par le développement d'un espaceur innovant dans un contexte particulier de sénescence cellulaire. Une sonde pour la détection de la  $\beta$ -galactosidase en milieu acide a notamment pu être synthétisée et testée.

En parallèle, des travaux ont porté sur une nouvelle génération de sondes ciblant une famille d'enzymes à fort intérêt scientifique et sociétal : les  $\beta$ -lactamases. La synthèse et l'évaluation biologique préliminaire d'une première sonde modèle a démontré l'efficacité de cette nouvelle architecture moléculaire. Cette sonde a, par la suite, permis l'élaboration de premiers résultats d'imagerie dans le cadre d'une collaboration active avec une équipe de recherche japonaise.

Enfin, un dernier volet sera consacré à un projet dont l'objectif n'est pas récent dans l'équipe : le développement d'alternatives à l'ELF-97 présentant une émission décalée vers le rouge ou le proche infrarouge. Ainsi, la synthèse de nouveaux fluorophores, leurs caractérisations physico-chimiques et des tests d'incorporation dans des dispositifs répondeurs ont notamment été réalisés. Plusieurs candidats se sont révélés à fort potentiel pour leur émission fortement décalée vers le rouge ou leur haute insolubilité. Ils pourraient permettre à terme l'adaptation de la technologie à une utilisation *in vivo*, but ultime de la technologie dans le cadre de l'imagerie moléculaire.



# Abstract

This doctoral thesis deals with the design and evaluation of fluorogenic probes for the detection of enzymatic activities in biological contexts of interest.

The development of stable fluorogenic probes incorporating ELF-97 is one of the research themes actively pursued by our team. The successful development of peptidases and glycosidases probes have opened many perspectives. A first chapter will be dedicated to the diversification of these probes, firstly by the variation of substrates for the detection of new glycosidases, then by the development of an innovative spacer in the context of cell senescence. In particular, a probe for the detection of  $\beta$ -galactosidase in acidic medium has been synthesized and tested.

In parallel, work has focused on a new generation of probes targeting an enzyme family with strong scientific and societal interest :  $\beta$ -lactamases. The synthesis and the preliminary biological evaluation of a first model probe demonstrated the effectiveness of this new molecular architecture. This probe subsequently led to the development of first imaging results as part of an active collaboration with a Japanese research team.

Finally, a last part will be devoted to a project whose objective is not recent in the team : the development of alternatives to the ELF-97 presenting a shifted emission towards the red or the near infrared. For this purpose, the synthesis of new fluorophores, their physicochemical characterizations and incorporation tests in responding devices have been carried out. Several candidates have proved to have high potential for two main reasons : strongly red-shifted emission or high insolubility. They could eventually allow the adaptation of the technology to an *in vivo* use, the ultimate goal of the technology in the context of molecular imaging.



# Liste des acronymes

- o*** *ortho* (substitution d'un noyau aromatique). 239
- p*** *para* (substitution d'un noyau aromatique). 224
- 4-MU** 4-méthylumbelliféron. 177
- 7-ACA** acide 7-aminocéphalosporanique, ou *7-Aminocephalosporanic Acid*. 122
- Ac** acétyle, ou *acetyl*. 196
- ACN** *acetonitrile*. 197, 206
- ACQ** extinction causée par agrégation, ou *Aggregation-Caused Quenching*. 46
- ADN** acide désoxyribonucléique, ou *Deoxyribonucleic Acid*. 24, 26, 27, 32, 33, 48, 92, 126, 128
- ADP** absorption à deux photons. 154, 155
- AIE** émission induite par agrégation, ou *Aggregation-Induced Emission*. 46, 166
- $\alpha$ -gal**  $\alpha$ -galactosidase. 66, 105
- $\alpha$ -glu**  $\alpha$ -glucosidase. 66, 89
- AOMK** *Acyloxymethyl Ketone*. 43
- ARN** acide ribonucléique, ou *Ribonucleic Acid*. 24, 33
- ASE** *Amplified Spontaneous Emission*. 160
- $\beta$ -gal**  $\beta$ -galactosidase. xvii, 27, 41, 49, 56–58, 61–63, 66–78, 80–82, 85, 89, 94–98, 100–102, 104, 105, 117, 136, 153, 180, 181, 187, 192, 245–249
- $\beta$ -glu**  $\beta$ -glucosidase. 66, 89, 90, 105
- $\beta$ -gus**  $\beta$ -glucuronidase. 66, 76, 77, 82, 85–90, 104
- $\beta$ -lac**  $\beta$ -lactamase. 110, 115, 116, 121–123, 125–128, 130–136, 139, 140
- Boc** *tert*-butoxycarbone. 98, 137
- Bu** butyle, ou *butyl*. 239

- BuLi** butyllithium. 136, 141
- CCM** Chromatographie sur Couche Mince. 69
- CDI** *1,1'-carbonyl-di-imidazole*. 175
- CDT** *1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazole)*. 175
- CES** *carboxylesterases*. 135
- CT** tomographie axiale calculée par ordinateur, ou *Computed Tomography*. 7, 12
- DCM** dichlorométhane. 166, 176, 177, 194–197, 200–206, 208–210, 212–214, 218, 219, 221, 223, 224, 226, 236, 237, 240
- DDQ** 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone. 199
- DIPEA** *N,N*-diisopropylethylamine. 196, 200, 201, 204, 206, 209, 210, 214, 218–220, 222, 223, 239
- DMBA** *1,3-dimethylbarbituric acid*. 195, 201, 205, 210, 218, 223
- DMF** diméthylformamide. 160, 226
- DMSO** diméthylsulfoxyde. 160, 167, 192, 193, 212, 216, 225–227, 236, 237
- E. coli*** Bactérie *Escherichia coli*. 67–69
- EET** transfert d'énergie électronique, ou *Electronic Energy Transfer*. 36
- EGFR** récepteur à EGF, ou *Epidermal Growth Factor Receptor*. 132, 133
- ELF-97** ELF-97 *alcohol*, du projet *Enzyme-Labeled Fluorescence* (ELF). ix, xi, 47–52, 55, 57, 58, 61, 62, 64, 65, 69, 71, 74, 78, 82, 86, 87, 91, 95, 96, 99, 100, 104, 109, 120, 121, 123, 125, 133, 135, 137, 139, 142, 145, 152–156, 166, 168, 175–181, 186, 196, 199, 201, 205, 210, 214, 219, 223
- ELISA** dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. 30
- ESI** *Electrospray Ionization*. 192
- ESIPT** transfert de proton intramoléculaire à l'état excité, ou *Excited-State Intramolecular Proton-Transfer*. 38–40, 47, 48, 145, 155–161, 166–172, 174, 179, 180, 186
- Et** éthyle, ou *ethyl*. 198
- EtOAc** *ethyl acetate*. 195, 198, 202, 208, 213, 216–218, 220–222, 227, 228, 236, 239, 240

- FACS** tri cellulaire par fluorescence (en cytométrie en flux), ou *Fluorescence-Activated Cell Sorting*. 56, 62, 72, 74, 75, 81, 104, 193
- FDA** *Food and Drug Administration*. 151
- FDG** fluorodésoxyglucose, ou *Fluorodeoxyglucose*. 12, 13
- FDG** *Fluorescein Di(β-D-Galactopyranoside)*. 41, 67–69, 193
- FRET** transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'énergie par résonance de type Förster, ou *Förster Resonance Energy Transfer*. 35, 36, 38, 116
- FSC** diffraction dans le sens du faisceau incident, ou *Forward Scattering*. 72, 74
- GFP** protéine verte fluorescente, ou *Green Fluorescent Protein*. 21, 32, 126, 127
- GGT** *γ-glutamyltransferase*. 56
- GSVs** *GLUT4 Storage Vesicles*. 119
- h** heure. 195
- HEK** *Human Embryonic Kidney*. 67, 73, 126, 127, 132, 140
- HPLC** chromatographie en phase liquide à haute performance, ou *High Performance Liquid Chromatography*. 80, 87, 99, 100, 123, 137, 197
- HPQ** *Hydroxyphenyl-quinazolinone*. 46, 47, 53–55, 157, 179
- HRMS** *High Resolution Mass Spectrometry*. 80, 192
- HSA** *Human Serum Albumin*. 161
- ICT** transfert interne de charge, ou *Internal Charge Transfer*. 36, 37, 156
- IR** Infrarouge. 147
- IRM** Imagerie par Résonance Magnétique. 8, 13–15, 21, 34, 146
- ISC** conversion intersystème, ou *Intersystem Crossing*. 19
- L** litre, et dérivés. 197
- LAP** Leucine aminopeptidase. 52–58, 62, 136
- LC** chromatographie en phase liquide, ou *Liquid Chromatography*. 80, 137, 192
- LEDs** diodes électroluminescente, ou *Light-Emitting Diodes*. 69
- m** mètre, et dérivés. 192
- Me** méthyle, ou *methyl*. 195
- MLCT** *Metal-Ligand Charge Transfer*. 37



- MMAE** *Monomethyl Auristatin E.* 76, 77
- mol** mole, et dérivés. 197
- MS** spectrométrie de masse, ou *Mass Spectrometry.* 80, 99, 102, 137, 138, 176, 178, 192, 197
- NAG** N-acétyl-glucosamine. 111
- NAM** acide N-acétyl-muramique. 111
- NIR** proche infrarouge, ou *Near-Infrared.* 145, 147, 149–152, 154, 155, 157, 169, 173, 180
- NMR** *Nuclear Magnetic Resonance.* 191
- o/n** sur la nuit (*overnight*). 198
- PABA** alcool *p*-aminobenzyle ou *p-Aminobenzyl alcohol.* 44, 45, 51, 56, 57, 181
- PAT** tomographie photo-acoustique, ou *Photoacoustic Tomography.* 16
- PBS** solution de tampon phosphate, ou *Phosphate Buffer Solution.* 53–55, 63–66, 68, 89, 90, 100, 101, 126, 132, 139, 163, 192, 193, 249, 250
- PCR** amplification en chaîne par polymérase, ou *Polymerase Chain Reaction.* 33, 115
- PE** *petroleum ether.* 195, 196, 198, 202, 208, 212, 213, 216, 218, 221, 226–228, 236, 239, 240
- PET** transfert d'électron photoinduit, ou *Photoinduced Electron Transfer.* 37, 38
- PET** tomographie par émission de positons, ou *Positron Emission Tomography.* 10–13, 15, 19, 34
- PGA** *Penicilin G Amidase.* 136
- Ph** phényle, ou *phenyl.* 195
- pH** potentiel Hydrogène. 63–66, 92, 94–96, 100–102, 127, 136, 192, 216, 222, 225
- pKa** constante d'acidité. 65, 96
- ppm** *parts per million.* xxi, 191
- Pr** propyle, ou *propyl.* 198
- PTSA** *para-toluenesulfonic acid.* 199
- qAPB** *quenched Activity-Based Probes.* 43–45
- RMN** Résonance Magnétique Nucléaire. xxi, 13, 80, 99, 102, 160, 167, 169, 176, 178

- ROS** espèces réactives de l'oxygène, ou *Reactive Oxygen Species*. 93
- SA- $\beta$ -gal** *Senescence-Associated  $\beta$ -gal*. 94, 95, 97, 101, 102, 105
- SDS** dodécylsulfate de sodium, ou *Sodium Dodecylsulfate*. 28
- SPECT** tomographie par émission monophotonique, ou *Single-Photon Emission Computed Tomography*. 10–13, 15, 34
- SSC** diffraction perpendiculaire au faisceau incident, ou *Side Scattering*. 72, 74
- TFA** acide trifluoroacétique, ou *Trifluoroacetic Acid*. 123, 137, 167, 169, 197, 213, 219, 224, 236, 237
- THF** *tetrahydrofuran*. 221, 239, 240
- TICT** *Twisted Internal Charge Transfer*. 37
- TLC** *Thin-Layer Chromatography*. 191
- TMS** *tetramethylsilane*. 191
- u. a.** unité arbitraire. 100
- UV** Rayonnements Ultraviolets. 17, 18, 48, 69, 147, 152–154, 159, 160, 163, 167, 169, 170, 173, 180, 186, 193
- v/v** rapport volumique. 195



# Glossaire

**HeLa** Cellules cancéreuses humaines immortalisées, couramment utilisées en laboratoire de biologie moléculaire pour les expériences de culture cellulaire. Leur nom vient de la contraction des prénom et nom de la patiente sur qui ces cellules (métastases d'un cancer du col de l'utérus) ont originalement été extraites, à savoir Mme Henrietta Lacks. 53, 55, 67, 71, 73–75, 117, 129–131, 139, 193, 249

**homéostasie** Régulation d'un paramètre physique interne (concentration d'un composé, température, etc.) autour d'une valeur repère d'équilibre, qui peut varier selon les conditions externes. 119

**pharmacocinétique** Étude du devenir d'une substance active contenue dans un médicament, après son administration dans l'organisme. 13

**pharmacogénomique** Étude des modifications de l'ADN et de l'ARN susceptibles de modifier l'assimilation d'un médicament par l'organisme d'un hôte et la réponse de ce dernier au traitement. 3

**tomographie** Technique d'imagerie permettant de reconstruire le volume d'un objet à partir d'une série de mesures effectuées depuis l'extérieur de cet objet.. 8

**zymogène** Précurseur protéique d'une enzyme : peptide inactif (dépourvu d'activité enzymatique), mais qui peut donner former une enzyme active après activation..



# Liste des symboles

- $\alpha$  Type de radioactivité caractérisée par l'émission d'une particule alpha, un ion  $\text{He}_2^+$ . 9. Position de l'oxygène porté par le carbone anomérique dans la chimie des sucres, alpha indiquant alors un oxygène en position axiale. xiii, 66, 82–85, 89, 90, 103–105, 186, 202.
- $\beta$  Type de radioactivité caractérisée par l'émission d'une particule bêta, un électron (radioactivité  $\beta^-$ ) ou un positron (radioactivité  $\beta^+$ ). 11. Taille du cycle pour les noyaux lactames (4 pour bêta, 5 pour gamma, etc.). ix, xi, xiii, 26, 36, 49, 58, 109, 110, 112–118, 120–123, 125–128, 130–142, 145, 186. Position de l'oxygène porté par le carbone anomérique dans la chimie des sucres, bêta indiquant alors un oxygène en position équatoriale. ix, xi, xiii, xv, xvii, 27, 41, 49, 56–58, 61–63, 66–78, 80–90, 94–98, 100–105, 117, 136, 153, 180, 181, 185–187, 192, 202, 245–249. Position d'un atome vis-à-vis d'un groupe caractéristique, alors situé à deux carbones de distance. 26, 62.
- $\delta$  Déplacement chimique, donné en *parts per million* (ppm), d'un signal issu d'un spectre Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). 191.
- $\gamma$  Type de rayonnements très énergétiques possédant des longueurs d'onde inférieures au picomètre ( $10^{-12}$  m). 9–11, 15, 18, 21. Type de radioactivité caractérisée par l'émission d'un ou plusieurs photons suite à la désexcitation d'un noyau excité, souvent arrivé dans cet état suite à une désintégration  $\alpha$  ou  $\beta$ . 9, 10. Position d'un atome vis-à-vis d'un groupe caractéristique, alors situé à trois carbones de distance. xv, 56.
- $\lambda$  Longueur d'onde : longueur associée à la distance entre deux maxima consécutifs d'une onde monochromatique dans un milieu homogène (périodicité spatiale des oscillations). 17, 19, 47, 53, 54, 69, 71, 130, 131, 149, 154, 155, 163, 165, 192–194, 242, 245, 249, 250

- $\Phi$  Rendement quantique de fluorescence. 241
- $\pi$  Type de liaisons chimiques avec recouvrement latéral des orbitales des atomes impliqués, la notation étant classiquement utilisée pour les liaisons double et triple, et les systèmes conjugués de ces dernières (système  $\pi$ ). 46, 155, 161
- $\sigma$  Section efficace d'un composé pour l'absorption à deux photons. 154

# Introduction





# Introduction

## 1 L'imagerie au service de la médecine

### 1.1 Progrès du domaine médical — la médecine personnalisée

La recherche moderne dans le domaine médical est aujourd'hui portée par plusieurs axes innovants, comme l'utilisation des cellules souches pour la mise au point des nouveaux types de traitements ou encore le développement de méthodes novatrices de diagnostic et d'élaboration de protocoles de soins via la médecine personnalisée.<sup>[1-3]</sup> Cette dernière prône l'adaptation aussi parfaite que possible du traitement au patient ayant une maladie, notamment dans le cas des cancers.<sup>[4]</sup> De nombreux facteurs sont en effet à considérer dans une telle démarche : chaque personne peut répondre d'une manière différente à un certain traitement en fonction de nombreux paramètres, qu'ils soient génétiques (sexe, prédispositions, immunités, etc.) ou environnementaux (âge, qualité de vie, etc.). Une même maladie peut également avoir plusieurs variantes avec des caractéristiques particulières et dont les traitements optimaux seront différents.

Afin de pouvoir déterminer le meilleur moyen de soigner un patient, ou en d'autres termes le bon traitement, pour le bon patient, au bon moment, plusieurs pré-requis sont nécessaires. Tout d'abord, l'utilisation de plus en plus présente de bases de données répertoriant les différentes origines génomiques des maladies ([pharmacogénomique](#)), reliées aux performances des différents médicaments inoculés dans chacun de ces cas.<sup>[5-7]</sup> Néanmoins, une compréhension profonde des mécanismes biologiques mis en jeu par la pathologie semble rester indispensable pour pouvoir proposer une solution efficace. De plus, la détermination des caractéristiques biologiques du patient par différents tests et analyses permet d'anticiper l'efficacité du futur traitement. Enfin, la détection, aussi précoce que possible, de la nature exacte de la maladie est un avantage certain pour la

mise en place des soins adaptés.

L'imagerie médicale, et plus précisément l'imagerie moléculaire, apparaît alors en tant qu'outil indispensable pour le développement de méthodes de traitement toujours plus efficaces.<sup>[8,9]</sup> En effet, la nature moléculaire des caractéristiques biologiques du patient et de sa pathologie font de l'imagerie moléculaire une méthode de choix pour leurs déterminations. On peut, de plus, évoquer la possibilité de suivre l'efficacité du traitement pour continuer son adaptation après le début des soins.

## 1.2 De l'imagerie à l'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire permet la caractérisation et la quantification, au niveau cellulaire et sub-cellulaire et donc moléculaires, des processus biologiques en préservant l'intégrité des organismes.<sup>[10,11]</sup> Son essor au début des années 90 parmi les techniques actuelles de diagnostique et de traitements<sup>[12]</sup>, mais également en tant qu'outil pour la recherche en Science, est le fruit de décennies de progrès dans les larges domaines de l'imagerie médicale<sup>[13,14]</sup> et de la biologie moléculaire.

Historiquement, il était connu depuis la fin des années 40 que des molécules injectées dans un animal pouvaient avoir une répartition bien particulière. Ce constat fut notamment fait avec l'utilisation d'anticorps radiomarqués dont la mesure de la radioactivité, dans différents prélèvements, a permis de connaître la biodistribution de ceux-ci.<sup>[15]</sup> Il ne s'agit alors pas encore d'imagerie moléculaire (un échantillonnage reste nécessaire), mais cet outil fut primordial dans les années 70 avec le développement de la médecine nucléaire (voir section 1.3.2, p. 9). L'injection d'agent de contraste à base d'atomes lourds radioactifs permettait l'observation de certaines structures anatomiques mais des techniques de marquages plus spécifiques, voire moléculaires, étaient alors désirées.

Un des premiers exemples concrets d'imagerie moléculaire remonte à 1974 où la première observation *in vivo* (hamster) d'anticorps radiomarqués, spécifiques d'un type de tumeur humaine, fut réalisée par "photoscan", prémices de la méthode SPECT.<sup>[16]</sup> Dans les années 80, les méthodes s'améliorent avec le renfort de la biologie moléculaire. On peut citer l'utilisation du couple biotine/streptavidine pour augmenter l'affinité entre agent de marquage et anticorps.<sup>[17]</sup> Il est alors possible de réaliser le radiomarquage dans un deuxième temps, après une première injection des anticorps spécifiques, ces derniers ayant l'inconvénient d'être trop lentement éliminés du système sanguin entraînant alors

un fort bruit de fond. Les années 90 voient quant à elles le perfectionnement de ces méthodes et les premières images d'expression d'un gène d'intérêt.<sup>[18]</sup>

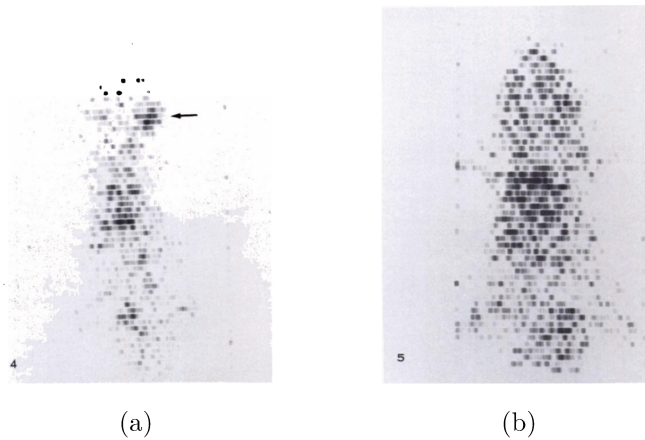


FIGURE 1 – Imagerie par *photoscan* de hamster avec une tumeur humaine greffée dans la joue, (a) avec utilisation d'anticorps radiomarqués spécifiques de la tumeur (pointée par une flèche), et (b) avec anticorps non spécifiques.<sup>[16]</sup>

En parallèle, des méthodes utilisant l'imagerie optique (voir section 1.4, p. 17) voient également le jour pour la localisation d'expression de gènes ou d'activités enzymatiques. Un des premiers exemples *in vivo*, en 1986, montre la possibilité d'observer la distribution spatiale d'une protéine (la luciférase) dans un organisme vivant (plante) grâce à la chimioluminescence (voir section 1.4, p. 17) lorsque la protéine, ou plutôt l'enzyme, est en présence de ces substrats naturels (ATP et luciférine).<sup>[19]</sup> Les premières applications sur animaux vivants n'apparaissent que dans les années 90 avec l'avènement de l'utilisation des protéines fluorescentes permettant la visualisation sans ajout de substrats exogènes de l'expression d'un gène d'intérêt.<sup>[20]</sup>

Comme on peut le voir à travers ces exemples historiques, la réelle différence entre imagerie et imagerie moléculaire est l'observation dans un organisme intact de biomarqueurs moléculaires. Ceux-ci permettent ainsi d'ajouter un paramètre moléculaire à l'imagerie, qui n'observe alors plus uniquement des structures anatomiques (différences entre tissus, présence de fractures, etc.) mais bien la présence ou l'absence d'une molécule (famille de molécules) ou même l'interaction de plusieurs biomolécules (colocalisation). Le contexte d'organisme vivant permet, lui, de ne pas perturber l'étude en ayant recours à des techniques *ex vivo* (culture cellulaire par exemple). De plus, dans le cas du diagnostic précoce de maladie par observation/détection de biomarqueurs moléculaires de la maladie (avant apparition de ces symptômes), le besoin de réaliser l'imagerie sur l'organisme vivant est évident.

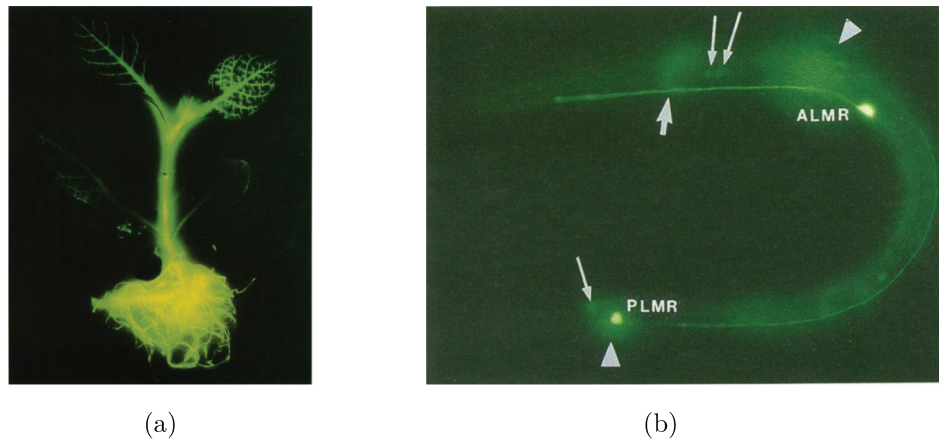


FIGURE 2 – Illustrations des premiers exemple d'imagerie moléculaire sur, (a) : végétaux transgéniques possédant une activité luciférase, une enzyme produisant de la chimioluminescence en présence de ces substrats (voir section 1.4, p. 17)<sup>[19]</sup>, et (b) : une des toutes premières études d'observation *in vivo* d'expression de gènes via l'utilisation de protéines fluorescentes synthétisées par l'organisme étudié, ici une larve de *C. elegans*.<sup>[20]</sup>

La formalisation de l'imagerie moléculaire arrive donc avec le développement de plus en plus rapide de ces méthodes à la fin des années 90, plusieurs revues décrivant alors ce "nouvel âge de l'imagerie".<sup>[21,22]</sup> Les progrès dans ce domaine continuent encore aujourd'hui, par le développement de nouvelles techniques, telle l'imagerie photo-acoustique (voir section 1.3.4, p. 15), ou le développement de nouvelles applications des techniques existantes, notamment dans le cadre de l'oncologie.<sup>[23]</sup> De nombreuses modalités d'imagerie permettent en effet l'observation *in vivo* de processus moléculaires, celles-ci seront décrites dans la prochaine section. Il est important de noter ici que, même si l'imagerie moléculaire se restreint normalement à un cadre *in vivo*, la mise au point de ces méthodes innovantes nécessitent une élaboration et des optimisations dans un contexte *in vitro* (sur cultures cellulaires par exemple, fixées ou non). Ces mises au point font donc également partie du champ de la recherche en imagerie moléculaire.

## 1.3 Différentes modalités d'imagerie moléculaire

### 1.3.1 Imagerie par rayons X et tomographie

La découverte des rayons X, et avec eux de l'imagerie par ces derniers, par Wilhelm Röntgen en 1895 est souvent citée comme point de départ de l'imagerie médicale.<sup>[24,25]</sup> À l'époque, il s'agit alors de la première méthode permettant l'observation de détails

anatomiques sans avoir recours à l'ouverture physique du corps. Son principe est basé sur la variation d'absorption de ces rayons X par les différentes parties du corps. Leurs hautes énergies leur permettent de traverser aisément les parties du corps peu denses (les tissus mous) alors que d'autres parties plus denses en absorbent une grande partie (les os par exemple). Ces différences peuvent alors être observées sur un écran photosensible, présentant dans ces conditions un contraste entre zones plus ou moins irradiées. C'est le principe de la radiographie.<sup>[26]</sup> Cette découverte vaudra à Wilhelm Röntgen le premier prix Nobel de Physique en 1901.

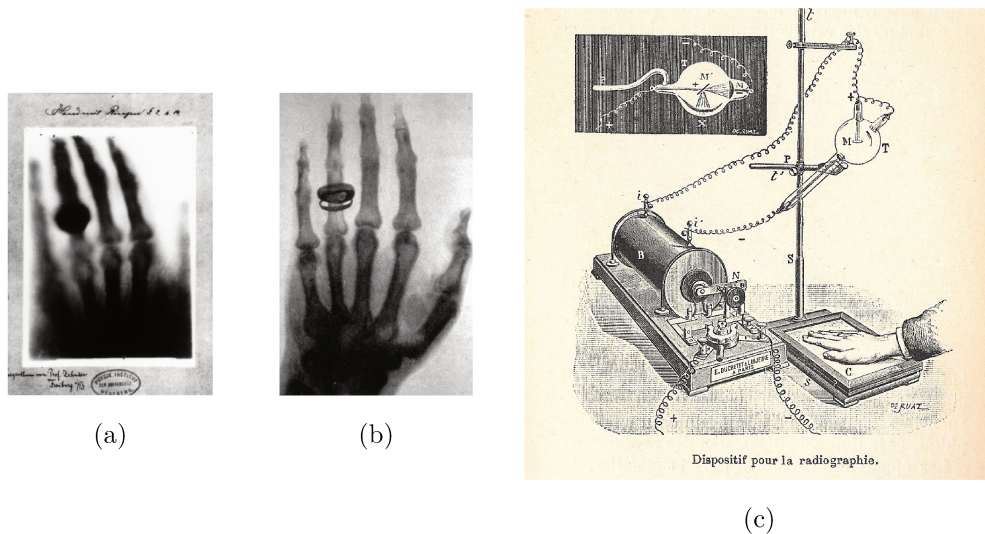


FIGURE 3 – Illustration (a) de la première radiographie (1895) réalisée par Wilhelm Röntgen, (b) d'une autre radiographie (1896) où la bague est encore davantage visible et (c) du dispositif initial de prise d'image.

Preuve de la nécessité de telles méthodes d'imagerie, les premiers centres de radiographie ouvrent dès 1896, quelques mois à peine après la découverte de Röntgen.<sup>[27]</sup> S'en suit alors une très forte popularisation de la méthode, au point de devenir un loisir en tant que nouveau type de photographie.<sup>[28]</sup> La découverte de la dangerosité de l'exposition répétée à de tels rayonnements mit un frein à son utilisation récréative mais la technique est toujours très utilisée de nos jours, par exemple pour la détection de fracture (plus communément appelée "radio").

Au début des années 70, avec l'arrivée d'ordinateurs assez puissants (pour l'époque), une évolution à la radiographie est apparue : la tomодensitométrie, tomographie axiale calculée par ordinateur, ou *Computed Tomography* (CT)), ou encore communément "scanner" (CT-scan).<sup>[29]</sup> L'idée est ici de réaliser de nombreux clichés radiographiques d'une même zone avec différents angles et de reconstruire numériquement une image



2D ou 3D de la zone étudiée.<sup>[30]</sup> Les avantages sont alors multiples, on peut citer notamment un gain important en résolution (la visualisation de milieux ayant des densités très proches est alors possible), mais également l'absence de la superposition d'images de structures situées en dehors de la zone d'intérêt. La reconstruction 3D permet une bien meilleure visualisation de la zone d'étude, une représentation en couches successives selon divers axes est aussi un moyen courant de présentation (on retrouve ainsi l'étymologie du mot **tomographie**, du grec *tomós* : "coupure", donnant "représentation en coupe"). Il faut tout de même souligner l'exposition à de plus grandes quantités de radiations qu'une simple radiographie, son utilisation doit donc être justifiée par un réel besoin d'information que cette dernière ne pourrait pas fournir.

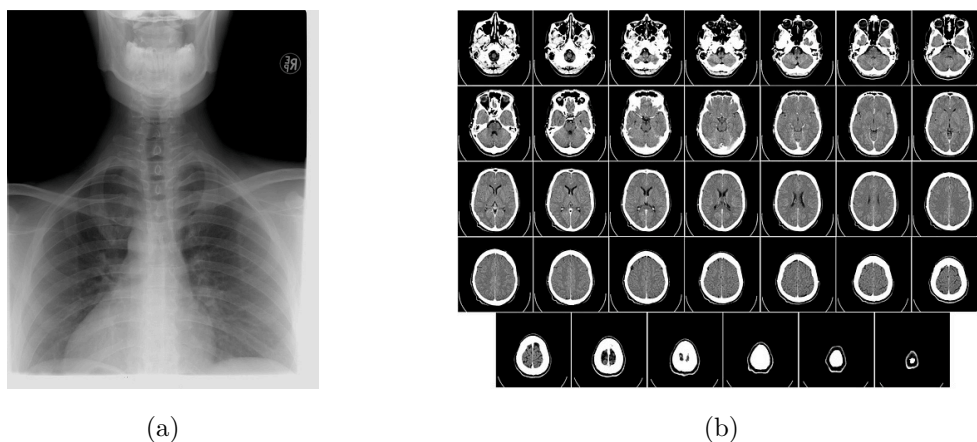


FIGURE 4 – Illustration (a) d'une radiographie et (b) d'un scanner.

La tomodensitométrie consiste davantage en une méthode de traitement des images appliquée à l'imagerie aux rayons X, qu'une nouvelle modalité d'imagerie. La description théorique derrière cette reconstruction remonte par ailleurs à 1917 mais l'absence de machines de calcul suffisamment puissantes n'a permis sa réelle application qu'autour de 1970. La mise au point de cette technique a, par ailleurs, valu un prix Nobel à Godfrey Newbold Hounsfield et Allan MacLeod Cormack (prix Nobel de Physiologie ou Médecine 1979). Historiquement, la tomodensitométrie est liée à l'imagerie par rayons X, mais d'autres modalités d'imagerie ont également utilisé de telles méthodes pour améliorer la qualité de leurs images ("méthodes tomographiques"), telles l'imagerie nucléaire ou encore l'**Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)**, qui seront présentées par la suite (sections 1.3.2, p. 9 et 1.3.3, p. 13).

Pour ces deux premières modalités, il est possible d'obtenir une certaine information spatiale à l'aide d'injection d'un produit de contraste présentant une très forte absorption des rayons X. Mais aucun ne présente un ciblage moléculairement actif, il n'est

en d'autres termes pas possible de réaliser de l'imagerie moléculaire avec ces dernières. Néanmoins, elles sont couramment utilisées de nos jours en parallèle d'autres modalités d'imagerie moléculaire pour la facilité d'obtention de structures anatomiques, fournissant ainsi un "fond de carte" de l'organisme étudié, qui viendra alors être complété par une autre modalité avec des informations plus localisées.

### 1.3.2 Médecine nucléaire : scintigraphie, PET, SPECT

Si le point de départ des méthodes radiographiques est la découverte des rayons X, celui de la médecine nucléaire, et des méthodes d'imagerie liées, serait la découverte des phénomènes de radioactivité.<sup>[31]</sup> On peut notamment citer la découverte de la radioactivité naturelle par Becquerel en 1896<sup>[32]</sup>, la découverte de deux éléments naturellement radioactifs (le polonium et le radium) par Pierre et Marie Curie en 1898<sup>[33]</sup>, celle de la nature des rayonnements radioactifs par Rutherford et Soddy en 1902<sup>[34]</sup>, et enfin celle de la transmutation d'éléments induits par bombardement de particules  $\alpha$ , également par Rutherford en 1919.<sup>[35]</sup> Cette possible transmutation fut plus tard prouvée d'un point de vue chimique par Frédéric et Irène Joliot-Curie avec leur découverte de la radioactivité artificielle avec la production des premiers radioisotopes, le  $^{30}\text{P}$  et le  $^{13}\text{N}$ .<sup>[36]</sup>

Mais le domaine de la médecine nucléaire est intimement lié à la notion de (radio)traceurs, molécule injectée dans le corps, possédant, ou non, une sélectivité moléculaire (on parle alors de radioligand dans le premier cas), mais toujours radioactivement marquée par l'incorporation d'un élément radioactif dans sa structure. Cette notion fut mise au point par George de Hevezy (souvent considéré comme le père de la médecine nucléaire) dès 1913, avec la première observation de la répartition d'un isotope de plomb dans une plante.<sup>[37]</sup> Freinée tout d'abord par la toxicité de tels radio-traceurs, la découverte d'Irène et Frédéric Joliot-Curie relança le développement de la méthode. Il est alors possible de "créer" de la radioactivité dans des éléments couramment utilisés par le Vivant et non plus des métaux lourds, toxiques. La désintégration des ces éléments radioactifs s'accompagne le plus souvent d'une émission de rayons  $\gamma$  (on parle dans ce cas de radioactivité  $\gamma$ ). Ces rayons de très haute énergie et donc très pénétrants, peuvent ainsi être détectés à l'extérieur de l'organisme étudié.<sup>[38]</sup>

Les premières imageries appliquées apparaissent avec les progrès des méthodes de détection. Ces dernières sont similaires à celles des méthodes radiographiques dans un



premier temps, les rayons X et  $\gamma$  étant de même nature, ils peuvent être détectés de la même manière. La différence entre les deux méthodes est la source de ces photons, externes dans la cas d'une radiographie (imagerie par transmission), interne dans le cas de l'imagerie nucléaire (imagerie d'émission, on parle également d'auto-radiographie). Malheureusement, ces images restaient tout de même de faible qualité. L'arrivée des méthodes de détections scintigraphiques à la fin des années 40 a permis le développement rapide de l'imagerie nucléaire.<sup>[39,40]</sup> L'électricité produite par l'interaction entre les rayonnements  $\gamma$  et un matériau (scintillateur) permet alors une détection bien plus fine de ces rayonnements et donc l'obtention d'une meilleure qualité d'image. C'est la méthode qui reste utilisée de nos jours lorsque l'on réalise une scintigraphie, grâce à l'utilisation des gamma-caméras utilisant des scintillateurs.<sup>[41]</sup>

Comme pour l'imagerie par rayons X, des méthodes tomographiques ont également vu le jour à partir de l'imagerie nucléaire. La méthode de tomographie par émission monophotonique, ou *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) est ainsi l'équivalent "tomographique" de la scintigraphie (telle la tomodensitométrie pour la radiographie).<sup>[42]</sup> Elle permet donc l'obtention de vraies informations 3D là où une simple scintigraphie planaire ne suffirait pas. Dans ces deux méthodes, la source de rayons  $\gamma$  est un noyau radioactif  $\gamma$ , qui émet directement ces rayonnements par désintégration. Les éléments les plus couramment utilisés sont le technétium  $^{99m}\text{Tc}$ , l'iode  $^{123}\text{I}$  ou encore l'indium  $^{111}\text{In}$ , notamment pour leur long temps de demi-vie (6 h, 13,2 h et 2,8 j respectivement) facilitant ainsi la synthèse des traceurs.

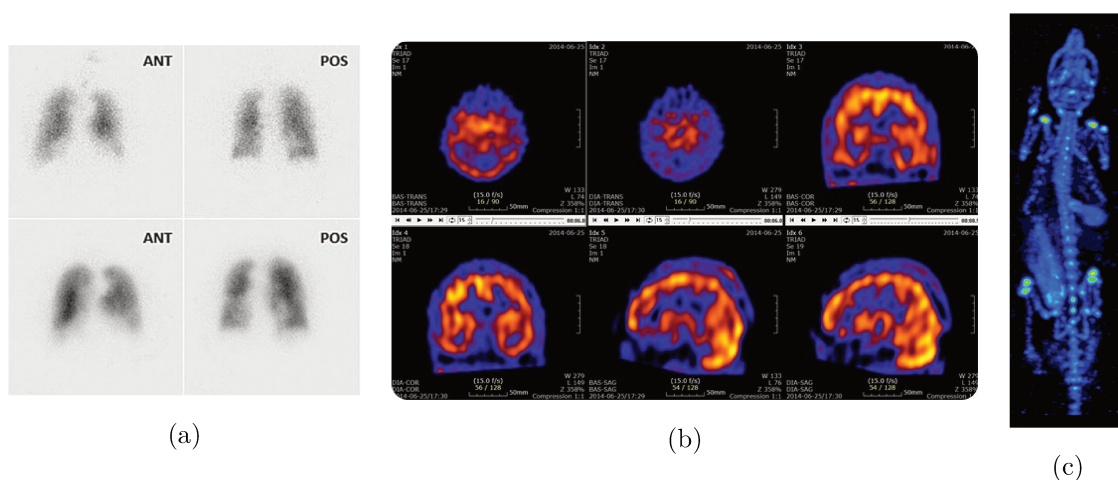


FIGURE 5 – (a) Illustration d'une scintigraphie pulmonaire chez l'Homme<sup>[43]</sup>, illustration de l'imagerie SPECT avec (b) : vue en tranche d'un cerveau humain et (c) vue globale d'une souris.

L'autre modalité très fréquemment utilisée pour l'imagerie moléculaire est la to-

mographie par émission de positons, ou *Positron Emission Tomography* (PET) [44,45], similaire à la SPECT dans la méthode de détection (rayons  $\gamma$ ), la source de ces rayons est ici différente. En effet, la PET utilise des noyaux radioactifs  $\beta^+$ , émetteurs de positons (ou positrons), l'antiparticule de l'électron chargée positivement. Ces positons, après un libre parcours moyen de l'ordre du millimètre, rencontrent un électron et s'annihilent mutuellement produisant alors l'émission de deux photons  $\gamma$  (511 keV) ayant des directions opposées (voir schéma 6a). [46] Ces photons peuvent alors être détectés de la même manière que la méthode SPECT, à l'aide de gamma-caméras. La détection simultanée des deux photons par deux détecteurs diamétralement opposés permet de localiser très précisément le lieu de l'annihilation (plus que pour un unique photon dans le cas de la SPECT). Les éléments radioactifs couramment utilisés pour la PET sont le fluor  $^{18}\text{F}$  (majoritairement), le carbone  $^{11}\text{C}$ , l'oxygène  $^{15}\text{O}$ , l'azote  $^{13}\text{N}$  ou encore le gallium  $^{68}\text{Ga}$ . [47] L'avantage de la PET est une plus grande précision dans la localisation du radiotraceur, et donc une meilleure résolution du signal. En revanche, les noyaux radioactifs  $\beta^+$  sont plus rares et ont généralement des temps de demi-vie assez courts (110 min pour le  $^{18}\text{F}$  ou 20 min pour le  $^{11}\text{C}$  par exemple), nécessitant leur production par un cyclotron et leur utilisation immédiate ensuite. Le coût d'une telle procédure est donc sensiblement plus élevé.

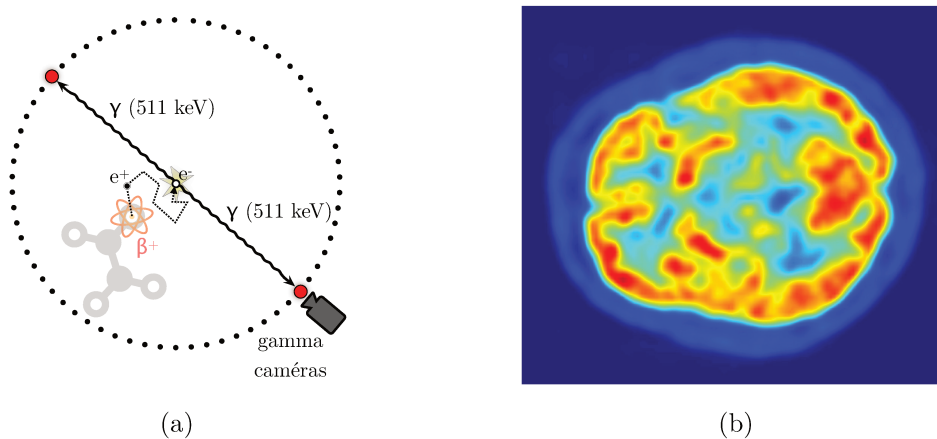


FIGURE 6 – (a) : Schéma du principe de l'imagerie PET et (b) : Illustration de l'imagerie PET d'un cerveau humain.

L'atout majeur de ces méthodes est l'énorme sensibilité qu'elles permettent. Elles peuvent en effet détecter des concentrations en traceurs de l'ordre du nanomolaire. La résolution est en revanche plus faible, entre le millimètre et le centimètre, et la toxicité de la quantité de rayons nécessaires à une acquisition est également à prendre en compte. Les modalités tomographiques (SPECT et PET) nécessitent par ailleurs souvent le couplage avec une autre méthode fournissant des détails anatomiques afin

de pouvoir localiser le signal dans l'organisme. L'association la plus fréquente est le couplage entre **PET** et tomodensitométrie, examen couramment appelé **PET-CT** scan.

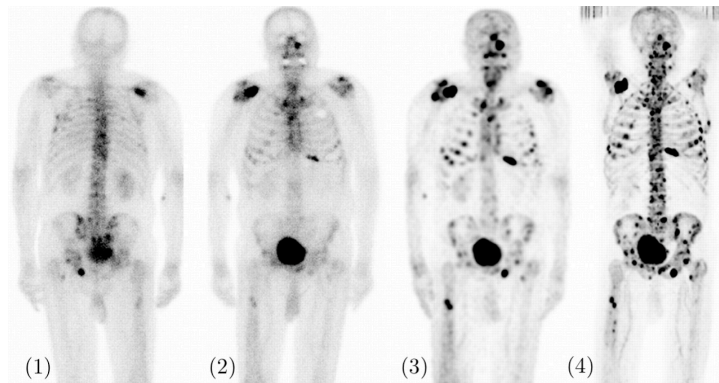


FIGURE 7 – Comparaison des trois principales modalités d'imagerie nucléaire appliquées à la détection de métastases chez un même patient avec (1) et (2) : vue postérieure et antérieure par scintigraphie planaire des os ( $^{99m}\text{Tc}$ ), (3) : équivalent en imagerie par **SPECT** ( $^{99m}\text{Tc}$ ) et (4) : équivalent en imagerie **PET** au  $^{18}\text{F}$ .<sup>[48]</sup> On remarquera le gain en détails par passage d'une méthode à la suivante.

La construction d'agents ciblant utilisant l'imagerie nucléaire comme moyen de détection est basée sur des molécules à deux principales composantes : une partie ciblant amenant la reconnaissance moléculaire et une partie signalante portant le noyau radioactif. Lorsque ce noyau est un métal (cuivre, gallium, technétium, etc.) la partie signalante peut être constituée par un centre chélatant, pouvant alors venir complexer le métal radioactif fraîchement préparé. Toutefois, pour les autres noyaux, une liaison covalente doit être instaurée avec le reste de la molécule. C'est par exemple le cas pour un des radiotraceurs les plus utilisés pour l'imagerie **PET** : le ( $^{18}\text{F}$ )-fluorodésoxyglucose, ou *Fluorodeoxyglucose* (**FDG**). Ce radiotraceur est une réussite pour plusieurs raisons : il s'accumule activement dans les cellules fortement consommatrices en glucoses, notamment les cellules tumorales, il est piégé une fois internalisé dans la cellule par une rapide phosphorylation enzymatique, et ne peut pas non plus réagir par absence de groupement hydroxy en position 2. Le **FDG** a été utilisé pour l'étude des processus biologiques impliquant le glucose<sup>[49]</sup> et pour des analyses oncologiques.<sup>[50]</sup> Pour l'imagerie **SPECT**, le [ $^{123}\text{I}$ ]-FP-CIT est un exemple d'agent ciblant, visant les transporteurs à dopamine pour l'imagerie de neurorécepteurs, notamment dans le cas de la maladie de Parkinson.<sup>[51]</sup>

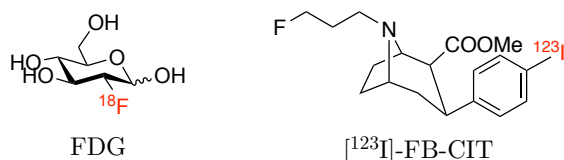


FIGURE 8 – Exemples de radiotraceurs employés par l'imagerie nucléaire, (a) FDG pour la PET et (b) [<sup>123</sup>I]-FP-CIT pour la SPECT.

Dans le contexte de la médecine personnalisée, ces modalités sont très importantes car elles constituent un moyen relativement simple et efficace pour suivre l'évolution spatiale d'un médicament dans le temps, en utilisant une version radiomarquée de ce dernier. Certains traitements utilisent par ailleurs la radioactivité comme "principe actif", on peut ainsi examiner la répartition dans le corps du médicament en cours de mise au point pour vérifier son devenir une fois administré (pharmacocinétique) puis augmenter la proportion en molécules radiomarquées (et donc la radioactivité fournie) afin de passer au traitement en lui-même : on parle alors de radiothérapie ciblée.<sup>[52]</sup>

### 1.3.3 Imagerie par résonance magnétique nucléaire

Une des méthodes d'imagerie les plus connues et développées aujourd'hui est l'IRM.<sup>[53]</sup> Cette modalité d'imagerie ne se base plus sur la détection de rayonnements, comme les précédentes, mais sur le magnétisme des molécules d'eau. L'IRM repose en effet sur le principe de la RMN, utilisée par exemple en chimie organique pour l'analyse de structures moléculaires, et décrite pour la première fois par Felix Bloch et Edward Mills Purcell en 1946. Ce n'est qu'au début des années 70, inspiré par les travaux en tomographie, que Paul Lauterbur réalise la première imagerie grâce à la RMN qu'il nomme alors zeugmatographie<sup>[54]</sup>, appliquée rapidement *in vivo* (souris) en 1974<sup>[55]</sup> puis sur tissu humain en 1975 par Peter Mansfield.<sup>[56]</sup> Les progrès conceptuels et technologiques s'enchaînent ensuite rapidement et les premières machines cliniques rentrent sur le marché au tout début des années 80. En 2003, le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine est attribué à Peter Mansfield et Paul Lauterbur pour "leurs découvertes concernant l'imagerie par résonance magnétique".

La méthode repose donc sur le principe de la RMN : les spins atomiques des atomes contenus dans un échantillon peuvent s'aligner sous l'effet d'un champ magnétique puissant. L'application de champs magnétiques oscillants, plus faibles et également appelés "radiofréquences" vont modifier temporairement l'orientation de ces spins. Une

fois le pulse de radiofréquences terminé, les spins vont alors retourner dans leur position d'origine (phénomène de relaxation), alignés sur le champs magnétique principal, par un mouvement en spirale aussi nommé précession. La vitesse de cette relaxation dépend de l'environnement électronique de l'atome concerné. Lors de l'acquisition d'un spectre RMN, on ne peut regarder qu'un seul type de noyau à la fois (fréquence caractéristique pour chaque noyau). En analyse chimique on regarde par exemple les environnements chimiques des hydrogènes et des carbones (ou fluor, phosphore, etc.) pour remonter à la structure moléculaire étudiée. L'IRM analyse, elle, la relaxation des hydrogènes des molécules d'eau présentes dans le milieu étudié. En effet, selon leur environnement, les molécules d'eau présentes dans un organisme auront des fréquences de précession différentes (graisse ou milieu aqueux, cellules cancéreuse ou non, etc.). L'application de gradients de radiofréquences permet alors de remonter à une information spatiale puis à la reconstruction de l'image.

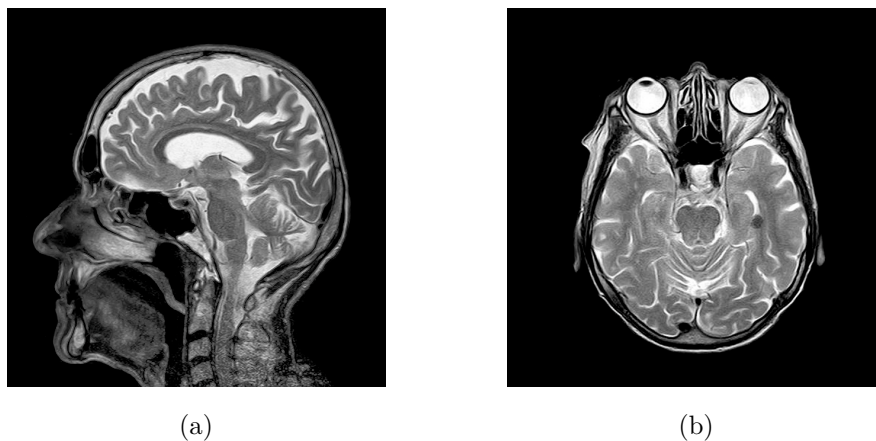


FIGURE 9 – Illustration d'imagerie IRM du crâne avec (a) image en coupe verticale et (b) image en coupe horizontale.

L'observation de structures anatomiques avec une haute résolution est donc possible de manière complètement non-invasive, expliquant la popularisation rapide de la méthode et son utilisation dans tous les hôpitaux encore aujourd'hui. Néanmoins, pour distinguer plusieurs tissus aux propriétés très proches ou encore ceux ne contenant que très peu de molécules d'eau, il est parfois nécessaire d'utiliser des molécules venant augmenter le signal, on parle alors d'agents de contraste. Souvent basés sur des complexes de métaux, notamment de gadolinium (pour son haut spin nucléaire :  $\frac{7}{2}$ )<sup>[57]</sup> mais aussi de manganèse<sup>[58]</sup>, voire de fer<sup>[59]</sup>, la proximité des molécules d'eau de leur sphère de coordination accélère fortement leur temps de relaxation et donc augmente le signal sur le lieu de présence de l'agent de contraste. Si ce dernier est conçu pour avoir en plus une sélectivité moléculaire pour un certain biomarqueur, ou une affinité pour

un certain type de tissus, il est alors possible de réaliser de l'imagerie moléculaire *in vivo* par IRM.<sup>[60]</sup> Le principal inconvénient restant la faible sensibilité de la méthode, nécessitant l'injection de quantités non-négligeables d'agent de contraste, et donc des possibles problèmes de toxicité liés.

Toutefois, de nombreux composés sont disponibles commercialement comme agents de contraste (non ciblant). Il est alors possible d'observer plus facilement les zones fortement irriguées en sang, c'est le cas du très connu Dotarem®. Il existe donc, de plus, des agents ciblant qui présentent (comme pour les traceurs SPECT/PET) une zone ciblant et une zone signalante, on peut par exemple citer le composé **1**, ciblant les récepteurs à progestérone, utilisé notamment pour l'étude des cancers du sein. L'autre principale thématique de recherche de notre équipe est la conception de sondes dites magnétogènes pour lesquelles le signal IRM n'est généré qu'en présence de l'enzyme (ou de l'analyte) cible. Le ciblage est dans ce cas plus importants car "actif", la réactivité d'une enzyme est nécessaire pour développer du signal, détectable ensuite par IRM.<sup>[61,62]</sup>

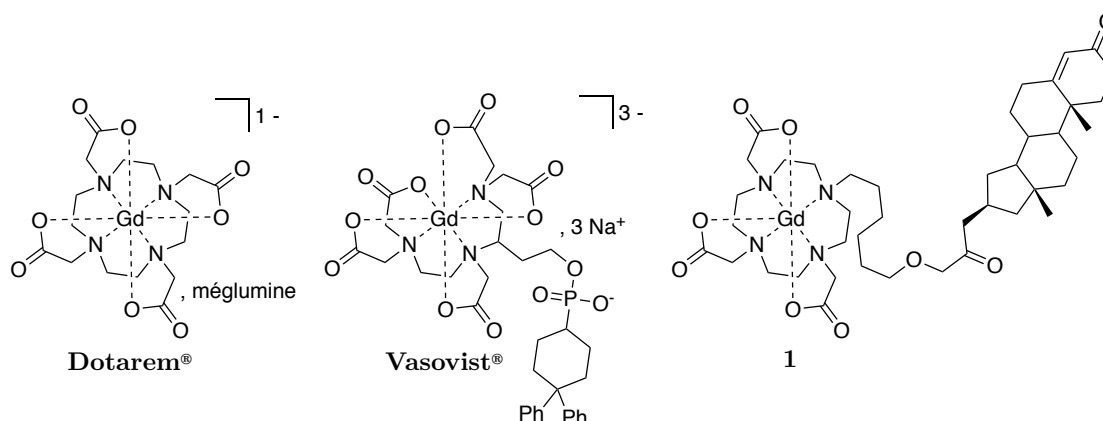


FIGURE 10 – Exemples d'agents ( $T_1$ ) utilisés en IRM et d'un chélate de gadolinium appliqué à l'imagerie moléculaire (ciblage des récepteurs à progestérone, notamment impliqués dans les cancers du sein).<sup>[63]</sup>

### 1.3.4 Autres modalités d'imagerie

**Échographie** Les ondes sonores, bien que beaucoup moins énergétiques que les rayons X ou  $\gamma$ , peuvent également traverser les tissus vivants, qui présentent alors différentes perméabilités. La méthode de création d'image utilise des pulses d'ultrasons en sources sonores. Ces ondes sont alors réfléchies différemment selon les couches atteintes, l'appareil mesure alors ces échos et une image est ensuite créée en utilisant le délai de



retour et l'intensité de l'écho. L'avantage de la méthode est d'être peu coûteuse, avec des équipements facilement transportables et surtout très peu, voire non toxiques ; c'est d'ailleurs pour cela qu'elle est la méthode de choix pour observer un fœtus en développement. Toutefois, l'imagerie moléculaire n'est pas possible avec cette modalité, car il n'existe pas de produit de contraste qui viendrait modifier les propriétés de réflexions des milieux aux ultrasons.

**Imagerie photo-acoustique** L'imagerie photo-acoustique utilise, comme l'échographie, la détection d'ultrasons pour la création d'images, mais ces derniers n'ont pas la même source. L'effet photo-électrique, découvert en 1880 par Alexander Graham Bell<sup>[64]</sup>, explique la production d'ondes sonores par irradiation lumineuse sur un matériau adapté. Adaptée à l'imagerie médicale plus récemment, la méthode se base sur les différences d'absorption des différents milieux biologiques à une excitation par irradiation laser, notamment à cause des variations dans la concentration en hémoglobine et la saturation en dioxygène.<sup>[65]</sup> L'excitation peut également se faire à l'aide d'ondes radios, on parle dans ce cas d'imagerie thermo-acoustique. L'énergie absorbée est alors convertie en chaleur, entraînant une dilatation thermo-élastique transitoire des milieux, créant finalement l'émission d'ondes ultra-sonores. L'imagerie photo-acoustique présente, comme l'échographie, une grande innocuité pour les organismes (ultrasons et laser non-toxiques), avec l'avantage pour la première de pouvoir utiliser des agents de contraste (produits absorbant fortement les irradiations laser, des chromophores donc) afin de réaliser de l'imagerie moléculaire. L'application des méthodes tomographiques est également possible, il s'agit alors de *tomographie photo-acoustique*, ou *Photoacoustic Tomography* (PAT).<sup>[66]</sup>

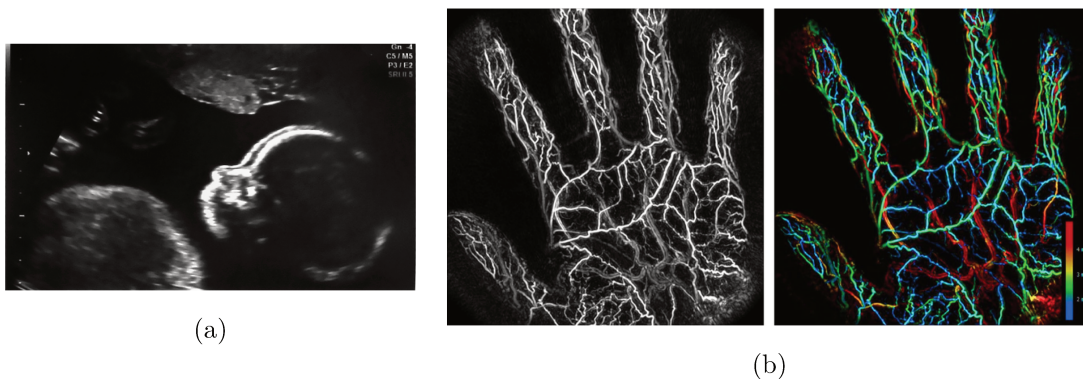


FIGURE 11 – Illustration de (a) : une échographie et (b) imagerie PAT de la vascularisation dans une main humaine, à gauche l'image brute et à droite une visualisation de la profondeur des vaisseaux/artères en fonction de la couleur.<sup>[67]</sup>

L'imagerie photo-acoustique est donc un domaine actif de recherche en imagerie moléculaire, néanmoins les applications visées (*in vivo*) sont fortement affectées par la forte absorbance de la lumière par les milieux biologiques. Il en est de même pour l'imagerie optique, mais cette dernière a l'avantage de l'ancienneté et des nombreuses applications autres qu'*in vivo* où l'imagerie photo-acoustique ne prétend pas concurrencer (microscopie cellulaire, cytométrie, etc.).

## 1.4 L'imagerie optique et comparaison

La dernière modalité d'imagerie couramment utilisée et qui fait l'étude de cette thèse est l'imagerie dite optique.<sup>[68]</sup> Elle est basée sur l'observation des rayons électromagnétiques faisant partie de la gamme des **Rayonnements Ultraviolets (UV)** ( $\lambda \in 10\text{--}400\text{ nm}$ ), du visible ( $\lambda \in 400\text{--}700\text{ nm}$ ) et du proche infrarouge ( $\lambda \in 700\text{--}2000\text{ nm}$ ). Les prémices de cette modalité sont très anciens si l'on considère la microscopie classique, ou même l'examen visuel comme faisant partie de l'imagerie optique. Dans ces deux cas, on observe en effet des photons dans la gamme du visible en provenance de l'échantillon étudié.

L'inspection de structure anatomique par observation de la diffusion de la lumière à travers l'organisme a notamment été une des prémices de l'imagerie optique. Appelée imagerie optique diffuse, cette méthode a vu le jour en 1831 avec une expérience de Richard Bright, qui observa le crâne d'un patient atteint d'hydrocéphalie par illumination avec une bougie. Plus tard, en 1929, Max Cutler observa le sein d'une patiente à l'aide d'une puissante source lumineuse.<sup>[69]</sup> Les vaisseaux sanguins apparaissent nettement grâce aux fortes absorptions de l'hémoglobine et des cytochromes (Figure 12). Malgré certains avantages (peu coûteuse, totalement non toxique), cette méthode fut peu à peu abandonnée à partir des années 1950 avec l'apparition des méthodes de luminescence.

L'imagerie optique consiste donc plus formellement en l'observation de photons issus d'un milieu biologique et produits par luminescence, c'est-à-dire par désexcitation radiative d'un composé, initialement amené à un état excité par différentes sources possibles. Cette source peut être par exemple une réaction chimique, on parle alors de chimioluminescence, si la réaction est enzymatique (comme c'est souvent le cas *in vivo*, on parle de bioluminescence). La source peut également être photonique, le com-



posé est alors excité via irradiation par un (ou plusieurs) photon(s), on parle alors de photoluminescence (fluorescence ou phosphorescence). On pourrait aussi citer l'électroluminescence (source électrique), la radioluminescence (source rayons X ou  $\gamma$ , utilisée pour la radiographie), ou encore la thermoluminescence, la sonoluminescence, ...

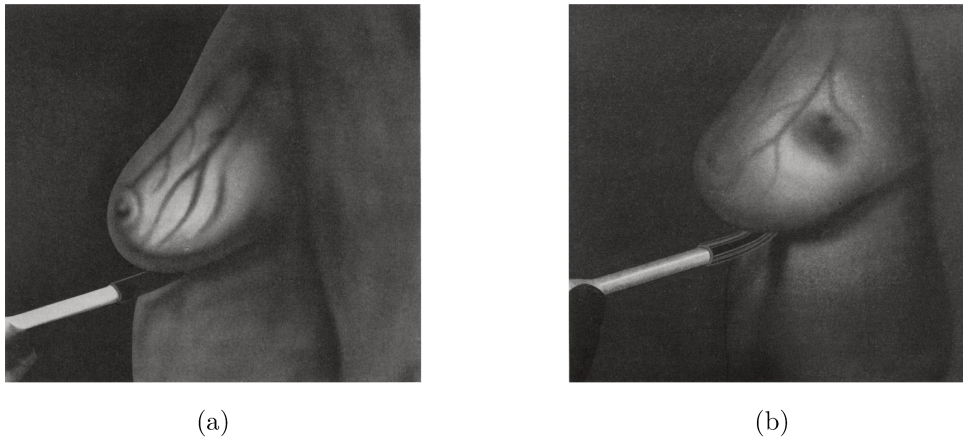


FIGURE 12 – Illustration de transilluminations du sein : observations à l'aide d'une puissante source lumineuse traversant ainsi les tissus, avec (a) : un sein normal et (b) : un sein présentant un hématome. <sup>[69]</sup>

L'examen de tels phénomènes n'est pas récente, la lumière émise par les lucioles la nuit est, en effet, un exemple de bioluminescence naturelle connu depuis des siècles. Les premières observations de fluorescence remontent quant à elles au 16<sup>e</sup> siècle et au médecin espagnol Dr. Nicolás Monardes, également passionné de biologie, qui consigna l'observation d'une opalescence bleutée dans des infusions de bois mexicains qu'il étudiait. <sup>[70]</sup> D'autres constats (notamment sur des minerais de type fluorite ou d'autres extraits de plantes contenant de la chlorophylle) se succédèrent jusqu'au milieu du 19<sup>e</sup> siècle mais sans véritables explications du phénomène. <sup>[71]</sup> C'est finalement Edmond Becquerel puis George Stokes qui donnent des premières rationalisations de la luminescence. <sup>[72,73]</sup> Stokes remarqua notamment qu'une solution contenant de la quinine émettait une lumière bleutée sous certaines conditions d'illuminations, et plus particulièrement sous irradiation UV, qu'il obtenait en diffractant la lumière du soleil, et en plaçant ensuite la solution "au-delà" du violet. <sup>[74]</sup> Les débuts de la compréhension du phénomène de bioluminescence remontent, eux, à la fin du 19<sup>e</sup> siècle grâce au médecin et pharmacien Raphaël Dubois qui découvrit en 1885 que la bioluminescence des lucioles était due à la présence d'une enzyme, la luciférase, et de son substrat, la luciférine, en présence d'oxygène. <sup>[75,76]</sup>

Ces phénomènes de luminescence peuvent être résumés et schématisés par le diagramme Jablonski (Figure 13). Un fluorophore est initialement dans son état fondamental  $S_0$ , l'absorption d'un photon (voir de plusieurs simultanément, et de même énergie), conduit la molécule vers un état excité  $S_n$ , ou plus précisément vers un état vibrationnel excité de ces niveaux. Un premier processus dit de conversion interne (IC) s'opère très rapidement et de manière non-radiative pour amener le fluorophore vers le premier état excité  $S_1$ . Depuis cet état, une désexcitation vers un niveau vibrationnel de l'état fondamental peut avoir lieu. Soit par voie non radiative, par collision intermoléculaire ou PET, soit par voie radiative par l'émission d'un photon : c'est la fluorescence. Une dernière possibilité est le passage vers un état triplet  $T_1$ , par conversion intersystème, ou *Intersystem Crossing* (ISC). Normalement interdite par les règles de la mécanique quantique, cette conversion est longue à l'échelle de ces transitions, et l'émission de photons depuis ce nouvel état est appelé phosphorescence.

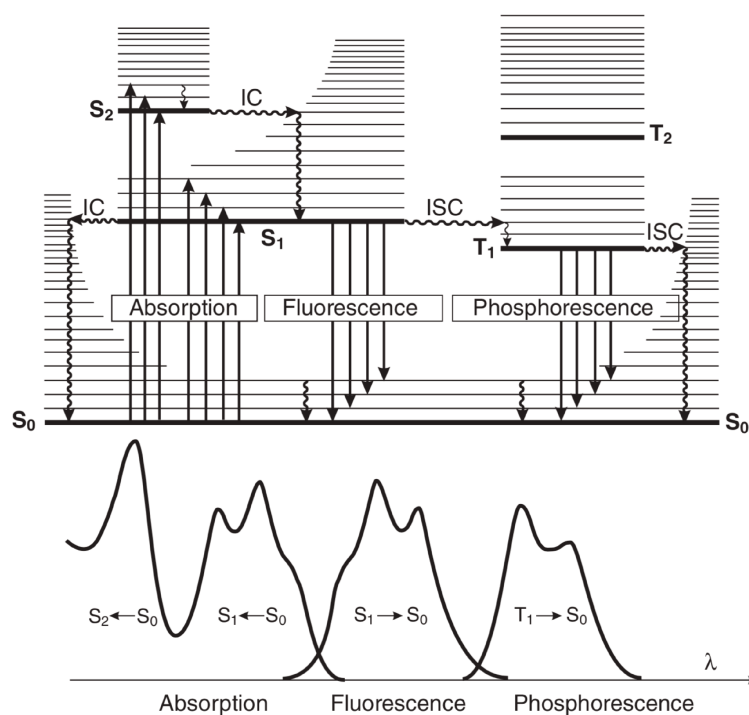


FIGURE 13 – Diagramme de Perrin-Jablonski avec, en bas, une illustration des spectres correspondants aux différents processus. [77]

Un fluorophore peut être décrit par de nombreux paramètres découlants de ces transitions : la longueur d'onde maximale d'excitation  $\lambda_{ex}$ , la longueur d'onde maximale d'émission  $\lambda_{em}$ , le déplacement de Stokes (différence énergétique entre ces deux maximums), le rendement quantique de fluorescence  $\Phi$  (ratio photons émis/photon absorbés), le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$ , la brillance (produit de  $\Phi$  et  $\epsilon$ ) ou encore le temps de vie de l'état excité  $\tau$ .

L'imagerie optique est donc l'observation de fluorescence ou de chimio/bio luminescence dans l'organisme d'étude. Certains composants présents dans les tissus vivants présentent par ailleurs des propriétés de fluorescence, on parle alors d'auto-fluorescence. On peut notamment citer les acides aminés aromatiques (surtout le tryptophane), les flavines, les pigments lipidiques ou bien le NADPH.<sup>[78]</sup> Ce type d'émission peut être directement utilisé pour visualiser certains processus par observation des modifications de répartitions de ces fluorophores naturellement présents, les zones à forte teneur protéiques telles le collagène et l'élastine s'y prêtent d'ailleurs particulièrement.<sup>[79]</sup> En revanche, lors de l'étude de luminophores non-endogènes, cette auto-fluorescence peut venir gêner l'observation, c'est donc un phénomène à considérer lors d'une étude par imagerie optique.<sup>[80]</sup>

Plusieurs solutions s'offrent alors pour amener ou créer cette luminescence artificielle. La synthèse des premiers fluorophores remonte à la fin du 19<sup>e</sup> siècle (synthèse de la fluorescéine par Adolph von Baeyer en 1871) mais leur utilisation en microscopie par fluorescence ne débute qu'autour du milieu de 20<sup>e</sup> siècle. De nombreux fluorophores ont par la suite été développés pour diverses propriétés de luminescence (longueur d'onde d'émission, intensité du signal, ...) ou de localisation dans l'organisme (seulement dans le système sanguin, ou dans certains compartiments sub-cellulaires comme les noyaux ou les mitochondries par exemple).<sup>[81,82]</sup>

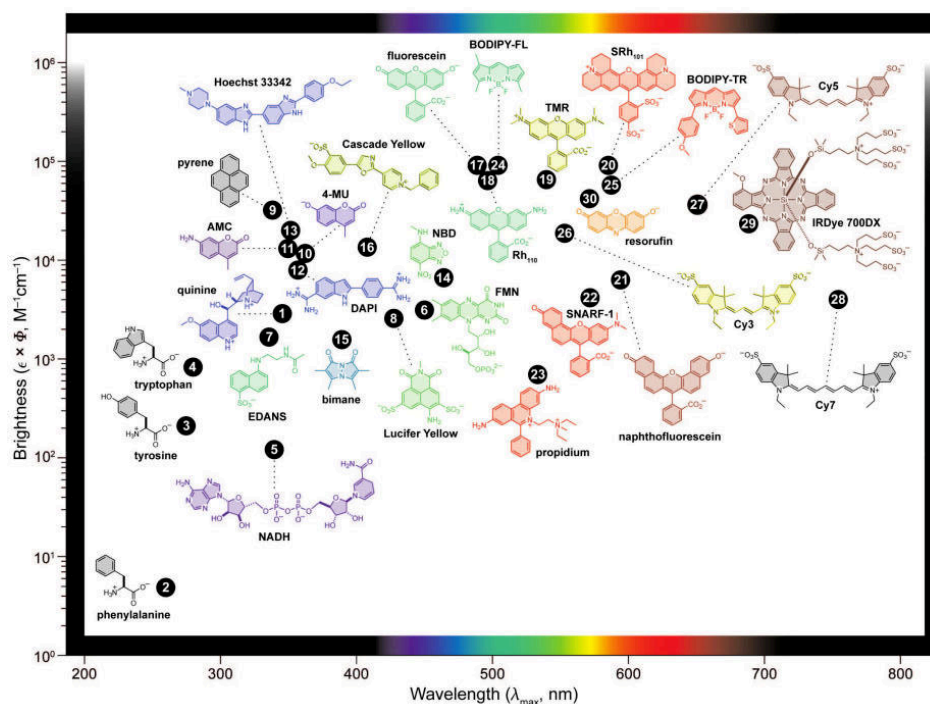


FIGURE 14 – Tableau comparatif de différents fluorophores usuels.<sup>[81]</sup>

Par la suite, la découverte de la *protéine verte fluorescente*, ou *Green Fluorescent Protein* (GFP), extraite d'une espèce de méduse appelée *Aequorea Victoria* et étudiée par Osamu Shimomura<sup>[83,84]</sup>, a énormément accéléré les études faites par fluorescence. En effet, la simplicité de création du signal luminescent par l'encodage génétique des protéines fluorescentes dérivées de la GFP permet la production du fluorophore directement par la machinerie cellulaire de l'organisme ou des cellules étudiées.<sup>[20,85]</sup> On s'évite ainsi les étapes de synthèses chimiques et les problèmes éventuels d'administration. Par la suite, de nombreux variants ont été développés par ingénierie génétique.<sup>[86,87]</sup> Les mêmes solutions se développent également en utilisant la chimio- et bio-luminescence, grâce à des chimioluminophores artificiels (comme les 1,2-dioxétanes) ou naturels (couple luciférine/luciférase).<sup>[88,89]</sup>

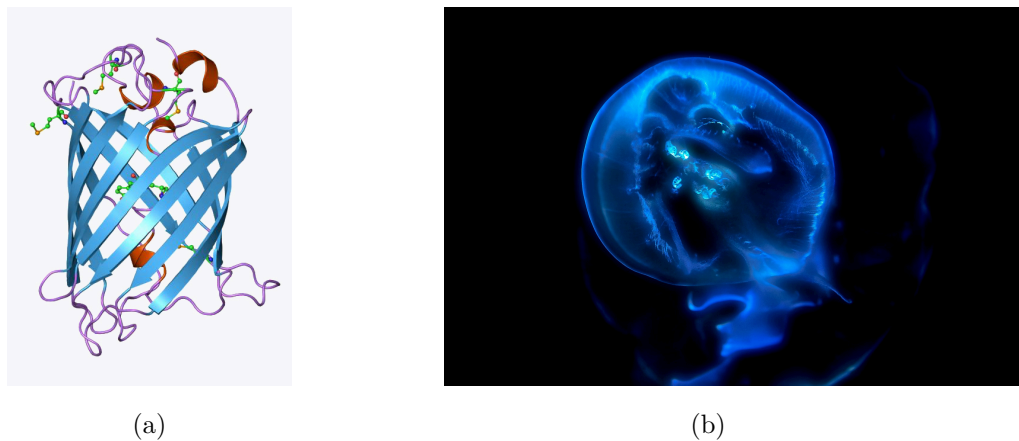


FIGURE 15 – (a) : Structure de la GFP avec le tonneau bêta protégeant le fluorophore en son centre, et (b) photo du spécimen de méduse *Aequorea Victoria* dont est issue la GFP.

L'émission lumineuse ainsi obtenue peut alors être observée par différents appareils, généralement toujours basés sur le principe de la microscopie, auquel peuvent venir se greffer différents lasers, filtres et autres composants optiques venant affiner l'observation. Les principaux avantages de ces méthodes sont l'absence de toxicité des rayons lumineux (contrairement aux rayons X ou  $\gamma$ ), un coût d'utilisation assez réduit, une bonne sensibilité (intermédiaire entre l'IRM peu sensible et les méthodes nucléaires très sensibles), et une haute résolution du signal (notamment avec les méthodes d'imagerie super-résolution qui ont fait l'objet du prix Nobel de Chimie 2014). La possibilité d'observer au même moment plusieurs signaux différents (expérience en *multiplexing*) est un autre avantage notable.<sup>[90]</sup>

En revanche, le principal frein au développement de ces techniques pour des applications cliniques est la mauvaise pénétration des rayons lumineux à travers des

tissus biologiques. En effet, plusieurs raisons peuvent expliquer cette observation. Tout d'abord, de nombreux composés, colorés, absorbent les rayonnements lumineux dans le visible, diminuant ainsi très rapidement l'intensité d'un signal devant traverser un nombre important de couches de tissus.<sup>[91]</sup> Ensuite, le corps est loin d'être un milieu homogène, le passage des rayons lumineux d'un milieu d'une certaine densité à un autre génère des phénomènes de réflexion et de diffraction entraînant une diffusion du signal.<sup>[92]</sup> Cette dernière est d'ailleurs la limitation principale, notamment lorsqu'on se place dans une gamme de longueurs d'onde moins absorbée par les tissus (voir section III.1.1, p. 146).<sup>[91]</sup>

C'est cette modalité d'imagerie optique appliquée à l'imagerie moléculaire qui constitue la thématique de recherche globale de cette thèse. Plus précisément de nouveaux outils d'imagerie moléculaire par fluorescence ont été développés dans un même but : la détection d'activités enzymatiques, qui font l'objet de la prochaine section.

## 2 Les enzymes – pourquoi et comment les détecter

### 2.1 Des outils indispensables

Avant de présenter l'intérêt et les outils pour détecter des enzymes, ou leurs activités, il convient tout d'abord de revenir sur le principe d'enzyme. Les enzymes sont des protéines, des macromolécules polymères d'acides aminés, possédant une activité catalytique. En effet, une grande partie des réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes, ou leurs équivalents acides nucléiques : les ribozymes.<sup>[93]</sup> Tel un catalyseur utilisé classiquement en synthèse chimique, les enzymes accélèrent des réactions chimiques en abaissant des barrières d'activation, elles sont également régénérées après la réaction : propriété caractéristique des catalyseurs.<sup>[94]</sup> Les différents types de réactions qu'elles peuvent accélérer sont assez variées et regroupées par familles. On retrouve par exemple la famille des oxydoréductases, catalysant comme leur nom l'indique des réactions d'oxydo-réduction, ou encore les hydrolases catalysant des hydrolyses, les transférases des réactions de transfert d'un groupement d'une molécule vers une autre (un phosphate par exemple) et plus récemment : la famille des translocases.<sup>[95,96]</sup>

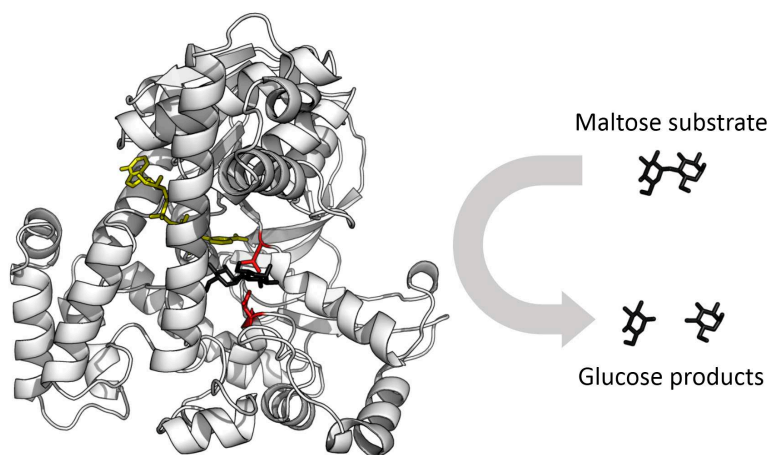


FIGURE 16 – Illustration d'une enzyme et réaction liée (Crédit : Thomas Shafee, sans modification, sous licence [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)).

Les enzymes sont donc des outils chimiques ultra-polyvalents par la variété d'activités qu'elles proposent, mais qui possèdent parallèlement une relativement forte sélectivité. Chacune possède en effet un ou des substrats bien particulier(s), et n'est en général capable de réaliser qu'une seule transformation. Cette propriété de sélectivité est amenée par la complexité structurale de telles molécules. Les enzymes sont de longues chaînes d'acides aminés (ou résidus) dont le repliement dans l'espace consti-



tuant sa structure dite tertiaire entraîne une grande affinité pour son ou ses substrat(s,) notamment au lieu où se produit la réaction enzymatique qu'on nomme communément le site actif ou bien la poche enzymatique.<sup>[97]</sup> La véritable réaction chimique est ainsi réalisée par un tout petit nombre d'acides aminés (entre 2 et 4 généralement) composant le site catalytique, à comparer aux quelques dizaines voire centaines de résidus composant les enzymes (de 62 par exemple pour la 4-oxalocrotonate tautomérase<sup>[98]</sup> à plus de 2000 pour l'acide gras synthase<sup>[99]</sup>).

On comprend dès lors l'intérêt d'étudier ces outils indispensables au Vivant. Les mécanismes de catalyse sont très complexes et dépendent de beaucoup de facteurs, physiques ou chimiques. La température par exemple accélère les réactions enzymatiques jusqu'à un certain point où la dénaturation, voire la dégradation de l'enzyme affecte sa structure spatiale et donc ses fonctions catalytiques. Certaines enzymes fonctionnent mieux en milieu acide, ou basique ; d'autres nécessitent la présence d'une autre molécule ou atome métallique, non substrat, pour voir apparaître leur fonction catalytique, notamment par modification structurale de la protéine. De plus, la nature des substrats est très variable et peut aller de toutes petites molécules tels le dioxygène, le dioxyde de carbone ou les sucres, à de très grosses macromolécules comme les protéines ou les acides nucléiques (acide désoxyribonucléique, ou *Deoxyribonucleic Acid* (ADN), acide ribonucléique, ou *Ribonucleic Acid* (ARN)).

Les enzymes se retrouvent donc un peu partout, dans les organismes vivants notamment où leurs rôles sont variés. Les processus de lecture de l'information génétique, communs à toutes les espèces vivantes, sont assurés par des enzymes. La digestion des aliments n'est pas seulement mécanique, mais également enzymatique, notamment pour les formes de vie ne disposant pas de réels systèmes digestifs. Des enzymes sont donc capables de couper les grosses macromolécules couramment trouvées dans la nourriture. Les peptidases (ou protéases) sont ainsi capables de dégrader les protéines en acides aminés assimilables. Certaines glycosidases vont pouvoir dégrader les polysaccharides tels l'amidon ou la cellulose en sucre plus élémentaires (glucose dans les deux cas).<sup>[100,101]</sup> Une fois ces briques élémentaires rendues disponibles, de nombreuses enzymes vont alors transformer ces molécules en produits d'intérêts pour l'organisme. Ces voies métaboliques où chaque produit est le substrat d'une nouvelle enzyme constituent un sujet d'étude permanent en biologie, afin d'étendre la compréhension des mécanismes cellulaires.<sup>[102]</sup>

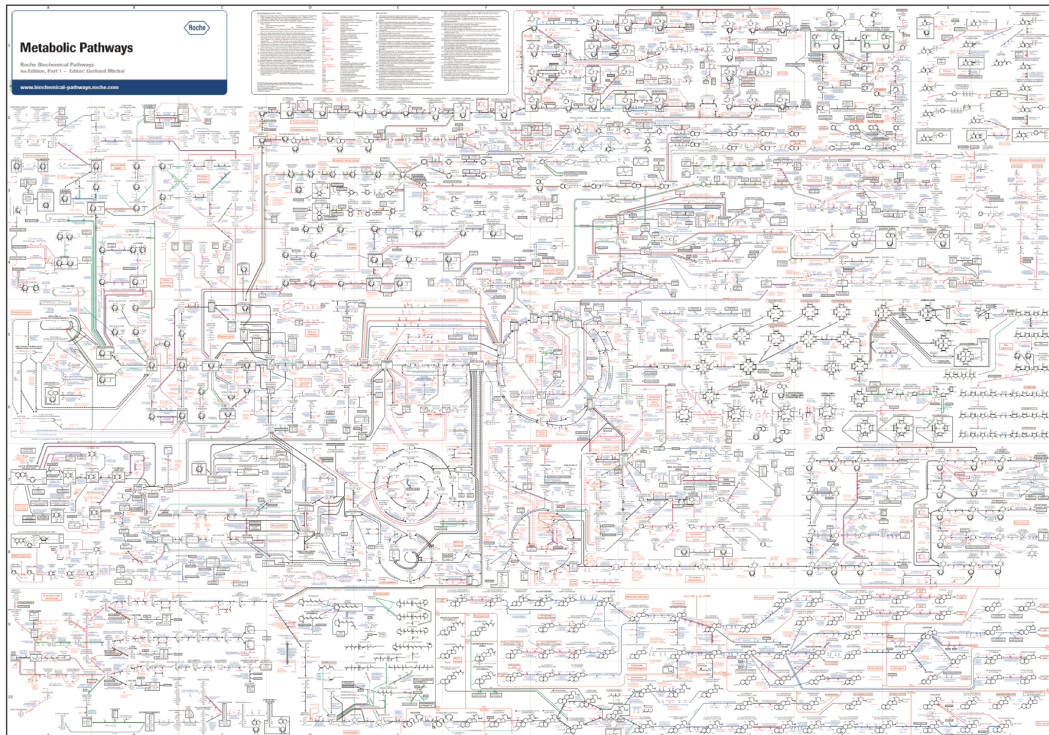


FIGURE 17 – Illustration de la diversité des activités enzymatiques, dans ce schéma (non exhaustif, et illisible à cette échelle) des voies métaboliques humaines. Chaque ligne correspond à une réaction chimique qui pour la quasi-totalité sont catalysées par une enzyme unique (Crédit : Roche, poster des voies biochimiques partie 1).

Plusieurs autres aspects justifient l'intérêt porté aux enzymes. Comme d'autres types de molécules, les enzymes peuvent être des biomarqueurs (moléculaires) de contextes pathologiques. En effet, la sur- ou sous-expression d'une enzyme peut être associée à une certaine pathologie, et la détection de ces variations d'expression peut venir aider le diagnostic.<sup>[103]</sup> Ces variations peuvent être une conséquence mais aussi la cause d'une maladie. L'équilibre chimique du corps (homéostasie) est très facilement dérégulé par l'absence ou la dysfonction d'une seule enzyme comme dans le cas de la maladie de Tay-Sachs, par absence d'une hexosaminidase.<sup>[104]</sup> Contrairement à d'autres types de biomarqueurs (récepteurs cellulaires ou analytes), les enzymes possèdent une activité catalytique, il faut donc séparer la présence d'une enzyme à la présence de son activité.<sup>[105]</sup> Une enzyme peut ainsi être produite dans une forme non active, on parle alors de proenzyme (ou zymogène), une modification post-traductionnelle active alors l'activité enzymatique. C'est le cas par exemple de la chymotrypsine, une puissante peptidase produite dans le pancréas qui ne doit être activée qu'au dernier moment, une fois arrivée dans l'intestin grêle. Pour cela, elle est produite sous une forme inactive appelée chymotrypsinogène et n'est transformée qu'une fois qu'aucun dommage



n'est plus possible (la transformation se fait d'ailleurs par réaction enzymatique).<sup>[106]</sup> Une enzyme peut également être sous forme inactivée par l'absence de son cofacteur, on parle alors d'apoenzyme.

Par ces exemples, on comprend qu'un biomarqueur enzymatique peut être la présence ou l'absence d'une enzyme, ou bien une variation de son activité (augmentation ou diminution).<sup>[107]</sup> La découverte de ces nouveaux biomarqueurs est, par ailleurs, un axe de recherche de la médecine personnalisée permettant une meilleure compréhension des mécanismes des pathologies, une détection précoce et une précieuse aide pour le développement de traitements efficaces.<sup>[108,109]</sup> De nombreux biomarqueurs enzymatiques sont à ce jour déjà identifiés. On peut par exemple citer l'augmentation de l'activité chitinase dans le liquide cérébro-spinal chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer<sup>[110]</sup> ou encore la présence de l'enzyme Lp-PLA<sub>2</sub> (*lipoprotein-associated phospholipase A2*) comme biomarqueur (et cause) de maladies cardiaques coronariennes.<sup>[111]</sup>

Une enzyme, sans être liée à un contexte pathologique, peut également être caractéristique d'un type d'organisme ou d'un organisme en particulier. Un exemple marquant est celui d'un type de bactéries résistantes aux antibiotiques, facilement identifiables par leur production d'enzymes de type  $\beta$ -lactamase (voir chapitre II). On peut aussi citer la présence d'une enzyme, la  $\beta$ -alanyl aminopeptidase, chez une seule espèce de bactérie particulièrement pathogène et résistante : *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>[112,113]</sup>

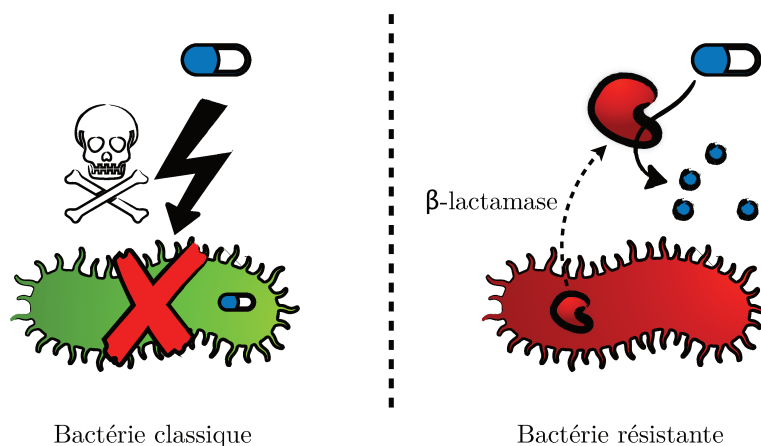


FIGURE 18 – Schéma de résistance bactérienne grâce à la classe d'enzymes  $\beta$ -lactamase.

Au delà de ce rôle de biomarqueur pour certaines pathologies ou organismes, les enzymes sont également devenues des outils courants en biologie. C'est le cas en biologie moléculaire notamment, où les enzymes de restriction<sup>[114]</sup> et les ligases<sup>[115,116]</sup> permettent respectivement de couper ou lier des brins d'ADN. Les technologies de gènes

rapporteurs utilisent également souvent les enzymes en tant que produits observables. Un gène rapporteur est un fragment d'ADN exogène (non présent dans l'organisme étudié), et dont le produit (une protéine) peut être identifié par différentes méthodes. Lorsque ce gène rapporteur est fusionné à un autre gène, l'observation de l'expression du premier permet d'étudier celle du deuxième.<sup>[117]</sup> La fluorescence est souvent utilisée en tant que méthode d'observation par l'utilisation de protéines fluorescentes (voir 1.4, p. 17 ou grâce à des enzymes : le gène rapporteur code alors pour une enzyme dont l'activité est repérable au moyen de sondes fluorescentes (fluorogènes) ou chromogènes.<sup>[118,119]</sup>

Cette méthode est aussi utilisée pour le contrôle de transfections/transformations (introduction de matériel génétique dans une cellule), l'ajout d'un gène rapporteur dans le vecteur d'ADN permet ensuite de confirmer l'incorporation du vecteur par la présence du produit du gène rapporteur. C'est la méthode classiquement utilisée pour la transformation de bactéries sur boîtes de Pétri, par l'observation d'une couleur bleue sur les colonies transformées. Cette couleur étant le résultat de la transformation d'une sonde chromogène (le X-gal) en précipité coloré, convertie par la  $\beta$ -gal, produit du gène rapporteur *lac Z*, initialement ajouté dans le vecteur à insérer (Figure 19).<sup>[120]</sup> Plus récemment, la méthode est également employée pour l'imagerie d'organismes vivants tels la souris ou l'Homme<sup>[121]</sup>, par différentes méthodes de détection allant de la fluorescence à l'imagerie nucléaire.<sup>[122]</sup>

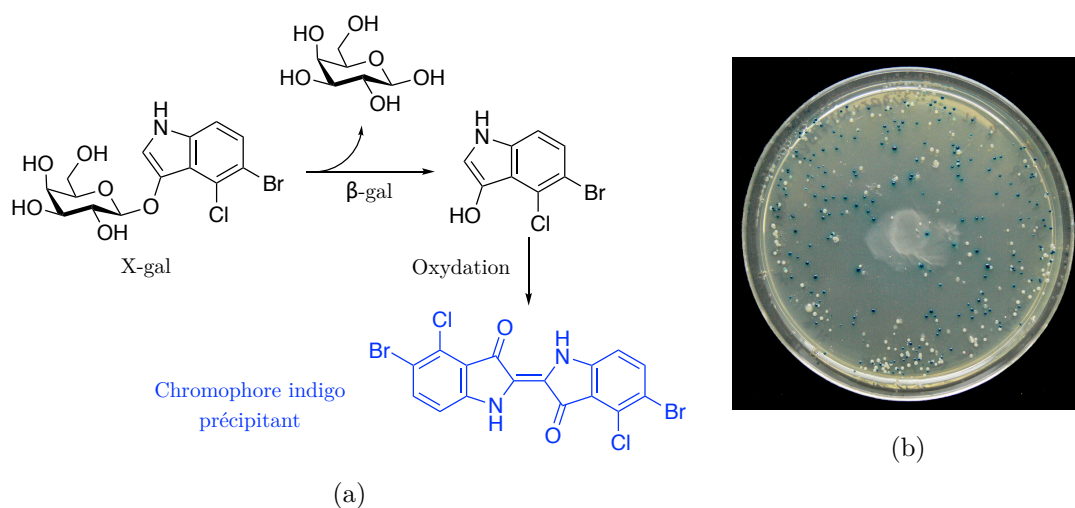


FIGURE 19 – Illustration (a) : du mécanisme de détection de la  $\beta$ -gal par le X-gal, et (b) : de l'identification de souche exprimant la  $\beta$ -gal (colonies bleues) ou non (colonies blanches) (Crédit : Stefan Walkowski, sans modification, sous licence CC BY 4.0).

Le dernier intérêt actuel des enzymes, et économiquement le plus important, est l'utilisation de ces dernières dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'alimentaire par exemple, pour augmenter les goûts grâce à des protéases ou lipases, à réduire les intolérances en détruisant le lactose notamment (lactase) ou certaines protéines allergènes (protéases). En tant que détergent, les enzymes permettent de supprimer de nombreuses classes de molécules comme les protéines, l'amidon ou encore les lipides. Mais de nombreuses autres applications pourraient être citées telles la production de biocarburants par valorisation de la biomasse (cellulase, amylase, xylanase)<sup>[123]</sup>, la maturation de bières (acetolactate decarboxylase)<sup>[124]</sup>, le blanchiment de textiles (laccase) ou à l'inverse, l'arrêt de blanchissement (catalase), ou encore comme agent anti-microbien (peroxydase).<sup>[125]</sup> Un dernier secteur notable est celui de la synthèse organique qui utilise parfois des enzymes pour réaliser certaines transformations avec des gains en terme de chimiosélectivité ou énantiosélectivité, en profitant de l'aspect catalytique et parfois à coûts modérés comparé à l'achat de catalyseurs organométalliques onéreux.<sup>[126,127]</sup>

Pour ces nombreux points, les enzymes constituent un sujet d'études dans des domaines très variés. Il est donc nécessaire d'avoir à sa disposition des méthodes efficaces d'analyse et détection. Un balayage de ces différentes méthodes sera présenté par la suite.

## 2.2 Détecter la présence d'une enzyme

Détecter l'activité d'une enzyme est généralement plus intéressant que de détecter seulement la présence d'une enzyme.<sup>[128]</sup> Néanmoins, la détection et la localisation de protéines est souvent plus simple à mettre en œuvre et à maîtriser que la quantification voire la localisation de l'activité d'une enzyme. Des méthodes existent depuis longtemps pour obtenir de telles informations spatiales.

La plus évidente, et peut-être la plus courante, est la méthode du *western-blot*.<sup>[129,130]</sup> L'échantillon contenant (éventuellement) la protéine d'intérêt subit tout d'abord une dénaturation (perte de la structure tertiaire et quaternaire des protéines), souvent par traitement au dodécylsulfate de sodium, ou *Sodium Dodecylsulfate* (SDS). Le résultat, un mélange de protéines linéarisées avec des charges négatives proportionnelles à leur charge, est alors déposé sur un gel de polyacrylamide. Une migration des protéines selon leur charge globale (donc indirectement selon leur taille) est réalisée grâce à

une électrophorèse. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane généralement en nitrocellulose, avant d'ajouter un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Une fois l'association effectuée, le couple est alors détecté grâce à une méthode parmi plusieurs disponibles.<sup>[131]</sup>

L'anticorps peut être initialement marqué avec un fluorophore ou couplé à une protéine fluorescente. C'est la technique la plus directe mais est souvent plus difficile à mettre en place car la création d'un tel anticorps sans perte de sélectivité est assez ardue. L'alternative couramment utilisée requiert l'utilisation d'un autre anticorps appelé anticorps secondaire, pouvant se lier spécifiquement au premier anticorps dit primaire, lui-même lié à la protéine d'intérêt. Cet anticorps secondaire, générique dans le sens où il peut être utilisé pour se lier à toute une famille d'anticorps primaires ayant chacun leur sélectivité, est repérable par couplage à un fluorophore (grâce à une liaison biotine-streptavidine par exemple), une protéine fluorescente, un fragment radioactif ou une enzyme permettant une détection par colorimétrie ou luminescence (souvent la peroxydase de raifort).<sup>[132]</sup>

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir étudier la présence d'une protéine dans un mélange initial complexe. Elle donne également des informations sur la quantité relative de la protéine dans le mélange, et plus intéressant encore, sur la taille de la protéine, celle-ci ayant pu subir des modifications post-traductionnelles comme une ubiquitination<sup>[133,134]</sup> ou une protéolyse.<sup>[135,136]</sup>

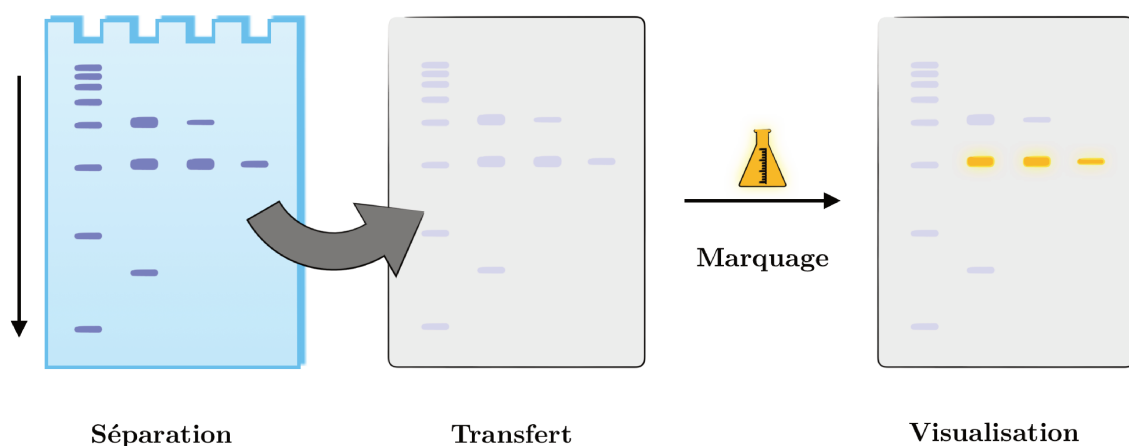


FIGURE 20 – Principe de la méthode *Western blot* : après dénaturation puis migration sur gel, les protéines sont transférées sur une membrane avant d'être révélées par une méthode adéquate, classiquement avec deux anticorps dont le secondaire est lié à un système rapporteur.

Cependant, la répartition spatiale d'une enzyme dans le milieu étudié est également un paramètre important qui ne peut être étudié avec cette méthode de *western blot*, celle-ci étant perdue très tôt dans le protocole. La cartographie d'enzymes dans leur contexte biologique est ainsi un autre défi expérimental. Heureusement, plusieurs méthodes existent afin d'obtenir ce genre d'informations. Parmi celles-ci, deux sont couramment utilisées : l'immunomarquage et l'utilisation de *Tags*. L'immunomarquage — littéralement l'utilisation d'anticorps (*immuno-*) pour le marquage — correspond schématiquement à l'étape de révélation d'un *western blot*, appliquée directement dans le contexte biologique d'étude. Le *western blot* étant en pratique une application d'immunomarquage parmi d'autres. La méthode dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, ou *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)<sup>[137,138]</sup> et autres (micro-)puces à protéines (*protein arrays*)<sup>[139]</sup> par exemple, n'utilisent pas de gel pour séparer les différentes protéines mais plutôt un support solide (le fond d'un puits) recouvert d'anticorps de capture venant immobiliser la protéine d'intérêt. La détection se fait alors par les mêmes méthodes que le *western-blot* à l'aide d'un ou deux autres anticorps.<sup>[140]</sup> Néanmoins, l'information spatiale est ici encore impossible à obtenir.

Pour repérer une enzyme au sein de son contexte biologique grâce à l'immunomarquage, on parle plus couramment d'immunohistochimie, correspondant alors à l'immunomarquage de tissus biologiques au moyen d'anticorps spécifiques. Des coupes de tissus (*histo-*) sont alors "fixées" : l'ajout de composés chimiques (le formaldéhyde notamment) permet la conservation des tissus par immobilisation des biomolécules présentes dans ces derniers, interrompant ainsi tous les processus biologiques en cours avec un minimum de perturbation du système.<sup>[141]</sup> Ensuite, comme pour un *western-blot*, un anticorps spécifique de la protéine/enzyme d'intérêt est ajouté et détecté dans un second temps avec les mêmes méthodes de détection.<sup>[142,143]</sup> L'ensemble des méthodes d'immunomarquage utilisant la fluorescence comme moyen de détection constituent l'immunofluorescence. Bien qu'extrêmement maîtrisées grâce à leur ancienneté, ces méthodes ont tout de même quelques défauts comme le fait de devoir étudier des tissus fixés, donc non-vivants, rendant alors très difficile l'analyse de phénomènes dynamiques. La spécificité des différents anticorps employés est également un problème récurrent et entraîne la possibilité de faux-positifs.

Afin de localiser la présence d'enzyme dans un contexte plus restreint qu'une coupe de tissus parfois complexe à analyser, l'immunocytochimie se différencie de l'immunohistochimie par la nature du système étudié en se restreignant à l'immunomarquage de

cellules (*cyto-*) isolées.<sup>[143]</sup> Ces dernières peuvent être des cellules en culture (adhérentes ou fixées sur un support) pour la détection en tant qu'outil de recherche en biologie, ou également pour l'analyse d'échantillons prélevés sur un organisme vivant à la recherche d'un biomarqueur par exemple. Là-encore, les méthodes de détection restent les mêmes (un ou deux anticorps avec moyens de détection).<sup>[144]</sup> Certaines études parlent d'immunocytochimie *in vivo* mais il s'agit en réalité d'une autre façon de nommer l'immunohistochimie car des coupes de tissus après fixation sont toujours réalisées.<sup>[145]</sup>

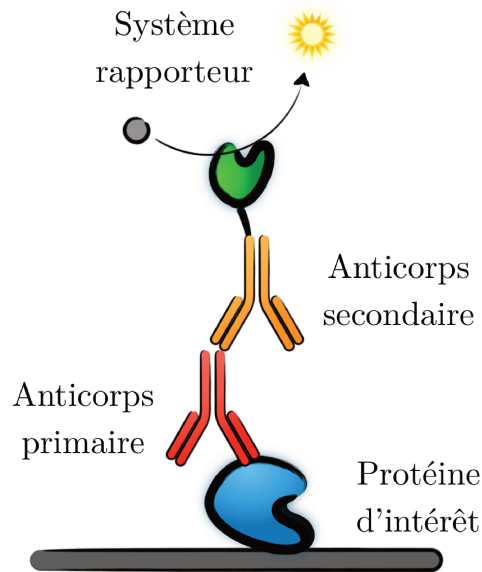


FIGURE 21 – Principe de l'immunomarquage.

La deuxième principale méthode pour la détection de protéines est l'utilisation d'étiquettes, plus communément appelées par leur nom anglais *tags*. Un *tag* est le plus souvent une séquence d'acides aminés (voire d'acides nucléiques dans certains cas, même si cela reste beaucoup plus rare), attachée artificiellement à un objet biologique d'étude, le plus souvent une protéine. L'ajout par modification génétique du gène de la protéine d'intérêt ouvre la voie à plusieurs applications. La première consiste en une aide à la purification d'un mélange protéique complexe : la séquence ajoutée, alors appelée étiquette d'affinité (*affinity tag*) reconnaît spécifiquement une phase stationnaire d'un système chromatographique.<sup>[146]</sup> Le *tag* peut également être ajouté pour ajuster les propriétés physico-chimiques de l'objet d'étude, comme augmenter son hydrosolubilité.<sup>[147]</sup> Toutefois, l'application qui nous intéresse davantage ici est leur utilisation comme outil de marquage.<sup>[148]</sup>

Le marquage de protéines à l'aide de *tags* peut être réalisé par différents moyens. Historiquement, les premiers exemples ont recourus aux protéines fluorescentes : la fusion du gène codant pour la protéine d'intérêt avec celui codant pour une protéine fluorescente permet d'observer directement la présence de la protéine une fois produite, cette dernière étant alors liée à la protéine fluorescente.<sup>[149]</sup> Cependant, leurs propriétés de fluorescence sont parfois modestes (faible émission ou fort photoblanchiment par exemple), l'ajustement des paramètres de tels objets n'étant pas une tâche facile, même si de nombreuses variantes sont maintenant disponibles.<sup>[150]</sup> L'alternative est alors d'utiliser des *tags* protéiques dont la fluorescence est créée dans un second temps, par ajout de molécules organiques fluorescentes ou fluorogènes. La spécificité du marquage est amenée par une réactivité spécifique ou une forte interaction entre la protéine "*tag*" et un motif présent sur le fluorophore/fluorogène. Cette technologie a été développée au début des années 2000 dans l'équipe du Pr Kai Johnsson avec le SNAP-*tag*. La protéine SNAP, dérivée d'une ADN-méthyltransférase, reconnaît spécifiquement le motif  $O^6$ -benzylguanine, se liant de façon covalente à un composé organique portant ce motif. Si ce dernier est un fluorophore, on obtient alors un moyen de marquer à façon une protéine d'intérêt avec un fluorophore au choix dont les propriétés peuvent être aisément ajustées et dont les performances surpasseront probablement celles d'une protéine fluorescente.<sup>[151,152]</sup>

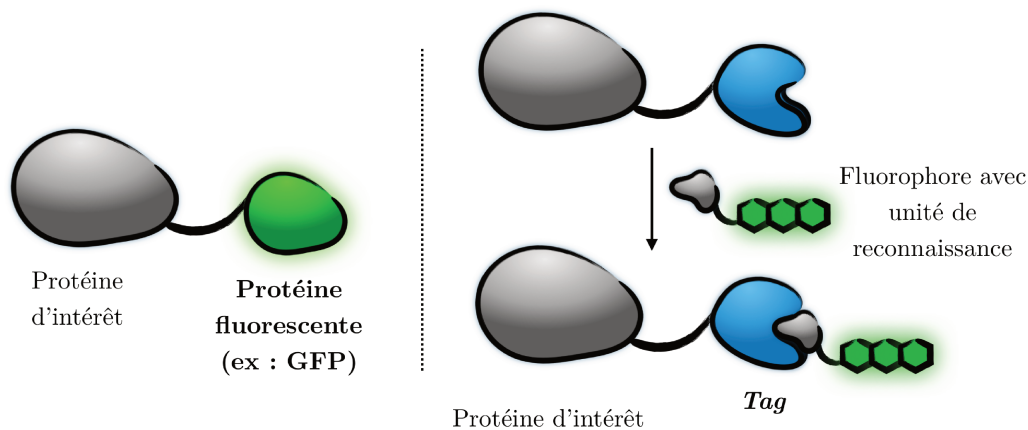


FIGURE 22 – Principe de la localisation d'une protéine d'intérêt par fusion avec une Protéine Fluorescente type GFP ou avec l'utilisation de *Tags*.

D'autres *tags* de ce genre ont ensuite vu le jour, ayant chacun leur motif de reconnaissance particulier et permettant le marquage simultané de deux protéines d'intérêt, chacune fusionnée avec un *tag* différent qui sera étiqueté par des fluorophores discernables.<sup>[153]</sup> Parmi ces *tags*, on peut citer : CLIP-*tag* (motif  $O^6$ -benzylcytosine)<sup>[153]</sup>,



HALO-*tag* (motif chloroalkyle)<sup>[154]</sup> ou PYP-*tag* (motif thioester de l'acide cinnamique.)<sup>[155]</sup> Des systèmes fluorogéniques ont également été développés avec l'utilisation de fluorophores seulement émissifs dans l'environnement particulier de la poche enzymatique (apolaire, restriction de rotation des liaisons) ou encore avec l'utilisation d'extincteur (*quencher*) de fluorescence relargué lors du couplage entre *tag* et fluorophore.<sup>[156–158]</sup> Une liaison non-covalente peut également être envisagée afin d'obtenir un marquage rapide et réversible, et donc très modulable grâce au FAST-*tag* récemment développé.<sup>[159,160]</sup> D'autres méthodes, telle l'utilisation d'acide aminés non naturels, ou encore la ligation assistée par ligand peuvent également être envisagées.<sup>[161]</sup>

Détecter la présence d'une enzyme, donc d'une protéine, peut parfois revenir à détecter l'expression du gène codant pour cette dernière. Une telle expression est caractérisée par la présence de l'ARN messenger (ARNm) correspondant, produit à partir du gène codant pour la protéine d'intérêt. Une méthode très similaire au *western blot* existe pour la détection d'ARN, nommé *northern blot*, son principe est le même : dénaturation, électrophorèse sur gel, transfert sur membrane pour analyse. Au-delà de la nature des molécules analysées, les différences concernent la méthode de dénaturation (formaldéhyde), la nature du gel (agarose) et les méthodes de détection après transfert. En effet, ici l'outil de détection est non plus un anticorps mais un fragment d'ARN ou ADN complémentaire de l'ARNm étudié. Ce dernier est en revanche couplé aux mêmes méthodes que le *western blot* pour sa détection (fluorophore, fragment radioactif, enzyme).<sup>[162,163]</sup> Il existe de plus une méthode de *northern blot* spécifique aux ARNm, discriminant ces ARN des autres grâce à leur séquence terminale particulière constituée d'un enchainement d'arginine (queue polyA)<sup>[164]</sup>, ou d'autres méthodes sans informations spatiales de type amplification en chaîne par polymérase, ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR).<sup>[165,166]</sup> Comme pour les protéines, l'immunomarquage possède également un équivalent avec la méthode d'hybridation *in situ* : une séquence ADN ou ARN complémentaire de l'ARNm étudié est marquée (par un fluorophore par exemple) ou possède un moyen de détection indirect (une enzyme notamment).<sup>[167]</sup> Après reconnaissance et association, la détection permet alors de localiser l'ARNm correspondant avec les mêmes avantages et inconvénients de l'immunomarquage.<sup>[168]</sup>

De nombreuses méthodes sont donc possibles pour détecter la présence d'une enzyme, ou lorsque cela suffit : l'expression de son gène. Cependant, comme discuté précédemment dans la section 2.1 p. 23, la présence d'une enzyme est à différencier de son activité : les formes inactivées, l'activation uniquement dans certaines localisations



ou la nécessité de multimères sont plusieurs exemples de cas où distribution spatiale et activité ne sont pas corrélées.<sup>[169,170]</sup> De plus, certaines méthodes de marquage, notamment celles nécessitant une modification de l'enzyme étudiée (ajout de *tags*), peuvent fausser plus ou moins drastiquement la répartition spatiale de cette dernière<sup>[171]</sup>, voire entraîner une perte ou une diminution/augmentation de son activité.<sup>[172]</sup> Il y a donc un besoin de méthodes de détection d'activités enzymatiques, dans la mesure du possible sans altération de ces activités par la mesure, ce qui constituera le sujet de la prochaine section.<sup>[173,174]</sup>

## 2.3 Détecter l'activité d'une enzyme

Plusieurs modalités d'imagerie prétendent pouvoir détecter et donc imager certaines activités enzymatiques.<sup>[175,176]</sup> On peut par exemple citer l'imagerie PET et SPECT<sup>[177]</sup>, l'imagerie IRM<sup>[178–180]</sup> ou encore l'imagerie photo-acoustique.<sup>[181,182]</sup> Toutefois, l'imagerie optique, notamment par fluorescence, est la modalité la plus utilisée à cette fin et celle qui possède le plus de méthodes et applications. Faisant l'objet d'étude de cette thèse, seule cette dernière sera étudiée par la suite. Détecter une activité enzymatique revient à détecter une réaction chimique bien particulière. Il faut ainsi trouver une solution technique pour relier cette transformation chimique à une réponse macroscopique détectable, une émission de fluorescence (ou luminescence) dans notre cas.

Pour ce faire, plusieurs stratégies ont été développées et possèdent au moins deux parties communes à savoir :

- une unité substrat qui sera reconnue par le site catalytique et sera réactif de la réaction enzymatique ;
- une unité dite signalante (luminescente dans notre cas), plus ou moins masquée, qui servira à émettre le signal après réaction enzymatique.

L'idée est alors de profiter de la réaction enzymatique venant modifier/cliver la partie substrat pour transformer le signal émis. La détection de cette modification de signal permettant alors de localiser l'activité recherchée. Cette modification peut être de différentes natures : le signal peut (entre autres) être amplifié ou atténué. La deuxième situation est probablement moins intéressante. En effet, si l'enzyme à détecter n'est présente qu'en faible quantité, il sera assez dur de localiser une faible diminution de signal qui ne contrastera que très peu par rapport au fort bruit de

fond.<sup>[183]</sup> En revanche, une faible fluorescence sur un bruit de fond relativement faible sera plus aisément détectable grâce au contraste plus important. Dans un cas limite, le système est même totalement binaire, passant d'un état totalement éteint, à émissif en présence de l'activité recherchée (*off-ON system*), on parle alors de sondes fluorogènes (ou fluorogéniques).<sup>[184]</sup>

Un autre mode de détection consiste à repérer une modification de signal, non pas d'un point de vue intensité lumineuse mais selon un autre paramètre, le plus souvent la longueur d'onde : celle-ci doit donc varier suite à la réaction enzymatique.<sup>[185]</sup> Cette réaction fait passer le système émissif d'une forme à une autre, ayant une longueur d'onde différente. La situation est alors légèrement plus complexe qu'avec une sonde fluorogène, l'entière des sondes n'est jamais convertie instantanément et la plupart du temps, une superposition des deux émissions des deux formes est obtenue. Pour remonter à l'activité enzymatique, il convient alors de mesurer l'intensité relative des deux émissions, leur ratio permettant de déterminer la quantité de sonde ayant réagi. Ce mode de détection est dit ratiométrique et sera présenté avant les sondes fluorogènes.

### 2.3.1 Sondes ratiométriques

Décrit pour la première fois par l'équipe de Roger Tsien (dont on doit aussi les travaux sur les protéines fluorescentes, voir 1.4) p. 17, cette méthode nécessite un changement de longueur d'onde d'émission suite à la détection désirée.<sup>[186]</sup> La majorité des sondes développées sur ce principe sont faites pour repérer des anions et cations<sup>[187]</sup>, beaucoup moins pour la détection de biomolécules comme des enzymes.<sup>[188]</sup> Lorsqu'une activité enzymatique est ciblée, le mécanisme de changement de longueur d'onde utilise souvent une même stratégie : le **transfert d'énergie entre molécules fluorescentes** ou **transfert d'énergie par résonance de type Förster**, ou *Förster Resonance Energy Transfer* (FRET).<sup>[189,190]</sup> Initialement découvert et étudié par Theodor Förster dans les années 40<sup>[191]</sup>, il est utilisé à des fins d'imagerie plus tard à partir des années 80/90.<sup>[192,193]</sup> Un système FRET est composé de deux fluorophores : un donneur et un accepteur. Si la distance entre eux est assez courte (en général : moins de 10 nm) et qu'un recouvrement spectral est suffisant entre émission du donneur et excitation de l'accepteur, un transfert d'énergie non-radiatif du donneur vers l'accepteur peut se produire après excitation du premier. L'accepteur est alors dans un état excité et sa désexcitation conduit alors à une possible émission de photons.<sup>[194,195]</sup>

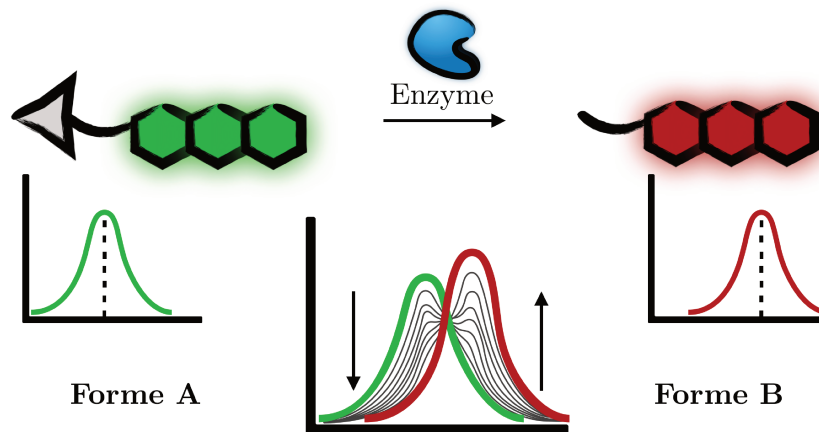


FIGURE 23 – Illustration du principe de sonde ratiométrique, deux formes différemment émissives sont possibles, par exemple avant et après conversion enzymatique. Après étalonnage, la mesure d'un spectre et de l'intensité relative des deux maxima permet de remonter à la concentration en enzyme.

Les sondes FRET à mode ratiométrique utilise l'éloignement des deux fluorophores suite à l'activité enzymatique, le lien assurant leur liaison étant dans ce cas le substrat enzymatique d'une réaction de clivage (hydrolyse dans la plupart des cas). On peut par exemple citer une sonde pour activité  $\beta$ -lactamase développée dans l'équipe de Roger Tsien<sup>[196]</sup>, avant clivage on observe l'émission de l'accepteur grâce au mécanisme de FRET, après clivage seule l'émission du donneur est observable, l'accepteur n'étant plus excité. D'autres types de transfert d'énergie existent, tel le transfert d'énergie électronique, ou *Electronic Energy Transfer* (EET).<sup>[197,198]</sup>

Certaines sondes fluorescentes ratiométriques pour activités enzymatiques n'emploient d'autre part qu'un seul fluorophore : dans ce cas, l'émission du fluorophore est modifiée par retrait ou ajout d'un groupement à proximité du noyau fluorescent (ou sur ce dernier directement). En modifiant le caractère électro-donneur/accepteur d'un groupement par exemple (comme le passage d'un éther à un alcool après hydrolyse), on peut modifier suffisamment les propriétés d'émission comme la longueur d'onde du signal afin d'obtenir les deux espèces émissives nécessaires au mode ratiométrique. Ces modifications sont rationalisées par le concept de transfert interne de charge, ou *Internal Charge Transfer* (ICT) : les fluorophores basés sur ce mécanisme possèdent un pôle électro-donneur et un électro-accepteur, reliés par un système pi-conjugué. À l'état excité, une redistribution importante des charges sur la molécule a lieu, créant alors un dipôle. La modification d'une des extrémités (par exemple, un retrait d'un groupement par réaction enzymatique) entraîne une importante modification de cet état excité et

donc de l'émission qui en découle.<sup>[197,198]</sup> On a bien alors deux formes émissives que l'on peut employer pour une analyse ratiométrique.<sup>[199,200]</sup> D'autres variantes de l'ICT existent mais ne seront pas détaillées par soucis de concision : *Metal-Ligand Charge Transfer* (MLCT), *Twisted Internal Charge Transfer* (TICT).<sup>[197]</sup>

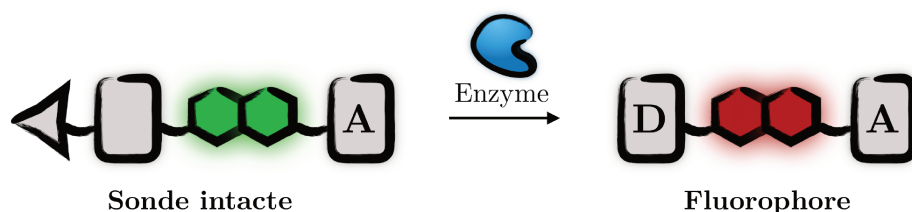


FIGURE 24 – Illustration du principe des sondes ratiométriques basées sur le principe d'ICT.

Cette méthode est également particulièrement adaptée à l'étude d'une proportion entre deux espèces en équilibre (comme deux formes acido-basiques par exemple) dont chacune est associée à une des deux émissions.<sup>[201]</sup> Elle permet aussi de quantifier une concentration en un analyte indépendamment de la concentration en sonde, ce qui facilite grandement la mesure. Toutefois, elle est un peu moins adaptée à la détection d'une activité enzymatique : l'absence d'activité est associée avec une émission et donc un arrière plan émissif. De plus, deux mesures et la réalisation d'un étalonnage préalable sont nécessaires ce qui augmente les erreurs de lecture et incertitudes liées, soulignant ainsi l'intérêt des sondes dites fluorogènes.

### 2.3.2 Sondes fluorogènes/luminogènes

Les sondes fluorogènes se basent sur une augmentation d'une émission fluorescente, voire sa création, suite à une réaction enzymatique.<sup>[202,203]</sup> Pour cela, il faut logiquement que cette fluorescence soit atténuée ou masquée avant réaction, lorsque la sonde est toujours intacte. Il existe alors différents moyens pour moduler/atténuer cette fluorescence.<sup>[204,205]</sup>

Le mécanisme couramment employé est l'extinction (*quenching*) de fluorescence par transfert d'électron photoinduit, ou *Photoinduced Electron Transfer* (PET). En présence d'un groupement inhibiteur adéquat (*quencher*) à proximité du fluorophore, un transfert d'électron à l'état excité peut alors avoir lieu, empêchant alors la désexcitation radiative et donc l'émission de fluorescence. Il s'agit ainsi d'une réaction d'oxydo-réduction à l'état excité, on parle par ailleurs de deux types de PET : le PET oxydatif et le PET réducteur.<sup>[206]</sup> Dans un cas, c'est un électron du fluorophore qui est transféré au

*quencher* électro-appauvri, le résultat est un fluorophore oxydé (et le *quencher* réduit), il s'agit alors du PET oxydatif. L'autre situation est inverse : le *quencher*, riche en électrons, en transfère un sur l'orbitale libérée par l'excitation du fluorophore, celui-ci est alors réduit, c'est le PET réducteur. Afin de développer des sondes (pour activités enzymatiques), le même concept que les sondes ratiométriques FRET est utilisé : un lien clivable par réaction enzymatique relie un fluorophore et une unité extinctrice (*quencher*). Après clivage enzymatique, les deux unités sont séparées et la fluorescence apparaît.<sup>[207,208]</sup>

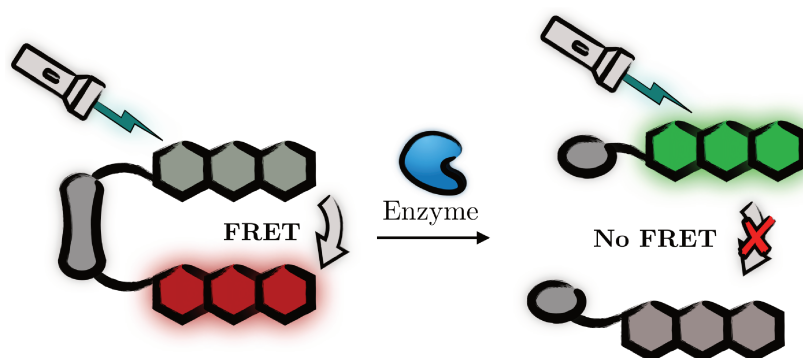


FIGURE 25 – Illustration du mécanisme des sondes basées sur le principe de FRET.

Les sondes FRET décrites précédemment peuvent également être considérées comme fluorogènes si on se concentre sur l'émission de fluorophore donneur : avant coupure enzymatique, le transfert par FRET a lieu et aucune fluorescence du donneur n'est observable. Après coupure enzymatique, le FRET est interrompu et la fluorescence du donneur apparaît. L'utilisation de filtres optiques est courante pour toutes les sondes fluorescentes mais elle est ici indispensable.

Le dernier mécanisme d'extinction de fluorescence, et celui sur lequel se basent ces travaux de thèse, est le transfert de proton intramoléculaire à l'état excité, ou *Excited-State Intramolecular Proton-Transfer* (ESIPT). Découvert en 1956 par Albert Weller<sup>[209]</sup>, et décrit plus formellement par la suite depuis les années 70,<sup>[210-214]</sup> il a permis notamment de nombreuses avancées dans les matériaux optiques.<sup>[215]</sup> Un fluorophore ESIPT possède un groupement donneur de liaisons hydrogène (le plus souvent un hydroxyle) relié par un système pi à un groupement accepteur de liaison hydrogène (comme un carbonyle ou une imine), les deux groupements devant, de plus, être proches spatialement. Après excitation du fluorophore, celui-ci passe dans un état excité où une première émission peut avoir lieu, c'est la fluorescence classique depuis la forme dite énolique. Néanmoins, pour une majorité de composés ESIPT, un transfert de protons se

produit depuis cet état pour obtenir la forme tautomérique cétone qui, plus stable, est plus basse en énergie. L'émission de fluorescence peut alors avoir lieu depuis ce nouvel état excité vers un état fondamental toujours de type cétone, qui redonnera le composé initial par un nouveau transfert de proton, à l'état fondamental cette fois-ci. [210,216]

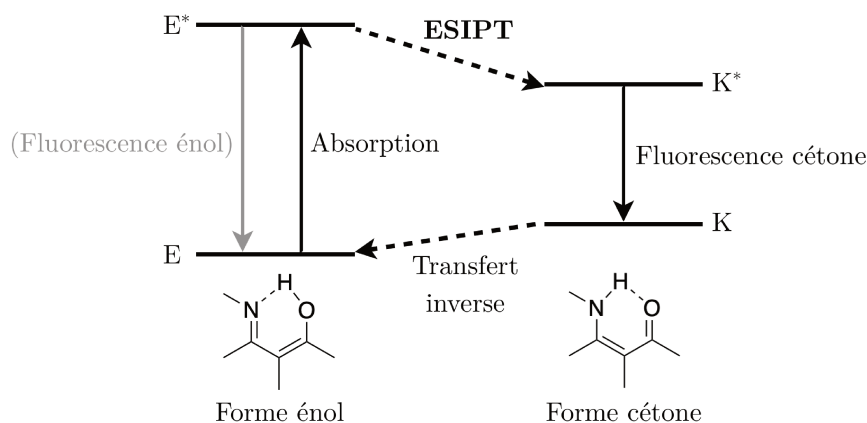


FIGURE 26 – Principe du mécanisme d'ESIPT.

L'intérêt de ce mécanisme est qu'en l'absence d'hydrogène à transférer, l'émission de fluorescence disparaît totalement, ou du moins celle depuis la forme cétone après le transfert de proton, l'émission depuis la forme énonique étant généralement faible voire absente. Il faut tout de même noter certains efforts pour obtenir des fluorophores ESIPT présentant une émission depuis cette forme énonique, possédant même une double émission si le transfert de proton peut toujours se faire. Ce genre de propriétés permet par exemple d'émettre une fluorescence sur une très large gamme spectrale en présence d'un unique fluorophore et d'une seule source excitatrice, facilitant, entre autres, la création de matériaux émissif de lumière blanche. [215,217]

Le second avantage de ce mécanisme est la grande différence d'énergie entre photon absorbé et émis, en effet la stabilisation énergétique importante qu'induit le transfert réduit d'autant l'écart entre niveau excité et niveau fondamental. En spectroscopie, ce décalage énergétique entre maxima d'excitation et d'émission est appelé déplacement de Stokes (du nom du physicien George Stokes, voir 1.4, p. 17), exprimé en énergie ou longueur d'onde. Ce fort déplacement de Stokes est avantageux pour plusieurs raisons : il évite les phénomènes de réabsorption (absorption par un fluorophore d'un photon émis par un autre), notamment présents lorsque les spectres d'excitation et d'émission se superposent et qui ont la tendance d'éteindre la fluorescence à l'état solide. De plus, l'autofluorescence des milieux biologiques présente généralement des déplacements de Stokes classiques (inférieurs à 50 nm), l'utilisation de fluorophores à grand décalage

de Stokes permet ainsi de supprimer une grande partie de cette autofluorescence par applications de filtres adéquats.<sup>[190]</sup>

Des sondes basées sur la modulation de l'émission par **ESIPT** ont commencé à être développées au début des années 90.<sup>[218,219]</sup> L'idée est simple : en fonctionnalisant le phénol (ou l'unité donneuse de liaison hydrogène), on supprime la possibilité d'**ESIPT** et on masque la fluorescence. Si de plus, l'unité fixée sur le phénol est un substrat d'une réaction enzymatique, on obtient alors une sonde fluorogène pour cette activité. D'autres mécanismes de sondes utilisent le retrait de groupements par un analyte non-enzymatique (telle une déprotection de phénol en synthèse organique) ou encore la complexation de métaux avec ce même phénol modifiant alors l'émission et permettant de détecter la présence du métal en question.<sup>[214,220]</sup> L'avantage d'utiliser le mécanisme d'**ESIPT** est l'extinction quasi, voire totale, de la fluorescence et donc une absence de signal parasite permettant un rapport signal sur bruit et donc une résolution optimale.

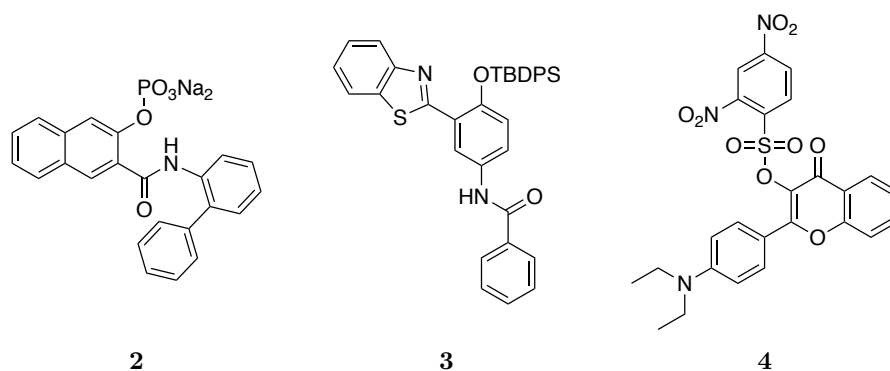


FIGURE 27 – Exemples de structures de sondes fluorogènes utilisant un mécanisme **ESIPT** (détection de la phosphatase<sup>[218]</sup>, de fluorures<sup>[221]</sup> ou de thiols<sup>[222]</sup>).

D'autres méthodes d'extinction de fluorescence existent mais sont moins répandues, on peut citer la formation d'excimères ou exciplexes (*exciton coupling*), ou l'auto-extinction lorsqu'une forte concentration locale d'un fluorophore atténue ou éteint son émission (*self-quenching*).<sup>[205]</sup> Néanmoins, un problème subsiste parmi la plupart des sondes décrites précédemment, à savoir la diffusion du signal une fois créé par la réaction enzymatique. En effet, la majorité des fluorophores restent solubles une fois relargués, ils sont alors plus ou moins libres de diffuser au sein des tissus biologiques dans lesquels ils sont relâchés. Une telle diffusion entraîne une évidente baisse de résolution du signal observable, si ce n'est une contamination des milieux avoisinants, compromettant alors l'efficacité de la détection. Heureusement, des méthodes existent pour limiter cette diffusion, comme nous le verrons dans la prochaine section.



## 3 Diffusion du signal et solutions : ELF-97

### 3.1 La diffusion du signal – un handicap pour la résolution

La problématique de la diffusion du signal est issue d'une certaine ambiguïté de la situation : pour être efficace le système rapporteur doit pouvoir diffuser librement dans tous les tissus afin d'atteindre sa cible et donc de pouvoir la détecter. En revanche, le signal qu'il produit lors de cette détection, ou plutôt la molécule formée ou relarguée doit, elle, rester le plus proche possible du lieu de détection, sous peine de ne pouvoir marquer précisément le processus ciblé.<sup>[105]</sup> Ce constat n'est pas récent et de nombreuses stratégies ont été développées pour empêcher cette diffusion, notamment au travers des membranes cellulaires.

#### 3.1.1 Solutions rudimentaires

Des solutions assez simples dans leurs approches existent, elles possèdent toutefois certaines contraintes comme nous allons le voir. Une première solution est d'utiliser un concept partagé à l'hystochimie : la fixation des tissus/cellules étudiés. Comme décrit dans la section 2.2, p. 28, des méthodes de "fixation" sont couramment utilisées en biologie moléculaire et cellulaire, en immobilisant toutes les biomolécules dans l'échantillon. Ainsi, on empêche, dans une certaine mesure, la diffusion des petites molécules tel un fluorophore relargué par une sonde enzymatique. Néanmoins, cette diffusion est toujours possible et certains protocoles laissent également la possibilité d'une diffusion de certaines protéines<sup>[223]</sup>, voire d'une altération des structures biologiques, enlevant ainsi tout l'intérêt de l'imagerie.<sup>[224,225]</sup>

Une approche utilise le refroidissement du milieu pour freiner cette diffusion. Appliquée à la détection de  $\beta$ -gal par un dérivé galactosylé de la fluoresceine, la *Fluorescein Di( $\beta$ -D-Galactopyranoside)* (FDG), la sonde est introduite dans les cellules rapidement à 37 °C, puis la température est vite abaissée à 4 °C, limitant fortement la diffusion du fluorophore.<sup>[226]</sup> Bien que relativement efficace dans ce cas, cette méthode n'est clairement pas généralisable : l'activité enzymatique est ici très importante (cellules transfectées par le gène *lacZ* générant ainsi une forte surexpression de l'enzyme) et l'activité réduite par la faible température n'empêche pas la génération du signal, ce qui pourrait être le cas dans beaucoup d'autres applications. De plus, la diffusion est



atténuée mais probablement pas éteinte, et cela n'est peut-être même plus le cas avec d'autres fluorophores. C'est donc davantage un exemple à garder en tête qu'une vraie solution au problème de diffusion.

Une autre méthode utilise une réactivité particulière du fluorophore une fois libéré : celui-ci agissant comme un monomère d'une réaction de polymérisation. Une fois relargué par la réaction enzymatique, la réaction de polymérisation peut avoir lieu entraînant la formation d'un polymère émissif de haut poids moléculaire, ce dernier ne pouvant alors plus diffuser à travers les membranes.<sup>[227]</sup> Cette méthode, élégante sur le papier, présente tout de même de nombreuses limites. Tout d'abord, la fluorescence est généralement modifiée par une telle réaction mais rarement dans un sens avantageux : la longueur d'onde varie peu mais l'intensité diminue grandement. Ce qui soulève un autre point : la sonde initiale est fluorescente, on a donc ici affaire à un système toujours émissif, mais atténué lors de la détection, ce qui n'est pas très attractif. Se pose également le problème de la toxicité d'une telle réaction intracellulaire. Les lavages nécessaires à la visualisation (impossible *in vivo*) et la rareté des réactions de polymérisation biocompatibles après réaction enzymatique s'ajoutent aux nombreux freins au développement de cette technologie.

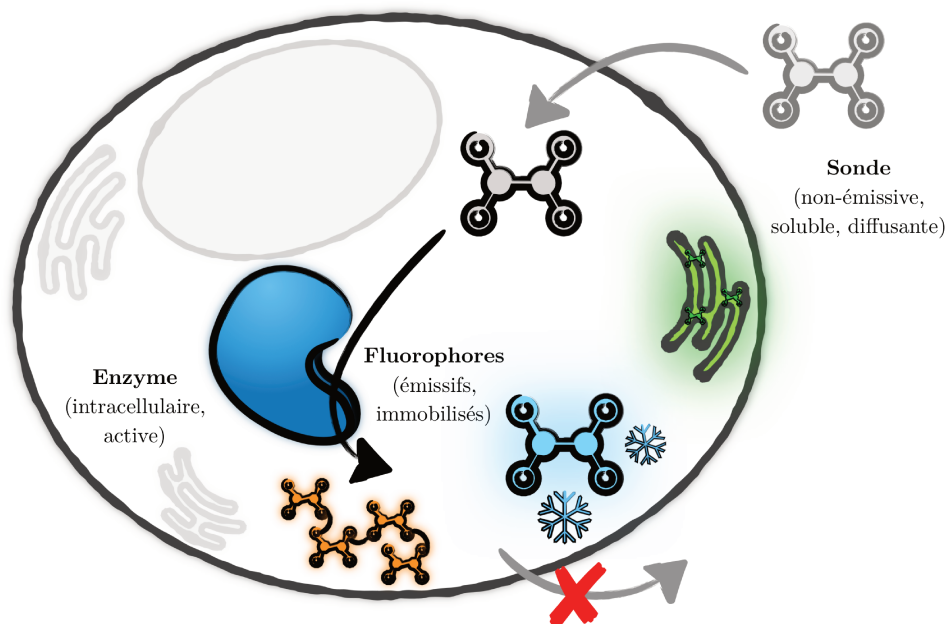


FIGURE 28 – Illustration des méthodes de rétentions "rudimentaires".

Une dernière approche relativement simple est de s'appuyer sur l'accumulation de certains fluorophores dans le cytoplasme ou certains organelles. Certaines sondes libèrent en effet un fluorophore présentant un motif particulier lui conférant une affinité

accrue pour une localisation sub-cellulaire. Un exemple classique, et de plus en plus utilisé, est de greffer un groupement morpholine : le composé qui en résulte présente dans ce cas une forte accumulation dans les lysosomes.<sup>[228]</sup> Cette accumulation permet de retenir le fluorophore dans l'organelle et donc dans la cellule. Une autre stratégie similaire est de jouer sur la charge du fluorophore, éventuellement modifiée après la réaction enzymatique. C'est le principe utilisé par certaines sondes basées sur des motifs rhodols (fluorophore hybride entre rhodamine et fluorescéine), qui sont connus pour s'accumuler activement dans le cytoplasme.<sup>[229,230]</sup> L'apparition d'une charge négative après réaction enzymatique peut également empêcher la diffusion à travers les membranes par répulsion électrostatique avec cette dernière. Toutefois, comme d'autres méthodes précédemment étudiées, la rétention n'est jamais totale, des lavages sont souvent nécessaires (limitation pour l'*in vivo*) et un bruit de fond reste présent.

### 3.1.2 Création de liaisons covalentes

Plusieurs mécanismes utilisent la création de liaisons covalentes comme outil pour la rétention d'un signal (fluorescent). Le but est ici d'accrocher le fluorophore dans la cellule, empêchant ainsi toute possible diffusion. Le mode de fixation, et par conséquent son lieu, varient selon ces méthodes.

La première famille de sondes, appelée *quenched Activity-Based Probes* (qAPB), permet de venir fixer un fluorophore directement dans le site catalytique de l'enzyme, lorsque cette dernière est active. On marque ainsi directement "l'activité" de l'enzyme cible. Ces sondes sont, de plus, activables : non émissives avant réaction avec l'enzyme cible, la fluorescence n'apparaît qu'à la fixation du fluorophore sur l'enzyme. Il faut donc générer un site réactif après coupure enzymatique avec lequel un nucléophile du site catalytique (généralement une serine ou une cystéine) va pouvoir réagir pour créer la liaison covalente. L'unité classique principalement utilisée dans ce but est l'*Acyloxymethyl Ketone* (AOMK).<sup>[231]</sup> Si cette méthode a prouvé son efficacité pour la détection de plusieurs familles d'enzyme<sup>[232]</sup>, elle présente toutefois des désavantages. Le principe même de la méthode, est basé sur l'alkylation du site catalytique, inactivant ce dernier. On perd ainsi l'amplification enzymatique et il faut donc une grosse quantité d'enzyme pour permettre une détection du signal. De plus, l'inactivation d'une enzyme (si elle n'est pas introduite artificiellement) peut présenter une importante toxicité si cette dernière joue un rôle primordial dans le système étudié.

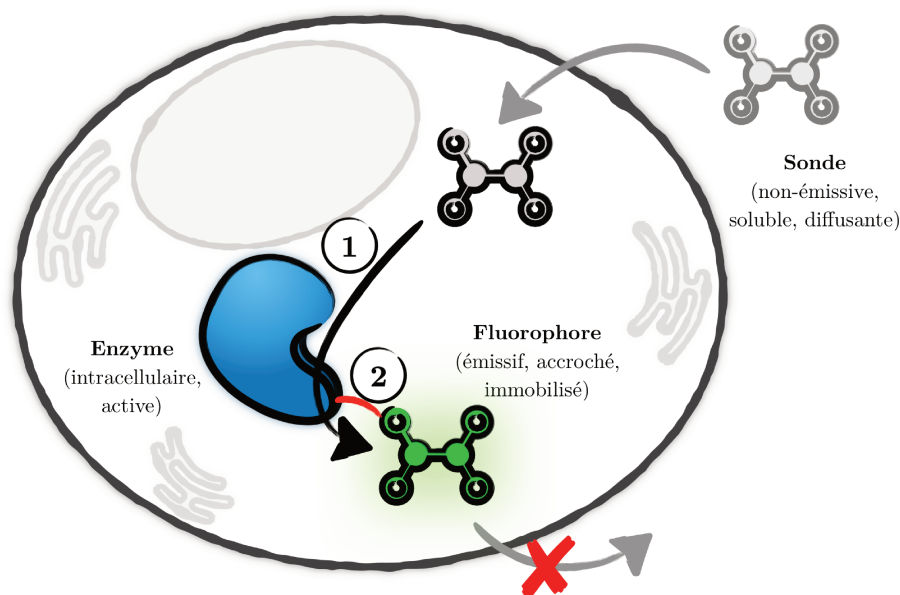


FIGURE 29 – Illustration du concept de sondes qAPB.

Pour contrecarrer ce dernier point, des sondes ont été développées avec d'autres motifs, par exemple à l'aide de quinone méthides qui possèdent une réactivité modulable en fonction des groupements présents sur le cycle aromatique.<sup>[233]</sup> Ces dernières, également utilisées pour la réalisation d'espaces auto-effondrables (voir section 3.2.2, p. 50), permettent l'atténuation de la réactivité du fluorophore libéré, qui peut alors diffuser sur une certaine distance avant de réagir et de s'accrocher. Pour générer ces quinones méthides, plusieurs solutions s'offrent aux chimistes.<sup>[234]</sup> Une des plus utilisées est ainsi l'utilisation d'espaces de type alcool *p*-aminobenzyle ou *p*-Aminobenzyl alcohol (PABA) : après clivage enzymatique, une réorganisation électronique au niveau du phénol libéré génère directement la quinone méthide (Figure 30) par élimination d'un groupement partant en position benzylique. On peut également citer l'utilisation de groupement (di-)fluorométhyl-benzène, c'est ici l'élimination d'un atome de fluor en position benzylique du phénol libéré par la réaction enzymatique qui génère la quinone méthide (Figure 30).<sup>[235]</sup> Dans ces deux cas, la réactivité de l'espèce relâchée peut être atténuée en modifiant la substitution du cycle pour éviter d'alkyler le site catalytique. Toutefois, cet effet est globalement compliqué à maîtriser totalement. En d'autres mots l'amplification enzymatique peut toujours être affectée et la biomolécule qui sera finalement alkylée peut, elle aussi, présenter une certaine toxicité.<sup>[236,237]</sup>

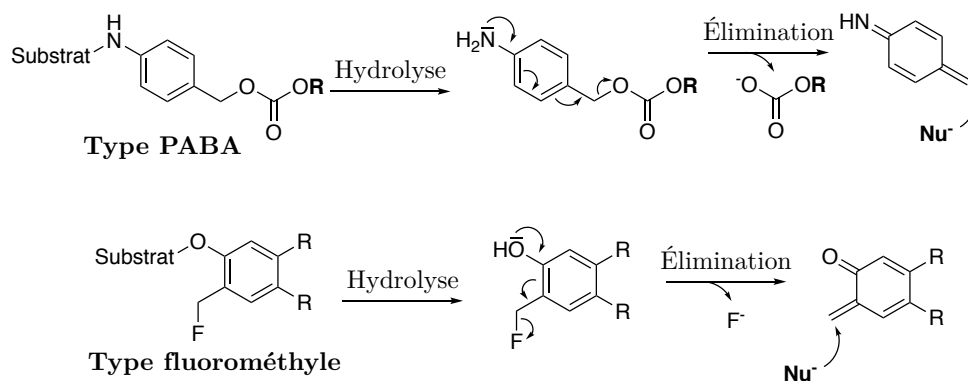


FIGURE 30 – Mécanismes de génération des quinones méthides, par l'utilisation d'espaces PABA ou par la présence d'unités fluorométhyles.

### 3.1.3 Précipitation

Le dernière méthode abordée est également celle qui a été utilisée dans ces travaux de thèse, il s'agit de la rétention par précipitation. On joue ici sur un changement d'état physique de l'espèce signalante pour la retenir au niveau du système marqué. Initialement, la sonde est soluble et peut diffuser librement au sein des tissus et membranes, conditions nécessaires à un marquage efficace. Après réaction avec l'enzyme, un fluorophore est relargué et sa concentration locale augmente rapidement du fait de l'amplification catalytique. Lorsque cette dernière atteint le seuil de précipitation (idéalement après un court délai), le fluorophore commence à précipiter. À l'état solide, il n'est alors plus possible pour lui de diffuser librement, notamment au travers des membranes. Le signal est ainsi retenu sur place sans pour autant altérer les sites catalytiques, l'amplification enzymatique est ainsi maintenue. De plus, aucune autre biomolécule n'est chimiquement modifiée, une relative faible toxicité est de ce fait à attendre, surtout à comparer aux systèmes de type qAPB vu précédemment.

Cette méthode n'est pas récente : dans les années 40 des substrats chromogéniques précipitants ont été développés, notamment les composés dérivés de colorant de type indigo dont le X-gal évoqué précédemment (Figure 19b).<sup>[238,239]</sup> Ces composés, loin d'être désuets, sont quotidiennement utilisés en laboratoire de biologie pour le contrôle de transformations/transfections ou les analyses immunochimiques.<sup>[120]</sup> Des méthodes analogues mais fluorogéniques ont également vu le jour dans les années 50-60.<sup>[240]</sup> Toutefois, ces dernières ont peu évolué jusqu'aux années 90 et sont restées peu utilisées du fait de leur complexité expérimentale. En effet, elles nécessitent un mélange de plusieurs composés, celui relargué par la réaction enzymatique n'est pas directement précipitant

mais doit réagir avec une autre espèce pour former le composé final, émissif et précipitant. L'exemple classique est la réaction de couplage entre un naphthol relargué avec un composé azo. En plus de la difficulté de mise en œuvre, le problème de la diffusion du naphthol avant réaction avec le composé azo entraîne une relative perte de l'information spatiale.<sup>[241]</sup>

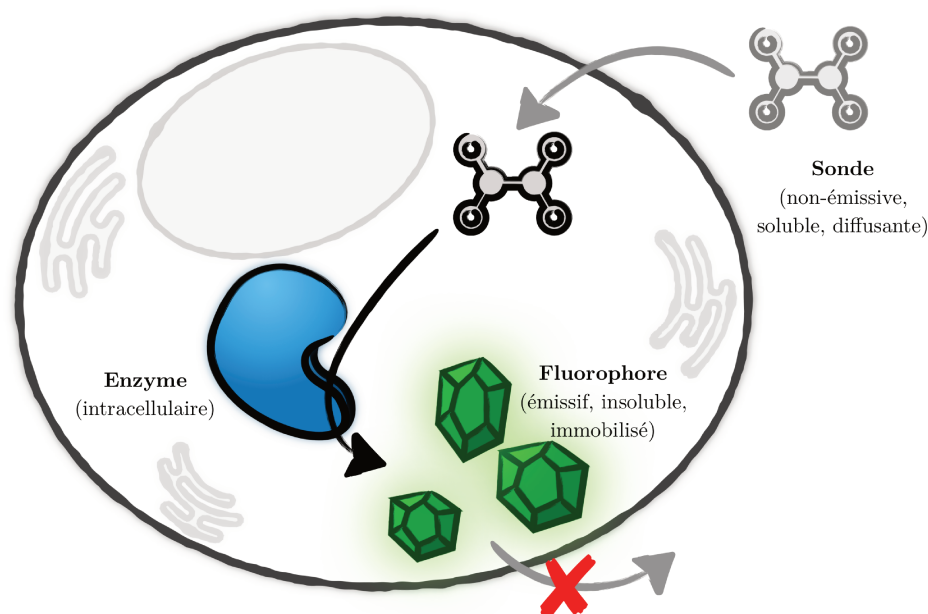


FIGURE 31 – Illustration du concept de sondes précipitantes.

Heureusement, la stratégie trouve un nouveau souffle dans les années 90 avec l'apparition d'une nouvelle gamme de composés, fortement émissifs et intrinsèquement insolubles, ils ne nécessitent donc plus de méthodes en plusieurs temps. Ces composés, les *Hydroxyphenyl-quinazolinone* (HPQ), ont alors relancé l'intérêt pour la fluorescence à l'état solide qui aboutie peu de temps après à la découverte de l'effet d'émission induite par agrégation, ou *Aggregation-Induced Emission* (AIE), avec lequel les fluorophores sont davantage émissifs à l'état solide qu'en solution. Classiquement, les fluorophores présentent généralement un comportement dit *extinction causée par agrégation*, ou *Aggregation-Caused Quenching* (ACQ), dans lequel les interactions (notamment de type  $\pi$ -stacking) diminuent grandement, voire totalement, les désexcitations radiatives par interactions intermoléculaires. Pour les fluorophores AIE, les nombreuses rotations permises en solution inhibent l'émission, tandis qu'à l'état solide ces rotations sont impossibles et les désexcitations radiatives ne sont alors plus inhibées. Beaucoup de composés et sondes les incorporant ont été développés par les équipes du Pr Ben Zong Tang.<sup>[242]</sup> Ils présentent néanmoins le désavantage de rendre fortement insolubles les sondes qui les incorporent, rendant alors encore plus dur l'accès synthétique à de telles

molécules qui doivent posséder, en plus des classiques substrat et fluorophore, des groupements solubilisants. La fluorescence est également rarement totalement éteinte par fonctionnalisation des fluorophores, le caractère fluorogénique n'est donc pas total, et la résolution de ce fait pas optimale.

Les fluorophores de type HPQ ont en revanche l'avantage de présenter à la fois une forte émission fluorescente à l'état solide mais également un phénomène d'ESIPT permettant (entre autres) une extinction totale de fluorescence lorsque ces derniers sont incorporés dans une sonde. Nous verrons plus en détails dans la section suivante leurs propriétés, notamment spectrales, ainsi que les sondes déjà développées sur leurs bases (principalement dans l'équipe) avec l'aide d'espaces auto-effondrables innovants.

## 3.2 L'ELF-97, un champion à dompter

### 3.2.1 *Molecular Probes* – les origines

Ces composés HPQ ont été développés par les équipes de recherche de *Molecular Probes* (rachetée plus tard par *Life Technologies* puis par *ThermoFischer*). Initialement, le projet intitulé *Enzyme-Labeled Fluorescence* (ELF) consistait au développement de sondes fluorogènes, précipitantes, pour la détection d'activités enzymatiques notamment dans le cadre de l'immunomarquage (pour la révélation des *Western Blots* et tests ELISA par exemple, voir section 2.3, p. 34). Le premier objectif était ainsi l'identification de nouveaux fluorophores aux propriétés spectrales requises pour ces applications. Parmi les nombreuses cibles moléculaires testées, certaines sont sorties du lot et notamment une : la dichloro-HPQ ou plus formellement la (2-(5'-chloro-2-hydroxyphényl)-6-chloro-4(3H)-quinazolinone, ou plus simplement ELF-97.

Ce fluorophore a été retenu pour de multiples raisons : il est tout d'abord assez fortement émissif, son rendement quantique est évalué entre 50 et 60 %, lui conférant ainsi une forte brillance.<sup>[243,244]</sup> Son émission par un mécanisme ESIPT permet d'obtenir un très fort déplacement de Stokes et donc des avantages qui en découlent (voir section 2.3.2, p. 37). Il possède ainsi un maximum d'excitation à  $\lambda_{ex} = 360$  nm et d'émission à  $\lambda_{em} = 530$  nm.<sup>[243]</sup> Développé dans ce but, il présente une très forte insolubilité en milieu aqueux (et organique par ailleurs) qui peut s'expliquer par la présence des deux atomes de chlore périphériques. L'analogue initial sans chlore possède, en effet,



des propriétés de luminescence équivalente mais une solubilité plus importante. Parmi les autres facteurs justifiant cette insolubilité, on trouve la formation aisée de liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisant son agrégation puis sa précipitation (Figure 32).<sup>[245]</sup> Autre propriété intéressante, la stabilité du signal émis par l'ELF-97 est très forte. Sa stabilité chimique d'une part : l'état insoluble réduit fortement les réactions chimiques possibles. D'autre part, sa stabilité envers le photoblanchiment (extinction de la fluorescence par réaction photochimique due à l'irradiation laser nécessaire à l'émission de fluorescence) est également remarquable, la comparaison avec la fluorescéine sur ce point est d'ailleurs éloquent (Figure 32).<sup>[244]</sup>

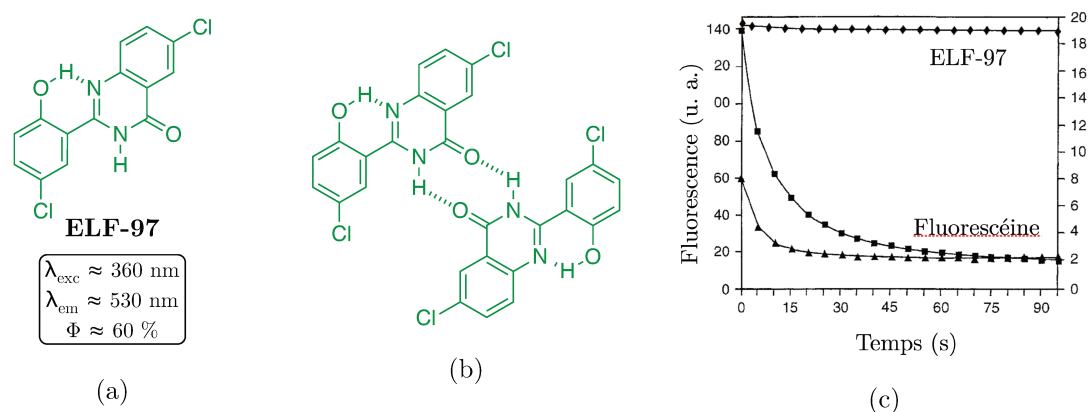


FIGURE 32 – Le fluorophore ELF-97, (a) : structure moléculaire, (b) : illustration de la formation de dimères par liaisons hydrogène intermoléculaire et (c) comparaison de résistance au photoblanchiment avec la fluorescéine (unités de fluorescence arbitraires).<sup>[244]</sup>

Enfin, la fluorescence par ESIPT est facile à masquer par retrait de l'hydrogène transférable, donc par fonctionnalisation du phénol dans ce cas. C'est ce concept qui a été développé dans un deuxième temps par *Molecular Probes* pour développer les premières sondes ELF-97 qui seront discutées par la suite. Il faut tout d'abord noter quelques inconvénients à l'utilisation de l'ELF-97. Le principal défaut de l'ELF-97 est son excitation située dans les UV, en plus de leur importante toxicité (principalement par dégradation photo-induite de l'ADN), les rayons UV sont aussi fortement absorbés par les tissus, limitant ainsi grandement la profondeur de pénétration, ce qui pose problème pour d'éventuelles applications *in vivo*. Sa longueur d'onde d'émission dans la gamme du vert n'est également pas optimale, ces longueurs sont moins absorbées que les UV mais le sont toujours trop pour une pénétration efficace des rayons lumineux. Finalement, sa forte insolubilité, même dans les solvants organiques, peut poser des soucis en synthèse organique lorsqu'une réaction incluant le fluorophore est à réaliser. Toutefois, cette éventuelle complexité synthétique est largement surmontable comme

le montrent les nombreux exemples de sondes incorporant l'ELF-97 ou des dérivés proches.

L'équipe de *Molecular probes*, dirigée par le Pr Haugland, a ainsi développé de nombreux exemples de sondes ELF-97 pour différentes familles d'hydrolases. Initialement, l'enzyme visée était la phosphatase alcaline pour son utilisation répandue comme enzyme rapporteuse dans les méthodes d'immunomarquage (enzyme liée à l'anticorps secondaire, voir section 2.2, p. 28). D'autres familles se sont, par la suite, ajoutées à la liste des sondes disponibles commercialement comme notamment des glycosidases (glucuronidase, glucosidase) ou des estérases (lipases). La stratégie employée est alors la plus simple : le substrat enzymatique correspondant (glycoside, phosphoryle, etc.) est directement greffé sur le phénol de l'ELF-97 (Figure 33). Stratégie qui semblait efficace comme le prouvent les nombreuses publications de l'équipe sur la technologie.<sup>[243–254]</sup> Plusieurs sondes furent de plus commercialisées dont la plus célèbre : l'ELF-97 *Phosphate*, sonde pour la phosphatase alcaline qui a par la suite été utilisée pour de nombreuses applications comme l'imagerie sur bactéries<sup>[255,256]</sup>, cellules mammifères<sup>[244,249]</sup>, mais également phytoplanctons<sup>[257–259]</sup> et poissons-zèbres (*zebrafish*)<sup>[253,260]</sup> ; on peut aussi évidemment citer les techniques immunohistochimiques (comme les *Western Blots* et tests ELISA)<sup>[261]</sup>, ainsi que la cytométrie.<sup>[249,262]</sup> D'autres sondes ont également par la suite vu le jour dans d'autres laboratoires, pour des activités enzymatiques telles que la monoamine oxydase ou la  $\beta$ -lactamase.<sup>[263,264]</sup> Par tout ces exemples, on peut saisir la grande versatilité de la technologie et les différentes illustrations ne font qu'appuyer les prétentions de haute précision du marquage de ces différentes activités enzymatiques.

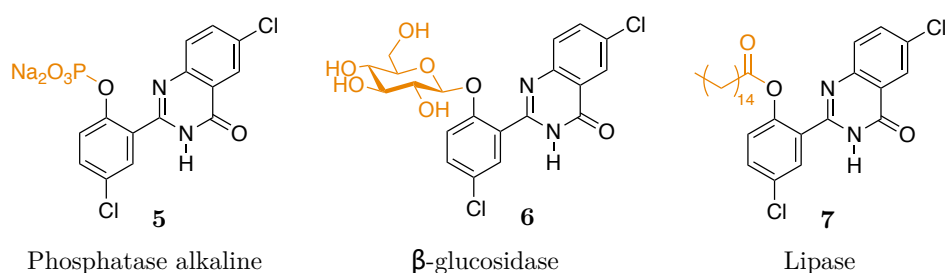


FIGURE 33 – Exemples de sondes ELF-97 développées par *Molecular Probes*.

Il y a toutefois une ombre à ce tableau prometteur : parmi toutes les sondes commercialisées, seule la sonde ELF-97 Phosphate a été maintenue, toutes les autres ont été retirées à la vente sans explications particulières. Récemment, la sonde ELF-97 pour  $\beta$ -gal a refait son apparition sur deux sites commerçants mais c'est le seul exemple. Notre hypothèse est que ces sondes souffrent toutes d'un soucis d'instabilité due à une



vulnérabilité accrue à l'hydrolyse spontanée : ces sondes présentent toutes un site électrophile (carbonyle ou éther) avec un très bon groupe partant : l'ELF-97. Celui-ci est en effet un phénol fortement électro-appauvri en raison notamment de l'effet inductif attracteur des deux atomes de chlore, son pKa est ainsi fortement abaissé et sa nucléofugacité exacerbée. Même le phosphate de la sonde ELF-97 *Phosphate* ne semble pas tout à fait convenir : les kits sont vendus avec un filtre à utiliser juste avant incubation, probablement pour éliminer les traces de fluorophores contaminantes, dues à une partielle dégradation par hydrolyse. Afin de pouvoir profiter des performances particulières de ce fluorophore, il a fallu trouver une solution chimique afin d'obtenir des sondes stables et performantes.

### 3.2.2 Maîtriser l'instabilité – l'arrivée des espaceurs auto-effondrables

En 2008, l'équipe du Pr Hasserodt a commencé à s'intéresser à cette problématique et s'est mise en quête d'alternatives aux sondes de *Molecular Probes* pour le développement de technologies marquant des activités enzymatiques. L'idée était alors plutôt simple : changer la nature de la liaison reliant l'ELF-97 au reste de la sonde tout en gardant un substrat clivable par réaction enzymatique. En d'autres termes, il faut changer la chimie au niveau du fluorophore sans changer la chimie du substrat. Ce problème ne peut être résolu qu'en ajoutant une nouvelle composante aux sondes existantes. Insérée entre substrat et fluorophore, ce lien peut être qualifié d'espaceur : on éloigne les deux composantes en ajoutant un lien entre ces dernières. Cela a plusieurs conséquences : la complexité des structures augmente forcément et un effort synthétique supplémentaire est donc déjà à prévoir. Toutefois, en éloignant le substrat du fluorophore, on améliore les chances d'une meilleure reconnaissance par l'enzyme (le substrat étant alors moins encombré par la proximité immédiate du fluorophore, cela dépend évidemment de l'espaceur utilisé mais en général la gêne stérique est réduite). Le dernier point, probablement le plus important dans notre cas, est la possibilité de changer la nature chimique des liens le reliant aux autres parties. Cela permet ainsi de pouvoir varier la nature de la liaison avec ELF-97 et donc de potentiellement trouver une alternative stable, mais permet également une plus grande variation de substrat : l'hydrolyse par l'enzyme peut libérer autre chose qu'un phénol (= l'ELF-97).<sup>[265]</sup> De nouvelles classes d'enzymes pourraient donc être ciblées tout en gardant une technologie relarguant l'ELF-97, c'est le cas des aminopeptidases notamment qui, après clivage enzymatique, relarguent un acide carboxylique et une amine.

Mais n'importe quel espaceur ne peut convenir pour conserver un mécanisme de détection efficace. En effet, la présence de cette composante supplémentaire ne doit pas empêcher la libération du fluorophore après clivage enzymatique. Cette réaction libère ainsi la sonde privée son substrat, pour relarguer le fluorophore il faut alors que l'espaceur s'élimine de lui-même : on parle dans ce cas d'espaceurs auto-effondrables (*self-immolative spacers*).<sup>[266]</sup> Ce type de stratégies ont été développées initialement pour la conception de pro-médicaments<sup>[267]</sup>, pour les mêmes raisons de libération d'encombrement (les médicaments sont de grosses molécules, davantage même que les fluorophores)<sup>[268]</sup> et d'établissement de liens plus stables.<sup>[269]</sup> Parmi ces espaceurs, on distingue souvent deux principales catégories : les espaceurs éliminants et les espaceurs cyclisants. Les premiers fonctionnent à l'aide d'un transfert électronique induit par la libération de l'espèce métastable (espaceur plus fluorophore ou médicament). L'exemple le plus courant est l'utilisation d'une unité PABA plus ou moins substituée, la libération du phénol (ou aniline) entraîne un déplacement de densité électronique vers la position benzylique, générant la rupture de l'autre lien (éther, carbonate, carbamate ou urée) (Figure 34). D'autres dérivées avec un système conjugué plus ou moins long existent et la substitution du cycle aromatique permet également de finement ajuster les différentes propriétés de l'espaceur : stabilité, vitesse d'effondrement, toxicité de l'espèce relâchée (quinone méthide dans le cas des dérivés de PABA).<sup>[237,266]</sup> On peut également citer un cas d'espaceur éliminant non aromatique : l'unité acétoxyméthyle qui, après libération de l'alcool par hydrolyse de l'ester (par exemple par action d'une estérase), relâche spontanément une molécule de formaldéhyde pour finalement relarguer l'espèce désirée (acide ou alcool) (Figure 34).

Les espaceurs cyclisants se basent quant à eux sur une cyclisation intramoléculaire pour libérer l'espèce désirée. Une fois le déclencheur retiré, par exemple par réaction enzymatique, un nucléophile (alcool ou amine) est alors relâché. Celui-ci constitue la partie terminale de l'espaceur dont le reste est constitué d'une chaîne aliphatique ou aromatique, classiquement à cinq ou six chaînons pour les raisons d'entropie de cyclisation favorable et plus ou moins préconfigurée (par ajout de groupement *gem*-diméthyl ou de cycle). Deux exemples couramment employés illustrent ces espaceurs le "*triméthyl lock*" avec un cycle aromatique et trois méthyles accélérant fortement la cyclisation (Figure 34)<sup>[270]</sup>, ou alors les espaceurs aliphatiques de type éthylènediamine acylée, avec également plus ou moins de préorganisation (Figure 34).<sup>[265]</sup>

L'objectif initial choisi par l'équipe à l'époque était de développer une sonde ELF-97

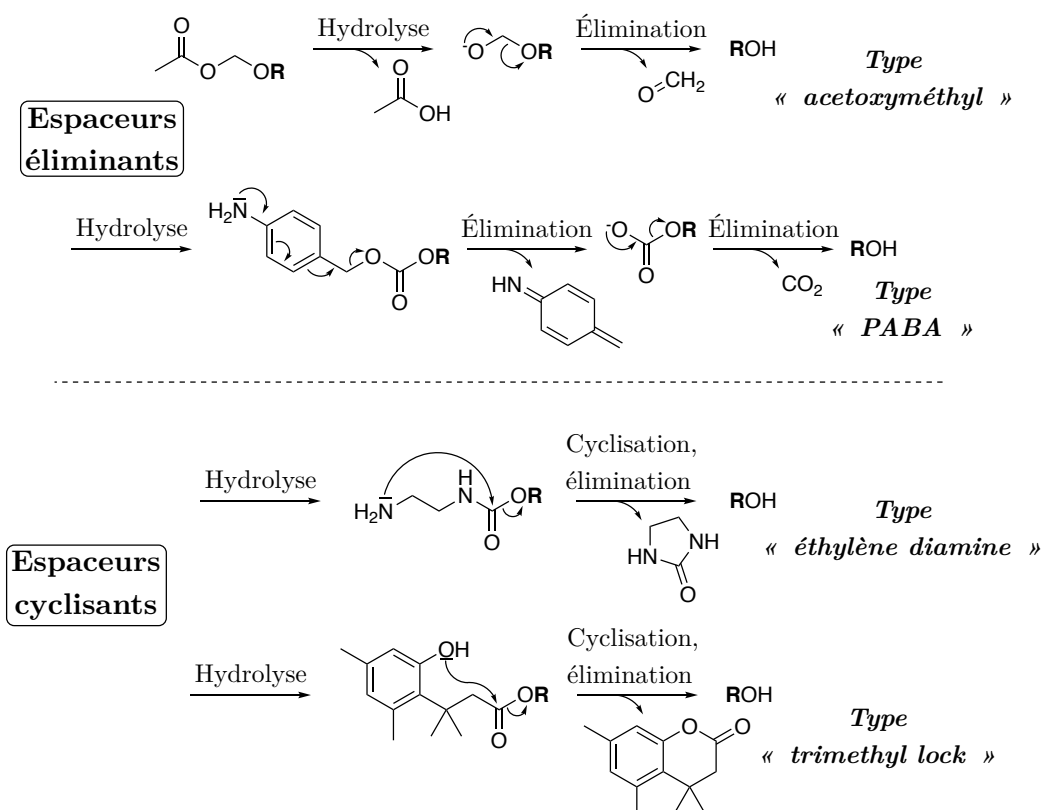


FIGURE 34 – Mécanisme d’auto-élimination des principaux espaceurs éliminants et cyclisants (les substrats clivables ne sont pas toujours représentés par soucis de clarté, de nombreuses variations sont possibles : O/N/S).

stable pour la détection de l’activité de la **Leucine aminopeptidase (LAP)** et ce, pour plusieurs raisons. Tout d’abord, comme expliqué précédemment, la **LAP** fait partie des aminopeptidases, famille d’enzymes qu’il n’était jusqu’alors pas possible de cibler avec des sondes **ELF-97**. Cette enzyme est une exopeptidase, elle retire un résidu à l’extrémité N-terminale d’un polypeptide, préférentiellement une leucine mais d’autres résidus proches structurellement peuvent aussi être clivés (telles la valine, l’isoleucine voire l’alanine).<sup>[271]</sup> Elle est, de plus, présente dans de nombreuses espèces de mammifères, de plantes et de bactéries.<sup>[271–273]</sup> Ses rôles physiologiques sont ainsi très variés : on connaît par exemple sa surexpression dans certains types de tumeurs<sup>[274]</sup>, ou son implication dans des mécanismes de résistance aux traitements anti-cancéreux<sup>[275]</sup>, mais également dans beaucoup d’autres contextes qui en font potentiellement une enzyme intéressante à étudier.<sup>[271,273]</sup>

D’un point de vue structural, les précurseurs chimiques pour la synthèse de composés incorporant une unité leucine sont facilement accessibles à faibles coûts (notamment la Boc-L-leucine). Un avantage majeur est aussi le caractère salin que l’unité leucine

confère à la molécule finale, et donc la forte hydrosolubilité qui en découle (condition nécessaire à la libre diffusion de la sonde avant conversion). S'agissant d'une unité leucine N-terminale, une amine primaire est ainsi présente sur la sonde, celle-ci sera alors majoritairement sous sa forme protonée à pH physiologique, apportant de ce fait la charge positive à la molécule. Autre avantage à travailler avec la LAP, cette dernière est relativement abordable vendue sous forme purifiée et permet donc la réalisation de nombreux tests *in vitro*. La LAP est aussi présente naturellement dans certaines lignées cellulaires couramment utilisées en biologie, telles les cellules HeLa. Les études *in cellulo* sont ainsi également facilement accessibles.

Avec ces raisons en tête, les recherches de premières sondes ont commencé avec le Pr Xiaobing Zhang et le Dr Michael Waibel en 2009, qui ont développé une première série de sondes fluorogènes précipitantes pour la détection de l'activité LAP.<sup>[276]</sup> Celles-ci comprennent entre l'unité leucine et le fluorophore HPQ un tandem d'espaces : un premier espaceur cyclisant, avec ou sans présence d'un groupement *gem*-diméthyl (pour la préorganisation par effet Thorpe-Ingold, censé favoriser la cyclisation), et un deuxième espaceur éliminant de type ester acétoxyméthyle (Figure 35).

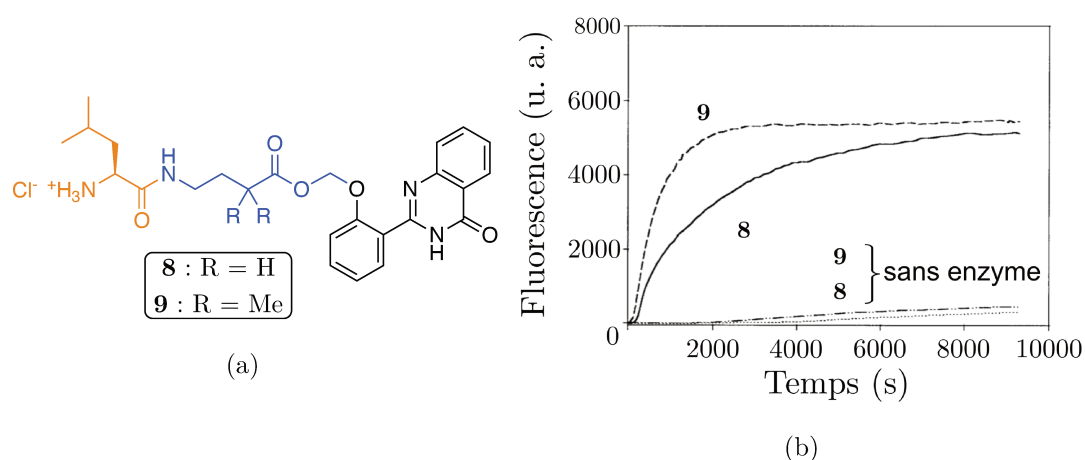


FIGURE 35 – Première génération de sondes fluorogènes précipitantes pour la LAP : (a) Structures moléculaires et (b) Résultats de cinétiques *in vitro* ( $\lambda_{ex} = 365$  nm,  $\lambda_{em} = 495$  nm, solvant solution de tampon phosphate, ou *Phosphate Buffer Solution* (PBS),  $37^\circ$  C,  $38 \mu\text{M}$  en sonde et  $0,002$  U de LAP.<sup>[276]</sup>)

Même si une fluorescence apparaît dès les premières minutes, et comme attendu encore plus rapidement pour le composé **9** présentant la préorganisation. Le caractère fluorogénique de ces sondes est ainsi démontré. Néanmoins le problème de l'instabilité vis-à-vis de l'hydrolyse spontanée n'est pas vraiment résolu : on peut en effet également voir une apparition de fluorescence pour les conditions sans enzyme, après un temps

plus long (environ 30 minutes) mais cela suffit à rendre cette technologie inapplicable dans de réelles situations, l'apparition de faux signal positif est trop important sur des temps courts.

Une deuxième famille de sondes a donc ensuite été mise au point par les Dr. Monica Vargas-Sanchez, Oliver Thorn-Seshold et Sean McKeon en 2010-2011.<sup>[277,278]</sup> Dans ces dernières, le lien avec le fluorophore HPQ a été changé : en lieu et place de l'éther de la première famille, on trouve ici un carbamate tertiaire, connu pour être le lien le plus stable à l'hydrolyse spontanée lorsque l'alcool qui le compose est fortement appauvri en électrons.<sup>[279]</sup> Le reste de l'espaceur cyclisant est une éthylène-diamine substituée, soit par un *gem*-diméthyl (pour les mêmes raisons que la sonde **10**), soit par un cycle à 6 membres formant alors une pipéridine à l'une des extrémités (**11**), la préorganisation devrait alors être encore plus forte par le gel de plusieurs degrés de liberté (Figure 36).

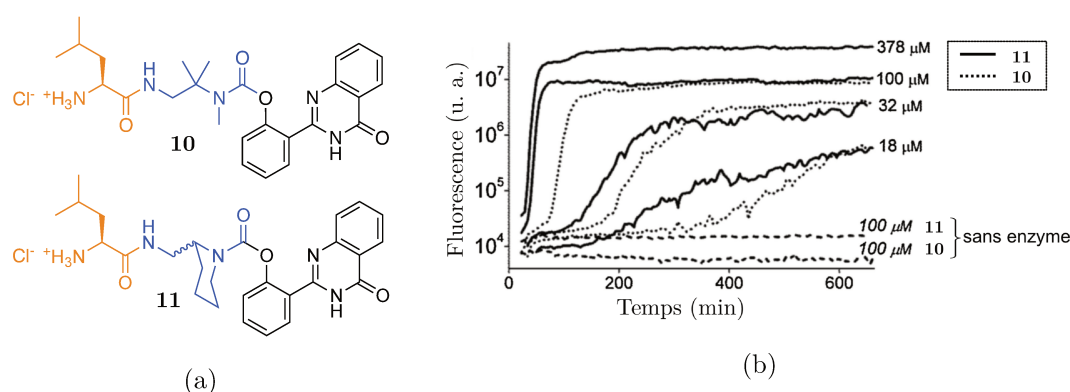


FIGURE 36 – Deuxième génération de sondes fluorogènes précipitantes pour la LAP. (a) : Structures moléculaires et (b) : résultats de cinétiques *in vitro* ( $\lambda_{ex} = 355$  nm,  $\lambda_{em} = 510$  nm, solvant PBS, 30 C, et 0,01 U de LAP.<sup>[277]</sup>)

Comme pour la première famille, un suivi de l'apparition de fluorescence *in vitro* a tout d'abord été effectué avec de l'enzyme LAP purifiée. Les résultats sont meilleurs que précédemment : la fluorescence apparaît toujours très vite lorsque l'enzyme est présente (également dès les premières minutes), à nouveau une plus forte préorganisation (sonde **11**) entraîne une apparition de signal plus rapide. La différence se fait au niveau des contrôles négatifs, dans ce cas aucune augmentation de signal n'est observable en l'absence de l'enzyme, même après 10 heures d'incubation à 37 °C. Ce résultat marque donc la première famille de sondes fluorogènes précipitantes assez robustes pour envisager d'autres applications en milieux biologiques. C'est donc ce qui a été testé dans un deuxième temps par l'équipe avec une première tentative d'imagerie *in cellulo* de l'activité LAP. Malheureusement, aucun signal n'a pu être observé dans les différentes

conditions testées.

C'est sur ce constat que le Dr Maxime Prost a envisagé une nouvelle modification de ces sondes afin d'augmenter les chances d'obtenir du signal *in cellulo*.<sup>[280]</sup> L'idée est alors simple, au lieu d'utiliser le fluorophore HPQ comme dans les deux premières génération de sondes, il a voulu tester l'utilisation du fluorophore optimisé à l'époque par *Molecular Probes*, à savoir l'ELF-97. En effet, ce dernier possède des propriétés spectrales aussi bonnes (voire supérieures) à la simple HPQ, mais surtout, son seuil de précipitation est encore plus bas, la sensibilité devrait donc logiquement être meilleure avec ce fluorophore. La sonde **12** a donc été synthétisée et testée *in vitro* puis *in cellulo*.<sup>[281]</sup> Les résultats *in vitro* sont assez similaires (apparition de signal rapide, totale stabilité) mais cette fois-ci, un signal fluorescent a pu être observé dans des cellules HeLa après moins de 30 minutes d'incubation de la sonde **12** à 22 °C (Figure 37). Cette nouvelle sonde est donc la première sonde ELF-97 stable, et applicable pour la détection de l'activité enzymatique LAP aussi bien *in vitro* que *in vivo*.

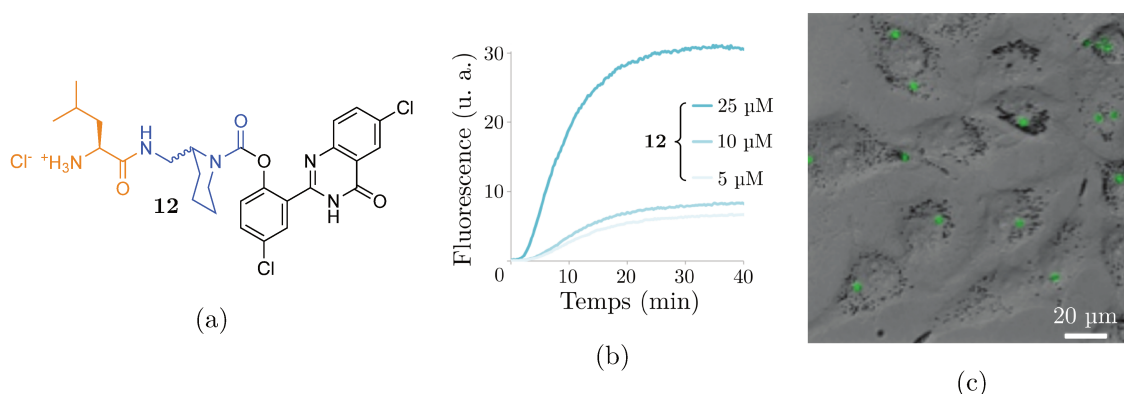


FIGURE 37 – Troisième génération de sondes fluorogènes précipitantes pour la LAP. (a) : Structures moléculaires, (b) : résultats de cinétiques *in vitro* (PBS, 37 °C, 38  $\mu$ M et 0,002 U de LAP) et (c) : cellules HeLa vivantes, incubées pendant 2 heures avec 10  $\mu$ M de sonde **12** et observées par microscopie à fluorescence (superposition des canaux de fluorescence en vert et de champ clair en niveaux de gris).<sup>[281]</sup>

Fort de ce résultat, de nombreuses applications de la détection de la LAP ont pu être effectuées (étude de bactéries sur boîte ou d'utilisation en révélation de *Western Blot* par exemple) montrant l'efficacité et la versatilité de la technologie.<sup>[280,281]</sup> D'autres peptidases ont aussi été ciblées et notamment des endopeptidases (enzyme hydrolysant au milieu d'une séquence peptidique, à opposer aux exopeptidases hydrolysant une extrémité).<sup>[280]</sup> Récemment, plusieurs équipes ont utilisé cette technologie d'espaceurs pour la détection de stress oxydant<sup>[282]</sup>, ou d'activités enzymatiques telle la furine ou

la  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT).<sup>[283,284]</sup>

Une autre famille d'enzymes avait également été visée par Maxime Prost : les glycosidases, avec comme enzyme modèle la  $\beta$ -gal. Mais dans ce dernier cas, seule une sonde à double sélectivité  $\beta$ -gal plus LAP (**14**) s'est montrée efficace (Figure 38).<sup>[285]</sup> La sonde  $\beta$ -gal seule (**13**) bien que stable en conditions aqueuses, montre une cinétique d'apparition de fluorescence très lente, presque 24 heures étaient en effet nécessaires pour atteindre le plateau de signal.<sup>[286]</sup>

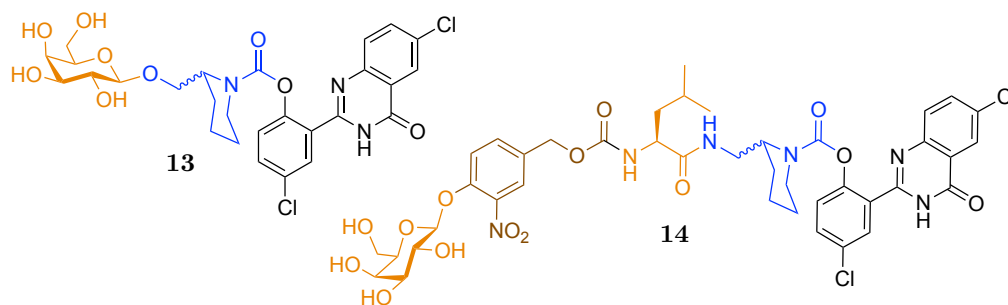


FIGURE 38 – Structures moléculaires de la première sonde pour  $\beta$ -gal (**13**) à l'hydrolyse très lente, et d'une sonde à double sélectivité (**14**) plus rapide malgré la présence de deux couples substrat-espaceur à la suite (galactose-PABA-leucine-espaceur cyclisant).<sup>[280,285]</sup>

### 3.2.3 Récentes avancées – sondes pour glycosidases

Plus récemment, une nouvelle version de sondes glycosidases est née, issue d'une proposition structurale du Dr Maxime Prost et synthétisée pour la première fois par le Dr Corentin Gondrand.<sup>[287]</sup> Le choix de l'activité  $\beta$ -gal en tant que preuve de concept pour cette nouvelle génération était motivé par plusieurs raisons. Le gène *lacZ* codant pour la  $\beta$ -gal est connu depuis longtemps et forme avec son produit enzymatique une paire pour une utilisation en tant que gène rapporteur (pour la technologie de gène rapporteur, voir 2.1, p. 23).<sup>[288]</sup> Le X-gal, est utilisé de manière routinière pour la détection d'activité  $\beta$ -gal avec l'avantage d'une rétention forte du signal par précipitation sur le lieu d'activité enzymatique.<sup>[120]</sup> Une alternative présentant les mêmes propriétés de rétention mais utilisant une émission fluorescente comme signal détectable est hautement souhaitée pour les nouvelles applications qu'elle permettrait, notamment en cytométrie de flux (tri cellulaire par fluorescence (en cytométrie en flux), ou *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS)). De nombreuses sondes, utilisant souvent la fluorescence comme méthode de détection ont été développées dans le but de détecter cette activité enzymatique.<sup>[199,235,289-292]</sup> De plus, la  $\beta$ -gal est associée à de nombreux contextes patholo-



giques. On peut par exemple citer certains cancers (ovariens primaires)<sup>[293]</sup> ou encore l'indigestion au lactose.<sup>[294]</sup> Comme il sera détaillé par la suite (section I.3, p. 92), la  $\beta$ -gal est également un biomarqueur de la sénescence cellulaire, qui constitue aussi un sujet d'étude en oncologie.

La stratégie structurale de cette nouvelle famille de composés s'inspire des résultats de la sonde à double sélectivité, offrant une meilleure cinétique de réponse que la sonde simplement  $\beta$ -gal.<sup>[285]</sup> L'hypothèse était alors qu'un clivage de glycoside aromatique est plus favorisé comparé à celui de sa version aliphatique. En effet, le caractère nucléofuge d'un phénol est meilleur que celui d'un alcool aliphatique, accélérant ainsi la réaction enzymatique. Pour autant, il faut garder le carbamate tertiaire indispensable à la stabilisation de l'ELF-97. La solution est donc d'utiliser un tandem d'espaces : un premier, éliminant de type PABA, le deuxième étant le classique espaceur cyclisant pipéridine (Figure 39).

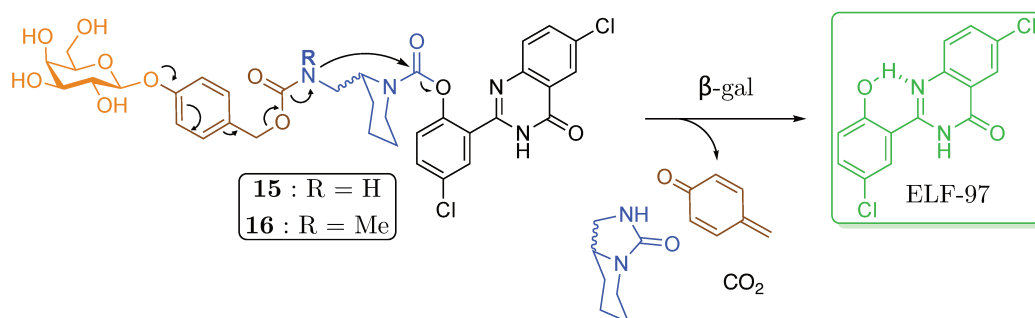


FIGURE 39 – Illustrations des sondes glycosidases et mécanisme de relargage de l'ELF-97.

Mes contributions à l'équipe ont alors commencé à cette époque avec la synthèse de l'analogue N-méthylé (**16**) pour comparer les cinétiques d'effondrement et les stabilités comparatives entre les liens carbamate secondaire et tertiaire. Finalement, pour les deux versions les résultats étaient très similaires et encourageants. Comparées à la première génération de sondes  $\beta$ -gal, ces sondes présentent une vitesse d'apparition de fluorescence beaucoup plus rapide, semblable même à celle des sondes LAP. La grande stabilité est également conservée puisqu'aucun signal n'est observable sur temps longs en absence d'enzyme. En revanche, la présence du méthyle supplémentaire pour la sonde **16** ne semble améliorer ni la cinétique de réponse, ni la stabilité. L'effort synthétique que son ajout nécessite (deux étapes supplémentaires) n'est donc pas justifiable et cette variante n'a pas été conservée pour la suite des études. Cette génération de sondes marque mon arrivée au laboratoire et la suite des résultats concernent donc les travaux de la présente thèse.



### 3.3 Objectifs de la thèse

Après les réussites des sondes LAP et  $\beta$ -gal les objectifs étaient alors nombreux. La sonde  $\beta$ -gal était une preuve de concept pour la réalisation d'autres sondes ciblant des enzymes de la famille des glycosidases. Dans une première partie seront ainsi présentées les avancées sur cette famille de sondes, en termes de variations de substrats pour la détection d'autres glycosidases, d'applications biologiques variées à l'aide de ces sondes mais aussi les premiers résultats d'un projet d'optimisation de l'espaceur cyclisant dans un contexte de sénescence cellulaire.

Dans un deuxième temps, je présenterai le développement et l'étude biologique initiale d'une toute nouvelle classe de sondes visant une activité enzymatique inédite dans l'équipe : les  $\beta$ -lactamases. L'intérêt pour ces enzymes est varié et peut aller de la résistance bactérienne aux outils biochimiques d'analyse en biologie moléculaire. Ces travaux ont notamment fait partie d'une collaboration active avec l'équipe japonaise du Pr Kazuya Kikuchi à l'Université d'Osaka dans laquelle j'ai pu effectuer un stage de recherche.

Enfin, la dernière partie sera consacrée aux progrès effectués sur une thématique de recherche récurrente depuis plusieurs années dans l'équipe, à savoir le développement d'analogues à l'ELF-97 possédant d'autres propriétés intéressantes, notamment spectrales. Une émission de fluorescence décalée dans le rouge ou le proche-infrarouge est notamment recherchée et nécessaire en vue de possibles applications *in vivo*. Plusieurs fluorophores issus de la littérature ainsi que de nouvelles structures seront présentés et analysés.

# Chapitre I

## Développement de sondes à activités glycosidases



# Chapitre I

## Développement de sondes à activités glycosidases

Ce chapitre sera consacré à la suite de mes travaux de Master 2 effectués dans l'équipe, à savoir la mise au point et le développement d'une série de sondes fluorogènes [ELF-97](#) pour la détection d'activités enzymatiques de type glycosidases. Ces travaux seront regroupés en trois principales sections. Un premier temps sera ainsi consacré à l'optimisation de la sonde  $\beta$ -gal déjà développée par l'équipe. La réalisation de sondes pour la détection de nouvelles enzymes de la famille des glycosidases constituera une seconde partie. Enfin, un projet plus exploratoire sera présenté sur la modification de l'un des espaceurs de la sonde modèle  $\beta$ -gal, afin d'optimiser son fonctionnement, notamment en milieu acide. Ce projet a pour cadre l'étude de la sénescence cellulaire, qui sera introduite dans un premier temps.

## I.1 Optimisation de la sonde $\beta$ -gal

Les sondes LAP et  $\beta$ -gal développées par les docteurs Maxime Prost et Corentin Gondrand ont démontré leur efficacité et la capacité de l'équipe à concilier la chimie de l'ELF-97 à celle de la réactivité enzymatique de plusieurs classes d'enzymes. Maxime Prost avait, après cette preuve de concept, développé intensivement la gamme de sondes peptidases avec la réalisation de plusieurs exemples pour des enzymes variées telles l'alanine aminopeptidase, la proline aminopeptidase, la  $\beta$ -alanine aminopeptidase ou encore certaines endoprotéases possédant des substrats plus complexes de type oligopeptides. Corentin Gondrand a, quant à lui, développé la première sonde  $\beta$ -gal stable et présentant une cinétique d'effondrement très rapide. Des premières évaluations biologiques, notamment de type cinétique *in vitro*, imagerie *in cellulo* ou FACS avaient pu être réalisées. Un autre exemple de sonde glycosidase avait également été synthétisé avec une sonde pour l'activité cellulase (17), dégradant la cellulose (par exemple de déchets végétaux) en glucose, dans un projet d'optimisation de la production de bioéthanol à partir de matières premières végétales.

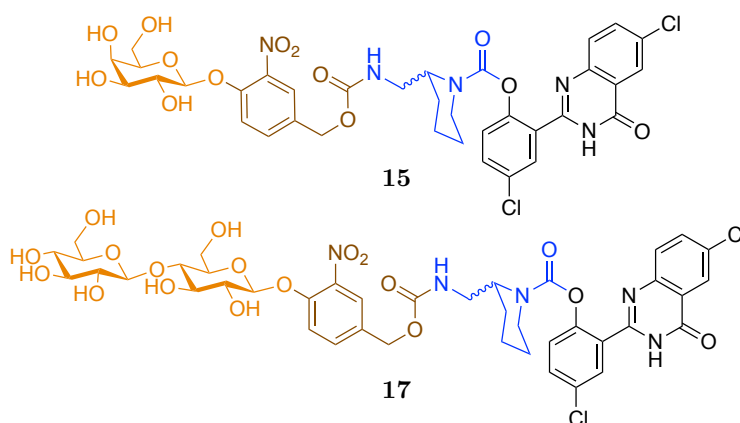


FIGURE 40 – Structures des sondes glycosidases déjà développées par l'équipe.

L'étude biologique primaire effectuée sur la sonde  $\beta$ -gal a été approfondie pendant la période de cette thèse. Je présenterai dans un premier temps ces nouveaux résultats biologiques, réalisés avec Damien Curton, alors Ingénieur d'études biologiste dans l'équipe. Par soucis de clarté, un enchaînement des types de manipulations sera respecté dans toute la suite du manuscrit : les résultats *in vitro* avec enzymes purifiées seront présentés dans un premier temps. Si celles-ci sont concluantes, des expériences *in cellulo* peuvent alors être envisagées, l'imagerie par fluorescence notamment et la cytométrie en flux lorsque cela est possible. Pour cette sonde  $\beta$ -gal, ces trois types d'expériences avaient déjà été conduites, des optimisations ont donc été effectuées. La

synthèse de la sonde **15** ne sera pas détaillée ici. La synthèse des sondes de type glycosidases sera en effet décrite dans la prochaine section dans le cadre des nouvelles sondes glycosidases (voir I.2, p. 82).

### I.1.1 Étude *in vitro*

La sonde **15** avait déjà été testée en présence, ou non, d'enzyme  $\beta$ -gal purifiée et avait pu montrer une très bonne stabilité jusqu'à 5 heures d'incubation à 37 °C. Une cinétique classique avec et sans enzyme est présentée en Figure 41. Nous avons décidé de pousser encore plus l'étude de cette robustesse, un des points forts de la technologie, en incubant la sonde **15** sur plusieurs jours en milieux aqueux (PBS), à 37 °C. Deux conditions avec et sans enzyme sont toujours nécessaires pour avoir une référence positive et pouvoir ainsi comparer le signal éventuellement obtenu par dégradation hydrolytique sans enzyme. Les résultats (Figure 41) montrent alors une stabilité prolongée de la sonde **15** : même après 4 jours, le faux signal positif reste en dessous de 1 %, comparé au signal positif classique.

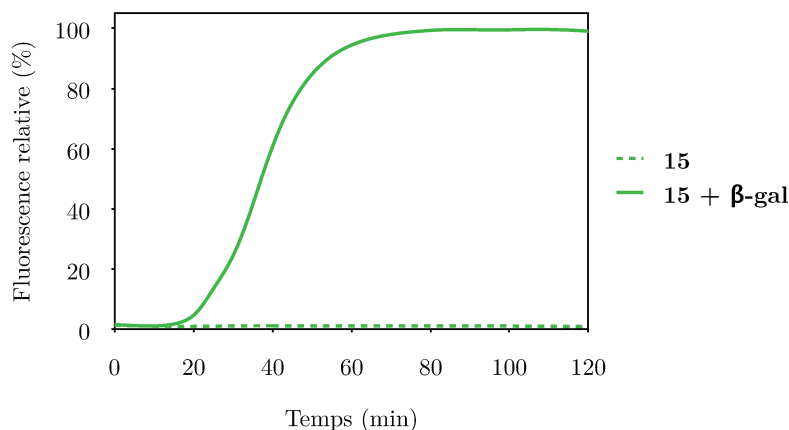


FIGURE 41 – Fluorescence de la sonde **15** en fonction du temps ; concentration : 10  $\mu$ M, solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 2.5 U.mL<sup>-1</sup>.

D'autres paramètres ont également été testés, à savoir la résistance à la température ainsi qu'une évaluation des performances à différents pH. Pour la stabilité thermique, la sonde a été placée en milieu PBS, puis chauffée à différentes températures pour une durée de 20 minutes (Figure 42). Jusqu'à 80 °C, aucune fluorescence contaminante n'est observée, attestant d'une stabilité de la sonde sur une telle durée. Au delà, une fluorescence initiale apparaît : elle est raisonnable jusqu'à 100 °C mais devient importante pour 110 °C. Un tel comportement n'est pas anormal, au contraire, la résistance

thermale est plutôt correcte compte-tenu de la nature des liens carbamates, qui sont connus pour ne pas être stables à la chaleur.<sup>[295]</sup>

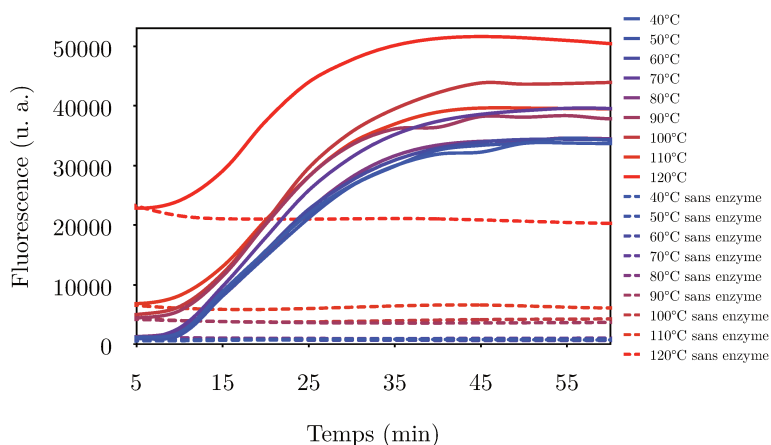


FIGURE 42 – Fluorescence de la sonde **15** en fonction du temps après 20 min d'exposition à différentes températures, concentration : 10  $\mu\text{M}$ , solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 2.5  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

De plus, même si cette fluorescence initiale pourrait gêner une détection efficace, les sondes ne montrent pas d'instabilité pendant le temps d'incubation, une fois revenu à température ambiante et après ajout de l'enzyme. Les sondes sont donc partiellement dégradées à haute température, mais restent fonctionnelles malgré tout. Ce résultat permet d'envisager l'incorporation de cette sonde **15** dans des gels d'agarose. Ceux-ci sont en effet coulés, par exemple dans des boîtes de Pétri, après liquéfaction vers 55 °C. Un ajout de la sonde à ce moment est possible car elle ne présente aucune dégradation à cette température.

L'apparition de fluorescence a aussi été testée en présence d'enzyme et en milieu PBS tamponné à différents pH (Figure 43). Une apparition de fluorescence est observable sur une gamme de pH allant de 5 à 11, valeurs honorables quand on les compare aux performances de sondes proches. Celles basées sur un motif fluorescéine notamment, comme celles de l'équipe du Pr Urano présentent, elles, une gamme de pH accessibles beaucoup plus resserrée (7 à 10). Le mécanisme de spirocyclisation nécessaire à l'observation de fluorescence étant en effet pH-dépendant, l'hydrolyse par catalyse acide ou basique n'est pas la seule à entrer en jeu pour expliquer l'absence du signal (ou la présence de signal en absence de réaction enzymatique). Dans notre cas, plusieurs paramètres rentrent en compte : la stabilité des liens (notamment carbamates) vis-à-vis de l'hydrolyse acide ou basique, et l'influence du pH sur les éliminations des espaceurs ou la précipitation de l'ELF-97.

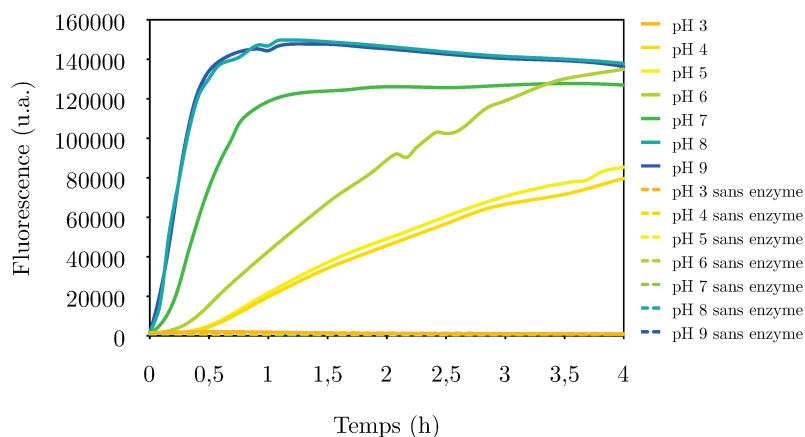


FIGURE 43 – Fluorescence de la sonde **15** en fonction du temps avec variation du pH, concentration : 25  $\mu$ M, solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 2.5 U.mL<sup>-1</sup>.

Concernant le premier point, le choix d'un lien carbamate a été fait en prenant en compte sa plus grande stabilité vis-à-vis des autres liens possibles (esters, éthers, etc.), il devrait donc présenter une relative résistance aux variations de pH. La disparition du signal au dessus de pH = 10 (non représenté) peut davantage s'expliquer par la déprotonation de l'ELF-97 en milieu basique. En effet, l'ELF-97 est un phénol dont l'acidité est accrue par l'effet électro-attracteurs des deux atomes de chlore. Même si sa constante d'acidité (pKa) n'a jamais été évaluée expérimentalement (probablement à cause de problèmes d'insolubilité), elle est évaluée théoriquement à une valeur de 7,3.<sup>[280]</sup> Le pKa réel doit ainsi être assez faible pour permettre sa déprotonation et par conséquent une perte des propriétés émissives (voir section 2.3.2, p. 37), voire une solubilisation qui entraînerait les mêmes effets.

La diminution, puis la disparition, du signal en milieu de plus en plus acide vient très probablement d'un ralentissement de la cyclisation intramoléculaire de l'espaceur pipéridine. Nous reviendrons plus en détail sur ce point par la suite dans le contexte de la sénescence (voir section I.3, p. 92), mais Maxime Prost avait déjà montré un tel ralentissement de cette cyclisation à pH acide.<sup>[280]</sup>

Un dernier point étudié est la spécificité du substrat pour son enzyme cible. Cette spécificité est indispensable pour envisager des études ultérieures car, en complément d'une grande stabilité, elle permet d'être sûr que l'observation d'un signal fluorescent est corrélée avec la présence de l'activité enzymatique recherchée. Pour la tester, la sonde **15** a été incubée dans les conditions classiques, mais en présence de différentes enzymes proches, sélectionnées dans la famille des glycosidases (Figure 44).



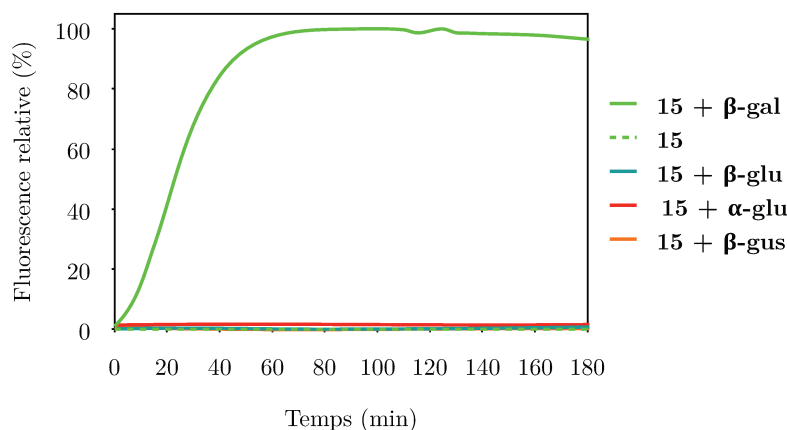


FIGURE 44 – Fluorescence de la sonde **15** en fonction du temps avec variation de l'enzyme ajoutée ; concentration : 10  $\mu\text{M}$ , solvant : PBS, température : 37  $^{\circ}\text{C}$ , enzyme ajoutée : 10  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

La spécificité observée semble optimale : seule la présence de la  $\beta$ -gal entraîne l'apparition rapide d'un signal fluorescent. Les enzymes très proches, notamment la  $\beta$ -gus et la  $\beta$ -glu ne génèrent aucune génération de fluorescence, même après 3 heures. Une  $\alpha$ -glycosidase a également été testée : l' $\alpha$ -glu, et n'a, de même, généré aucun signal. Il aurait été plus pertinent de tester dans ce cas l' $\alpha$ -gal pour laquelle seule l'anométrie du substrat type serait modifiée, malheureusement cette dernière, bien que disponible commercialement sous forme purifiée, est relativement chère à l'achat et n'aurait servi que dans cette application particulière. Nous avons ainsi préféré nous restreindre aux enzymes disponibles au laboratoire qui s'avèrent être logiquement les plus abordables à l'achat. De plus, une autre étude de spécificité sur une sonde à double sélectivité (décrite par la suite, section I.2, p. 82) nous conforte sur la sélectivité  $\alpha/\beta$  de tels substrats.

Ces nouveaux résultats *in vitro* viennent ainsi compléter les premières études qui avaient démontré le bon fonctionnement de la sonde **15** et sa non-toxicité. En poussant les études de stabilité sur de longues durées et par des tests à différents pH ou à haute température, nous avons ainsi montré la grande robustesse de la technologie moléculaire employée. La stabilité sur plusieurs jours permet ainsi d'envisager des expériences à plus long terme, par exemple sur des colonies bactériennes cultivées en boîte de Pétri, qui nécessitent souvent des temps de prolifération élevés (typiquement au moins 16 heures mais jusqu'à 48 heures). La stabilité à la chaleur est très correcte, néanmoins l'autoclavage (aseptisation par la chaleur) d'une solution de sonde (ou d'un milieu/gel la contenant) n'est en revanche pas envisageable. Il nécessiterait dans ce

cas une stabilité jusqu'à 120 °C sur 20 minutes. Finalement, la forte spécificité du système permet de considérer sereinement des applications sur cellules vivantes, où de nombreuses molécules et donc enzymes se côtoient dans un environnement restreint.

### I.1.2 Étude *in cellulo*

Plusieurs types d'expériences peuvent être conduites *in cellulo*. On peut ainsi varier le type de cellules utilisées : bactériennes ou mammifères, mais également la nature de ces dernières. De nombreuses bactéries peuvent être cultivées sur boîte ou en suspension, il en est de même pour les cellules mammifères avec l'utilisation de lignées modèles assez variées. On peut notamment citer les cellules HeLa ou de *Human Embryonic Kidney* (HEK). La lecture de la fluorescence obtenue (ou non) peut alors s'effectuer par différentes modalités : microscopie par fluorescence et cytométrie en flux entre autres.

#### I.1.2.1 Étude sur bactéries

Plusieurs technologies existent déjà pour la détection d'activité  $\beta$ -gal sur bactéries, on peut notamment citer le X-gal et la FDG. Déjà abordées précédemment (section 2.1 p. 23, 3.1.1 p. 41 et 3.1.3 p. 45) ces deux sondes souffrent chacune de défauts. Le X-gal est chromogénique, et n'autorise qu'un contrôle visuel ou par mesure d'absorbance, limitant ainsi grandement les applications possibles. La FDG est, quant à elle, fluorogène, mais le fluorophore relâché, la fluorescéine en l'occurrence, est hydrosoluble et est connue pour pouvoir diffuser librement et rapidement en dehors des cellules et à travers les cellules.<sup>[226,296]</sup> Nous nous sommes ainsi intéressés à comparer notre technologie de sonde fluorogène précipitante à ces références largement utilisées dans les laboratoires de recherche.

Le premier test, peut-être le plus simple à mettre en œuvre, est l'incubation d'une suspension bactérienne en présence de la sonde. Nous avons choisi de travailler avec les bactéries *E. coli*, organisme-modèle pour ce genre d'étude, du fait notamment de sa vitesse de reproduction (une division toutes les 20 minutes à 37 °C en milieu riche). Deux lignées différentes seront utilisées : une positive (*lacZ* +) et une négative (*lacZ* -) afin de constituer un contrôle négatif. Celles-ci ont été incubées en présence de deux sondes, notre sonde  $\beta$ -gal (**15**) ainsi que la FDG commerciale (Figure 45).

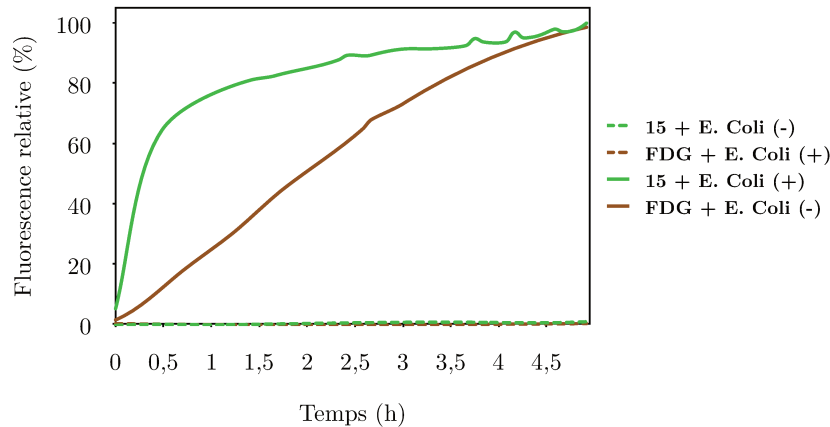


FIGURE 45 – Fluorescence des sondes **15** et **FDG** en fonction du temps, concentration : 25  $\mu$ M, solvant : PBS, température : 37 °C,  $1.10^6$  bactéries en suspension.

Pour les deux sondes, une fluorescence apparaît rapidement et finit par atteindre un plateau. Toutefois, une cinétique plus rapide peut être notée pour notre sonde **15**. On peut comparer les temps de "demi-apparition de fluorescence", temps pour lesquels la fluorescence a atteint la moitié de sa valeur maximale. On trouve alors une valeur d'environ 20 minutes pour notre sonde **15** et 2 heures pour la **FDG**, soit une diminution par un facteur 6, attestant de la réponse rapide obtenue par cette sonde à double-espaces. Concernant la stabilité, les deux sondes jouent jeu égal avec une totale absence de signal dans les bactéries négatives. La fluorescence obtenue dans les bactéries positives peut ainsi être clairement attribuée à une coupure par la  $\beta$ -gal, et non par une autre dégradation enzymatique ou hydrolytique.

Du fait de leur très petite taille (entre 0,5 et 3  $\mu$ m pour *E. coli*) et de leur motilité, il n'est pas aisé de réaliser de la microscopie de cellules bactériennes isolées. Nous avons plutôt choisi de nous concentrer sur un autre type d'imagerie : celle de cultures bactériennes en boîtes de Pétri. Pour cette dernière, une suspension bactérienne est tout d'abord déposée sur gélose, un milieu riche en nutriments et solidifié par la présence d'agar-agar (appelé également agarose dans sa forme purifiée). Une fois déposées, les bactéries sont étalées par stries successives afin d'obtenir des cellules isolées qui, après multiplication, donneront une colonie de bactéries au patrimoine génétique identique. Pour distinguer ces colonies sur un critère d'activités enzymatiques, par exemple pour tester la transformation de bactéries par un système de gène rapporteur, il suffit d'incorporer la sonde dans le milieu gélosé encore liquide, la lecture pourra alors directement se faire après développement des bactéries.

Une fois encore, la sonde **15** a été comparée à la **FDG** afin de différencier les deux lignées *E. coli lacZ* + et *lacZ* -. Deux boîtes de Pétri sont nécessaires, une avec un milieu gélosé contenant la sonde **15** (50  $\mu$ M) et l'autre avec la sonde **FDG**. Sur ces deux milieux sont alors déposés, d'un côté, une suspension de bactéries positives et de l'autre, une suspension de bactéries négatives. Elles sont ensuite étalées classiquement mais sans superposer les stries afin de garder deux zones bien distinctes entre les types bactériens. Après 24 heures de culture à 37 °C, les boîtes sont examinées sous lampe UV afin d'observer la fluorescence développée (Figure 46). Il faut d'ores et déjà noter ici le caractère imparfait de la mesure : la lampe UV utilisée est celle classiquement utilisée pour la révélation de plaques de Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et possède deux longueurs d'onde d'excitation :  $\lambda_{ex1} = 256$  nm et  $\lambda_{ex2} = 365$  nm. Pour un système *ELF-97* la deuxième est relativement bien adaptée, sa longueur d'onde maximale d'excitation étant située aux alentours de 360 nm. En revanche, pour la fluorescéine, l'excitation optimale se situe aux alentours de 490 nm, on risque ainsi une certaine atténuation du signal pour la sonde **FDG**. Pour éviter ce problème, une table d'illumination possédant des diodes électroluminescente, ou *Light-Emitting Diodes* (LEDs) de longueurs d'onde adaptées aux deux fluorophores pourrait être utilisée, mais ce genre d'équipements coûte probablement très cher et n'est en tout cas pas disponible dans le laboratoire où cette thèse a été effectuée.

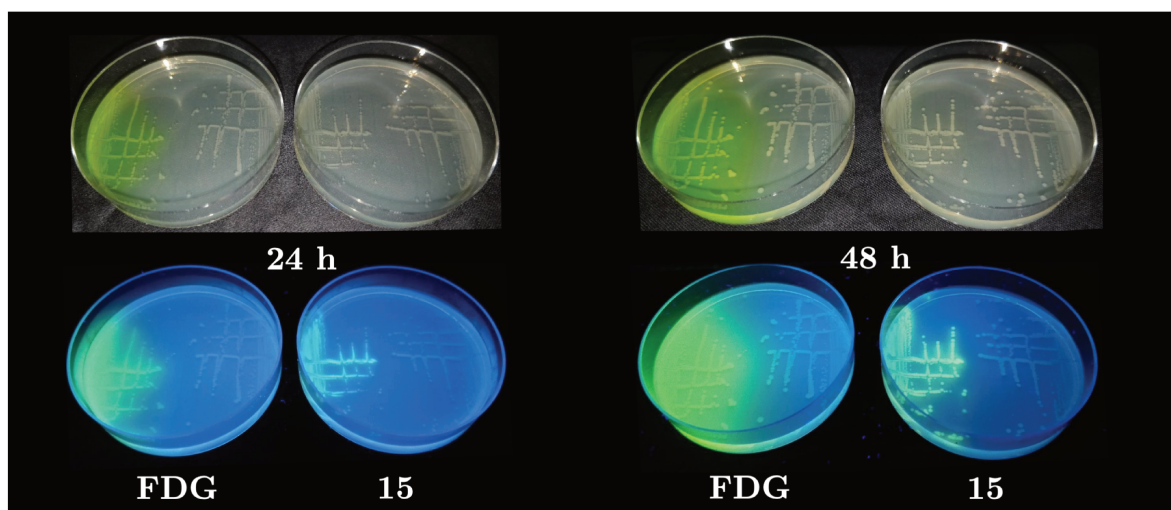


FIGURE 46 – Boîtes de Pétri avec milieu gélosé contenant la **FDG** (boîte de gauche) et la sonde **15** (boîte de droite), pour chacune les bactéries sur la partie gauche sont  $\beta$ -gal + et sur la partie droite  $\beta$ -gal - ; concentration : 50  $\mu$ M, température : 37 °C.

Malgré la longueur d'onde inadaptée, l'émission de la fluorescéine est clairement observable et illustre parfaitement le besoin de technologies apportant une véritable rétention du signal. En effet, en utilisant la sonde **FDG**, un signal est bien visible,

et uniquement au niveau des bactéries positives, mais celui-ci diffuse très rapidement malgré le milieu solide. Après 24 heures, toute la zone positive est déjà marquée et après 48 heures le signal atteint même la zone des bactéries négatives. On comprend alors aisément qu'il n'est pas possible d'utiliser une telle technologie pour la discrimination de colonies positives et négatives : toute la zone étant fluorescente, comment savoir de quelle(s) colonie(s) est issu le signal ? Une transformation bactérienne n'est jamais quantitative, il est donc absolument nécessaire de pouvoir discriminer efficacement les colonies marquées des non-marquées, or ce n'est pas possible ici. En revanche, le profil est bien différent en utilisant la sonde **15** : dans ce cas, le signal est clairement localisé, à 24 comme 48 heures, il est possible d'observer la fluorescence de colonies uniques. Un léger halo est tout de même visible, mais n'est pas dû à une diffusion du signal fluorescent, ni à une diffusion de l'enzyme (cette dernière étant intracellulaire) mais plutôt au dispositif de prise d'image non adapté aux faibles intensités lumineuses : les halos n'étant pas visibles à l'œil nu.

Ces premiers résultats en présence de bactéries sont très encourageants et ouvrent la voie à d'autres expériences. La cytométrie en flux est adaptable à l'étude des bactéries et apporterait une notion quantitative à l'étude. Une discrimination d'un mélange de colonies positives et négatives serait également envisageable, notamment après transformation et étalement sur boîte. Le X-gal est le substrat classiquement utilisé dans ce cadre, mais le critère de fluorescence pourrait permettre une double caractérisation des colonies d'une boîte. En utilisant un mélange de sonde chromogène (comme le composé **15**) et chromogène (comme le X-gal mais pour une autre activité enzymatique), l'observation de la coloration puis de la fluorescence apporterait une classification plus fine, pour un même délai d'incubation.

### I.1.2.2 Microscopie de cultures cellulaires

La première application des sondes peptidases et glycosidases est toutefois l'imagerie moléculaire d'activités enzymatiques dans des cellules mammifères. L'objectif au long terme étant de pouvoir les appliquer à *l'in vivo*, et à l'Homme, il faut donc posséder un système efficace au sein de cellules eucaryotes. Des expériences en microscopie par fluorescence dans ce sens avaient été présentées par Corentin Gondrand dans son manuscrit de thèse. Une lignée cellulaire positive à la  $\beta$ -gal avait, à l'époque, été choisie : les cellules C17.2. Ces dernières possèdent, en effet, une activité  $\beta$ -gal constitutive.



Comme toujours, un contrôle négatif est nécessaire, pour discriminer vrai signal et bruit de fond. Classiquement, les cellules HeLa ont été sélectionnées dans ce but, ces dernières sont connues pour être  $\beta$ -gal-négatives. Les images obtenues sont présentées ci-dessous (un exemple d'image par microscopie confocale peut être trouvé en Annexes, section III.5, p. 245).

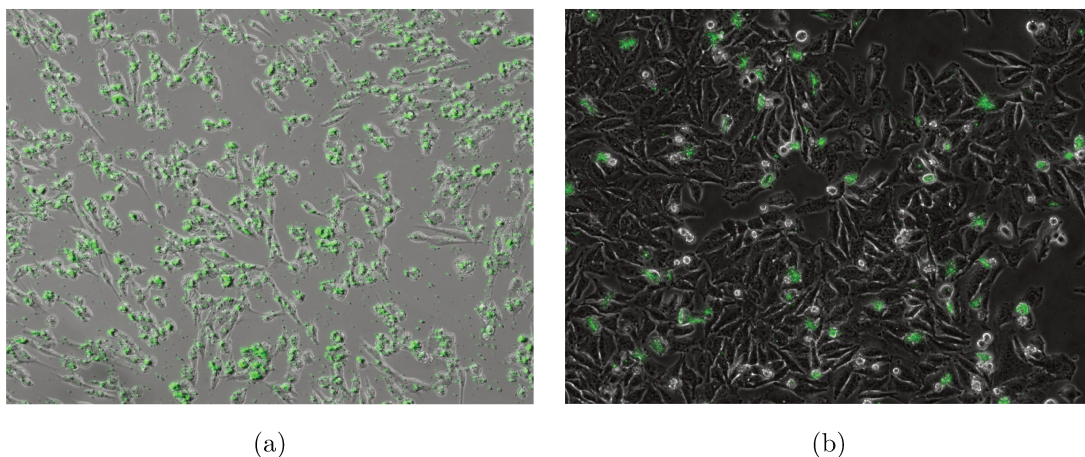


FIGURE 47 – Images par microscopie de fluorescence (a) de cellules C17.2 ou (b) de cellules HeLa, incubées avec 50  $\mu$ M de la sonde  $\beta$ -gal **15** pendant 24 h à 37 °C (superposition de l'image directe par contraste de phase et de l'image de fluorescence ( $\lambda_{ex} = 355$  nm,  $\lambda_{em} = 530$  nm)).

Du signal est bien observable dans la quasi totalité des cellules positives (C17.2), prouvant la pénétration de la sonde, sa conversion par l'enzyme puis la précipitation de l'ELF-97 nécessaire au développement de la fluorescence. En revanche, un peu de signal extra-cellulaire est également observé, provenant probablement de l'éclatement de certaines cellules (les temps d'incubation étant assez longs), plutôt que d'une diffusion de l'enzyme ou des précipités ou dehors des cellules. Mais le principal problème est la présence de fluorescence non-négligeable dans les cellules normalement négatives (HeLa). Ce signal peut avoir plusieurs sources dont une dégradation de la sonde qui libérerait de manière spontanée du fluorophore ou une activité  $\beta$ -gal résiduelle dans ces cellules. La deuxième explication semble plus plausible au vue des résultats de stabilité obtenus *in vitro*. Ce contrôle négatif n'en est donc pas vraiment un et d'autres conditions sont à trouver pour l'obtenir. C'est avec cet objectif que des nouvelles expériences ont été entreprises, notamment en cytométrie de flux, afin de quantifier précisément le marquage (difficile à évaluer sur une image de microscopie). Différentes populations de cellules ont été évaluées à la recherche de conditions menant à une absence de fluorescence, constituant alors un véritable contrôle négatif.

### I.1.2.3 Cytométrie en flux

Pour quantifier plus finement le marquage par fluorescence d'une population de cellules, on profite des possibilités offertes par les méthodes modernes de cytométrie en flux, notamment par **FACS**. Cette méthode consiste à analyser des paramètres physiques individuels d'une large population de cellules : plusieurs dizaines de milliers de cellules sont ainsi analysables en quelques minutes. Dans le cas du **FACS**, plusieurs paramètres peuvent être obtenus pour chaque cellule. Pour ce faire, une suspension de cellules est aspirée et acheminée grâce à un système fluidique jusqu'au détecteur devant lequel les cellules passent majoritairement une par une. Un laser est notamment présent dans ce détecteur et la mesure de la diffraction dans le sens du faisceau incident, ou *Forward Scattering* (FSC) et de la diffraction perpendiculaire au faisceau incident, ou *Side Scattering* (SSC) permet d'obtenir respectivement la taille de la cellule et sa granularité de surface. Ces deux informations donnent des indices sur la nature des cellules et permettent d'exclure les débris cellulaires ou les cellules agrégés présentant, en effet, des profils de taille et des irrégularités de surface facilement distinguables. La fluorescence émise après excitation par le laser est également mesurée et permet de comparer les intensités relatives à l'intérieur des différentes cellules. Plusieurs lasers peuvent être utilisés sur une même cellule et plusieurs émissions fluorescentes mesurées (jusqu'à 10 dans les plus grosses expériences). Dans ce genre d'études, il est primordial d'éviter toute diffusion du signal, qui viendrait fausser la quantification par transfert de fluorescence vers des cellules normalement non-marquées.<sup>[105]</sup>

Notre technologie mettant l'accent sur une totale rétention du signal à l'intérieur des cellules prend ainsi toute son importance. L'objectif à terme étant d'arriver à détecter un tout petit nombre de cellules (quelques unités), positives à une activité enzymatique, dans une grande population de cellules négatives (plusieurs dizaines de milliers voire plus) ; c'est en quelque sorte le problème de l'aiguille dans la botte de foin à l'échelle cellulaire. Cette situation se retrouve par exemple lors d'une tentative de détection de cellules cancéreuses (type métastase) sur un échantillon contenant alors une très grande majorité de cellules saines. Pour atteindre cet objectif, deux critères sont nécessaires : un marquage efficace, si ce n'est quantitatif (on ne veut pas "manquer" des cellules positives), ainsi qu'une absence totale de marquage aspécifique, de dégradation ou de diffusion du signal pour éviter tout faux positif. Corentin Gondrand avait déjà présenté des résultats préliminaires en **FACS**, le marquage de cellules  $\beta$ -gal positives C17.2 a pu être observé mais n'a jamais été quantitatif : 90 % des cellules étaient fluorescentes

après 24 heures. De plus, tout comme en microscopie cellulaire, un véritable contrôle négatif manquait : que ce soit avec les cellules **HeLa** ou **HEK** (toutes deux connues pour être  $\beta$ -gal-négatives), un signal était toujours observé. Ce dernier est certes plus faible qu'avec les cellules C17.2 mais il empêche tout de même la preuve de concept d'une détection efficace.

Un nouveau duo de cellules a donc été choisi pour tenter d'améliorer d'une part les taux de cellules marquées, et d'autre part, d'obtenir un véritable contrôle négatif, avec des cellules qui ne présenteraient aucune fluorescence. Les cellules utilisées en routine dans les laboratoires de culture cellulaire sont généralement des cellules cancéreuses. Ces dernières ont, en effet, une certaine capacité à se diviser plus rapidement que les cellules non-cancéreuses, ce qui constitue un avantage certain dans un but de multiplication rapide avant une expérience. Ces lignées sont ainsi dites "immortalisées" : elles ne possèdent pas (plus) de mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire (comme la sénescence, étudiée par la suite section I.3, p. 92). Toutefois, ces cellules cancéreuses présentent souvent des profils d'activités enzymatiques bien différents des cellules classiques. Il n'est donc pas surprenant de retrouver une activité  $\beta$ -gal (même faible) dans ces cellules : celle-ci étant connue pour être sur-exprimée dans certains cancers, comme expliqué précédemment (section 3.2, p. 47).<sup>[293]</sup> Une nouvelle stratégie a donc été choisie pour obtenir un contrôle négatif : l'utilisation d'une seule lignée cellulaire pour laquelle on pourrait dans un cas sur-exprimer l'activité  $\beta$ -gal, et dans un autre la masquer totalement. Pour cela, des cellules **HeLa** ont été soit transfectées avec un vecteur contenant le gène *lacZ*, soit incubées en présence d'une importante quantité de lactose, inhibiteur compétitif naturel de la  $\beta$ -gal.

Plus précisément, trois conditions différentes ont été testées : des cellules **HeLa** transfectées avec un vecteur (pcDNA3.1) contenant le gène *lacZ* comme cellules positives, des cellules **HeLa** transfectées avec le même vecteur mais sans le gène *lacZ* ("vecteur vide") pour contrôler l'effet éventuel de la transfection, et enfin des cellules **HeLa** transfectées avec ce vecteur vide et en présence de lactose, comme contrôle négatif. De plus, le vecteur pcDNA3.1 contient un gène codant pour une protéine fluorescente rouge : la mCherry, permettant de quantifier la transfection. En effet, il est nécessaire de connaître le nombre de cellules transfectées, donc possédant l'activité  $\beta$ -gal, pour déterminer précisément le pourcentage de cellules marquées. En rapportant le nombre de cellules fluorescentes vertes sur le nombre de cellules fluorescentes rouges, on obtient alors le taux exact de marquage.



Ces trois types cellulaires ont ainsi été incubés avec la sonde **15** (12,5  $\mu\text{M}$ ) pendant 2 heures, ces cellules adhérentes ont été mises en suspension puis analysées par FACS. Les données de diffraction sont obtenues dans des *dot plots* dans lesquels chaque événement est représenté par un point sur un graphe dont les deux axes sont les deux diffractions FSC et SSC (Figure 48). Le nombre de points étant très élevé, seul les seuils de concentrations en événements sont représentés (un peu comme les courbes de niveaux sur une carte géographique). On peut ainsi avoir une idée de la taille ainsi que de la granularité des cellules et également enlever de l'analyse les débris cellulaires (très petits) ou les cellules agrégées (tailles élevées). Pour les trois conditions, les profils de tailles des cellules (en abscisse) sont semblables. En revanche, lorsqu'on regarde la granularité, les cellules positives (transfectées avec le plasmide  $\beta\text{-gal}$ ) se démarquent. Elles présentent, en effet, une irrégularité de surface plus forte, probablement due à la présence de précipités intracellulaires d'ELF-97. La proportion de cellules mortes et de débris sont relativement similaires, signe d'une faible toxicité de la sonde ou des produits résultats de sa conversion (dont les précipités).

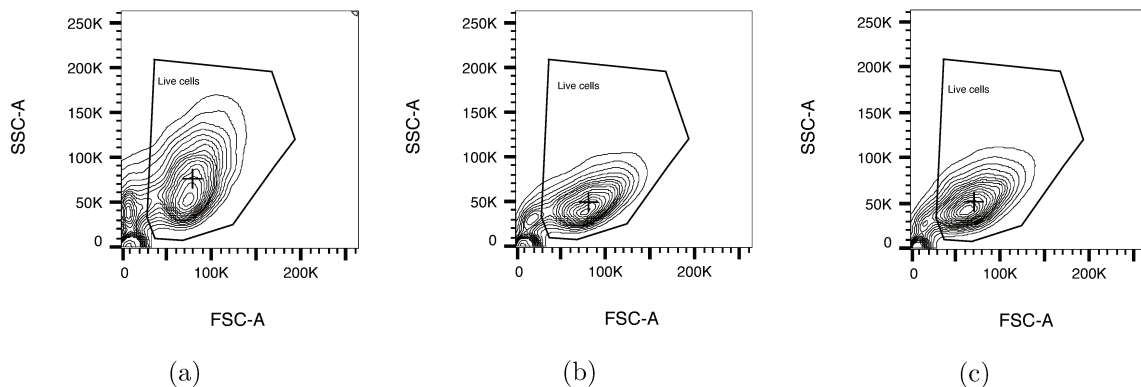


FIGURE 48 – *Dot plots* des trois conditions expérimentales : (a) : cellules HeLa transfectées avec le vecteur  $\beta\text{-gal}$ , (b) : cellules HeLa transfectées avec un vecteur vide et (c) : cellules HeLa transfectées avec ce même vecteur vide et incubées avec un inhibiteur compétitif (lactose).

Une quantification des différentes populations de cellules fluorescentes peut alors être effectuée. Pour cela, un seuil est à définir : une valeur absolue de fluorescence au dessus de laquelle une cellule sera considérée fluorescente. Après avoir déterminé cette valeur pour les émissions vertes et rouges, on a directement accès aux pourcentages désirés, qui sont répertoriés dans la Figure 49 (pour les détails de ces seuils, voir les graphiques en annexes, section III.5, p. 246).

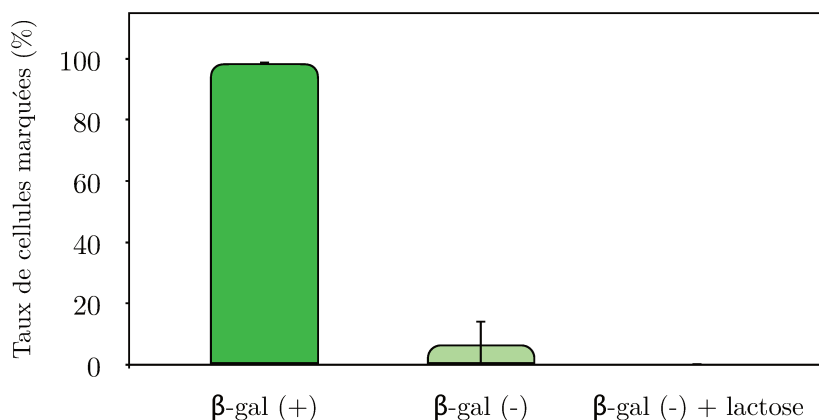


FIGURE 49 – Quantification par FACS du pourcentage de cellules marquées par fluorescence par la sonde **15** avec (a) cellules HeLa transfectées avec le vecteur  $\beta$ -gal, (b) : cellules HeLa transfectées avec un vecteur vide et (c) : cellules HeLa transfectées avec ce même vecteur vide et incubées avec un inhibiteur compétitif (lactose).

Les résultats obtenus sont très satisfaisants. Après seulement deux heures, le marquage des cellules exprimant la  $\beta$ -gal est quasi-quantitatif (98,6 %) montrant ainsi l'efficacité de la détection. On s'assure alors de ne pas "manquer" une cellule positive. Dans le même temps, les contrôles montrent la nécessité de l'inhibiteur dans l'obtention des cellules négatives. En effet, sans ajout de lactose, un marquage faible mais significatif est bien présent (6,6 %). L'ajout de lactose permet en revanche d'éteindre l'activité  $\beta$ -gal résiduelle des cellules HeLa, avec une absence totale de marquage (0,0 %). Ce résultat vient, en complément des cinétiques *in vitro* longue durée (section I.1.1, p. 63), renforcer les arguments en faveur de la grande stabilité de cette nouvelle génération de sondes. De plus, la différence de marquage à l'ajout de lactose confirme la nature de l'hydrolyse de la sonde : c'est bien la  $\beta$ -gal qui déclenche l'effondrement de la sonde et l'apparition de la fluorescence. Le double objectif est alors atteint : la sonde **15** permet bien une détection efficace de cellules exprimant l'activité  $\beta$ -gal, par un marquage quantitatif et une grande robustesse en absence de l'enzyme cible. Ces conditions pourront, par la suite, être appliquées à la microscopie par fluorescence, afin de valider visuellement le marquage ou son absence dans les différentes populations.

La possibilité d'améliorer encore les performances de cette sonde pourrait venir par le greffage d'autres groupements sur la structure initiale. Par exemple, l'augmentation de la spécificité pour un certain type de cellules pourrait être obtenu par ajout de groupements ciblant. Un projet exploratoire utilisant la chimie "Click" a débuté dans cet objectif et est présenté par la suite.

### I.1.3 Variation de l'espaceur pour le greffage de groupements ciblants

L'ajout de groupements ciblants sur une molécule, notamment sur une sonde, a déjà été discuté comme stratégie de rétention du signal sur place (voir section 3.1.1, p. 41). Le groupement ajouté est censé apporter une affinité particulière pour une molécule (un récepteur, une protéine, etc.) ou une localisation (cytoplasme, organelle, etc.) tout en ne modifiant pas (ou au minimum) l'activité de la sonde. L'équipe du Pr Papot à l'Université de Poitiers a développé cette stratégie pour la réalisation de pro-médicaments, activés par des glycosidases ( $\beta$ -gal et  $\beta$ -gus notamment), et portant des groupements latéraux modifiant les propriétés pharmacocinétiques de ces composés.

Ils ont, par exemple, créé un pro-médicament relargant un agent antinéoplasique : la *Monomethyl Auristatin E* (MMAE), bloquant ainsi la division cellulaire des cellules cancéreuses.<sup>[297]</sup> Mais pour éviter les risques de toxicité au cours d'une chimiothérapie, il faut localiser au maximum son effet au sein des tumeurs. La MMAE ne possède, en effet, pas de ciblage particulier, il interrompt la division de n'importe quelle cellule. Pour apporter le ciblage, la stratégie a alors été de greffer un acide folique sur le pro-médicament. Le récepteur à folate est un biomarqueur de surface cellulaire, surexprimé dans plusieurs types de cancer, tels que les cancers du poumon, du sein, du cerveau, du côlon, du rein, des ovaires et du sang.<sup>[298,299]</sup> En revanche, il est présent en quantité faible ou indétectable dans la plupart des tissus normaux. Cette caractéristique particulière des cellules malignes a été exploitée à l'aide de conjugués folate-médicament pour amener de puissants agents cytotoxiques au niveau des sites tumoraux.<sup>[300,301]</sup> La meilleure illustration de ces vecteurs pharmaceutiques est probablement le conjugué folate-désacétylvinblastine monohydrate.<sup>[302]</sup>

Un autre exemple plus récent relargue la même molécule cytotoxique, cette fois-ci par action de la  $\beta$ -gus. Le ciblage dans le corps humain est amené par un groupement latéral de type maléimide, pouvant se coupler *in vivo* à l'albumine plasmatique. La conjugaison prévient d'une rapide élimination rénale, et permet donc une longue rétention dans le système sanguin. L'hypervascularisation des environnements tumoraux provoque alors l'accumulation du pro-médicament dans ces dernières.<sup>[303]</sup>

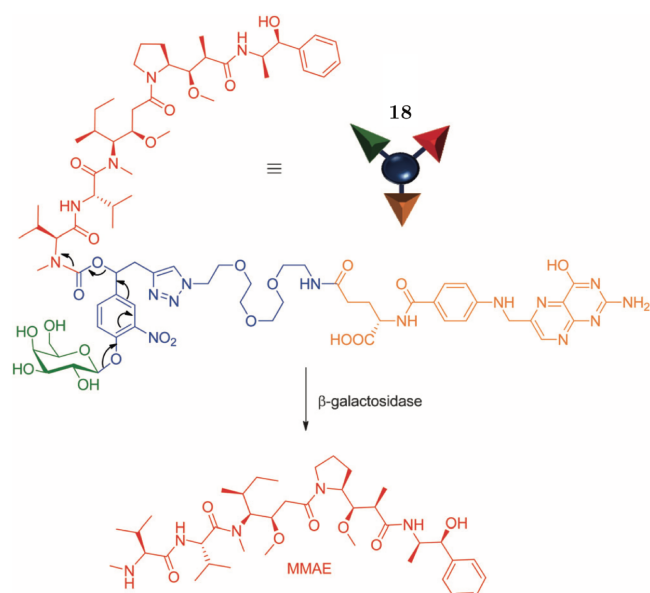


FIGURE 50 – Structure moléculaire et mécanisme d'action du pro-médicament **18**, relargant la MMAE (en rouge) au niveau des tumeurs, par action de la  $\beta$ -gal et d'un groupement ciblant : l'acide folique (en orange).<sup>[297]</sup>

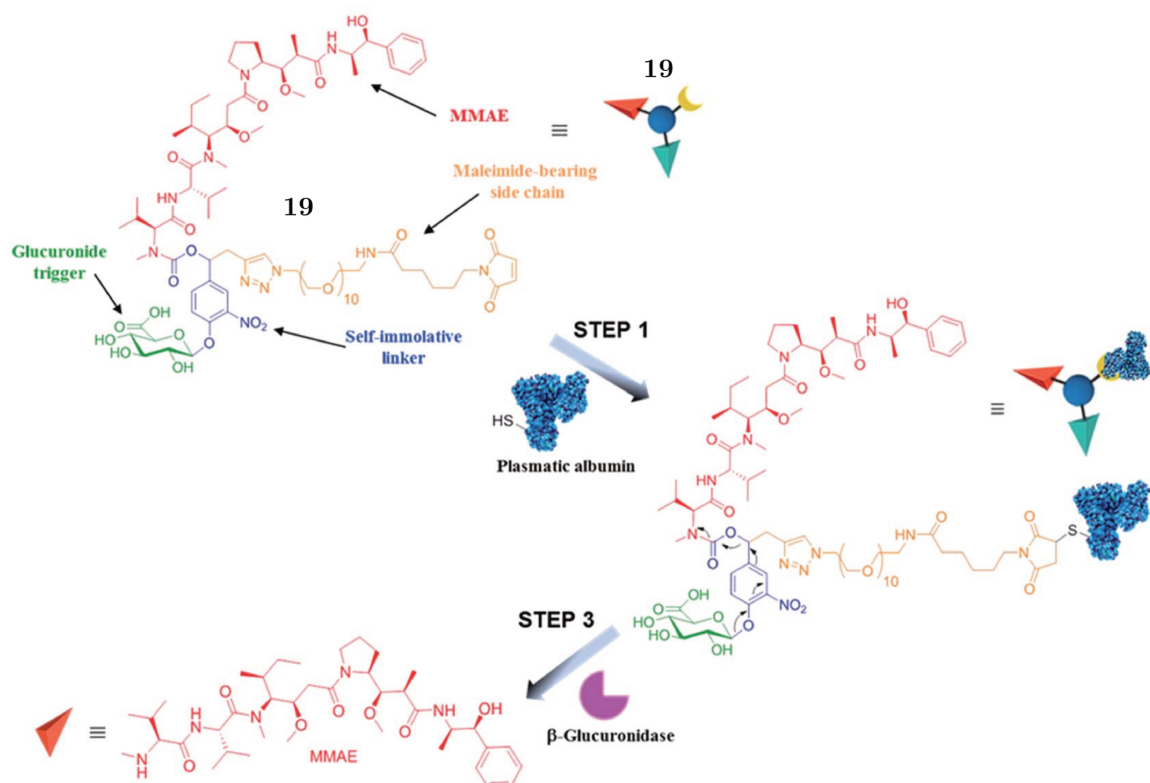


FIGURE 51 – Structure moléculaire et mécanisme d'action du pro-médicament **19**, relargant la MMAE (en rouge) au niveau des tumeurs, par action de la  $\beta$ -gus et d'un groupement ciblant : un maléimide se couplant à l'albumine plasmatique (en orange).<sup>[297]</sup>

Le projet commun était alors de combiner les technologies des deux équipes afin d'obtenir une sonde pour activité enzymatique, possédant les excellentes propriétés de ciblage des pro-médicaments de l'équipe du Pr Papot, avec les performances — notamment de rétention du signal — des sondes ELF-97. Dans un premier temps, la sonde **20** a été considérée. Elle répondrait à une activité  $\beta$ -gal en relargant l'ELF-97, tout en possédant un acide folique greffé au niveau du tandem d'espaceurs (Figure 52).

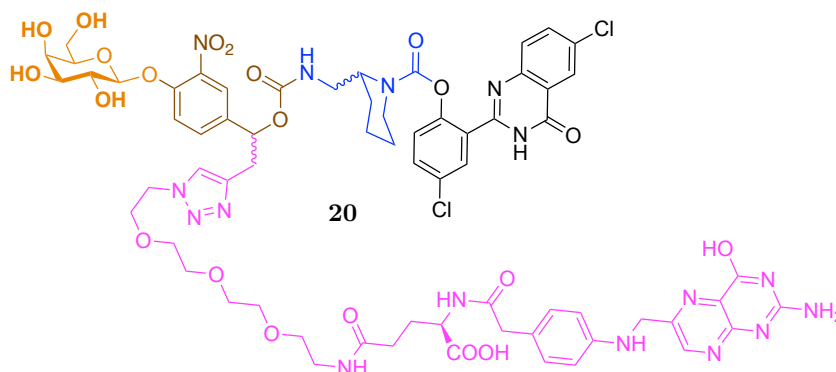


FIGURE 52 – Structure moléculaire de la sonde **20**, relargant l'ELF-97 en présence d'activité  $\beta$ -gal et possédant un groupement acide folique pour le ciblage de cellules cancéreuses.

La synthèse du précurseur **25**, utilisé précédemment pour les pro-médicaments, avait été optimisée de leur côté. Elle s'effectue en trois étapes relativement efficaces (57 % de rendement global), décrites dans la Figure 53 ci-dessous. Un échantillon cet intermédiaire **25** nous a alors été fourni et constitue le point de départ de notre synthèse.

La suite se compose des étapes classiques de synthèse de la sonde  $\beta$ -gal, décrite dans la thèse de Corentin Gondrand<sup>[62]</sup> et dans le brevet associé.<sup>[287]</sup> Un couplage avec l'espaceur mono-protégé **26** (dont la synthèse est présenté plus tard, voir section I.2.2, p. 85) constitue la première étape, suivie de la déprotection du groupement allyle en conditions douces avec présence de palladium catalytique. Le composé **28** obtenu est couplé au chloroformiate de l'ELF-97 pour obtenir la sonde protégée **29**. Ce chloroformiate est très instable et est préparé juste avant le couplage avec l'amine, sans être isolé, les deux étapes (activation puis couplage) sont ainsi réalisées par synthèse monotope (Figure 54).

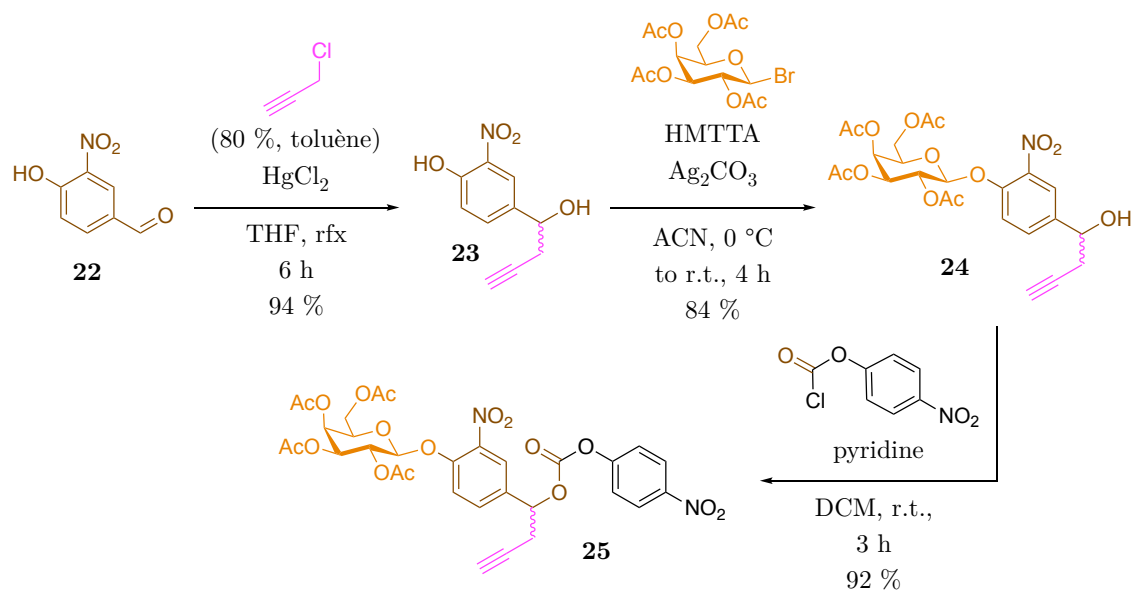


FIGURE 53 – Voie de synthèse pour l'obtention du précurseur **25**.

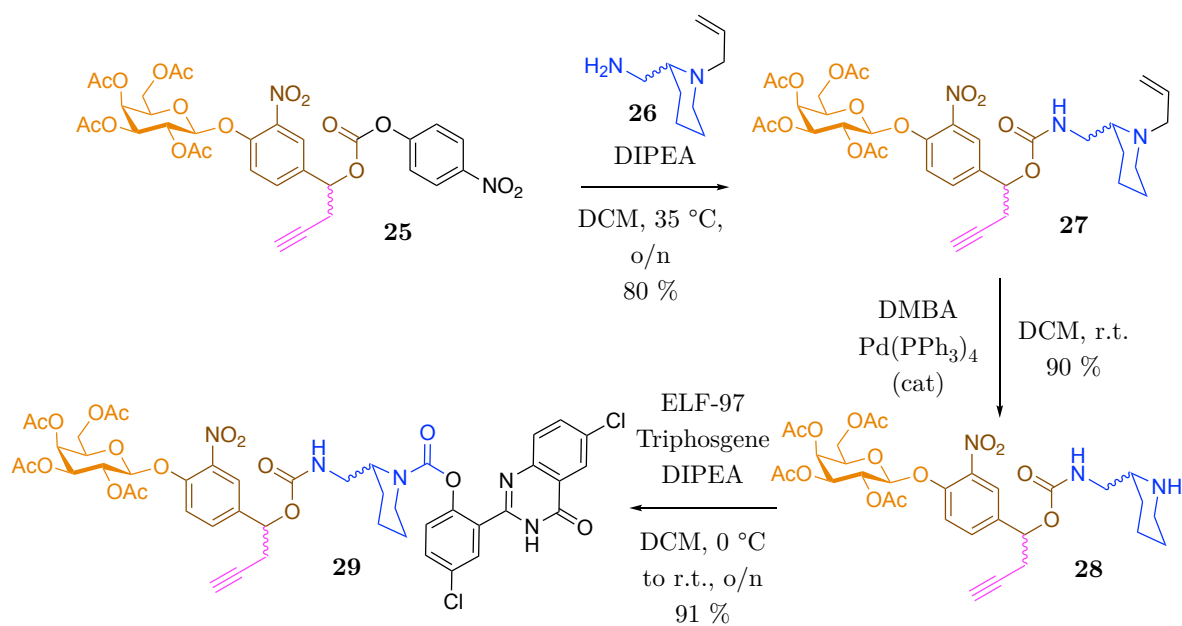


FIGURE 54 – Voie de synthèse pour l'obtention de l'intermédiaire **29**.

La déprotection n'est pas réalisée tout de suite car l'étape de couplage par chimie "Click" doit tout d'abord être effectuée. Ce genre de réaction est relativement complexe, il avait donc été décidé qu'elle soit tentée dans leur équipe, habituée aux protocoles expérimentaux. Un échantillon d'un cinquantaine de milligrammes de la sonde **29** a donc été envoyé à Poitiers pour être couplée à l'acide folique dans un premier temps. La déprotection des acétates du galactose constituerait alors la dernière étape (Figure 55).

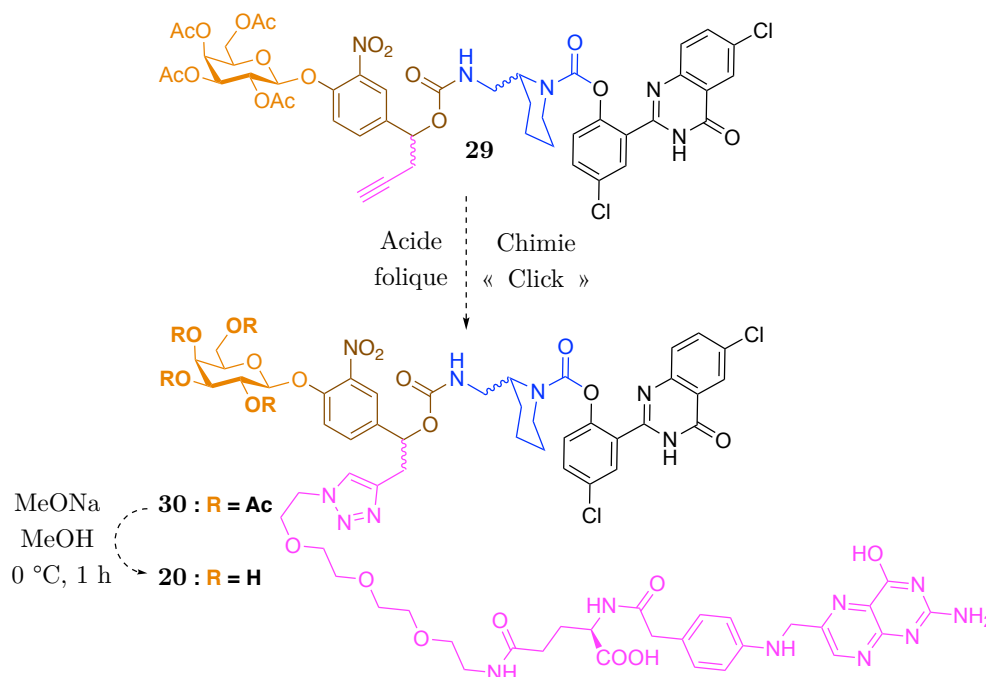


FIGURE 55 – Voie de synthèse finale pour l'obtention de la sonde **20**.

Malheureusement, aucun résultat ne nous est, pour l'instant, parvenu sur ces deux étapes. Si ces dernières finissent par fonctionner, une purification par chromatographie en phase liquide à haute performance, ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) sera nécessaire pour obtenir la sonde **20** sous forme purifiée. Compte-tenu de la taille d'un tel objet moléculaire, la caractérisation chimique s'effectuera probablement par *High Resolution Mass Spectrometry* (HRMS) et LC-spectrométrie de masse, ou *Mass Spectrometry* (MS), la RMN pouvant être relativement complexe à analyser (plus de 60 carbones avec deux centres stéréogènes non contrôlés). Pour la caractérisation biologique, une cinétique *in vitro* avec la  $\beta$ -gal purifiée pourrait confirmer le bon fonctionnement du système en présence de l'enzyme cible. L'étape déterminante sera alors la réalisation d'imagerie par microscopie *in cellulo*, voire d'expérience en cytométrie de flux, pour observer la possible apparition de signal fluorescent et sa localisation. Il sera alors très intéressant de comparer plusieurs types cellulaires possédant, ou non,

des récepteurs à folate dans le but de confirmer le ciblage.

Ces différents résultats viennent compléter l'étude initiale présentée par Corentin Gondrand dans sa thèse. L'étude approfondie de cette sonde modèle vient confirmer les performances désirées pour les sondes développées par l'équipe. Les échecs des premières générations de sondes ont placé la stabilité à l'hydrolyse comme paramètre majeur à étudier lors du développement de nouvelles structures. Ici, cette stabilité est excellente. Il est, en effet, très rare d'observer dans la littérature de telles études sur plusieurs jours. Généralement, elles se cantonnent à une étude de stabilité sur le temps minimal d'incubation. Il est pourtant nécessaire d'avoir une stabilité étendue lorsque la détection devra être réalisée dans des conditions non-optimales, comme dans le cas d'une activité très faible. La variation des contextes d'étude (bactéries, cellules mammifères) montre également une certaine versatilité de la sonde  $\beta$ -gal, qui s'adapte à différentes applications : microscopie et surtout **FACS**. Cette versatilité pourrait être encore étendue en développant d'autres sondes possédant une variation au niveau de l'unité substrat glycosidique.



## I.2 Nouvelles sondes pour glycosidases

Comme pour les peptidases, d'autres enzymes de la famille des glycosidases peuvent être maintenant ciblées par la technologie de double espaceurs en tandem. Cela a constitué un premier projet en début de thèse. D'autres personnes de l'équipe ont aussi collaboré sur ces sondes, notamment deux stagiaires M2 placées sous ma responsabilité : Léa Mélin et Alix Tordo. Certaines synthèses ou parties de synthèse sont le fruit de leur travail, comme cela sera précisé par la suite.

### I.2.1 Objectifs et nouvelles cibles

En plus de la  $\beta$ -gal, d'autres glycosidases présentent elles aussi un intérêt à pouvoir être détectées voire imagées. En gardant la même structure de tandem d'espaceurs — assurant stabilité et vitesse de détection — et l'ELF-97 pour ses propriétés de précipitation et d'émission, il est possible de varier la nature du ou des sucre(s) constituant la partie substrat. On obtient alors de nouveaux déclencheurs enzymatiques capables de cibler d'autres activités avec, normalement, une forte spécificité. Pour cette étude, deux candidats ont été choisis pour compléter les sondes  $\beta$ -gal et cellulase. Tout d'abord la  $\beta$ -gus est une glycosidase aux propriétés relativement proches de la  $\beta$ -gal. Elle est notamment utilisée comme la  $\beta$ -gal en tant que technologie de gène rapporteur en association avec son gène encodant : GUS.<sup>[304]</sup> Il est en revanche majoritairement utilisé pour la recherche en biologie des plantes alors que la  $\beta$ -gal l'est davantage pour la recherche sur bactérie ou cellules mammifères.<sup>[305]</sup> Comme pour la  $\beta$ -gal, une déficience (génétique) en  $\beta$ -gus est associée à un syndrome pathologique : la maladie de Sly (ou mucopolysaccharidose de type VII), entraînant de multiples malformations morphologiques ainsi que des infections pulmonaires.<sup>[306]</sup> Son substrat naturel est un  $\beta$ -D-glucuronide qu'elle clive pour libérer l'acide  $\beta$ -D-glucuronique, un dérivé proche du glucose dont l'hydroxyle en position 6 est remplacé par un acide carboxylique (Figure 58).<sup>[307]</sup>

L'autre enzyme ciblée n'est pas unique. En effet, l'idée de cibler des  $\alpha$ -glycosidases est naturellement apparue après les premiers résultats positifs sur les sondes  $\beta$ -glycosidases. Malheureusement la synthèse de telles sondes est rendue beaucoup plus complexe par la nécessité d'une liaison  $\alpha$  entre le sucre et le premier espaceur. La méthode habituellement employée est une réaction de Koenigs-Knorr,  $\beta$ -stéréosélective par assistance

anchimérique de l'acétate alors en position 2 (Figure 56).<sup>[308]</sup> Il semble en revanche bien plus compliqué d'obtenir la sélectivité inverse. Cette dernière a déjà été obtenue mais nécessite dans ce cas une modification de l'acétate en position 2 avant couplage, pour un ester (1*S*)-phényl-2- (phénylsulfanyl)éthylrique. En utilisant un tel groupement, l'intermédiaire oxonium formé est modifié et possède un ion sulfonium lié en  $\beta$  grâce à la forte stabilisation de la conformation de type décaline qui est alors formée. L'attaque nucléophile subséquente crée alors une liaison glycosidique  $\alpha$  (Figure 56). Un changement inverse de groupement par traitement à l'éthérate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ ) est alors possible pour retrouver l'acétate en position 2.<sup>[309]</sup>

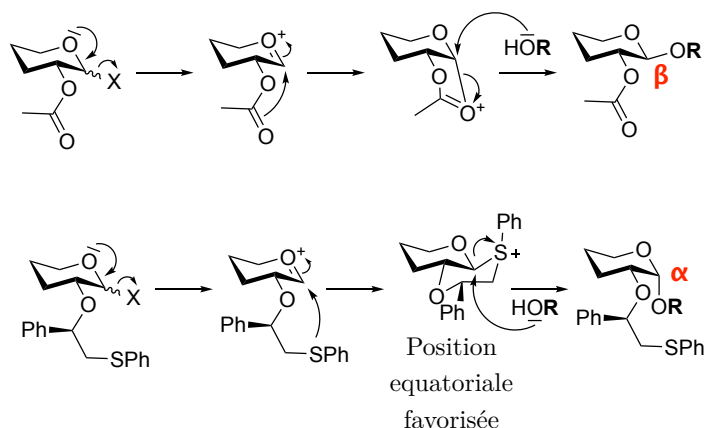


FIGURE 56 – Illustration de la stéréosélectivité des réactions de glycosylation par assistance anchimérique.

Pour éviter une telle mise au point synthétique, nous avons opté pour une approche plus directe. Des polysaccharides possèdent déjà naturellement une liaison glycosidique  $\alpha$  grâce aux nombreuses catalyses enzymatiques stéréosélectives. On peut notamment citer l'un des plus abondants d'entre eux, l'amylose, un des deux principaux composants de l'amidon. Celui-ci est un polymère linéaire d' $\alpha$ -D-glucose reliés par leurs positions 1 et 4, dont le nom officiel serait ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4) $\alpha$ -D-glucopyranoside) $_n$ . Dans les processus de digestion, une enzyme — l'amylase — est capable de dégrader ce polymère, libérant alors du maltose (dimère de glucoses reliés par une liaison  $\alpha$ ). Ce sucre, également appelé maltobiose ou sucre de malt, est disponible commercialement sous forme protégée et possédant un brome en position anomérique, éléments nécessaires à la réaction de Koenigs–Knorr. On obtient ainsi directement une liaison glycosidique  $\alpha$  sans étape synthétique supplémentaire. Néanmoins un problème persiste : la liaison formée par la réaction de Koenigs–Knorr sera classiquement en  $\beta$ . La détection d'une activité amylase n'est donc pas vraiment pertinente avec une telle sonde : il manquerait une activité  $\beta$ -glucosidase pour libérer le premier espaceur, puis le reste de la sonde et

donc le fluorophore.

Notre stratégie est donc autre, nous avons voulu profiter des deux types de liaisons glycosidiques, accessibles aisément par le schéma synthétique classique, pour tenter d'observer une double sélectivité. Le substrat est ainsi composé d'un  $\alpha$ -glucose, lié à un  $\beta$ -glucose, lié au reste de la sonde. Pour obtenir une double sélectivité, il est nécessaire de ne considérer uniquement les exoglycosidases qui, contrairement aux endoglycosidases, ne peuvent cliver un sucre qu'en position terminale. Ainsi, la liaison  $\beta$  entre le deuxième sucre et le reste de la sonde ne peut être clivée qu'après élimination du premier glucose par une (exo) $\alpha$ -glycosidase. La sonde a donc besoin de deux activités enzymatiques différentes, et consécutives afin de retirer les deux glucoses formant le substrat, retrait qui entraîne alors l'effondrement et le relargage du fluorophore et donc la création du signal fluorescent.

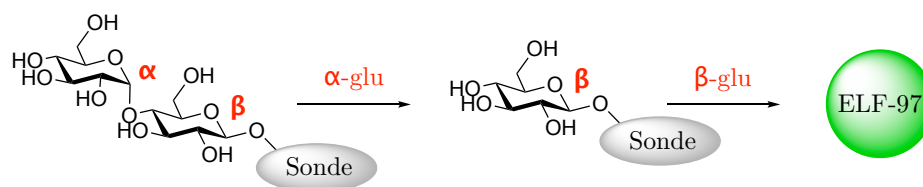


FIGURE 57 – Illustration de la double sélectivité espérée pour une sonde portant un  $\beta$ -maltobiose.

Au-delà de l'aspect fondamental, on peut citer certains avantages à obtenir une sélectivité multiple pour une sonde à activité enzymatique. Comme expliqué précédemment, un contexte pathologique est rarement associé à une seule modification du profil enzymatique : ce sont beaucoup de niveaux d'activités qui sont modifiés. On peut ainsi identifier plusieurs sur-expressions enzymatiques associées à une même maladie. Une sonde unique détectant simultanément deux biomarqueurs enzymatiques constitue alors une solution pratique et élégante. On peut également imaginer une application comme contrôle de double transfections. Si l'on veut introduire deux plasmides dans une même cellule ou bactérie, il faut ensuite pouvoir contrôler quelle cellule contient effectivement ces deux vecteurs après transfection. En utilisant un gène rapporteur différent sur chaque plasmide, une sonde à double sélectivités permettrait de marquer seulement les cellules possédant les deux enzymes produits des gènes rapporteurs, témoin d'une double transfection réussie.

La structure de ces deux nouvelles sondes possédant une ou deux nouvelles unités glycosides est donnée dans la Figure 58 ci-dessous.

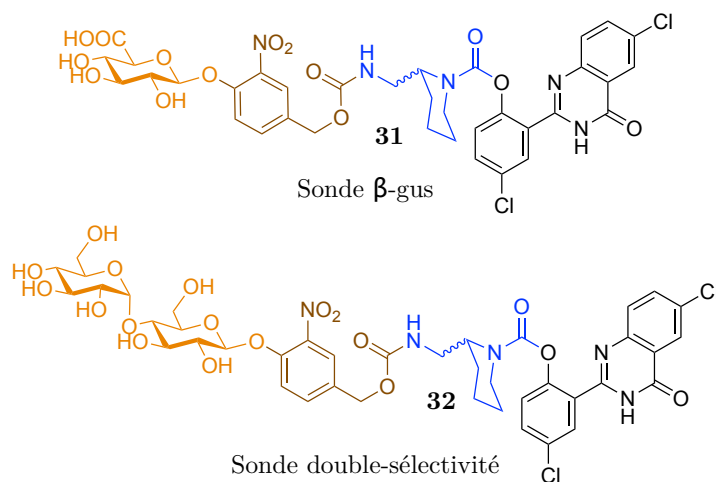
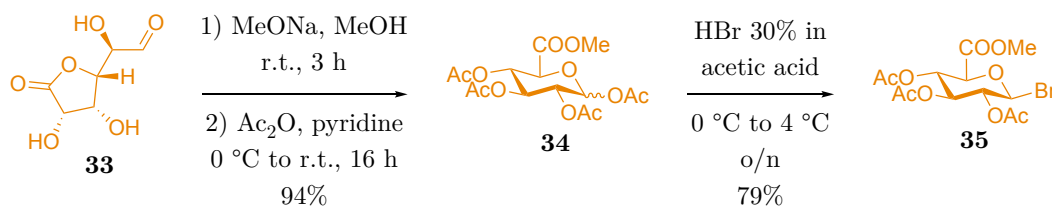


FIGURE 58 – Structure moléculaire des deux nouvelles sondes glycosidases, sonde **31** pour  $\beta$ -gus et sonde **32** pour double sélectivité  $\alpha/\beta$ .

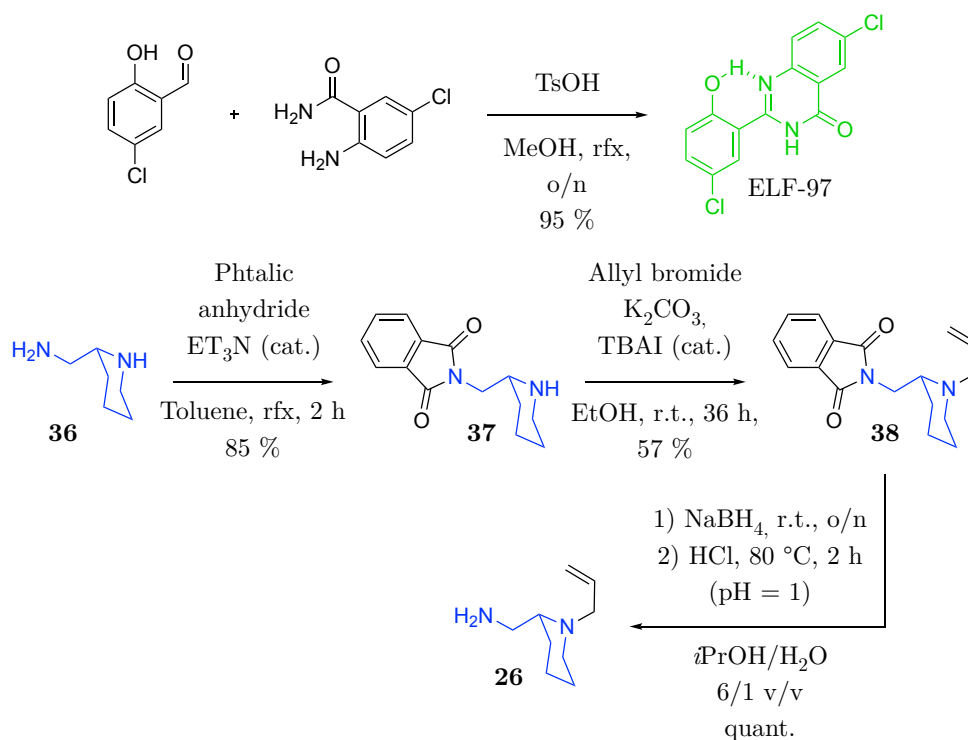
Après avoir étudié leurs synthèses, des études préliminaires *in vitro* seront présentées pour ces deux sondes.

### I.2.2 Synthèse des nouvelles sondes glycosidases

Les molécules **31** et **32** ont été préparées selon le même schéma global de synthèse de la  $\beta$ -gal, décrit dans la thèse de Corentin Gondrand<sup>[62]</sup> et dans le brevet associé.<sup>[287]</sup> La synthèse démarrant d'ordinaire avec une version protégée du sucre de départ (acétates sur les fonctions alcools) et activée par un halogène en position anomérique. Pour les sondes  $\beta$ -gal (**15**) et double-sélectivités(**32**), de tels sucres sont disponibles commercialement. En revanche, pour la sonde  $\beta$ -gus, il est d'abord nécessaire de synthétiser cet intermédiaire. Cette synthèse s'effectue en deux étapes à partir de la glucuronolactone. La première étape consiste à la cyclisation et l'acétalisation des alcools, tandis que la deuxième réalise la substitution de l'alcool anomérique par un atome de brome afin d'obtenir l'intermédiaire **35** désiré (Figure 59).

FIGURE 59 – Synthèse de l'intermédiaire **35** précurseur de la sonde  $\beta$ -gus.

Deux intermédiaires sont communs à ces deux synthèses. Il s'agit tout d'abord de l'**ELF-97**, synthétisé en une étape à l'aide d'un couplage hétérocyclique entre le 5-chlorosalicylaldéhyde et le 5-chloroanthranilamide. Plus précisément, l'intermédiaire commun est sa version "activée" au triphosgène afin de former le chloroformiate correspondant.

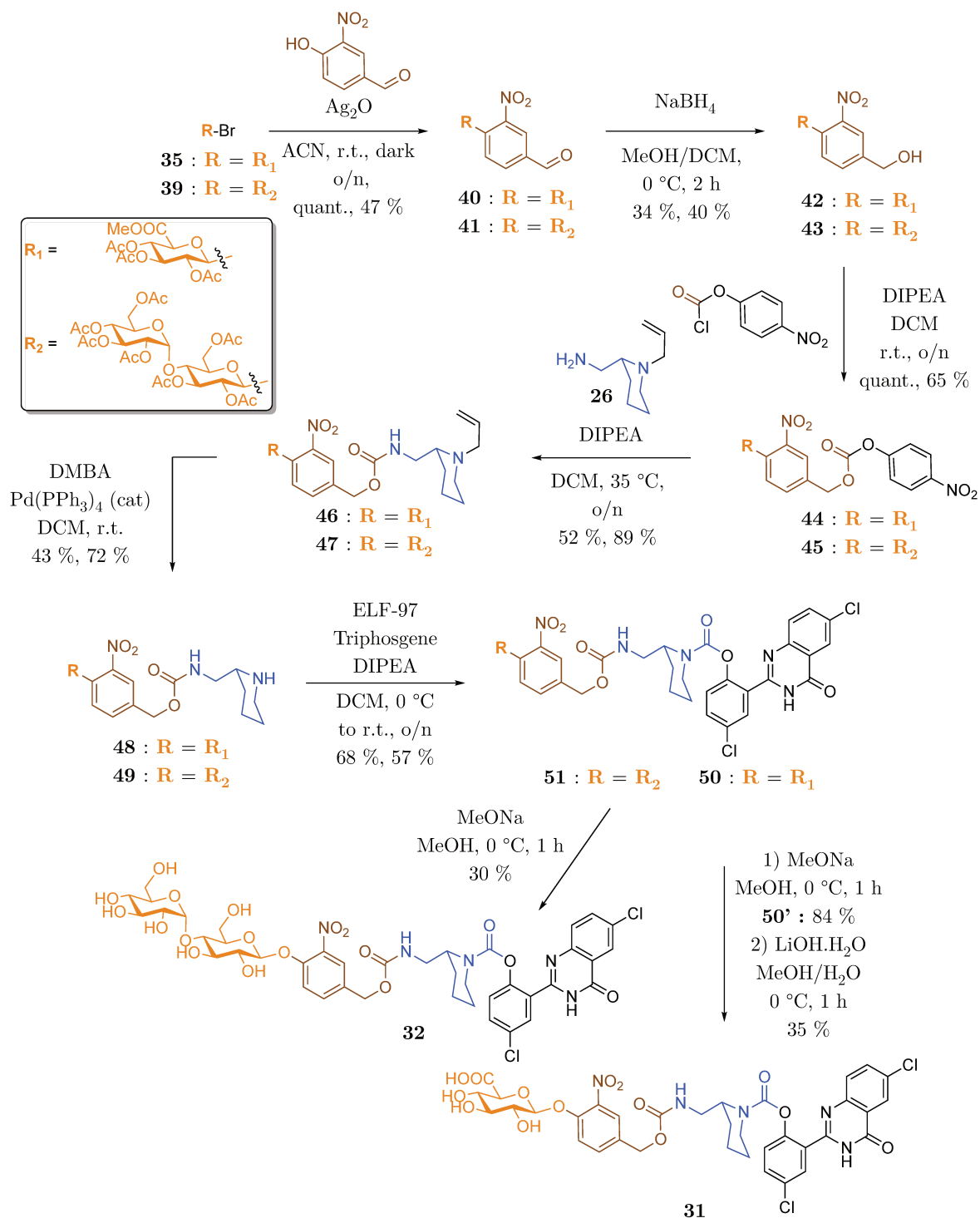
FIGURE 60 – Synthèse des intermédiaires **ELF-97** et **26**, communs aux synthèses des sondes glycosidases.

Le second intermédiaire est l'espaceur cyclisant, dont l'amine secondaire est sélectivement protégée par un groupement allyle (molécule **26**). Une telle mesure est rendue nécessaire par la réactivité obtenue en utilisant la 2-aminométhylpiperidine non-protégée. Dans ce cas, une réaction préférentielle de l'amine secondaire vis-à-vis de la primaire avait été observée, produisant *in fine* une liaison carbamate secondaire avec l'**ELF-97**, liaison instable due à l'élimination possible par un mécanisme de type E<sub>1</sub>cB. Une protection sélective de l'amine secondaire avait été développée par Coent

Gondrand et passe par la protection initiale de l'amine primaire par l'anhydride phtalique, suivie de la protection de l'amine secondaire au bromure d'allyle et terminée par la déprotection de l'amine primaire ( $\text{NaBH}_4$  puis  $\text{HCl}$ ) pour aboutir à l'intermédiaire **26** (Figure 60). Une telle séquence est nécessaire pour discriminer les deux amines aux réactivités très proches. Une méthode directe serait, en effet, difficilement chimiosélective, et les isomères formés présenteraient également des profils spectroscopiques trop proches.

Le reste de la synthèse est identique pour les deux sondes et est présenté Figure 61. Le sucre protégé est couplé au 4-hydroxy-3-nitro-benzaldéhyde par une réaction de Koenigs-Knorr ( $\beta$ -sélective). L'aldéhyde obtenu est réduit au  $\text{NaBH}_4$  puis activé par le chloroformiate de 4-nitrophényle pour former le carbonate activé correspondant. Celui-ci est couplé à l'espaceur pipéridine protégé **26**, l'amine tertiaire obtenue est déprotégée en conditions douces en présence de palladium puis est couplé au chloroformiate de l'ELF-97 pour obtenir la sonde protégée (même schéma que la sonde "clickable" **29**). La déprotection des acétates s'effectue en condition basique, par l'action du méthanolate de sodium.

Pour la sonde **31**, une déprotection supplémentaire est nécessaire : celle de l'ester méthylique de l'unité glucuronide, elle s'effectue par action de l'hydroxyde de lithium en présence d'eau. Une purification finale par HPLC afin d'éliminer toutes traces éventuelles d'ELF-97 résiduelles, condition impérative pour éviter la présence de fluorescence contaminante lors des mesures. Ces synthèses ont été principalement réalisées par Léa Mélin pour la sonde  $\beta$ -gus et Alix Tordo pour la sonde double sélectivité durant leur stage de M2 sous ma responsabilité. Alix Tordo continue actuellement sa thèse dans l'équipe, notamment sur des thématiques de recherche proches du troisième chapitre de cette thèse, c'est à dire la variation de la partie fluorophore des sondes (voir Chapitre III). Une fois ces sondes obtenues et purifiées, l'étape logiquement suivante est l'évaluation de leur comportement en présence d'enzymes cibles purifiées.


 FIGURE 61 – Voies de synthèse des sondes  $\beta$ -gus (**31**) et double-sélectivité (**32**).

### I.2.3 Évaluation des nouvelles sondes glycosidases

Pour la sonde  $\beta$ -gus, l'étude est classique : on mesure la fluorescence en fonction du temps avec ou sans l'enzyme cible, la  $\beta$ -gus. Pour la sonde double-sélectivité, il faut tester plus de conditions : pour confirmer que la présence des deux enzymes cibles est nécessaire, des mesures d'apparition de fluorescence en présence d'une seule enzyme sont nécessaires. On obtient alors quatre conditions : sans enzyme, avec seulement l' $\alpha$ -glu, seulement la  $\beta$ -glu et enfin avec les deux simultanément. Les résultats obtenus sont donnés dans les Figures 62 et 63.

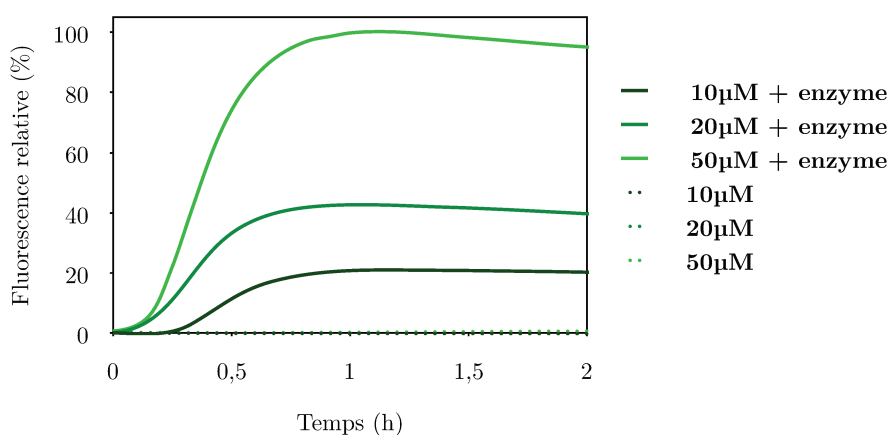


FIGURE 62 – Fluorescence de la sonde  $\beta$ -gus **31** à différentes concentrations en fonction du temps ; solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 10 U.mL<sup>-1</sup>.

La sonde  $\beta$ -gus présente un profil similaire à la sonde  $\beta$ -gal. On peut ainsi noter une bonne stabilité en absence de l'enzyme cible et une rapide apparition de fluorescence lorsque cette dernière est présente. Le délai d'apparition du signal est légèrement plus important lorsque l'on se place dans les mêmes conditions (concentrations en sonde, quantité d'enzyme et température). Néanmoins, cette différence peut être attribuée à une différence de réactivité entre les deux enzymes  $\beta$ -gal et  $\beta$ -gus dont les activités enzymatiques ne sont pas équivalentes.

De manière intéressante, la sonde double-sélectivité présente un comportement plus particulier. En présence des deux enzymes  $\alpha$ -glu et  $\beta$ -glu, une apparition de signal peut être observée. Toutefois, la courbe de fluorescence obtenue n'est pas habituelle. D'ordinaire, après un certain délai pour atteindre le point de précipitation, la fluorescence augmente de manière exponentielle avant de ralentir puis d'atteindre le plateau. Ici, le délai est toujours présent et même plus important (2 heures), la fluorescence augmente ensuite, mais de façon quasi-linéaire avant d'atteindre un plateau après 7 heures. Ce



ralentissement peut s'expliquer logiquement par la nécessité des deux réactions enzymatiques successives. La diffusion de l'intermédiaire dont un seul sucre a été retiré afin d'atteindre la deuxième enzyme limite également la conversion rapide de la sonde.

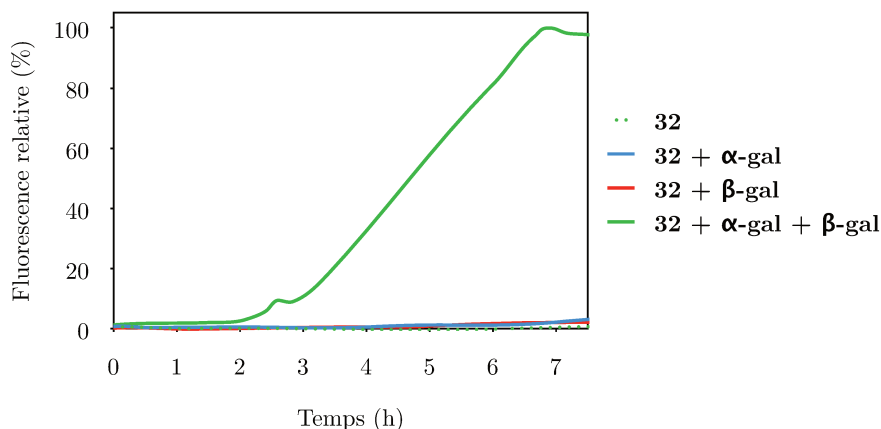


FIGURE 63 – Fluorescence de la sonde double-sélectivité **32** en fonction du temps ; concentration : 50  $\mu\text{M}$ , solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 2,5  $\text{U.mL}^{-1}$ .

Pour contrôler si une double sélectivité est bien achevée, il est alors nécessaire de s'intéresser aux conditions n'utilisant qu'une seule enzyme. De manière satisfaisante, dans les deux cas, aucun signal n'est observable dans le temps de l'expérience. On confirme ainsi la nécessité du clivage consécutif de l' $\alpha$ -glucose puis du  $\beta$ -glucose. On peut toutefois noter une faible apparition de signal en présence de  $\beta$ -glu uniquement. N'étant pas présent dans les autres contrôles, ce signal est probablement dû à une très faible conversion de la sonde par coupure endo (retrait simultané des deux sucres). Toutefois, ce signal est assez faible pour rester négligeable.

Ces validations de comportements *in vitro* pour ces deux sondes ouvrent ainsi la voie à d'autres applications dans des contextes biologiques intéressants. Des études préliminaires avec la sonde  $\beta$ -gus ont été réalisées dans ce but sur des racines de plantes d'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*, plante modèle couramment utilisée en laboratoire de biologie des plantes). Des variants génétiques exprimant la  $\beta$ -gus dans certaines parties existent en effet. On peut ainsi obtenir des plantes possédant l'activité enzymatique recherchée dans les zones de division cellulaire, ou aux extrémités des racines. Cependant, les premiers résultats n'ont pas été concluants et d'autres tentatives et optimisations seront nécessaires pour améliorer le marquage. La perméabilité de la sonde est probablement un facteur limitant ici : la paroi cellulosique des cellules végétales est plus difficile à traverser que celles d'organismes mammifères, nécessitant souvent l'utilisation de composés perméabilisants type détergents.

L'évaluation de la sonde double-sélectivité dans un contexte de double transfection est, elle, possible mais nécessite une mise en œuvre expérimentale assez complexe. Effectivement, pour contrôler l'efficacité de la sonde dans ce contexte, il faut posséder un autre moyen de contrôle qui se soit déjà montré efficace. Or ici, de telles solutions sont rares. On peut envisager utiliser deux protéines fluorescentes différentes pour chaque plasmide à transférer, mais le problème de recouvrement spectral de ces dernières avec l'[ELF-97](#) sera alors important. De par son large déplacement de Stokes et son émission à l'état solide présentant de larges bandes en excitation comme en émission, l'[ELF-97](#) couvre déjà une grosse proportion du spectre visible. L'application de cette nouvelle sonde ne reste ainsi qu'une perspective future pour l'instant.

## I.3 Développement d'un nouvel espaceur pour l'étude de la sénescence

Comme nous l'avons vu précédemment (section I.1, p. 62), le comportement des sondes, notamment glycosidases, est largement influencé par le pH du milieu étudié. Certains contextes d'étude nécessitent justement des pH non-ordinaires, c'est notamment le cas de la sénescence cellulaire qui sera présentée dans un premier temps.

### I.3.1 Contexte de la sénescence cellulaire

La sénescence, autrement appelée vieillissement biologique, est la dégradation lente et progressive des fonctions biologiques. Cette notion très générale peut s'appliquer à l'Homme, on parle alors plus simplement de vieillissement. Ce terme apparaît au milieu du 20<sup>e</sup> siècle avec les premières études sur les causes du vieillissement des êtres vivants, conséquences de la découverte d'organisme "immortels", ou plutôt ne présentant pas de processus de vieillissement.<sup>[310,311]</sup> Néanmoins, la notion de sénescence se réfère plus souvent à la notion de sénescence cellulaire, phénomène de régulation de la division des cellules, animales ou végétales.<sup>[312,313]</sup> Ce concept est à différencier de l'apoptose ou de la nécrose constituant les mécanismes biologiques de mort des cellules, une équivalence à l'échelle humaine serait la comparaison entre le processus de vieillissement et la mort en elle-même. Les deux processus sont évidemment liés et leurs implications réciproques représentent un domaine actif de recherche.<sup>[314]</sup>

La sénescence cellulaire est donc le ralentissement progressif de la division cellulaire, pouvant être déclenchée de plusieurs manières. La plus "naturelle" est celle de l'âge avancé d'une population de cellules. Après un certain nombre de réplifications qui dépend de la lignée étudiée, les cellules vont progressivement arrêter de se diviser : c'est la sénescence répllicative.<sup>[315]</sup> Cet arrêt est dû à certains dommages causés à l'ADN entraînés par le raccourcissement progressif des télomères après chaque division cellulaire.<sup>[316]</sup> Les télomères sont les régions terminales des chromosomes protégeant justement ces derniers d'éventuels dommages ou fusion entre eux.<sup>[317]</sup> Toutefois, d'autres causes peuvent induire ce phénomène de sénescence cellulaire, on parle dans ce cas de sénescence induite par stress. Ces stress peuvent être de différentes natures : environnementaux, par exemple, par exposition à des agents cytotoxiques. Ils peuvent

également être métaboliques comme dans le cas du stress oxydant, les *espèces réactives de l'oxygène*, ou *Reactive Oxygen Species (ROS)* étant souvent citées comme cause de déclenchement de la sénescence cellulaire. Il a par ailleurs été prouvé que ces ROS entraînent un raccourcissement des télomères, comme les divisions cellulaires, mais dans un temps beaucoup plus court.<sup>[318]</sup> Ce raccourcissement déclenche alors des cascades moléculaires aboutissant à la sénescence, puis à la mort cellulaire.

Une autre cause importante de sénescence cellulaire induite par stress est l'activation d'oncogènes, gènes dont l'expression favorise l'apparition des cancers. Il s'agit alors d'un mécanisme de défense des cellules face à l'apparition de cancers.<sup>[319]</sup> Les cellules cancéreuses sont, en effet, en constante réplication et donc normalement rapidement soumises au processus de sénescence. La réplication finit par diminuer et la tumeur cesse de grossir, on la qualifie alors de bénigne. Cependant, si ce processus de sénescence est inhibé, la réplication ne faiblit jamais, voire accélère, et la tumeur devient alors maligne. La situation réelle est évidemment encore plus complexe mais cette approche permet de comprendre l'importance que prend la sénescence cellulaire dans le cadre de certaines maladies, et tout particulièrement des cancers.<sup>[320]</sup>

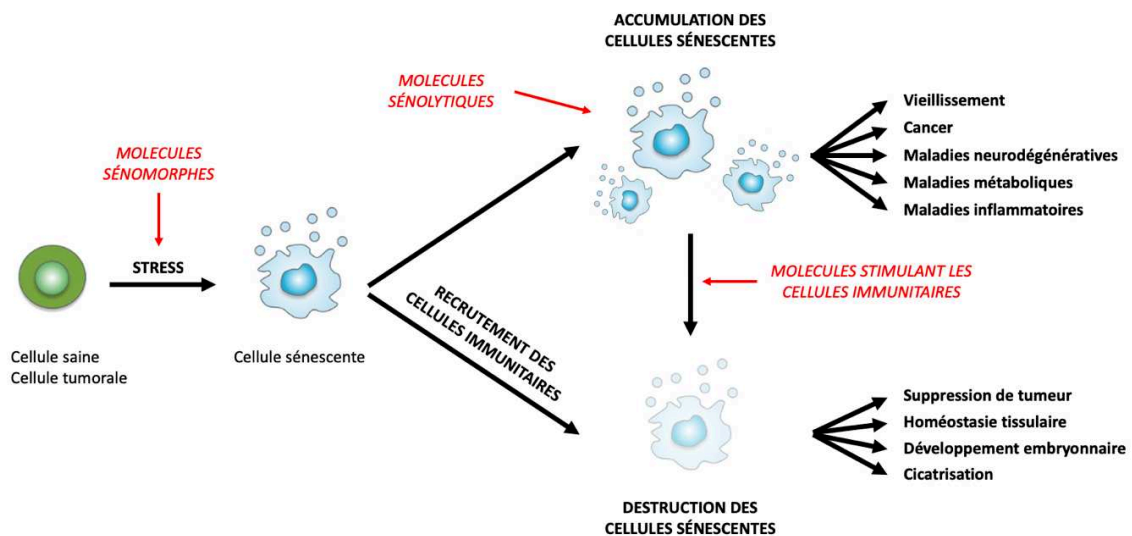


FIGURE 64 – Illustration schématique des rôles de la sénescence cellulaire (Crédit : Pierre-François Roux, sans modification, sous licence CC BY 4.0).

Les champs de recherche de la sénescence, notamment cellulaire, sont donc très variés. En plus de son implication dans la cancérogénèse, la sénescence cellulaire est également étudiée pour sa relation encore mal comprise avec le vieillissement des organismes.<sup>[321]</sup> Par ailleurs, la sénescence est aussi connue pour son ambivalence. Elle est autant impliquée dans la génération des tumeurs que dans leur inhibition ; elle participe

au vieillissement global mais parallèlement à la réparation des tissus.<sup>[322]</sup> Ces nombreux rôles complexes font de la sénescence un sujet actif d'étude dans des domaines variés de la Santé. Le développement d'outils pour aider ces études est donc nécessaire et constitue un autre domaine de recherche. Des cellules en sénescence sont à première vue pas si évidemment différenciables de cellules en prolifération. Elles continuent de garder des interactions chimiques avec les cellules avoisinantes et ne présentent pas de modification physique immédiate. Un biomarqueur moléculaire de la sénescence est ainsi indispensable pour une identification rapide.

Dans ce contexte, la *Senescence-Associated  $\beta$ -gal* (SA- $\beta$ -gal) est couramment utilisée comme témoin de cellules sénescents.<sup>[323]</sup> La  $\beta$ -gal est normalement absente de l'intérieur des cellules mammifères classiques. Comme décrit précédemment, sa sur-expression est plutôt associée à des contextes pathologiques (cancers ovariens).<sup>[293]</sup> Toutefois, une activité  $\beta$ -gal peut aussi être présente hors contexte cancéreux, c'est le cas pour les cellules sénescents. Ces dernières expriment, en effet, une activité  $\beta$ -gal un peu particulière puisque localisée au sein de la cellule dans une seule organelle : les lysosomes.<sup>[324]</sup> Ces derniers sont également un peu spéciaux : leur pH interne est très acide, autour d'une valeur de 4,7, assez loin du 7,2 cytosolique.<sup>[325]</sup> Le développement de méthodes de détection efficaces pour la SA- $\beta$ -gal est donc limité par plusieurs facteurs. La SA- $\beta$ -gal est différente de la  $\beta$ -gal, pour développer un système fiable, il faut tester les nouvelles sondes avec la première et non la deuxième. Or, celle-ci n'est pas disponible commercialement : les études *in vitro* ne sont ainsi pas réalisables. Pour l'aspect *in cellulo*, des méthodes d'induction de sénescence existent mais compliquent fortement les expérimentations. De plus, le pH très acide du milieu dans lequel s'exprime la SA- $\beta$ -gal rend les sondes couramment utilisées pour la détection de la  $\beta$ -gal difficilement exploitables.

Plusieurs études ont déjà été publiées pour la détection de la sénescence cellulaire par l'imagerie de la SA- $\beta$ -gal, mais ces dernières manquent parfois de prouver totalement leur bon fonctionnement dans le contexte réel.<sup>[326]</sup> On peut distinguer deux types d'approches. D'une part, les études se basant sur la détection de la  $\beta$ -gal simple, non lysosomale. Celles-ci manquent ainsi directement de pertinence : tout l'enjeu est, ici, de pouvoir adapter des sondes dans un nouveau contexte de la sénescence. La sur-expression de la  $\beta$ -gal, par exemple par transfection du gène *lacZ* n'est pas représentative d'un tel contexte. Ces sondes pourront alors voir leur comportement être totalement modifié une fois appliquées à la détection de la sénescence.<sup>[199,327,328]</sup> D'autre

part, de plus rares études appliquent les sondes au contexte de sénescence, induite par réplication ou par stress (oxydatif voire avec composés cytotoxiques).

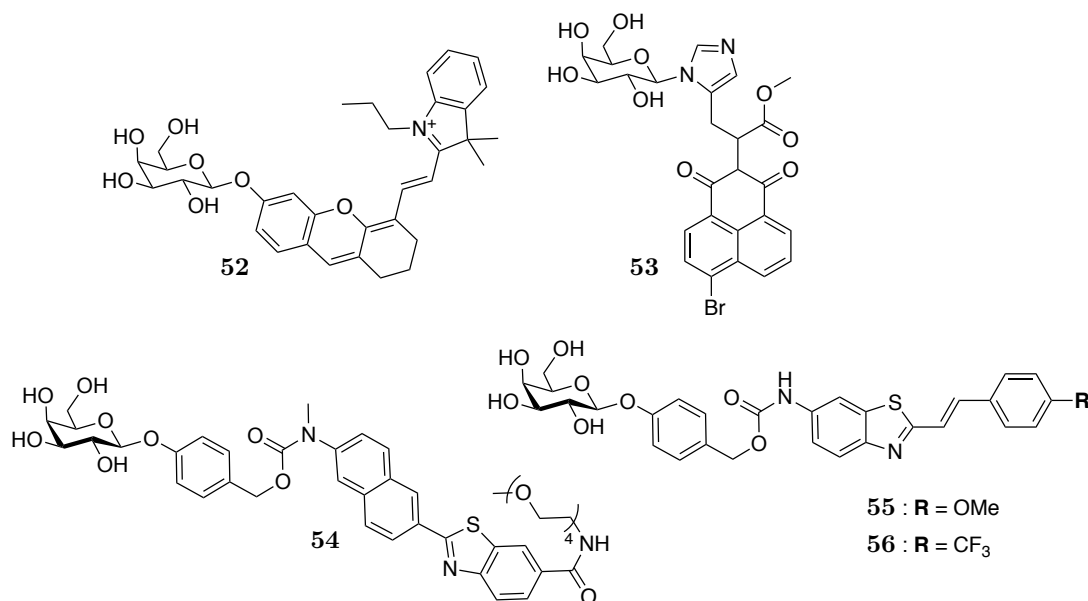


FIGURE 65 – Structures moléculaires de plusieurs sondes développées pour détecter la SA- $\beta$ -gal. [329–332]

Néanmoins, la question de la performance en pH acide est rarement, voire toujours écartée. [329,330,333] Deux études l'évoquent tout de même : la première décrit une sonde ratiométrique (54) pour la détection de SA- $\beta$ -gal, toutefois, seule une comparaison de l'intensité des deux signaux en fonction du pH est présentée. [331] L'intensité d'émission globale peut être dans ce cas fortement diminuée en milieu acide, tout en maintenant un ratio des deux pics d'émission constants. La deuxième, elle, étudie uniquement la stabilité et non la performance des sondes (55, 56) à pH acide. [332] Un faible signal résiduel est d'ailleurs observé à tous les pH testés, preuve d'une extinction non totale de la fluorescence. Dans tous ces exemples, les fluorophores utilisés sont probablement tous diffusants car solubles aux concentrations d'étude. À notre connaissance, aucune sonde avec rétention du signal n'est, à ce jour, décrite pour la détection de la sénescence.

Nous avons de notre côté voulu mettre la priorité sur cette influence du pH, qui conditionne les futures performances de la sonde en contexte réel, tout en profitant des propriétés particulières de l'ELF-97. Nous avons déjà observé un ralentissement de l'apparition du signal avec la diminution du pH (section I.1, p. 62). Deux raisons peuvent expliquer ce ralentissement. Tout d'abord l'enzyme utilisée est la  $\beta$ -gal classique, issue de l'expression du gène *lacZ*. Cette dernière n'est donc pas lysosomale, son activité n'est donc vraisemblablement pas optimale en milieu acide. Ensuite, le méca-

nisme de relargage de l'ELF-97 fait apparaître un intermédiaire amine primaire (après coupure enzymatique et élimination du premier espaceur, Figure 39). En milieu physiologique, celle-ci sera en majeure partie protonée, l'ammonium résultant perd ainsi toute propriété nucléophile et ne peut plus réaliser la cyclisation intramoléculaire nécessaire à la libération du fluorophore. Plus le pH est acide, plus la fraction d'amine protonée est grande, la cyclisation ralentissant alors dans le même temps. La solution envisagée est alors de diminuer le pKa de l'amine en question, pour réduire la protonation et ainsi conserver une élimination de l'espaceur cyclisant efficace sur une plus large gamme de pH.

Plusieurs papiers décrivent l'évolution du pKa (expérimental) d'amines en fonction de leurs substitutions. On peut ainsi retrouver certaines tendances illustrées par les exemples de la Figure 66. Le pKa de l'isobutylamine est autour de 10,15, celui de l'éthylènediamine autour de 9,98; on peut donc imaginer un pKa de l'intermédiaire amine primaire aux alentours de cette valeur de 10. En revanche, la présence d'un atome d'oxygène lié à l'azote fait fortement baisser cette valeur. On trouve les valeurs de 5,97, 5,96 et 5,59 respectivement pour l'hydroxylamine, la méthylhydroxylamine et la méthoxyamine.<sup>[334]</sup> L'idée d'ajouter un groupement méthoxy sur l'amine primaire de l'espaceur cyclisant est donc naturellement apparue. Une version N-méthylé avait déjà été réalisée (pendant mon stage de M2, voir section 3.2.3, p. 56) et n'avait pas modifié le comportement d'apparition du signal. On peut donc espérer que la présence d'un autre petit groupement en fera de même. La diminution du pKa de l'intermédiaire méthoxyamine pourrait alors permettre une amélioration des cinétiques d'effondrement en milieu acide, notamment autour d'un pH de 5.

Base	$\text{Me-NH}_2$	$\text{HO-NH}_2$	$\text{MeO-NH}_2$
pKa:	10,98	5,97	5,59

FIGURE 66 – Illustration de l'évolution du pH d'amines simples par diverses substitutions.

La cible moléculaire, constituée de la sonde  $\beta$ -gal à laquelle serait greffé un groupement méthoxy au niveau du carbamate secondaire reliant les deux espaceurs entre eux, est représentée dans la Figure 67 ci-dessous. Sa synthèse sera décrite dans la prochaine section.

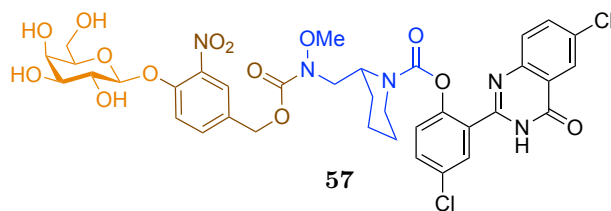


FIGURE 67 – Structure moléculaire d'une sonde pour la détection de la SA- $\beta$ -gal, comprenant une version méthoxyamine de l'espaceur cyclisant.

### I.3.2 Synthèse

Comme pour la version N-méthyle, une nouvelle synthèse de l'espaceur est nécessaire. L'obtention de telles méthoxyamines passe généralement par la réduction de l'imine correspondante, elle-même obtenue à partir de l'analogue aldéhydique (Figure 68). Dans notre cas, on peut imaginer obtenir cet aldéhyde par oxydation contrôlée de l'alcool de la 2-hydroxyméthylpiperidine protégée (**60**). Pour greffer le groupement allyle, une méthode en deux étapes à partir de l'acide pipécolique commercial (**58**) : double allylation et réduction de l'ester allylique été choisie. Bien que décrite dans un papier<sup>[335]</sup>, l'oxydation de l'alcool **60** en aldéhyde a posé problème. L'obtention de quantités très réduites et d'un mélange complexe à purifier a empêché la réalisation du reste de la synthèse. Dans ce papier les auteurs soulignent, en plus du rendement modeste (50 %) une instabilité importante du produit **60**. Cette voie de synthèse a, de ce fait, été abandonnée.

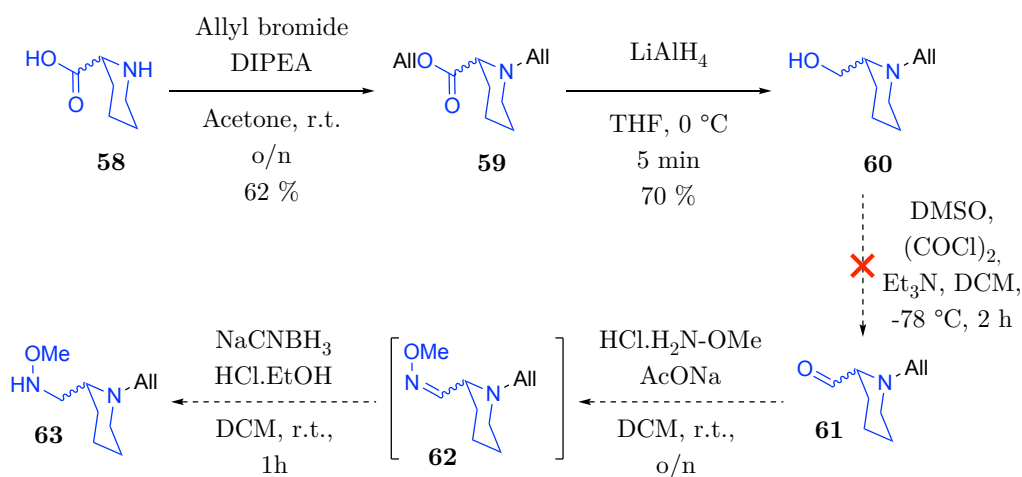


FIGURE 68 – Voie de synthèse envisagée pour l'obtention de l'intermédiaire **63**.

Comme expliqué dans la section I.2.2 p. 85, la présence de l'allyle est nécessaire pour orienter la réaction de couplage avec l'amine primaire. La sélectivité inverse étant obtenue en utilisant la 2-aminométhylepiperidine. La gêne stérique n'est donc pas le



facteur primordial ici, la plus grande nucléophilie de l'amine secondaire vis-à-vis de la primaire (par effet inductif des deux carbones) semble être déterminante. Mais dans le cas de ce nouvel espaceur, l'absence de groupement protecteur entraînerait la compétition entre une amine secondaire et une méthoxyamine secondaire. La nucléophilie devrait logiquement être bien supérieure pour cette dernière, grâce à l'effet électrodonneur du groupement méthoxy adjacent. Une nouvelle voie de synthèse aboutissant à l'espaceur méthoxyamine non protégé a donc été envisagée (Figure 69). Elle permet dans ce cas l'utilisation d'un autre groupement protecteur sur l'amine secondaire, qui reste nécessaire pour la formation de l'unité méthoxyamine. Une protection classique par un groupe *tert*-butoxycarbonyle (Boc) a dans un premier temps été tentée. La synthèse démarre ainsi par cette protection sur la 2-hydroxyméthylpipéridine commerciale (**64**), suivie de l'oxydation douce en aldéhyde. La formation de l'unité méthoxyamine, s'effectue par la formation de l'imine par réaction avec le sel hydrochloré de la N-méthoxyamine, puis réduction immédiate (sans isoler l'imine) au cyanoborohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ). La déprotection du Boc constitue alors l'ultime étape pour obtenir l'intermédiaire désiré **69**.

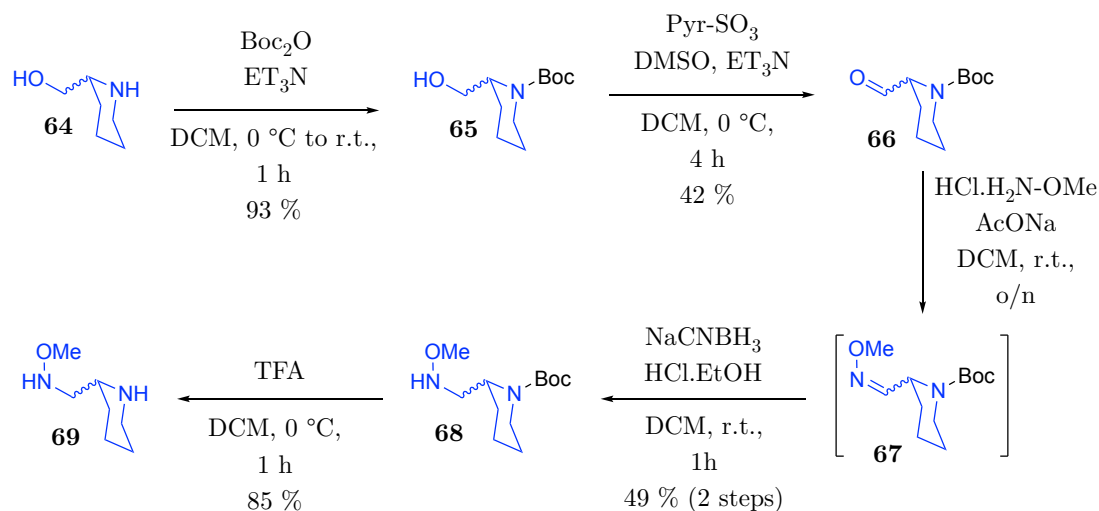
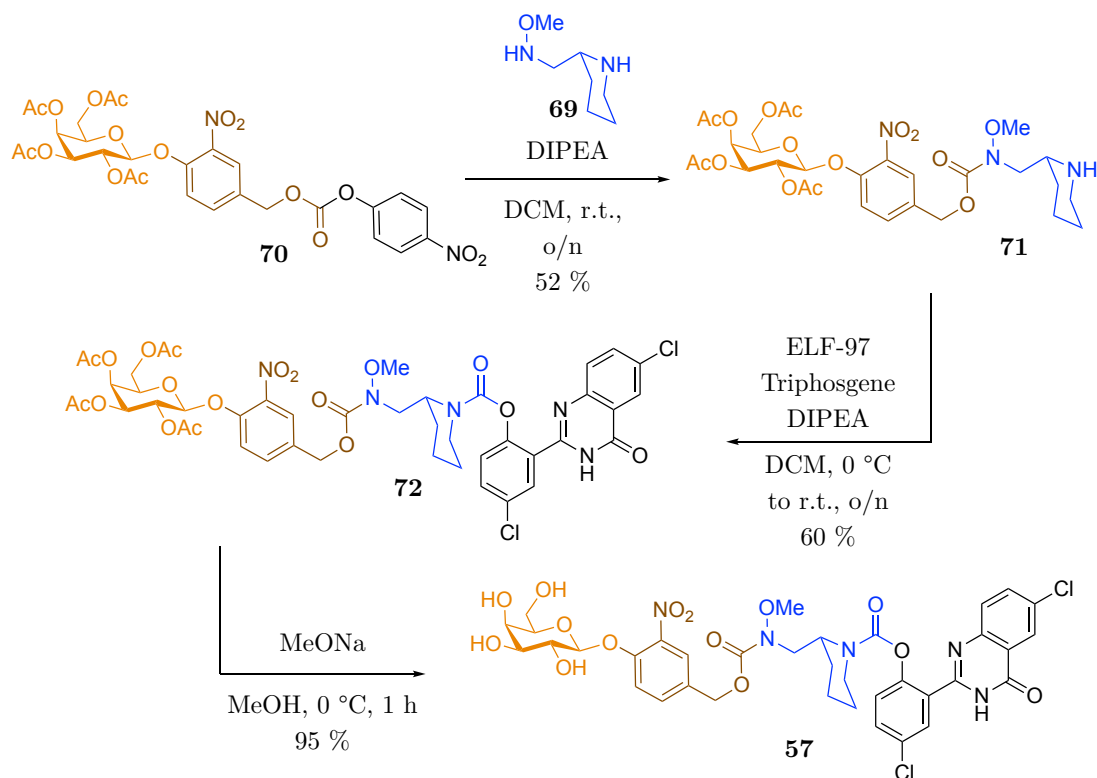


FIGURE 69 – Voie de synthèse de l'espaceur intermédiaire méthoxyamine **69**.

Cette première synthèse a ainsi été effectuée selon les conditions décrites dans la Figure 69. Les rendements obtenus sont parfois modestes (notamment pour l'oxydation de l'alcool **65**) et nécessiteraient une optimisation. La suite de la synthèse est la finalisation de la sonde, à partir du carbonate activé **70**, déjà utilisé pour la synthèse de la sonde  $\beta$ -gal classique (**15**).

FIGURE 70 – Voie de synthèse pour l'obtention de la sonde méthoxy **57**.

L'obtention du produit de couplage **71** a pu être prouvée par MS et RMN, toutefois la chimiosélectivité est plus dure à démontrer. Des expériences NOESY ont été effectuées, mais n'ont pas montré d'interactions spatiales appuyant une structure en particulier. L'obtention de structures cristallines par diffraction aux rayons X serait très utile, mais nécessite une augmentation de l'échelle de produit engagé. Avec environ 30 mg, il est, en effet, très compliqué d'obtenir des cristaux convenables pour une telle analyse. Cette quantité a, cependant, été suffisante pour terminer la synthèse (greffage de l'ELF-97, déprotection des acétates, et purification par HPLC). La quantité de sonde obtenue est assez faible (moins de 5 mg), une reproduction est donc également nécessaire pour permettre des caractérisations plus approfondies (RMN notamment).

### I.3.3 Résultats et perspectives

Toujours en collaboration avec Damien Curton, une première comparaison des deux versions d'espaceurs a été effectuée. La validation *in vitro* de la sonde a constitué la traditionnelle première étape. Le résultat est donné dans la Figure 71. Plusieurs choses sont à noter : premièrement, une certaine fluorescence résiduelle peut être observée et est proportionnelle à la quantité de sonde ajoutée. Cette fluorescence est très probable-

ment due à des traces d'ELF-97 contaminantes par manque de purification. Plusieurs passages à l'HPLC sont parfois nécessaires pour éliminer ces traces. Malheureusement, ici, la quantité de sonde **57** obtenue après une purification n'a pas autorisé d'en effectuer d'autres. Encore une fois, une synthèse à plus grosse échelle est donc impérative pour atteindre un niveau de pureté supérieur. Toutefois, un comportement satisfaisant est obtenu : en absence de  $\beta$ -gal aucune augmentation de fluorescence n'est notable, et ce jusqu'à 10 heures. En présence de l'enzyme, un signal apparaît très rapidement et permet d'atteindre un plateau avant 1 heure d'incubation. La cinétique d'effondrement est même assez rapide pour "rater" le début de l'apparition du signal, ce qui constitue un signe encourageant pour la suite.

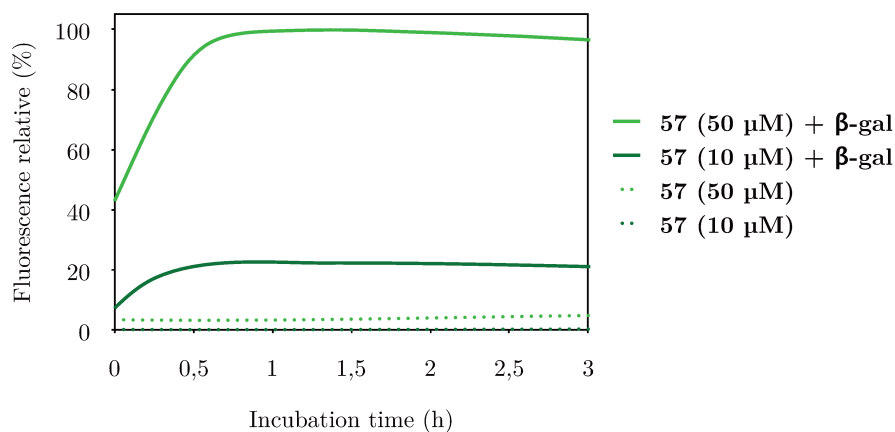


FIGURE 71 – Fluorescence (u. a.) de la sonde méthoxy **57** à différentes concentrations en fonction du temps; solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 10 U.mL<sup>-1</sup>.

Pour évaluer son comportement en fonction de l'acidité, une autre mesure est effectuée. Le signal est, cette fois-ci, mesuré en faisant varier le pH du tampon d'incubation. Les résultats (Figure 72), montrent des cinétiques optimales vers des valeurs de pH de 7 et 8. Pour des pH plus acides, des profils d'apparition de signal habituel sont observés jusqu'à pH = 4. Il faut maintenant comparer les vitesses d'apparition de signal en comparant à la sonde modèle  $\beta$ -gal **15**, ne possédant pas l'unité méthoxy.

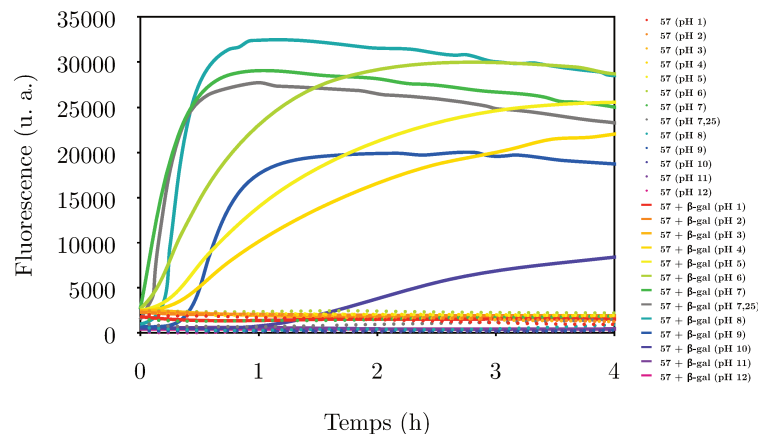


FIGURE 72 – Fluorescence de la sonde méthoxy **57** à différents pH en fonction du temps ; concentration : 10 mM, solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 10 U.mL<sup>-1</sup>.

La sonde SA- $\beta$ -gal étant destinée à une application à la détection de la sénescence en milieu acide, seules les valeurs de pH entre 4 et 7 seront retenues pour cette comparaison. Les courbes de fluorescence en fonction du temps obtenues sont reportées dans la Figure 73. Pour tous les pH testés, la sonde méthoxy semble être plus rapide : la fluorescence commence à apparaître avec un délai toujours inférieur à celui de la sonde classique. La fluorescence résiduelle est évidemment toujours présente ici, mais aucun signal n'apparaît pour les contrôles négatifs, témoignant de la stabilité des deux systèmes.

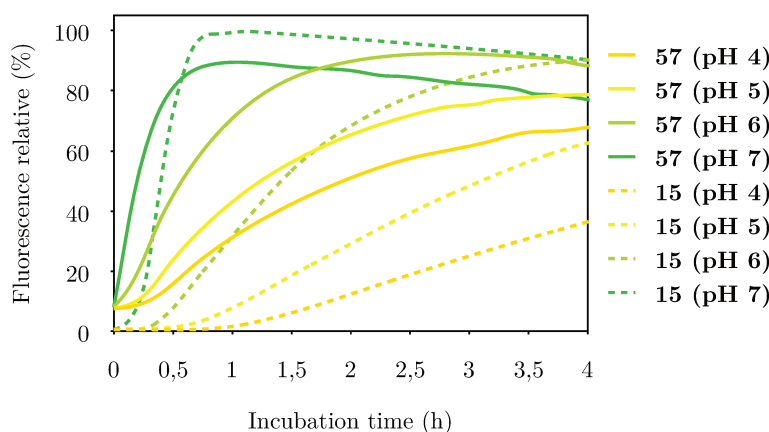


FIGURE 73 – Fluorescence des sondes  $\beta$ -gal **15** et méthoxy (**57**) en fonction du temps, à différents pH ; concentration : 10  $\mu$ M, solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 10 U.mL<sup>-1</sup>.

Pour tenter de quantifier plus finement cette amélioration de performances, on peut comparer les temps de demi-apparition de signal, temps pour lesquels le signal atteint 50 % de sa valeur maximale. Pour une valeur de pH de 5 (la plus proche du pH

lysosomal de 4,7), ces temps sont d'environ 1h15 pour la sonde méthoxy et un peu plus de 3 heures pour la sonde  $\beta$ -gal classique, soit une diminution par un facteur 2,5. Pour les autres pH : 4, 6 et 7, les facteurs d'accélération sont respectivement d'environ 2,6, 2,3 et 2,1. On constate donc une augmentation de l'accélération avec une diminution du pH. Cela vient par conséquent appuyer l'hypothèse de la protonation de l'intermédiaire comme explication au ralentissement de la détection observé en milieu acide.

Ce premier résultat est donc très encourageant et une étude sur cellules sénescents devrait venir désormais compléter l'étude. Comme indiqué précédemment, un nouveau lot de cette sonde est absolument nécessaire pour permettre d'obtenir des quantités plus importantes, de sonde finale mais également des intermédiaires. Une meilleure purification de ces molécules serait alors possible et une caractérisation physico-chimiques plus poussée pourrait ainsi être menée. Malheureusement, la deuxième synthèse sur plus grosse quantité du nouvel espaceur intermédiaire ne s'est pas aussi bien déroulée que la première. La formation en deux étapes de l'unité méthoxyamine par amination réductrice a posé de gros problèmes de purification et le produit désiré n'a pu être isolé. Une synthèse alternative employant des alkoxy-sulfonamide a alors été tentée mais sans meilleurs résultats. Ce projet ayant été démarré en cours de dernière année, nous n'avons pas disposé d'assez de temps pour retenter une de ses deux voies synthétiques.

Les perspectives sur cette étude sont multiples. Au-delà d'une étude en contexte réel de sénescence, l'amélioration des performances de détection à pH physiologique pourrait être transférée à la détection d'autres enzymes, de la famille des glycosidases ou autres. Un coût synthétique plus important est nécessaire pour leur réalisation, toutefois la synthèse étant convergente, il pourrait être amorti par la production d'une grosse quantité de cet espaceur méthoxy, alors utilisable dans de multiples synthèses. En outre, une meilleure compréhension des sondes est possible grâce à une particularité observée pendant la synthèse de la sonde SA- $\beta$ -gal. Ce nouvel espaceur présente, au même titre que l'ancien, un centre stéréogène. Les substrats commerciaux utilisés étant racémiques, les sondes finales et intermédiaires sont obtenues sous forme de mélange de diastéréoisomères non-séparables (le sucre possède également plusieurs centres stéréogènes et aucune étape n'est stéréosélective). Cependant, pendant cette synthèse, après le couplage avec le nouvel espaceur (intermédiaire **71**), deux molécules aux mêmes spectres RMN et au profil MS similaires ont pu être isolées après colonne chromatographique. Ces deux composés pourraient donc être les deux diastéréoisomères, cette

fois-ci séparables. La synthèse a été poursuivie sur un seul de ces deux composés mais, lors d'une prochaine synthèse, il serait très intéressant de pouvoir synthétiser les deux isomères de la sonde finale. Les enzymes sont effectivement des objets chiraux, leur conférant la possibilité de discriminer des sucres  $\alpha$  et  $\beta$  par exemple. Il serait alors pertinent de vérifier l'influence d'un centre stéréogène, certes éloigné, sur la reconnaissance enzymatique. Si une différence est observable, on pourrait alors choisir la meilleure version et donc améliorer encore les performances de détection.

## I.4 Conclusions et perspectives du chapitre I

Grâce aux avancées majeures précédant mon arrivée dans l'équipe, de nombreuses perspectives s'étaient alors ouvertes pour le développement de notre technologie de sondes à activités enzymatiques, basées sur l'ELF-97. Maxime Prost avait ainsi développé la première sonde efficace et stable incorporant ce fluorophore particulier, créant alors une première famille de sondes pour activités peptidases. Corentin Gondrand avait, lui, ouvert la voie à une nouvelle famille de sondes pour la détection de glycosidases. Une stratégie de double espaceur a alors été nécessaire pour la réussite d'une preuve de concept avec une sonde modèle pour  $\beta$ -gal, qui a ensuite montré de bonnes performances dans des résultats préliminaires. La première partie de cette nouvelle étude a été de développer et d'optimiser les applications de cette sonde **15** dans divers contextes biologiques. Elle a ainsi démontré une stabilité sur plusieurs jours, une très bonne sélectivité envers la  $\beta$ -gal et une applicabilité en cellule mammifère — avec, notamment, un marquage quantitatif en FACS — ainsi qu'en cellules bactériennes, où les images prises en boîtes de Pétri démontrent l'excellente rétention du signal au sein des colonies positives.

Grâce à cette nouvelle technologie d'espaces auto-effondrables, d'autres enzymes de la même famille des glycosidases sont désormais ciblables. Ce projet poursuivi en parallèle a permis le développement d'un début d'exemplification de cette génération de sondes, avec la synthèse d'une sonde (**31**) pour la détection d'activité  $\beta$ -gus. L'étude primaire *in vitro* a confirmé des performances similaires à la sonde modèle  $\beta$ -gal. Malheureusement, les premières tentatives d'application sur une plante modèle — dans lequel l'enzyme  $\beta$ -gus est couramment utilisée comme produit de gène rapporteur — n'ont pas été concluantes. De nouvelles tentatives devraient être envisagées prochainement.

Une nouvelle preuve de concept a également été faite pour démontrer la sélectivité de ces substrats. Une sonde (**32**) portant deux sucres, un  $\alpha$ -glucose et un  $\beta$ -glucose, a, dans ce cadre, été synthétisée. Un test *in vitro* avec les enzymes cibles a montré la nécessité de la présence des deux exo-glycosidases pour permettre l'apparition de fluorescence. En complément du concept de *double-gating* développé par Maxime Prost<sup>[285]</sup>, cette nouvelle technologie permet également l'obtention de sondes à double-sélectivité. La sonde **32** ne possède pas encore d'applications concrètes, mais le contrôle de multiples transfections ou la détection simultanée de plusieurs biomarqueurs enzymatiques

pourraient constituer des champs de recherche potentiellement très intéressants pour cette sonde.

Pour développer encore plus cette famille de sondes, de nouveaux exemples pourraient être envisagés par la suite. Des sondes simples possédant un unique sucre pourraient augmenter le panel d'applications possibles. Des sondes pour  $\beta$ -glu ou  $\alpha$ -mannose seraient ainsi envisageables. Des sucres plus complexes pourraient aussi être incorporés pour des contextes bien particulier, telle une sonde pour détecter l'activité neuraminidase (Figure 74), biomarqueur étudié pour son importance dans l'infection du virus de la grippe.<sup>[336,337]</sup> Obtenir des sondes portant la stéréochimie inverse au niveau du carbone anomérique serait également un plus pour les études de sélectivité et pourrait trouver des applications biologiques. Un déficit en  $\alpha$ -gal est, par exemple, associé au contexte pathologique de la maladie de Fabry. Pour obtenir de telles structures, un effort synthétique supplémentaire sera toutefois à prévoir, pour les raisons de stéréosélectivité de la réaction de Koenigs–Knorr précédemment discutées (voir section I.2.1, p. 82).

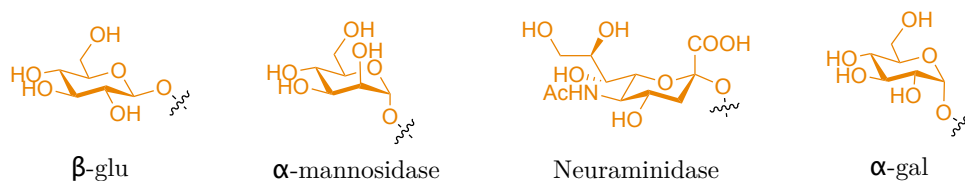


FIGURE 74 – Exemples de nouveaux substrats pour la suite d'exemplification des sondes de la famille des glycosidases

Enfin, la dernière partie de ce chapitre a concerné le développement d'un nouvel espaceur. Initialement pensé pour la détection de la SA- $\beta$ -gal, associée au contexte de sénescence cellulaire, cette nouvelle technologie pourrait profiter à toutes les familles de sondes déjà développées ou à venir. En effet, appliqué à la  $\beta$ -gal, les cinétiques d'effondrement semblent être grandement améliorées grâce à son incorporation, tout en préservant la stabilité indispensable des sondes. L'étude de cette sonde modèle 57 dans le contexte réel de sénescence constitue l'objectif à court-terme de ce projet. La réalisation d'autres exemples utilisant cette nouvelle technologie serait alors un second objectif, applicable, par exemple, à une nouvelle famille de sondes, qui sera décrite dans le chapitre suivant.





## Chapitre II

Une nouvelle classe d'enzymes -  
sondes pour  $\beta$ -lactamases



## Chapitre II

# Une nouvelle classe d'enzymes - sondes pour $\beta$ -lactamases

La famille des sondes peptidases a constitué la première génération de sondes ELF-97 stables développées par l'équipe. Plus récemment, une autre catégorie d'enzymes est désormais détectable : les glycosidases. De nombreuses variations et applications ont déjà été menées sur ces deux familles, comme décrit par les précédents doctorants du groupe ou dans la première partie de cette thèse.<sup>[62,280,281,285,287]</sup> Ce second chapitre sera, lui, consacré au développement d'une nouvelle classe de sondes, dans le but de détecter une famille d'activités enzymatiques inédite : les  $\beta$ -lactamases.

Nous verrons dans un premier temps en quoi il est intéressant de pouvoir repérer ces enzymes. Dans ce cadre, une collaboration majeure avec l'équipe du Pr Kazuya Kikuchi (Université d'Osaka) est ainsi née, et a abouti à plusieurs séjours entre les deux pays. La mise au point et la réalisation d'une voie de synthèse pour l'obtention d'une sonde modèle fut le premier objectif de cette étude et sera présentée dans un premier temps. Son évaluation biologique, réalisée aussi bien en France qu'au Japon, constituera alors une seconde partie. Enfin, une dernière section sera consacrée à la tentative de variation des propriétés physico-chimiques de la sonde. La perméabilité membranaire sera notamment un point crucial dans le cadre du projet collaboratif.

## II.1 Les $\beta$ -lactamases, de la résistance bactérienne à l'étude du diabète

En 1928, Sir Alexander Fleming rentre de vacances et découvre avec étonnement qu'une de ses cultures bactériennes est contaminée par un champignon. Plus étonnant encore, il remarque que les colonies de bactéries proches du champignon ont été détruites. Il cultiva alors ce champignon découvrit qu'il produisait une substance, à l'origine de la mort des bactéries.<sup>[338]</sup> Ce champignon fut plus tard identifié comme appartenant au genre *Penicillium*. Cette découverte fortuite mènera Sir Edward Abraham à l'identification en 1942 de la substance active, déjà nommée pénicilline (structure confirmée par diffraction aux rayons X en 1945 par Dorothy Hodgkin).<sup>[339]</sup> C'est alors le premier membre de la désormais grande famille des antibiotiques.

Mais dans sa première étude, Alexander Flemming a également observé l'inefficacité de la pénicilline sur un certain nombre de souches bactériennes qu'il possédait.<sup>[338]</sup> Ce fut alors à nouveau Edward Abraham qui isola en 1940 la substance permettant cette résistance.<sup>[340]</sup> Il identifia alors cette substance comme étant une enzyme, dont l'activité inhibait l'action de la pénicilline. C'est la première preuve d'une résistance enzymatique à l'action d'un antibiotique. Avec la détermination de la structure de la pénicilline, l'action de cette enzyme fut plus tard caractérisée comme une  $\beta$ -lac.

De nombreuses études ont ensuite été menées pour comprendre les origines et mécanismes de ces composés. On connaît aujourd'hui la grande variété de  $\beta$ -lactamases (pénicillinases, céphalosporinases, carbapénémases, etc.). Au-delà de leur rôle dans les résistances bactériennes, ces enzymes sont désormais utilisées comme outil privilégié en biologie moléculaire. Nous balaierons ainsi ces différents aspects dans cette première section.

### II.1.1 Les $\beta$ -lactamases, une arme de défense des bactéries

Les antibiotiques tels que la pénicilline ont pour la plupart un mécanisme semblable pour leur action bactéricide. Celui-ci est ciblé contre un composant essentiel à la survie des bactéries : leur paroi cellulaire. Véritable mur de protection contre les agressions physiques et chimiques, sa fragilisation est rapidement fatale pour les bactéries. Un des composants principaux de ces parois est le peptidoglycane. Sa structure est assez

particulière car composée à la fois de chaînes glycosidiques et peptidiques. Plus précisément, les chaînes glycosidiques sont formées de l'alternance entre deux sucres : la N-acétyl-glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl-muramique (NAM) (Figure 75). Ces chaînes sont reliées entre elles par une chaîne d'acides aminés, liant deux NAM par une liaison peptidique au niveau de leur unité acide lactique.

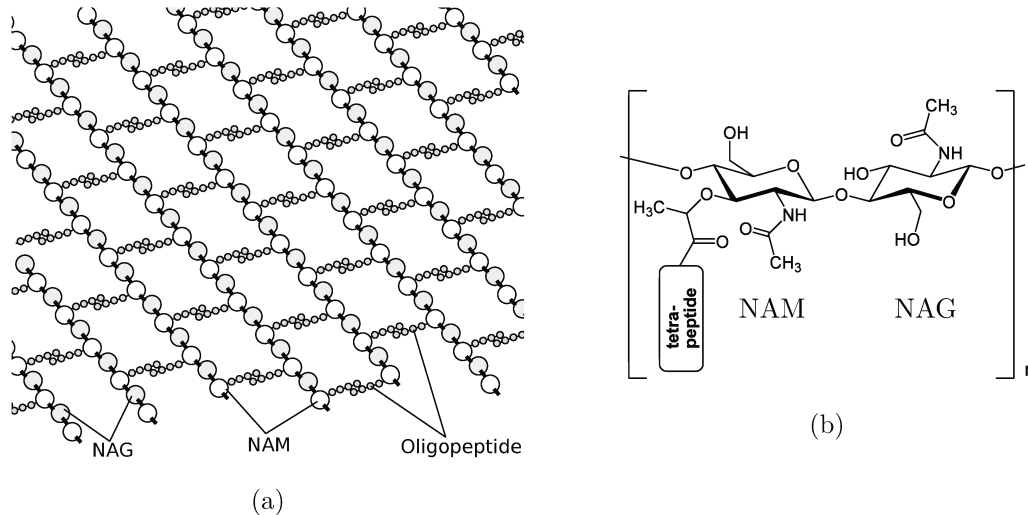


FIGURE 75 – Illustration de (a) : la structure du peptidoglycane et (b) : des deux sucres composant sa partie glycosidique (NAG et NAM).

Pour former de telles structures, de nombreuses étapes biosynthétiques sont nécessaires. Elles sont généralement décomposées en trois grandes parties, la synthèse des monomères dans le cytosol<sup>[341]</sup>, leur assemblage dans la membrane interne<sup>[342]</sup>, puis la polymérisation des chaînes obtenues dans la partie externe qui forme alors la paroi cellulaire.<sup>[343]</sup> C'est cette dernière qui est inhibée en présence d'antibiotique de type pénicilline. En effet, les chaînes peptidiques avant couplage sont terminées par la succession de deux alanines (D-Ala-D-Ala). Ce groupement est reconnu par une enzyme venant lier deux chaînes entre elles, il s'agit d'une transpeptidase. En bloquant son activité, il n'est plus possible pour la machinerie moléculaire bactérienne de relier les polymères non réticulés. La paroi cellulaire ne peut alors se former par manque de stabilité globale apportée par la réticulation. Sans cette protection la bactérie ne survit pas longtemps. Dès qu'elle rentre en phase de division (ce qui est très fréquent), la synthèse de peptidoglycane étant inactivée, la bactérie perd sa paroi cellulaire (on parle alors de sphéroplastes) et meurt rapidement.

Pour inhiber cette transpeptidase, des micro-organismes (tel *Penicillium chrysogenum* dont est issue la pénicilline), ont produit des molécules capables de mimer le substrat de l'enzyme cible. L'unité di-alanine, est ainsi très proche structurellement des

antibiotiques  $\beta$ -lactame (Figure 76). Mais ils possèdent en plus quelque chose que le dipeptide seul n'a pas : un site électrophile. En effet, la transpeptidase possède, entre autres, une sérine libre dans son site actif. La présence de l'antibiotique dans ce site permet l'attaque de l'alcool de cette sérine sur le carbonyle du cycle  $\beta$ -lactame.<sup>[344]</sup> Ainsi fixé, l'antibiotique inhibe l'activité enzymatique de la transpeptidase, et donc également celle de la synthèse de la paroi cellulaire entraînant la mort de la bactérie. Afin d'augmenter l'efficacité d'une telle stratégie, l'Homme a examiné les nombreux antibiotiques naturellement produits par des micro-organismes pour détecter les meilleures activités. La synthèse chimique de la pénicilline en 1957 par John Sheehan marque également le début du développement d'analogues artificiels de la pénicilline et d'autres antibiotiques naturels. Il existe désormais une variété énorme de ces antibiotiques synthétiques, regroupés en plusieurs familles en fonction des groupes caractéristiques présents : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes sont les principaux mais il en existent encore d'autres (monobactames, carbacéphèmes, etc.). La Figure 76 illustre les principaux exemples.

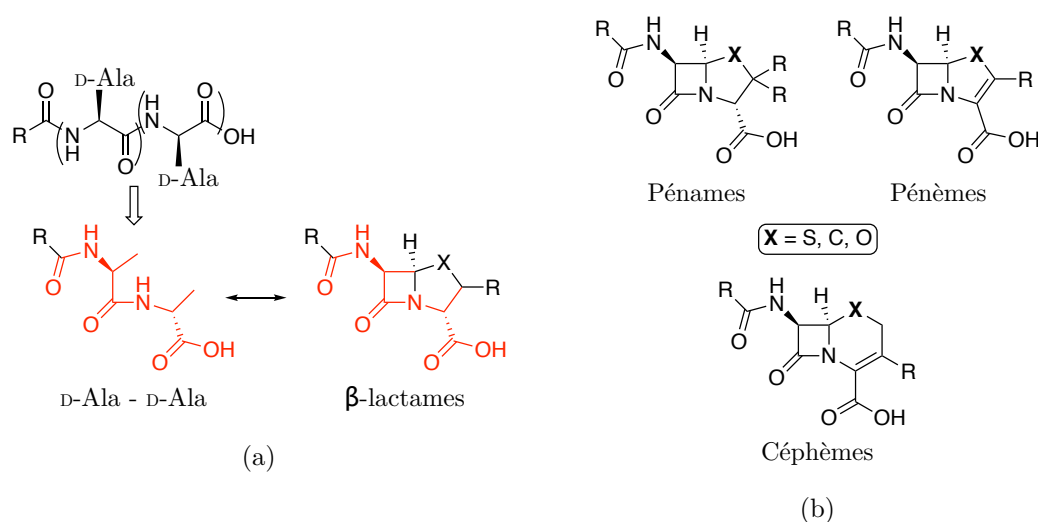


FIGURE 76 – Illustration de : (a) la ressemblance structurale entre l'unité di-alanine et les antibiotiques de type  $\beta$ -lactame, et (b) structure des principales familles de ces antibiotiques (pas de préfixe si X = S, préfixe "carba" si X = C et préfixe "oxa" si X = O).

Les bactéries et autres micro-organismes sont parmi les premiers organismes vivants sur Terre. Si certains ont développé des mécanismes d'attaque comme la production d'antibiotiques, les bactéries ont aussi élaboré des stratégies de défense. Effectivement la résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas récente, sa proportion a juste exponentiellement augmenté depuis le début de la production à l'échelle industrielle de ces molécules par l'Homme.<sup>[345,346]</sup> Issus de millions d'années d'évolution, les mécanismes

de résistance aux antibiotiques sont ainsi multiples et sophistiqués.<sup>[347,348]</sup> Parmi eux, on peut par exemple citer les procédés d'efflux dans lesquels des protéines transmembranaires (aussi appelées pompes à efflux) sont spécialement dédiées à rejeter les antibiotiques en dehors des cellules par un transport actif de ces molécules.<sup>[349]</sup> On peut aussi évoquer la modification des structures composant les parois cellulaires pour diminuer la sensibilité aux inhibiteurs de synthèse de peptidoglycane, ou encore les modifications d'affinité des transpeptidases pour favoriser l'unité di-alanine et empêcher l'entrée des antibiotiques  $\beta$ -lactame à l'intérieur des sites catalytiques.<sup>[350]</sup>

Toutefois, le procédé le plus spécifique est celui de la résistance grâce aux  $\beta$ -lactamases. C'est d'ailleurs le premier phénomène de résistance jamais observé<sup>[338]</sup> et analysé.<sup>[340]</sup> Ces enzymes sont spécialisées dans l'hydrolyse des  $\beta$ -lactames, tout particulièrement ceux des antibiotiques de type  $\beta$ -lactame. Leur haute spécificité pour ces derniers permet une destruction avant que l'inhibition de la synthèse des parois cellulaires ait lieu. De plus, ces  $\beta$ -lactamases sont excrétées : elles peuvent agir à l'extérieur des bactéries, prévenant d'autant plus l'approche des antibiotiques.

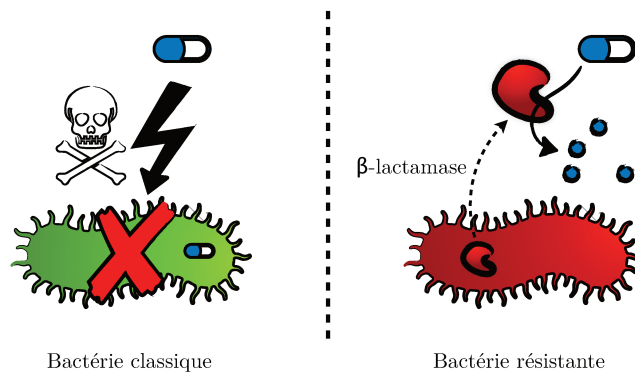


FIGURE 77 – Illustration du mécanisme de résistance bactérienne par utilisation de  $\beta$ -lactamases.

Ce type de résistance n'est donc pas récent, et les  $\beta$ -lactamases comptaient ainsi déjà de nombreux variants avant l'arrivée des antibiotiques synthétiques. L'énorme augmentation de ces derniers dans l'environnement a exercé, et exerce toujours, une pression de sélection très forte. La rapide multiplication des bactéries entraîne une fréquence assez élevée de possibles mutations génétiques, favorisant encore davantage l'apparition de nouveaux mutants. On évalue d'ailleurs à plusieurs centaines le nombre toujours croissant de gènes différents codant pour des  $\beta$ -lactamases.<sup>[348]</sup> Des moyens de lutter contre ces enzymes existent, le plus simple est l'administration d'inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases simultanément aux antibiotiques.<sup>[351]</sup> Le plus connu est l'acide clavulanique,



découvert en 1977 dans une bactérie (*Streptomyces clavuligerus*).<sup>[352]</sup> Il est reconnu par les  $\beta$ -lactamases et se fixe irréversiblement dans leur site catalytique, empêchant alors la dégradation des antibiotiques. Cet inhibiteur et les autres, grâce à leur action synergique avec les antibiotiques, permettent d'outrepasser certaines résistances.

Toutefois, les bactéries finissent pas évoluer pour réduire l'affinité des  $\beta$ -lactamases avec ces derniers, ou même arriver à les détruire.<sup>[353]</sup> La lutte contre ces résistances est ainsi sans fin car les bactéries ne cesseront probablement de s'adapter aux nouvelles molécules développées par l'Homme ou d'autres micro-organismes. L'apparition de spécimens présentant de multiples résistances est par ailleurs un des soucis majeurs dans cette lutte.<sup>[354]</sup> En effet, la solution couramment employée pour traiter ces infections est l'identification précise (et la plus rapide possible) du pathogène responsable. Ses faiblesses sont alors connues, et le bon antibiotique ou la bonne combinaison d'antibiotiques/inhibiteurs peut alors être administré. La présence de résistances multiples complique alors énormément l'identification d'un traitement. Les tableaux ci-dessous (Figure 78 et 79) illustrent la susceptibilité aux antibiotiques de certaines souches bactériennes résistantes. Parmi les plus dangereuses, on retrouve notamment une souche de staphylocoque doré (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) résistante à toutes les pénicillines et céphalosporines, ou encore *Enterococcus faecium*, présentant des résistances très variées.

		Gram-Positive Organisms																
Percent Susceptible (Number of isolates tested)	# of all isolates from all sources	Penicillins			Cephalosporins		Quinolones		Tetracyclines			Other Antimicrobials						
		Ampicillin	Oxacillin	Penicillin	Cefazolin	Ceftazidime	Levofloxacin	Moxifloxacin	Doxycycline	Tetracycline	Tigecycline	Clindamycin	Erythromycin	Linezolid	Nitrofurantoin	Rifampin	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Vancomycin
<i>Enterococcus</i> sp. (unspecified and other)	338	90 (338)		‡			‡		36 (338)			‡	100 (226)	87 (319)	‡		87 (333)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	6,791	100 (6,791)		99 (681)			84 (3,991)		16 (3,585)	21 (6,791)	100 (3,991)		11 (2,046)	99 (1,177)	99 (4,242)		100 (6,791)	
<i>Enterococcus faecium</i>	788	28 (788)		‡			18 (147)		41 (147)	23 (769)	100 (429)		2 (282)	100 (684)	42 (466)	‡	47 (529)	
Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)*	18,828	‡	100 (18,728)	40 (10,820)	100 (10,213)	‡	94 (13,216)	94 (13,793)	100 (7,881)	96 (18,703)	100 (11,220)	80 (18,828)	65 (18,428)	100 (18,772)	99 (9,533)	100 (11,858)	99 (18,828)	100 (18,785)
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)*	7,445	‡	0 (7,445)	0 (7,445)	0 (3,346)	0 (98)	38 (4,411)	38 (6,092)	99 (3,180)	93 (7,442)	100 (4,313)	62 (7,438)	18 (7,439)	100 (7,093)	99 (4,143)	100 (6,532)	79 (7,445)	100 (7,431)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	403			85 (292)			98 (274)	98 (296)			78 (403)		80 (316)	63 (403)			89 (347)	100 (403)


Comparison with 2016 Susceptibility: ■ 10% or greater increase ■ 5-9% increase ■ 5-9% decrease ■ 10% or greater decrease

Note: Data are presented for surveillance purposes only and are not intended for use in clinical decision making. This antibiogram should not take the place of individual clinical assessment and isolate susceptibility testing.

FIGURE 78 – Exemples de sensibilité à divers antibiotiques pour plusieurs bactéries résistantes Gram positives (les chiffres indiqués sont les pourcentages d'isolats susceptibles d'être soignés par l'antibiotique concerné, entre parenthèses est précisé le nombre d'isolats étudiés, la couleur des cases représente la variation du taux de susceptibilité par rapport à l'année précédente)

## II.1 Les $\beta$ -lactamases, de la résistance bactérienne à l'étude du diabète

		Gram-Negative Organisms														
Percent Susceptible (Number of isolates tested)	# of all isolates from all sources	Penicillins			Cephalosporins				Carbapenems			Quinolones			Other Antimicrobials	
		Amoxicillin/ Clavulanic Acid	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin/ Tazobactam	Cefuroxime	Ceftazidime	Ceftazidime	Cefepime	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Amikacin	Nitrofurantoin	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole
<i>Acinetobacter</i> sp.	859		93 (805)	75 (843)		17 (841)	77 (795)	83 (154)		98 (794)	99 (795)	90 (859)	94 (795)	‡	0 (43)	88 (859)
<i>Citrobacter freundii</i>	452		*	*	*	*		97 (412)	100 (312)	99 (274)	100 (314)	92 (447)	92 (314)	100 (452)	93 (452)	96 (452)
<i>Citrobacter koseri</i>	1,214			97 (1,213)	78 (434)	98 (1,205)	99 (622)	99 (1,026)	100 (893)	100 (436)	98 (622)	99 (1,213)	99 (474)	96 (1,214)	95 (1,213)	98 (1,214)
<i>Enterobacter</i> sp.	2,948	*	*	*	*	*	86 (1,740)	95 (2,593)	100 (1,796)	98 (1,419)	100 (1,740)	96 (2,787)	98 (1,740)	90 (2,948)	51 (1,927)	90 (2,930)
<i>Escherichia coli</i>	49,745	88 (43,611)	64 (30,677)	98 (46,444)	73 (4,077)	95 (49,745)	93 (26,568)	97 (43,477)	100 (24,411)	100 (24,412)	95 (28,482)	83 (49,742)	82 (28,468)	98 (49,742)	97 (48,033)	78 (38,442)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,640	95 (4,475)	85 (6,391)	96 (10,209)	87 (2,798)	97 (10,305)	95 (6,085)	96 (8,803)	100 (5,522)	100 (5,167)	100 (5,167)	96 (10,327)	96 (5,981)	98 (10,330)	56 (9,027)	90 (10,640)
<i>Proteus mirabilis</i>	4,872	99 (2,199)	95 (2,765)	100 (4,813)	97 (805)	98 (4,867)	99 (2,714)	98 (4,349)	100 (2,249)	87 (2,199)	99 (1,318)	92 (4,872)	94 (2,714)	99 (3,583)	*	89 (4,409)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,413			99 (6,822)			91 (3,409)	93 (6,573)	*	90 (6,536)	95 (4,251)	87 (7,413)	81 (4,250)	98 (7,412)	*	*
<i>Serratia marcescens</i>	864	*	*	*	*	*	*	98 (768)	100 (487)	‡	99 (425)	96 (864)	88 (569)	99 (714)	*	96 (859)


 Comparison with 2016 Susceptibility: ■ 10% or greater increase ■ 5-9% increase ■ 5-9% decrease ■ 10% or greater decrease

Note: Data are presented for surveillance purposes only and are not intended for use in clinical decision making. This antibiogram should not take the place of individual clinical assessment and isolate susceptibility testing.

FIGURE 79 – Exemples de sensibilité à divers antibiotiques pour plusieurs bactéries résistantes Gram négatives (les chiffres indiqués sont les pourcentages d'isolats susceptibles d'être soignés par l'antibiotique concerné, entre parenthèses est précisé le nombre d'isolats étudiés, la couleur des cases représente la variation du taux de sensibilité par rapport à l'année précédente).

À travers ces exemples, on comprend l'importance d'analyser en profondeur ces mécanismes de résistance. Il est alors nécessaire d'avoir les outils chimiques et biologiques pour permettre ces études. La détection d'activité  $\beta$ -lac s'inscrit ainsi dans ce cadre de recherche. La présence de cette activité enzymatique est, en effet, un biomarqueur de la résistance bactérienne. Des solutions technologiques variées existent d'ores et déjà pour détecter de telles activités. La plus simple est d'utiliser le principe de la découverte de la pénicilline. En plaçant un échantillon de bactéries à tester au contact d'un panel d'antibiotiques  $\beta$ -lactame, une inhibition de leur développement montre une sensibilité aux molécules testées. Dans le cas contraire, si les bactéries continuent de se multiplier, on peut conclure à une résistance à l'antibiotique. C'est le test de l'antibiogramme. Bien que facile à mettre en place, la méthode reste toutefois limitée, on identifie ni la souche bactérienne en cause, ni le type de résistance à l'œuvre. Une alternative proche est de cultiver les bactéries dans un milieu sélectif, n'autorisant le développement que d'un type bactérien. On peut ainsi connaître la bactérie en cause et adapter le traitement. Ces deux méthodes sont généralement employées en premier lieu en cas de doute, pour détecter la résistance.

D'autres méthodes prennent alors le relais pour confirmer la résistance. Elles sont de trois types principaux. Génétiques tout d'abord, en détectant la présence des gènes codant pour les  $\beta$ -lactamases avec notamment la technique de la PCR.<sup>[355]</sup> Mais la

présence du gène ne garantit pas son utilisation par la machinerie cellulaire, la présence de l'enzyme n'est donc pas assurée. Des méthodes immunologiques (voir section 2.2, p. 28) existent ainsi pour venir détecter la présence de  $\beta$ -lactamases.<sup>[356]</sup> Mais comme discuté précédemment, présence ne veut pas dire activité, les technologies de sondes moléculaires pour activités enzymatiques rentrent donc en jeu pour affiner les analyses.

Comme pour beaucoup d'autres enzymes, des sondes chromogènes et fluorogènes existent. La sonde la plus commune est sûrement la Nitrocéfine. Mise au point dans les années 70, cette sonde chromogène utilise astucieusement l'activité des  $\beta$ -lactamases pour générer un changement de couleur.<sup>[357]</sup> L'hydrolyse du  $\beta$ -lactame du noyau céphalosporine libère alors une amine secondaire, reliée au chromophore (un dérivé du di-nitrocinnamaldéhyde) grâce à la double liaison naturellement présente dans le cycle dihydrothiazine (Figure 80). La modification du caractère électrodonneur de l'azote modifie alors grandement les propriétés spectrales du chromophore, la solution passe ainsi du jaune au rouge après hydrolyse.

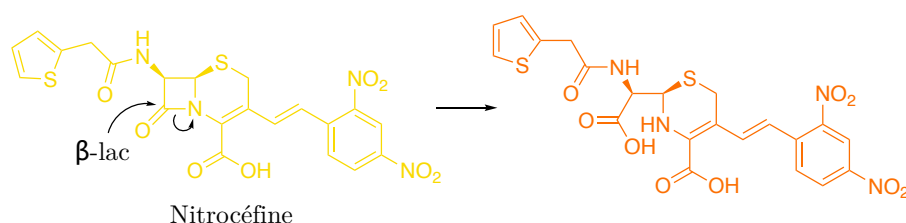


FIGURE 80 – Illustration du mécanisme de détection de l'activité  $\beta$ -lac par la Nitrocéfine.

En se basant sur un principe proche, à savoir l'élimination d'un groupe partant en position 3' après hydrolyse du  $\beta$ -lactame d'une céphalosporine<sup>[358]</sup>, des sondes fluorogène ou ratiométrique ont vu le jour. La première est la sonde CCF2-AM, développée, entre autres, par Roger Tsien.<sup>[359]</sup> Cette dernière est ratiométrique, l'hydrolyse libère un des deux fluorophores attachés à chacune des extrémités du noyau céphalosporine, interrompant alors le FRET. Le développement de sondes fluorogènes a suivi, avec le relargage de fluorophores masqués par la liaison avec la céphalosporine.<sup>[196,264,360-362]</sup> Même si certaines de ces sondes récentes ont parfois été utilisées pour la détection de pathogènes résistants<sup>[361,362]</sup>, leur principale application a tout d'abord été la détection d'expression génique appliquée à la biologie moléculaire, concept qui sera détaillé dans la prochaine section.

## II.1.2 Un outil de choix pour la biologie moléculaire

Les  $\beta$ -lactamases sont donc des enzymes bactériennes utilisées par ces dernières pour résister aux actions des antibiotiques, naturels ou de synthèse. De ce fait, cette famille d'enzymes est absente des organismes mammifères qui ne possèdent pas de peptidoglycane dans leurs parois cellulaires. Les antibiotiques n'ont donc aucun effet nocif sur la synthèse de ces membranes et les  $\beta$ -lactamases n'ont ainsi aucun intérêt.

Nous avons précédemment vu que les technologies de gènes rapporteurs peuvent souffrir de plusieurs défauts, dont le principal serait la génération de faux-signal positif par la présence naturelle d'une faible quantité d'enzyme, produit du gène rapporteur. C'est notamment le cas de la  $\beta$ -gal dont on peut retrouver une faible activité dans les cellules mammifères, notamment celles utilisées en culture cellulaire (voir section I.1.2, p. 67). Une activité  $\beta$ -gal se retrouve ainsi dans de nombreuses cellules cancéreuses (comme les HeLa) mais aussi dans les cellules sénescents (voir section I.3.1, p. 92). Une lignée de cellules un peu âgées, des cellules trop nombreuses ou le stress induit par la transfection nécessaire à l'utilisation de gènes rapporteurs pourraient être des causes d'apparition de sénescence cellulaire. Celle-ci s'accompagne alors d'une activité  $\beta$ -gal, certes lysosomale, mais qui peut tout de même générer un faux-signal positif.

Dans ce cadre-là, l'utilisation d'enzymes rapportrices totalement orthogonales au système étudié serait un vrai atout pour augmenter les chances d'observer des résultats significatifs. C'est l'idée initiale qui a poussé certaines équipes à tenter d'employer une  $\beta$ -lactamase comme outil rapporteur en biologie moléculaire.<sup>[359,363]</sup> Ces enzymes possèdent, en effet, plusieurs avantages autre que leur orthogonalité aux organismes mammifères. Tout d'abord, elles ont été, et sont toujours très étudiées dans le contexte de la résistance bactérienne : leurs structures, cinétiques d'activités enzymatiques, spécificité de substrats ou encore inhibiteurs sont ainsi bien connus. Leur relative petite taille permet une ingénierie protéique aisée, notamment sans perte d'activité après fusion avec une protéine d'intérêt. La  $\beta$ -lactamase TEM-1 (environ 29 kDa) est couramment utilisée dans ce but, elle est présente dans de nombreuses espèces bactériennes (résistantes) et son activité est bien connue.<sup>[364,365]</sup> Les premières sondes fluorogènes pour la détection d'activité  $\beta$ -lactamases ont donc été créées pour compléter les technologies de gènes rapporteurs nouvellement développées avec la  $\beta$ -lactamase TEM-1.

Reporter Gene	Enzyme Amplification	Miniaturizable	Ratiometric	FACS-Compatible	Stable Cell Lines
$\beta$ -Lactamase	+++	+++	+++	+++	+++
Luciferase	+++	++	—	—	+
Secreted AP	+++	+	—	—	+
CAT	+++	—	—	—	—
$\beta$ -Galactosidase	+++	++	—	++	++
GFP	—	+	—	+++	+++

FACS, fluorescence-activated cell sorting; AP, alkaline phosphatase; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; GFP, green fluorescent protein; +++, highly appropriate; ++, appropriate; +, time-consuming or labor-intensive; —, inappropriate.

FIGURE 81 – Comparaison des atouts de différentes technologies de gènes rapporteurs.<sup>[366]</sup>

L'autre utilisation des  $\beta$ -lactamases pour la biologie moléculaire est celle de *Tag* pour l'imagerie de protéine d'intérêt (voir section 2.2, p. 28). La différence avec la technologie de gène rapporteur étant qu'ici, l'activité enzymatique classique n'est pas conservée. L'étude du mécanisme d'hydrolyse de la  $\beta$ -lactamase TEM-1 fait apparaître deux étapes : l'acylation d'une sérine du site actif par attaque sur le  $\beta$ -lactame, puis la désacylation par attaque d'un glutamate. L'inhibition de la seconde étape par modification génétique permet d'obtenir une  $\beta$ -lactamase mutante, sélectivement acylable par des molécules comprenant une unité pénicilline voire céphalosporine. En greffant une unité fluorescente sur une telle molécule, on obtient alors un couple enzyme/substrat fluorescent, hautement sélectif et dont le signal peut être généré après fusion avec une protéine d'intérêt à imager. Ce concept de  $\beta$ -lactamase-*Tag* a été développé dans l'équipe du Pr Kasuya Kikuchi de l'Université d'Osaka.<sup>[367,368]</sup> Leurs connaissances sur l'ingénierie des  $\beta$ -lactamases a amené la naissance d'un projet collaboratif avec notre équipe, toujours dans un contexte d'imagerie d'une protéine d'intérêt. Ce projet sera décrit par la suite.

### II.1.3 Application à l'étude de l'internalisation du glucose : localisation de la protéine GLUT4

Ce projet collaboratif est le fruit de l'obtention d'un financement partagé dans le cadre du programme TMOL 2016 (ANR et équivalent japonais : JST), intitulé *Intracellular tracking of protein function by design and synthesis of fluorogenic probes for MEMORY imaging* (acronyme : GLUTTRACK). Le contexte global est l'étude du suivi spatio-temporel de protéines, notamment dans le cas de déplacements fonctionnels des ces protéines d'intérêt. En tant que preuve de concept, la protéine GLUT4 a été choisie comme objet d'étude pour son implication dans l'internalisation du glucose, et ses conséquences dans le contexte du diabète. Les protéines GLUT sont en effet une

large famille constituant les transporteurs du glucose dans l'organisme. Certaines, dont GLUT4, sont insulino-dépendants, leur activité de transport est alors modifiée par la variation du taux d'insuline dans le sang. Leurs rôles dans l'**homéostasie** de la glycémie ne sont pas encore totalement compris<sup>[369]</sup>, mais la protéine GLUT4 est connue pour y jouer un rôle majeur.<sup>[370]</sup>

GLUT4 est une glycoprotéine, en temps normal stockée dans des vésicules (*GLUT4 Storage Vesicles (GSVs)*) intracellulaires. En présence d'une concentration plus élevée que d'habitude en insuline sanguine, une voie métabolique complexe est activée et entraîne une translocation rapide de ces vésicules jusqu'à la membrane. Une internalisation du glucose est alors déclenchée pour diminuer son taux sanguin.<sup>[371]</sup> Un dysfonctionnement de cette translocation a notamment été associée au diabète de type II.<sup>[372,373]</sup> Les recherches actuelles tentent de comprendre les mécanismes précis de cette translocation et du maintien de GLUT4 pendant le temps nécessaire au niveau de la membrane (externe/interne).<sup>[374,375]</sup>

La glycosylation des protéines est une modification post-traductionnelle importante dans les organismes vivants.<sup>[376]</sup> Elle régule plusieurs processus cruciaux parmi le repliement et la dégradation des protéines, ou le trafic intracellulaire et intercellulaire.<sup>[377,378]</sup> GLUT4 possède un site unique de glycosylation sur un résidu asparagine (Asn57), dont le rôle hypothétique serait de contrôler la rétention de GLUT4 au niveau de la membrane cellulaire. Peu après le début du projet commun, l'équipe du Pr Kikuchi a prouvé ce rôle par l'utilisation de deux sondes basées sur la technologie de PYP-*Tag*.<sup>[379]</sup> L'une était perméable aux membranes, et marquait la GLUT4 intracellulaire ; l'autre, imperméable et émettant à une autre longueur d'onde, marquant la GLUT4 extracellulaire. En supprimant artificiellement la glycosylation, l'étude a montré une disparition de la rétention, soulignant la nécessité du fragment glycane pour cette dernière.

Toutefois, une méthode d'imagerie de GLUT4 avec une plus grande résolution spatio-temporelle est toujours nécessaire pour confirmer ce résultat et comprendre plus en profondeur son fonctionnement : la glycosylation est, par exemple, supposée jouer un rôle dans l'organisation spatiale de GLUT4 au niveau de la membrane.<sup>[379]</sup> En effet, avec l'utilisation de *Tags*, l'internalisation de GLUT4 après diminution de l'insuline sanguine, entraîne l'internalisation du signal : on perd alors l'information spatiale. Un autre problème peut être l'impossibilité de marquer la protéine transloquée sur la membrane extérieure, après un premier marquage intracellulaire : si tous les *Tags* ont réagi,

il n'y a plus la possibilité de réagir avec la sonde imperméable externe. En utilisant une technologie d'enzyme rapportrice avec une méthode à rétention efficace du signal, il serait possible de marquer efficacement GLUT4, et de conserver le signal à l'extérieur même après internalisation de la protéine. C'est ce concept qui se cache derrière le terme de *memory imaging*. Un autre avantage est de profiter de l'amplification enzymatique pour la détection, tandis que l'utilisation de *Tags* peut souffrir d'un manque de sensibilité (une protéine GLUT4 entraîne une seule molécule fluorescente).

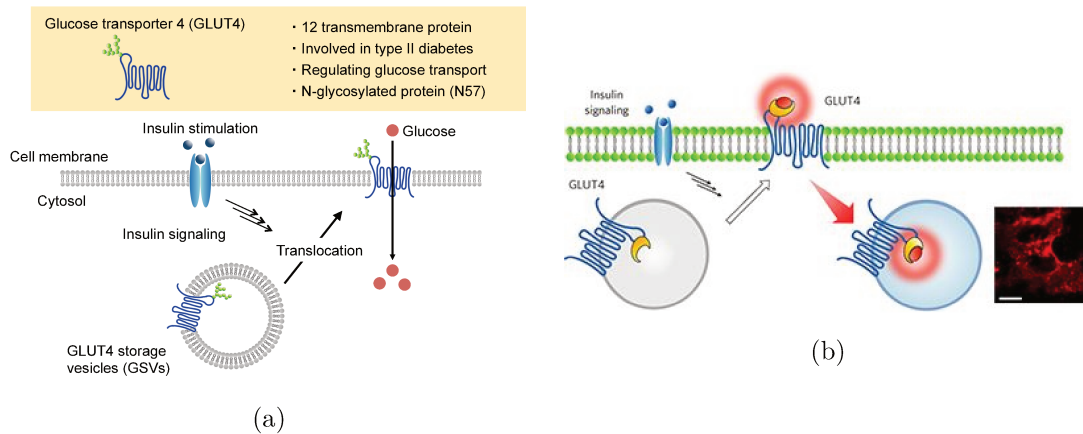


FIGURE 82 – Illustration (a) : du rôle de GLUT4 dans le transport du glucose (crédit : projet commun ANR-JST GLUTTRACK 2016) et (b) : du principe des sondes fluorogènes développées dans l'équipe du Pr Kikuchi pour étudier l'impact de la glycosylation dans la translocation et le maintien à la surface de GLUT4.<sup>[379]</sup>

L'idée est alors d'utiliser les performances permises par les sondes ELF-97 pour l'étude du trafic de protéines, avec GLUT4 en preuve de concept. Une réflexion préalable pour choisir l'enzyme rapportrice a rapidement convergé vers la  $\beta$ -lactamase, pour son orthogonalité et sa facilité dans la création des outils génétiques nécessaires à l'étude (disponibilité du gène, petite taille, etc.). Il faudra néanmoins développer plusieurs sondes, avec des perméabilités opposées, afin de pouvoir détecter GLUT4 de manière intra- et extracellulaire, et ainsi permettre l'étude de la translocation. La perméabilité membranaire est un paramètre difficile à prévoir *a posteriori*, notre stratégie a donc constitué en la réalisation d'une première sonde modèle, à l'évaluation de ses performances et paramètres physico-chimiques telle la perméabilité et enfin à la réalisation de variants pour obtenir les deux sondes désirées.



## II.2 Synthèse d'une sonde modèle pour la $\beta$ -lactamase

La sonde modèle est basée sur le même mécanisme que les sondes déjà développées pour la détection d'activité  $\beta$ -lactamase, c'est-à-dire l'élimination d'un groupement en position 3' par hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame. La double liaison du noyau céphalosporine est indispensable pour permettre la conjugaison électronique, et donc l'élimination. On pourrait imaginer placer l'ELF-97 directement après cette double liaison, cela simplifierait la structure globale mais le lien avec le fluorophore ne serait alors pas un carbamate, identifié par l'équipe comme seul lien permettant la stabilisation nécessaire vis-à-vis de l'hydrolyse spontanée. Une telle sonde a cependant été synthétisée et publiée en 2011 par une équipe ne s'étant jamais intéressée à l'ELF-97 précédemment.<sup>[264]</sup> Toutefois, l'étude reste primaire et aucun contrôle négatif n'est présenté, on ne dispose ainsi d'aucune information sur la stabilité de telles sondes. Le noyau  $\beta$ -lactame, avec sa forte tension de cycle et son site électrophile, est intrinsèquement susceptible à l'hydrolyse. Si on ajoute un autre lien connu pour être aussi vulnérable (lien éther avec un phénol électro-appauvri), les chances d'obtenir une sonde assez robuste pour permettre une détection efficace sont très faibles.

Nous avons donc voulu profiter des connaissances acquises grâce aux précédentes générations de sondes pour concevoir une sonde ELF-97- $\beta$ -lac la plus stable possible. Pour cela, l'espaceur cyclisant pipéridine semble être indispensable et la structure de la sonde modèle est ainsi l'enchaînement du substrat-déclencheur céphalosporine, lié à l'espaceur cyclisant par un lien carbamate, auquel est relié classiquement l'ELF-97 (Figure 83).

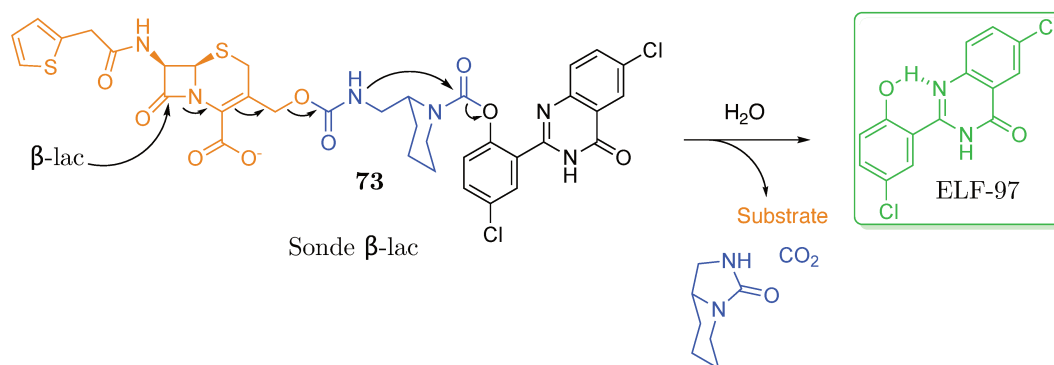


FIGURE 83 – Structure moléculaire et mécanisme de la sonde **73** pour la détection d'activité  $\beta$ -lac.



La voie de synthèse d'une telle sonde peut être divisée en deux grandes étapes. La fin de la synthèse est constituée des mêmes étapes que les sondes glycosidases (si ce n'est une différence de déprotection finale), la première étape étant l'obtention d'un intermédiaire activé du substrat en vue du couplage avec l'espaceur (Figure 84). Classiquement, la synthèse démarre de l'acide 7-aminocéphalosporanique, ou *7-Aminocephalosporanic Acid (7-ACA)*, intermédiaire commercialement disponible à un prix très raisonnable (moins d'un euro le gramme) pour la complexité d'une telle structure (masse molaire approchant les  $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  avec deux centres stéréogènes contrôlés). Une déprotection de l'acétate est nécessaire en tout premier lieu. Sans quoi, les groupements protecteurs ajoutés dans les étapes suivantes ne tiendraient pas aux conditions de retrait de l'acétate. Ces protections sont donc réalisées consécutivement (sans isoler le produit intermédiaire mono-protégé), il s'agit d'une acylation de l'amine primaire par le chlorure de 2-thiophène-acétyle suivie par l'estérification de l'acide carboxylique par le diphenylméthyldiazométhane. Ce dernier est synthétisé en une étape, par oxydation de la benzophénone hydrazone par réaction de Swern ou par réaction à l'oxyde de mercure (II) (plus simple à mettre en œuvre mais plus toxique). L'activation de l'alcool obtenu se fait classiquement par réaction avec le chloroformiate de 4-nitrophényle pour obtenir l'intermédiaire **80**.

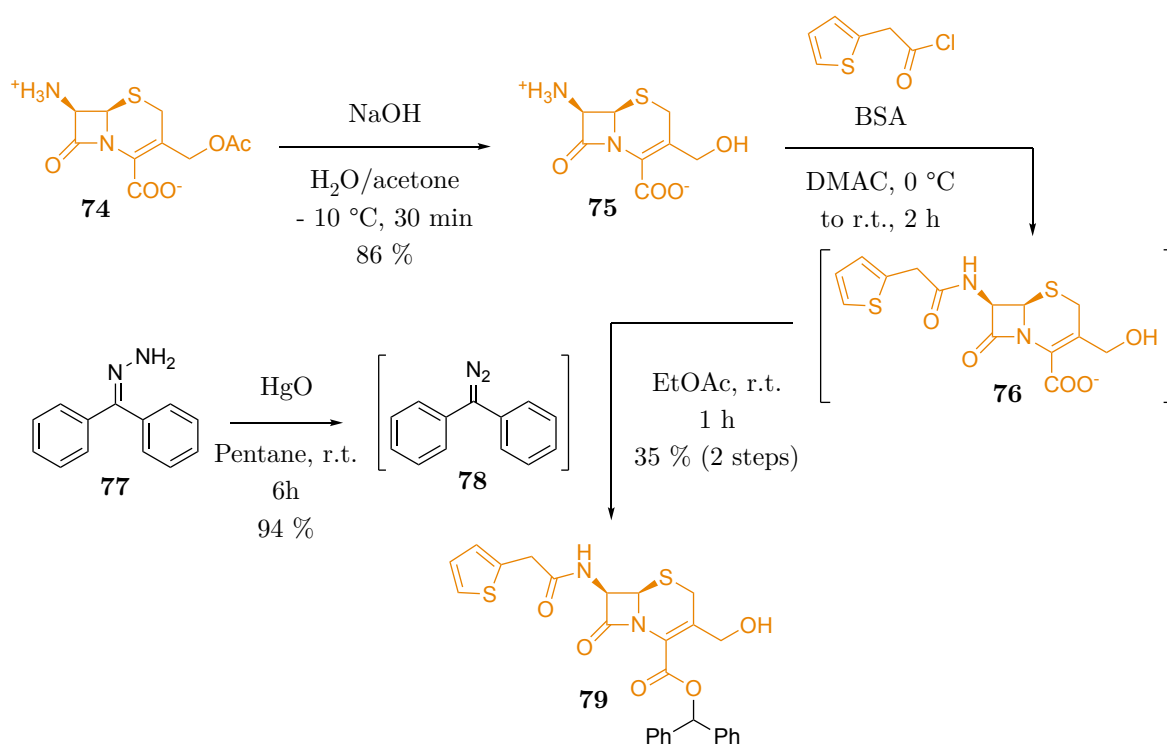


FIGURE 84 – Première partie de la voie de synthèse de la sonde modèle  $\beta$ -lac **73**.

La fin de la synthèse est alors similaire aux précédentes synthèses. Le couplage avec l'espaceur allylé permet d'obtenir le composé **81**, mais avec un rendement plutôt faible. Celui-ci peut s'expliquer par la probable attaque de l'amine primaire sur le cycle  $\beta$ -lactame assez électrophile. On pourrait pour améliorer l'efficacité du couplage imaginer une activation inverse, on active dans un premier temps l'amine primaire de l'espaceur **26** que l'on couple avec l'alcool **79**. Toutefois, une quantité suffisante de produit a pu être obtenue et l'exploration de cette alternative n'a pas (encore) été poursuivie. L'étape suivante est la déprotection du groupement allyl de l'espaceur, toujours pallado-catalysée pour obtenir l'amine **82**. Le greffage de l'ELF-97 s'effectue ensuite selon la procédure habituelle : chloroformylation du phénol puis ajout de l'amine. La déprotection finale concerne uniquement le groupement diphénylméthyle, par réaction avec de l'acide trifluoroacétique, ou *Trifluoroacetic Acid* (TFA). En effet, la présence de l'acide carboxylique libre est absolument nécessaire à la reconnaissance par l'enzyme, tandis que la présence du groupement thiophène n'est pas gênante (on le retrouve d'ailleurs sur certaines sondes commerciales telle la célèbre Nitrocéfine). Une HPLC est finalement effectuée pour obtenir le produit final pur.

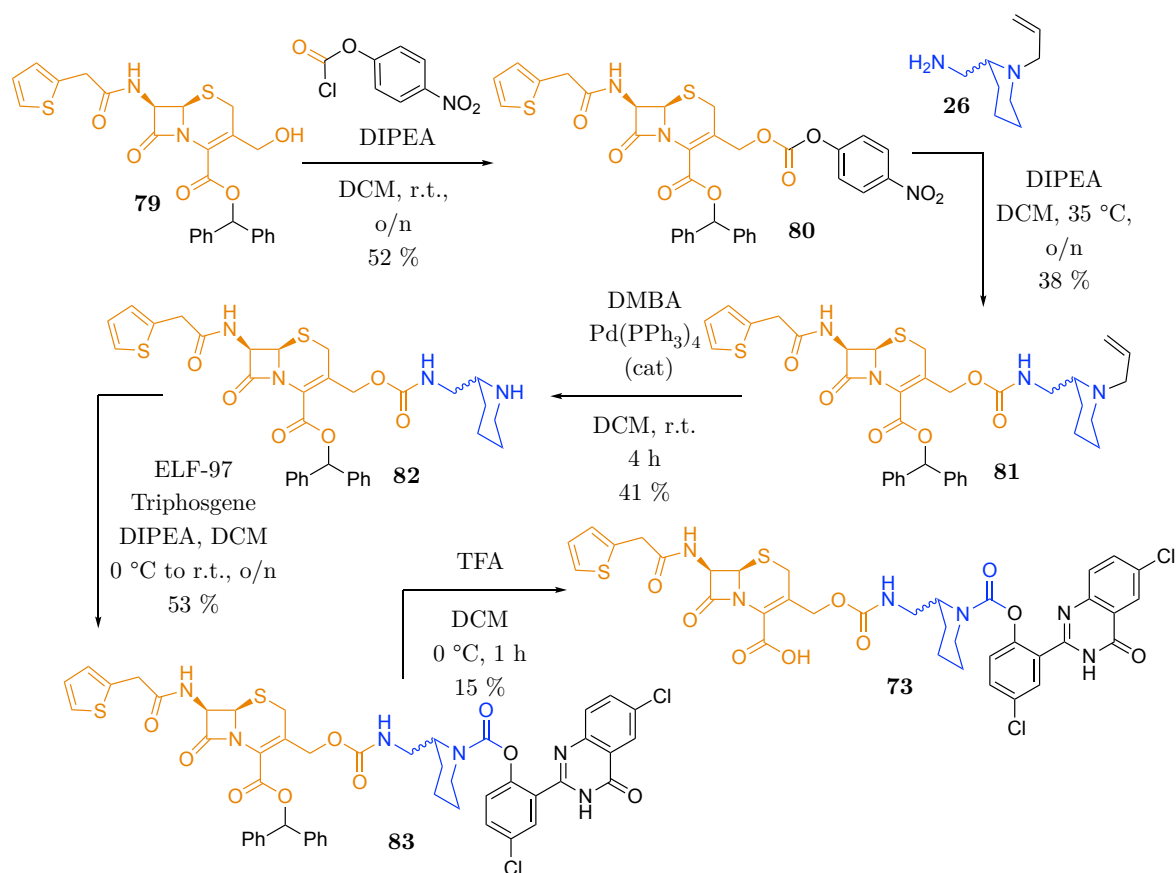


FIGURE 85 – Deuxième partie de la voie de synthèse de la sonde modèle  $\beta$ -lac **73**.

Un premier lot de la sonde **73** a ainsi pu être obtenu, dans des quantités relativement faibles (moins de 5 mg). Une large partie a alors été mise de côté au vu du futur déplacement dans l'équipe de recherche japonaise. Le restant a servi aux caractérisations et aux premières évaluations biologiques.

## II.3 Évaluation biologique et séjour d'étude

Le schéma classique de caractérisation des sondes de l'équipe a été suivi ici également. À savoir, une évaluation tout d'abord *in vitro* puis *in cellulo*. La suite de l'étude s'est déroulée au Japon, dans l'équipe du Pr Kikuchi.

### II.3.1 Première évaluation biologique de la sonde $\beta$ -lactamase

Un premier test *in vitro* a donc été envisagé pour évaluer, d'une part, la réactivité de la sonde à une activité  $\beta$ -lac, mais également pour avoir une première idée de la stabilité d'un tel objet moléculaire. Au vu des quantités disponibles, les conditions testées n'ont pas été nombreuses par soucis d'économie de produit. Deux concentrations de sonde **73** ont ainsi été incubées à 37 °C en présence d'une enzyme commerciale purifiée : une pénicillinase. Celle-ci a un spectre d'action assez large pour couper ce noyau céphalosporine basique (les sites de fournisseurs précisent également céphalosporinase en synonyme pour cette enzyme). Les mesures de fluorescence obtenues sont présentées dans la Figure 86 ci-dessous. À notre grande satisfaction, un profil d'apparition de signal classiquement obtenu pour d'autres sondes (glycosidases par exemple) est également observable ici. On peut toujours remarquer le délai pour le début de son apparition, le temps pour la concentration en **ELF-97** d'atteindre son point de précipitation. Autre point positif, l'absence de signal lorsqu'aucune enzyme n'est rajoutée permet d'espérer un certaine stabilité de cette sonde, au moins pour le temps nécessaire à une expérience. Sur des temps plus longs, une faible fluorescence pourrait apparaître à cause d'une hydrolyse non-spécifique du noyau  $\beta$ -lactame, connu pour ne pas être stable en milieu aqueux.<sup>[380]</sup>

La présence de fluorescence initiale est probablement à attribuer à un manque de purification dû aux faibles quantités obtenues. Le fait que ce signal diminue au cours du temps est plus étrange, mais pourrait s'expliquer par une agrégation particulière du fluorophore dans ces conditions, gênant la mesure de la fluorescence dans les puits. La différence avec le signal habituellement observé est que, ici, tout le fluorophore est présent initialement, tandis qu'il est relâché progressivement dans le cas d'une détection enzymatique. La répartition spatiale doit ainsi être bien différente et pourrait favoriser des phénomènes d'agrégation.

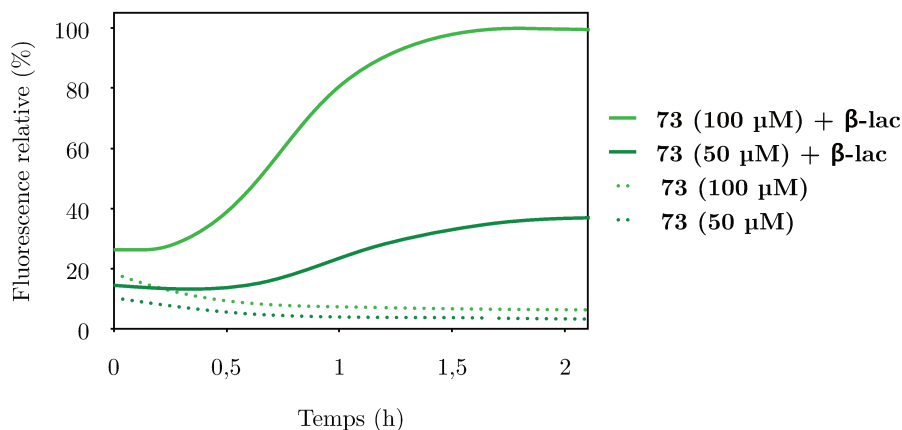


FIGURE 86 – Fluorescence de la sonde **73** à différentes concentrations en fonction du temps ; solvant : PBS, température : 37 °C, enzyme ajoutée : 10 U.mL<sup>-1</sup>.

Grâce à cette première expérience, il semble possible d'appliquer la sonde à un contexte plus proche de son application envisagée. Une évaluation *in cellulo* est, de plus, indispensable pour obtenir les informations sur la perméabilité membranaire de la sonde, paramètre important dans le contexte du projet GLUT4.

Différentes conditions ont été employées afin d'obtenir un contrôle positif et négatif. Les vecteurs contenant le gène codant pour la  $\beta$ -lac TEM-1 nous ont été fournis par l'équipe japonaise. La condition positive est apportée par des cellules HEK 293T (une lignée cellulaire particulièrement adaptée aux transfections), transfectées avec un plasmide pcDNA3.1- $\beta$ -lac, qui permet une expression d'activité  $\beta$ -lac intracellulaire. Le contrôle négatif est quant à lui constitué des mêmes cellules HEK 293T, cette fois-ci transfectées par le vecteur pcDNA3.1 "vide", ne contenant ainsi pas le gène codant pour la  $\beta$ -lac. Classiquement, de telles inoculations de matériel génétique dans des cellules est rendu possible par l'action d'agents lipidiques encapsulant les plasmides pour permettre de traverser les membranes, l'exemple le plus utilisé dans ce but est sûrement la lipofectamine.<sup>[381]</sup> Cependant, ce genre de réactifs est plutôt onéreux et une autre méthode a été choisie : la transfection au phosphate de calcium. Dans ce cas, un précipité de phosphate de calcium est formé dans la solution d'ADN à incorporer, celui-ci portera alors à sa surface le plasmide. Le masquage des charges négatives de l'ADN par les ions phosphates permet l'incorporation dans les cellules par un mécanisme qui n'est pas totalement élucidé.<sup>[382]</sup> Pour contrôler l'efficacité de la méthode, une troisième transfection de cellules HEK 293T avec un plasmide pcDNA3.1-GFP permet d'évaluer, par une observation de la fluorescence intracellulaire, la bonne incorporation du plasmide, qui est supposée être similaire pour les deux autres conditions.

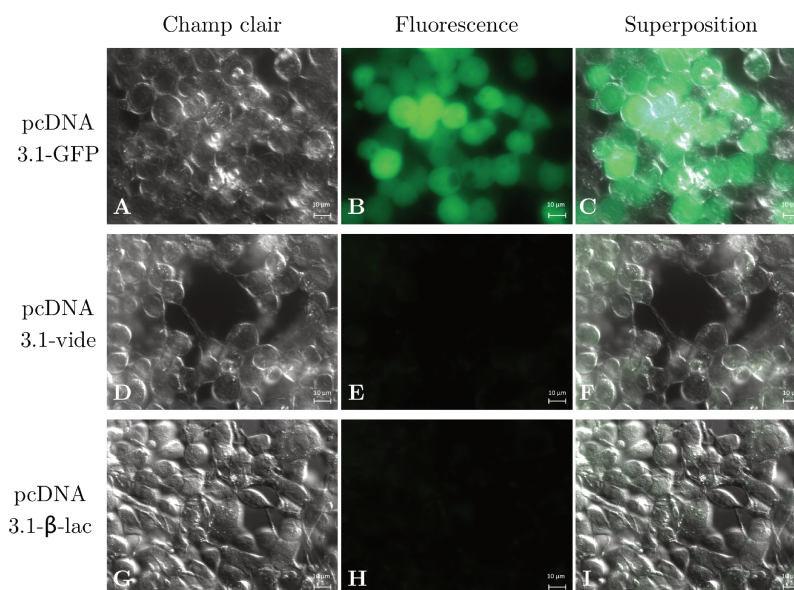


FIGURE 87 – Images par microscopie de fluorescence (de gauche à droite : champ clair, canal fluorescent puis superposition des deux premières images) de cellules HEK 293T transfecées par (A,B,C) : un plasmide pcDNA3.1-GFP, (D,E,F) : un plasmide pcDNA3.1- $\beta$ -lac et (G,H,I) : un plasmide pcDNA3.1-*vide*. Pour ces deux conditions, les cellules ont été incubées avec 25  $\mu$ M de sonde **73** pendant 2h30 à 37 °C (milieu : DMEM-Fluorobright, laser : 50 %, exposition : 500 ms).

Pour le contrôle de transfection, une intense fluorescence verte peut être observée dans la majorité des cellules, confirmant ainsi la présence de GFP intracellulaire et donc l'efficacité de la méthode. En revanche, pour les deux autres conditions, aucune fluorescence significative n'a pu être obtenue. Dans les images, l'intensité du laser a été fortement augmentée, comme les temps d'exposition afin d'être sûr de ne pas rater un signal, même faible. Dans ces conditions, les deux transfections donnent le même résultat : une absence de signal fluorescent, intracellulaire comme extracellulaire. Cela nous indique plusieurs choses. Tout d'abord, la sonde semble de nouveau être stable dans ces conditions opératoires. Dans le cas contraire, un signal, même extracellulaire, aurait dû être observable.

Toutefois, l'absence de signal intracellulaire nous pousse à penser que la sonde **73** n'est pas perméable aux membranes cellulaires. Ce qui ne serait pas surprenant si on la compare par exemple au substrat commercial Nitrocéfine : celui-ci est connu pour être également imperméable. Cela s'explique par la présence de l'acide carboxylique libre, donc un carboxylate à pH physiologique. La charge négative ainsi présente sur la sonde entraîne une répulsion par les membranes cellulaires, pareillement chargées né-

gativement. Pour confirmer cette hypothèse, l'expérience pourrait être reproduite avec une condition supplémentaire impliquant une lyse cellulaire pour libérer le contenu intracellulaire, permettant alors le contact entre la sonde et l'enzyme active et la génération d'un signal. Cela viendrait confirmer la possibilité de détecter une enzyme produite par la machinerie cellulaire, dans un contexte plus complexe avec la présence de nombreuses autres biomolécules.

La sonde **73** est donc un premier candidat intéressant pour une application à l'imagerie de GLUT4. Imperméable aux membranes, elle permet techniquement la détection d'une activité  $\beta$ -lac extracellulaire, constituant ainsi la première des deux sondes nécessaires au projet (perméable ou non). Contrairement aux sondes basées sur la technologie de PYP-Tag, après internalisation de GLUT4, le signal se maintient au niveau des membranes externes. Une translocation, même transitoire, entraîne ainsi un marquage fluorescent qui reste externe. Il reste à développer une, ou des, alternative(s) avec une perméabilité membranaire permettant la détection intracellulaire, mais ce premier candidat permet une première étude d'imagerie de GLUT4. Celle-ci s'est déroulée dans le laboratoire japonais, dans le cadre d'un séjour de recherche effectué au cours de la deuxième année de cette thèse.

### II.3.2 Séjour de recherche dans l'équipe japonaise

Avant mon arrivée dans l'équipe d'Osaka, plusieurs travaux avait déjà été effectués par un étudiant de M2 (Kazuma Mori). Les vecteurs ADN nécessaires ont été créés par ingénierie génétique : on peut notamment citer les plasmides pcDNA3.1  $\beta$ -lac-GLUT4-mCherry et GLUT4-mCherry- $\beta$ -lac (Figure 88). Le premier permet une expression de  $\beta$ -lac au niveau de la membrane externe, tandis que pour le deuxième l'activité sera au niveau de la membrane interne, après translocation dans les deux cas.

L'ajout d'un gène codant pour la protéine fluorescente mCherry permet un rapide et facile contrôle de la localisation de l'expression du vecteur. Ces vérifications ont été effectuées et le comportement attendu a pu être observé (Figure 89).

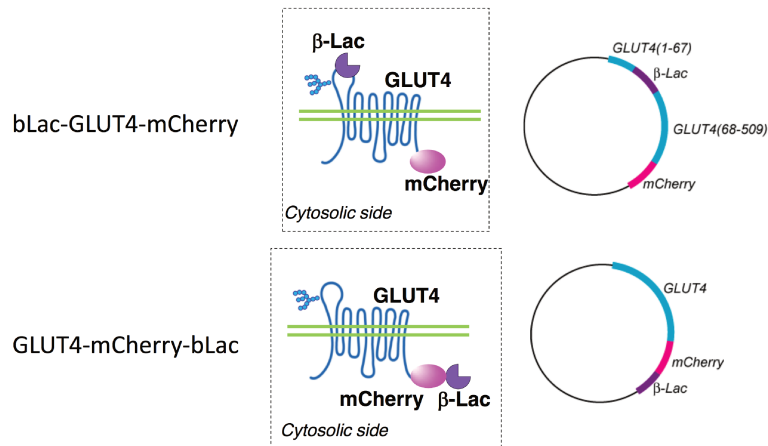


FIGURE 88 – Illustrations des deux principaux plasmides créés par l'équipe Japonaise pour l'étude de la translocation de la protéine GLUT4 sous l'action d'insuline.

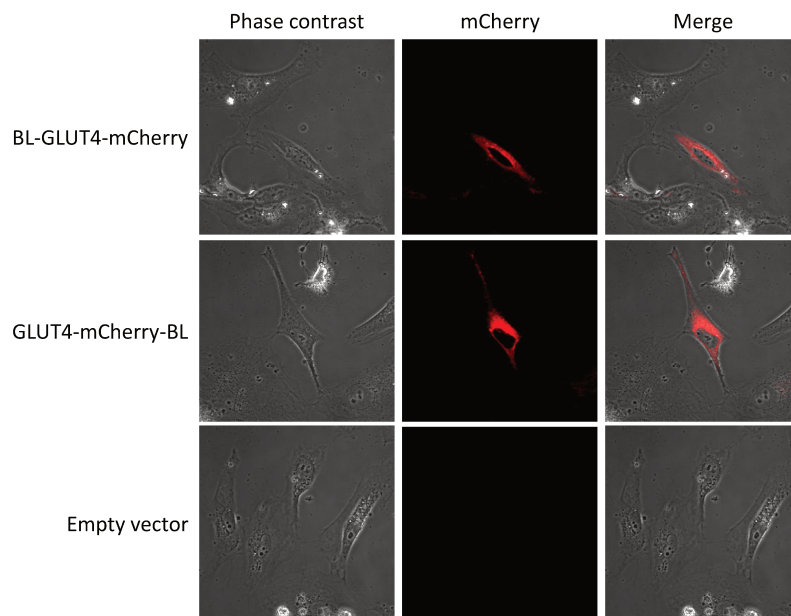


FIGURE 89 – Image par microscopie de fluorescence de cellules HeLa transfectées avec les deux plasmides créés par l'équipe japonaise et par un vecteur vide comme contrôle négatif.



Nous étions alors en possession des outils nécessaires pour faire exprimer une protéine de fusion GLUT4- $\beta$ -lac, de manière intra-et extracellulaire. La dernière étape préliminaire consiste alors à vérifier et optimiser le phénomène de translocation induite par l'insuline. En effet, il faut être sûr qu'une fois l'insuline ajoutée, on obtient effectivement une activité  $\beta$ -lac extracellulaire, sans quoi, une absence de signal ne pourra pas être clairement expliquée. La présence de la protéine de fusion  $\beta$ -lac peut, par exemple, venir perturber la reconnaissance moléculaire et donc la translocation. J'ai donc été en charge d'effectuer cette vérification, en utilisant un rapporteur classique d'activité  $\beta$ -lac déjà évoqué : la Nitrocéfine. Celle-ci est imperméable aux membranes, on ne peut donc détecter que l'activité extracellulaire. En présence d'une activité  $\beta$ -lac, l'hydrolyse du  $\beta$ -lactame de la Nitrocéfine entraîne un décalage de sa longueur d'onde d'absorption, passant d'une couleur jaune à rouge (un pic à  $\lambda_{abs} = 490$  nm, caractéristique, apparaît). Plusieurs conditions ont donc été prévues : des cellules HeLa transfectées soit avec un vecteur pcDNA3.1 "vide" ou  $\beta$ -lac-GLUT4-mCherry. Avec le deuxième, un ajout d'insuline, ou non, est effectué avant incubation avec la sonde chromogène.

Plusieurs tentatives ont été effectuées dans ces conditions. Le meilleur résultat est présenté dans la Figure 90. Dans le contrôle négatif (vecteur vide), aucune augmentation significative de l'absorbance à 490 nm n'est observable, signe que le noyau céphalosporine de la Nitrocéfine est laissé intact. En revanche, dans la majorité des expériences, les deux conditions avec le vecteur GLUT4- $\beta$ -lac génère l'apparition d'une couleur rouge, avec ou sans insuline. Dans le meilleur cas, on peut tout de même noter une différence d'intensité d'absorption à 490 nm, néanmoins une augmentation est toujours observable sans ajout d'insuline. Le protocole de génération n'est donc pas optimisé.

Le point positif est que l'on sait, grâce au contrôle négatif, que l'apparition de signal est due à une activité  $\beta$ -lac et non une hydrolyse non spécifique. Toutefois il reste à comprendre la raison de l'apparition de signal sans insuline. Il y a probablement deux raisons envisageables : une translocation même en absence d'insuline ou une faible perméabilité de la Nitrocéfine qui peut alors être convertie de manière intracellulaire. Sans avoir de véritables preuves, la première explication semble plus probable car même une très faible translocation entraîne la présence d'une activité  $\beta$ -lac extracellulaire, la Nitrocéfine peut alors être convertie de manière catalytique. Dans le deuxième cas, l'amplification enzymatique n'a plus d'importance, seule une très faible quantité de Nitrocéfine serait convertie à l'intérieur des cellules.

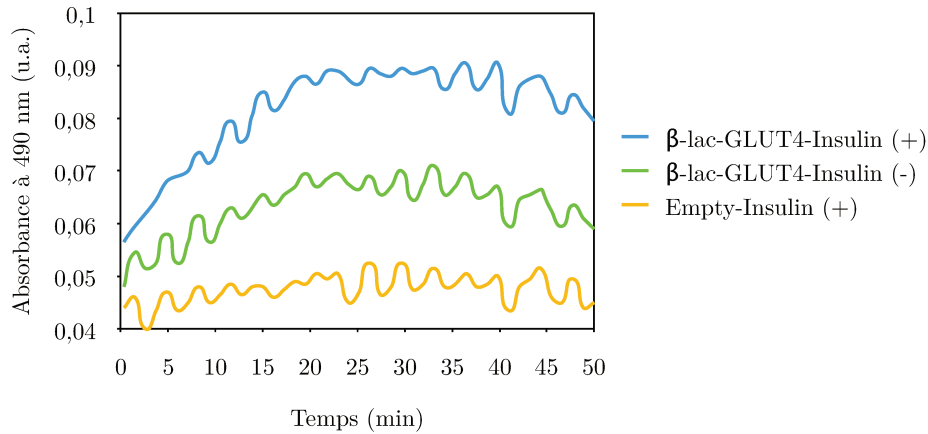


FIGURE 90 – Variation de l'absorbance à 490 nm du surnageants de cellules HeLa transfectées par un vecteur  $\beta$ -lac-GLUT4 avec insuline (en bleu), sans insuline (en vert) et de cellules HeLa transfectées par un vecteur vide sans insuline (en jaune). Les valeurs sont le résultat de la moyenne de deux puits aux conditions identiques.

Une répétition très récente par l'équipe japonaise a donné de nouveau le même résultat, avec la même différence entre présence et absence d'insuline. Une expérience d'immunomarquage (voir section 2.2, p. 28) a, par ailleurs, confirmé la présence de la protéine de fusion au niveau des membranes (Figure 91).

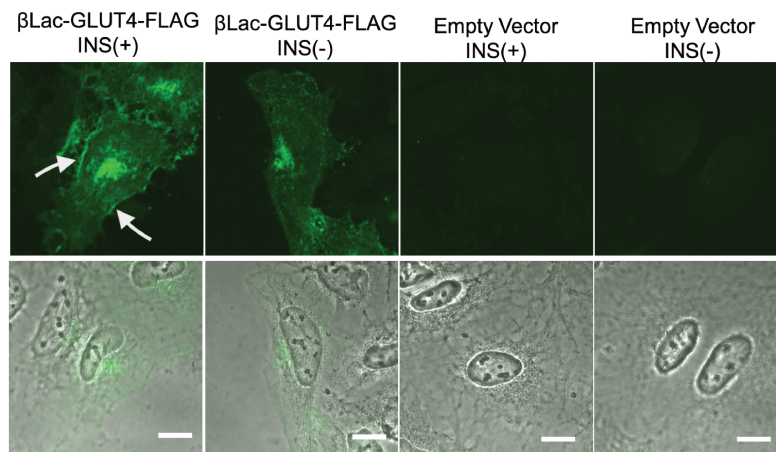


FIGURE 91 – Images en microscopie par fluorescence de cellules HeLa, transfectées par un vecteur contenant  $\beta$ -lac-GLUT4-FLAG, ou un vecteur vide, et détection de l'unité FLAG par immunomarquage : 1<sup>er</sup> anticorps anti-FLAG, 2<sup>e</sup> anticorps marqué par la fluorescéine. En présence d'insuline (INS+), une fluorescence membranaire peut être observée (flèches) attestant de la bonne translocation de la protéine de fusion.  $\lambda_{ex} = 473 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} \in 490\text{--}590 \text{ nm}$ , barre d'échelle : 25  $\mu\text{M}$ .

Ayant passé la majeure partie du séjour à tenter d'optimiser ce protocole, sans vraie réussite jusqu'à l'approche de mon retour en France, une autre stratégie a été choisie. Au lieu d'utiliser cette protéine de fusion GLUT4- $\beta$ -lac, un autre plasmide a été considéré : un pcDNA3.1 récepteur à EGF, ou *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)- $\beta$ -lac. L'EGFR est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase, impliquée dans la croissance épidermique. Elle est notamment connue pour ses similitudes avec les récepteurs à insuline et des mutations sur ce récepteur sont associées à certaines formes de cancers.<sup>[383,384]</sup> La principale différence qui a poussé à son utilisation est sa présence permanente au niveau de la membrane : on s'évite ainsi le protocole d'induction de la translocation à l'insuline. Un test de la sonde **73** est alors envisageable pour tenter de détecter une activité  $\beta$ -lac extracellulaire, et d'observer la performance de la rétention du signal si celui-ci est observé.

Une seule tentative a pu être réalisée, faute de plus de temps. Il faut, en effet, plusieurs jours pour obtenir les cellules HEK 293T prête à la transfection, réaliser cette dernière, attendre deux jours supplémentaires pour permettre l'expression transitoire du matériel génétique inséré, et enfin réaliser l'imagerie à proprement parler. Les cellules HEK sont connues pour leur facilité de transfection, mais également pour ne pas rester très adhérentes si les conditions de culture varient des standards optimaux. C'est notamment le cas lors de l'incubation avec une sonde, on retire le milieu de culture (classiquement coloré au rouge de phénol) et souvent autofluorescent pour optimiser la lecture de fluorescence. S'agissant d'un test unique, une courte durée d'incubation a donc été préférée (une heure), pour minimiser ce genre de problème. L'obtention des images a été effectuée par observation avec un microscope confocal à fluorescence.

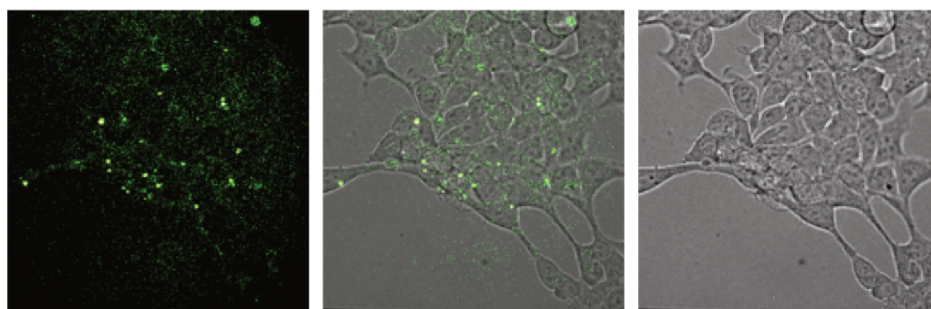


FIGURE 92 – Image par microscopie de fluorescence (de gauche : canal fluorescent, à droite : champ clair et au milieu : superposition des deux images) de cellules HEK transfectées avec le plasmide EGFR- $\beta$ -lac puis incubées une heure avec 50  $\mu$ M de la sonde **73** à 37 °C (milieu : PBS).

De manière satisfaisante, une fluorescence verte a pu être observée au niveau des cellules comme on peut le voir dans la Figure 92. Il semble que de fins précipités d'ELF-97 restent fixés au niveau des membranes cellulaires. Il est, malheureusement, impossible de connaître la localisation exacte du signal. Il est normalement possible d'obtenir une information tridimensionnelle grâce à la microscopie confocale, toutefois, ici, le signal était un peu trop faible pour obtenir un résultat significatif. On peut, pour la même raison, observer un léger signal à l'extérieur des cellules. Celui-ci est probablement un bruit de fond dû, justement, à la faiblesse du signal (les temps d'exposition sont rallongés, les chances d'obtenir un bruitage sont donc accrues). Ce premier résultat est donc très encourageant et appelle à d'autres répétitions et optimisations que je n'ai pas pu effectuer moi-même, mon séjour étant alors terminé.

Les perspectives sur ce projet sont alors nombreuses. Le protocole de translocation de la protéine de fusion GLUT4- $\beta$ -lac est déjà fonctionnel mais un travail plus poussé pourrait être mené pour tenter d'empêcher l'apparition de signal en absence d'insuline. Ayant été effectué seulement une fois, des tests d'imagerie supplémentaires sont nécessaires pour améliorer le marquage de l'activité  $\beta$ -lac extracellulaire, grâce au vecteur EGFR- $\beta$ -lac. Ayant ramené certains vecteurs en France, ces expériences pourraient être conduites au laboratoire. Toutefois, l'équipe japonaise possède davantage d'expérience sur ces systèmes et reste donc prioritaire sur ces tests. Finalement, la réunion de ces deux optimisations conduirait à la tentative d'imager la translocation de GLUT4- $\beta$ -lac grâce à la technologie ELF-97. Tous ces tests sont également préliminaires pour l'étude du trafic de la protéine GLUT4, et de l'importance de sa glycosylation dans son maintien au niveau des membranes. Pour cela, une autre sonde, cette fois-ci perméable, sera nécessaire. Dans ce but, un séjour de recherche inverse a été possible et fait l'objet de la prochaine partie.

## II.4 Étude de variantes structurales

Plusieurs variantes de la sonde modèle **73** ont été considérées. Il faut, dans le cadre du projet collaboratif, une version perméable aux membranes cellulaires pour pouvoir imager efficacement la protéine GLUT4 intracellulaire. Mais cette variante est aussi indispensable pour d'autres applications visées par la technologie. En effet, si on considère l'utilisation d'une  $\beta$ -lac en tant que produit de gène rapporteur, l'expression à détecter sera dans la plupart des cas intracellulaire. En revanche, pour l'identification de la résistance aux antibiotiques, la sonde modèle devrait suffire du fait de la sécrétion des  $\beta$ -lactamases par les pathogènes résistants. Pour imaginer des variations structurales permettant d'obtenir cette perméabilité membranaire, on peut se baser sur l'importante bibliographie déjà effectuée sur la pharmacocinétique des antibiotiques.

En effet, les antibiotiques de type  $\beta$ -lactame possèdent un carboxylate libre nécessaire à la reconnaissance par les  $\beta$ -lactamases. Pour les mêmes raisons de répulsions électroniques avec les membranes, ils sont le plus souvent imperméables à ces dernières. Des stratégies ont donc été développées pour contrer ce problème, et pourraient être réutilisées dans notre cas pour obtenir les mêmes résultats. Deux approches semblent être généralement choisies : la technique de type pro-médicament ou l'électronneutralité.

Les techniques de pro-médicaments, qui ont inspiré l'apparition des espaceurs auto-effondrables (voir section 3.2.2, p. 50) ne sont pas récentes. L'idée est plutôt simple, on masque l'activité de la molécule par une fonctionnalisation chimique, qui peut être enlevée par une certaine réactivité lorsque le moment/lieu est adapté. Dans notre cas, l'idée est de venir masquer la charge négative du carboxyate par une fonctionnalisation chimique, notamment par réaction d'estérification. Sous cette forme estérifiée, le médicament (ou dans notre cas : la sonde) n'est plus reconnue par les  $\beta$ -lactamases, cependant elle peut pénétrer beaucoup plus aisément à l'intérieur des cellules. Une fois entrées, il faut enlever ce groupement protecteur pour récupérer l'activité. Les esters employés ont donc été sélectionnés pour pouvoir être clivés rapidement par des estérases génériques intracellulaires. La molécule ainsi déprotégée récupère alors son activité bactéricide, ou ses capacité d'imagerie. Un premier (pro)médicament utilisant ce concept était déjà référencé en 1986 : le Céfuroxime axétil, des études de pharmacocinétique montrent une meilleure absorption gastro-intestinale que son équivalent non-estérifié.<sup>[385,386]</sup> Le groupement protecteur utilisé est un ester acétoxyéthylique. D'autres esters, parfois assez complexes, ont également été employés pour les mêmes

fins, des exemples sont donnés dans la Figure 93.<sup>[387,388]</sup> Ce concept a aussi été appliqué pour la réalisation de sondes  $\beta$ -lac intracellulaires et semble donc être une méthode viable.<sup>[359,389]</sup>

Cette méthode pourrait donc être employé sur la sonde modèle **73**. Cependant, l'accès synthétique à de tels esters est souvent très complexe. Un ester plus simple, type méthylique pourrait pourtant suffire théoriquement : les cellules humaines possèdent en effet deux familles d'enzymes *carboxylesterases* (CES) : les CES1 et CES2.<sup>[390]</sup> Les CES1 sont notamment connues pour cliver une petite partie alcool et une grosse partie acyle (tel un ester méthylique d'une céphalosporine).<sup>[390]</sup> Cependant, de tels esters n'ont jamais été utilisés pour des pro-antibiotiques type céphalosporines. Pour la raison de complexité synthétique, la deuxième stratégie d'électroneutralité a donc été préférée. Dans cette dernière, l'idée est d'ajouter (au moins) une charge positive sur la molécule pour "compenser" la charge négative. Ce concept est la base des céphalosporines dites de quatrième génération.<sup>[391]</sup> La charge positive sert notamment à modifier l'orientation de la molécule (antibiotique) lors de son arrivée dans un pore membranaire.<sup>[392]</sup> Néanmoins, pour ne pas gêner la reconnaissance, la charge positive nécessite d'être éloignée du noyau  $\beta$ -lactame. Le résultat est donc des molécules assez grosses, ce qui peut, en contrepartie, affaiblir la perméabilité. Pour preuve, les céphalosporines de première génération, plus petites, présentent une meilleure perméabilité que celles de quatrième génération, malgré leur charge globale négative. Il est donc complexe de prévoir le résultat d'une modification de la sonde modèle mais l'ajout d'une charge positives sur des sondes ELF-97 est une problématique déjà étudiée dans l'équipe.

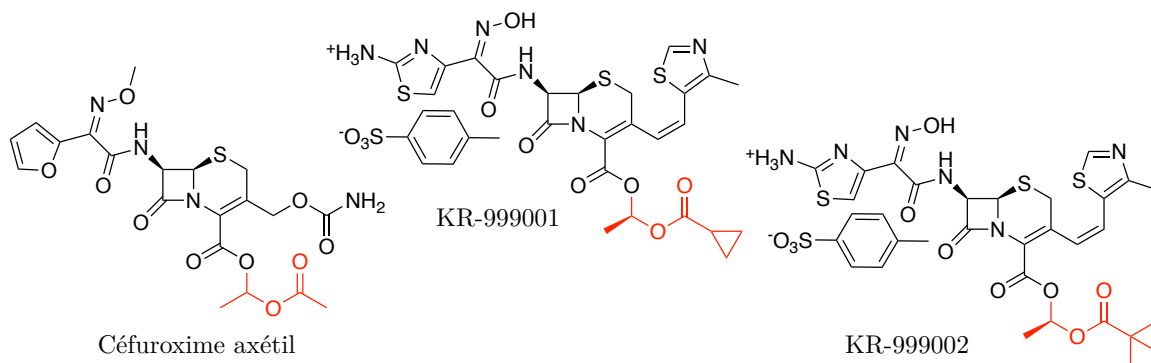


FIGURE 93 – Structures moléculaires de certains pro-médicaments de type céphalosporine.

Cette problématique est apparue pour des raisons de solubilisation de sondes apolaires. En effet, les parties espaceur cyclisant et fluorophores sont communes à toutes les sondes et globalement apolaires, voire hydrophobes pour l'ELF-97. La solubilité



(aqueuse) de la sonde doit donc être augmentée par la partie substrat. Dans les cas des peptidases (type LAP) ou glycosydases (type  $\beta$ -gal), la solubilité est amenée par la charge positive de l'ammonium de l'acide aminé ou les nombreux groupements hydroxyles du sucre. Mais si le substrat est aussi apolaire, un problème de solubilité de la sonde initiale peut apparaître. Pour contourner ce problème, Maxime Prost a développé, pendant sa thèse dans l'équipe, une variante de l'espaceur cyclisant classique. Ce nouvel espaceur, appelé tripartite, incorpore un cycle piperazine en lieu et place du cycle pipéridine (Figure 94). L'amine secondaire résultante est protonée à pH physiologique, apportant ainsi un caractère salin à la sonde et donc une hydrosolubilité accrue.<sup>[280]</sup>

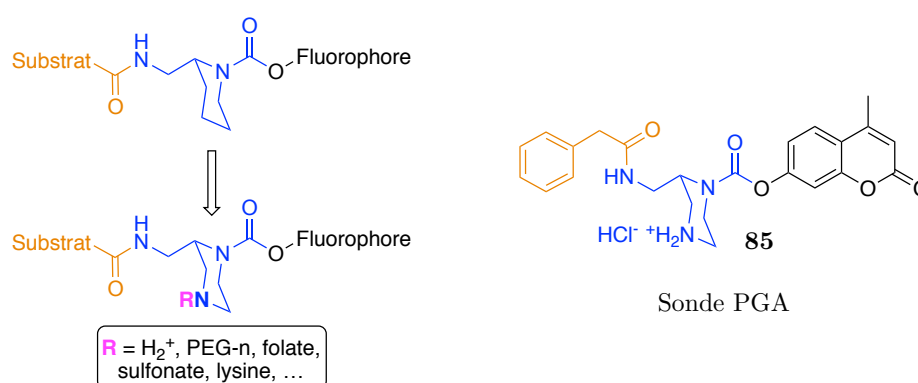


FIGURE 94 – Illustration du concept d'espaceur tripartite et exemple de la sonde **85** pour *Penicilin G Amidase* (PGA), développée par Maxime Prost durant sa thèse.<sup>[280]</sup>

La synthèse de ce nouvel espaceur a bien été développée, mais nécessite l'emploi de *sec*-BuLi, réactif relativement dangereux rendant une augmentation des quantités plutôt complexes. Maxime Prost avait, par ailleurs, déjà tenté de modifier cette synthèse et quelques essais non fructueux avaient été menés.<sup>[280,393]</sup> Une voie alternative a donc été de nouveau envisagée afin d'optimiser l'obtention de cet espaceur, et de pouvoir tenter de l'incorporer dans la technologie de sondes  $\beta$ -lac. Cette nouvelle synthèse démarre d'un composé commercial plutôt pratique : l'acide 4-Boc-pipérazine-2-carboxylique (Figure 95). Dans celui-ci le cycle piperazine est déjà formé, les deux amines sont dessymétrisées et un unique groupement fonctionnel (acide carboxylique) est présent.

La synthèse consiste en quatre étapes linéaires, la première étant la double allylation de l'amine secondaire libre et de l'acide carboxylique. Une chimiosélectivité n'était pas recherchée ici, car, au delà du défi synthétique qu'elle représente, l'estérification d'acides carboxyliques précède souvent — et facilite — la réduction en alcool. Cette réduction

au  $\text{LiAlH}_4$  permet d'obtenir l'espaceur tripartite alcool, sans observer de réduction du groupement **Boc** ( $\text{NaBH}_4$  et  $\text{LiBH}_4$  ont d'abord été testés mais ne permettaient pas une réduction efficace de l'ester). La conversion en son homologue amine se fait en deux étapes : une réaction de Mitsunobu avec le phthalimide dans un premier temps pour obtenir le groupement amine protégé. La déprotection finale s'effectue dans un deuxième temps par réaction avec la méthylamine (l'hydrazinolyse est impossible ici car la double liaison de l'allyle est dans ce cas réduite) et permet l'obtention de l'intermédiaire **90** désiré.

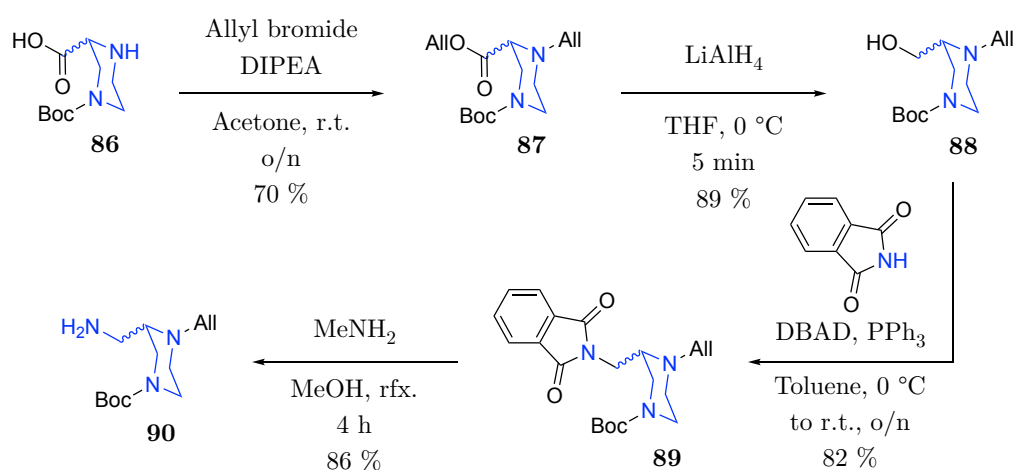


FIGURE 95 – Nouvelle voie de synthèse de l'espaceur tripartite **90**.

Une fois obtenu, l'intégration de cet espaceur dans la sonde **ELF-97** pour  $\beta$ -lactamases a pu être tentée. Ce projet a fait l'objet d'un stage de recherche en France d'une étudiante de l'équipe du Pr Kikuchi : Maho Umeno, stage qu'elle a effectué sous ma responsabilité. La voie de synthèse envisagée et suivie est semblable à celle utilisée pour la synthèse de la sonde modèle **73**. Les premières étapes de préparation du substrat (déprotection de l'acétate, double protection et activation de l'alcool) sont d'ailleurs communes et ont été répétées avec succès dans le cadre de ce stage. Le couplage avec l'espaceur est alors réalisé avec le nouvel intermédiaire **90**. Les dernières étapes sont de nouveau similaires à la première synthèse : déprotection pallado-catalysée de l'allyle puis couplage avec le chloroformiate de l'**ELF-97** et n'ont pas posé de problèmes particuliers. La dernière étape de déprotection est grandement facilitée par les conditions identiques de retrait des groupements diphénylméthyle et **Boc** : par réaction au **TFA**. Cependant, le produit final n'était, contrairement à l'habitude, pas visible par **MS**. Cela complique fortement le suivi réactionnel et d'autant plus l'étape de purification finale par **HPLC**. D'ordinaire, une évaluation des temps de rétention est effectuée sur une colonne similaire mais montée sur une **LC-MS**. Mais ici, le produit n'étant pas visible,



il est compliqué de prévoir son temps de rétention et la purification a été réalisée "à l'aveugle". Néanmoins, un produit a pu être isolé, et est désormais visible par MS avec un pic moléculaire correspondant à la sonde désirée. En revanche, la quantité isolée est à nouveau très faible : moins d'un milligramme. La synthèse sera donc à refaire afin d'obtenir des quantités suffisantes pour une caractérisation physico-chimique classique.

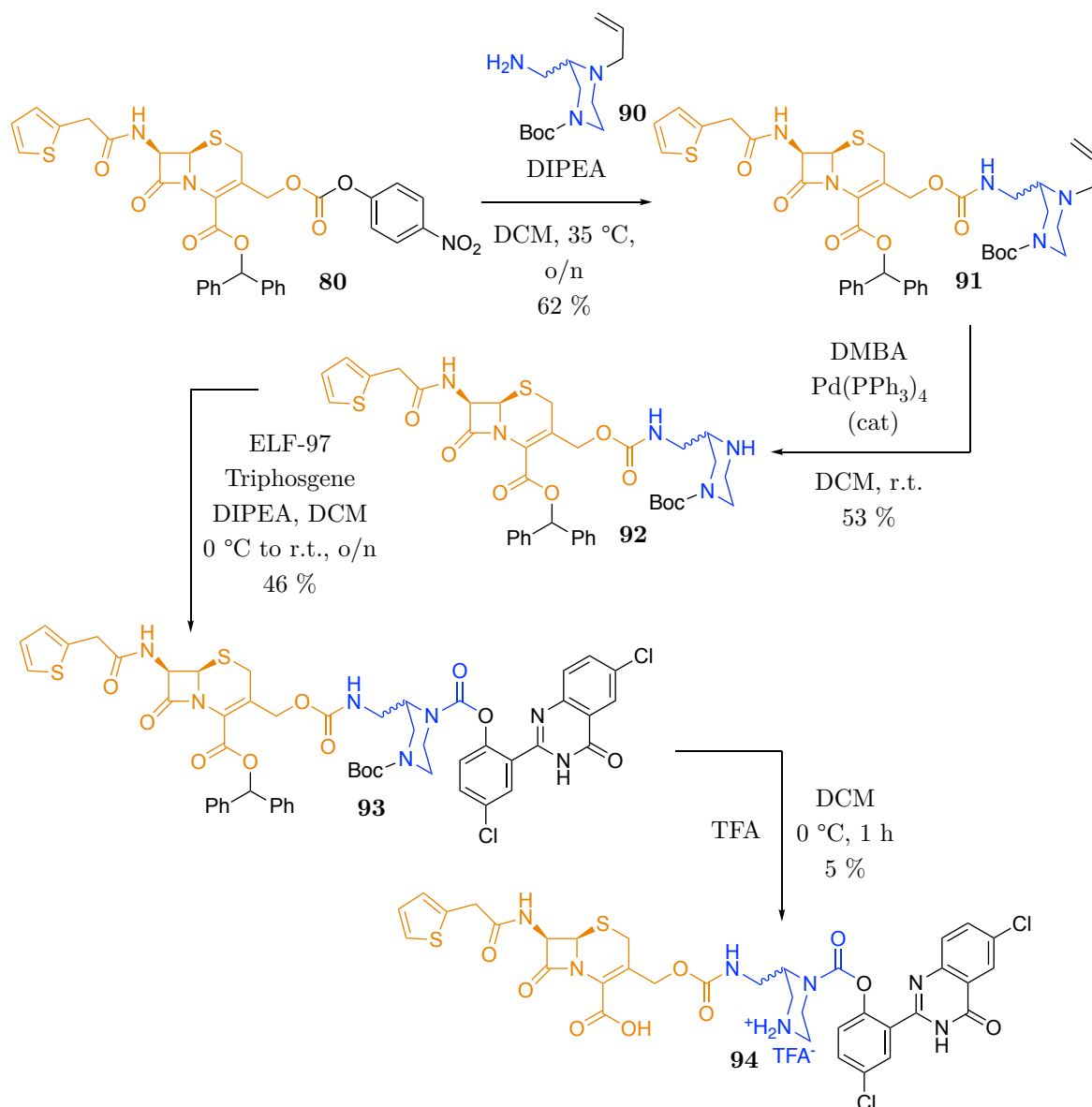


FIGURE 96 – Voie de synthèse pour l'obtention de la sonde **94**.

Une première évaluation biologique a tout de même pu être menée. Une cinétique d'apparition de fluorescence *in vitro* a été effectuée, dans les mêmes conditions que la sonde modèle **73**. Mais dans ce cas le résultat est bien différent : aucun signal n'a pu être obtenu, autant en présence qu'en l'absence de l'enzyme cible (pénicilline). Cela est surprenant car la charge positive supplémentaire est relativement éloignée du cycle  $\beta$ -lactame, du moins autant que pour les céphalosporines de quatrième génération.

L'absence de signal sans enzyme pourrait refléter une absence de réactivité de la sonde, ou bien l'absence totale de la sonde. Ce résultat, présenté dans la Figure 97, ne permet donc pas de conclure sur les performances de la sonde.

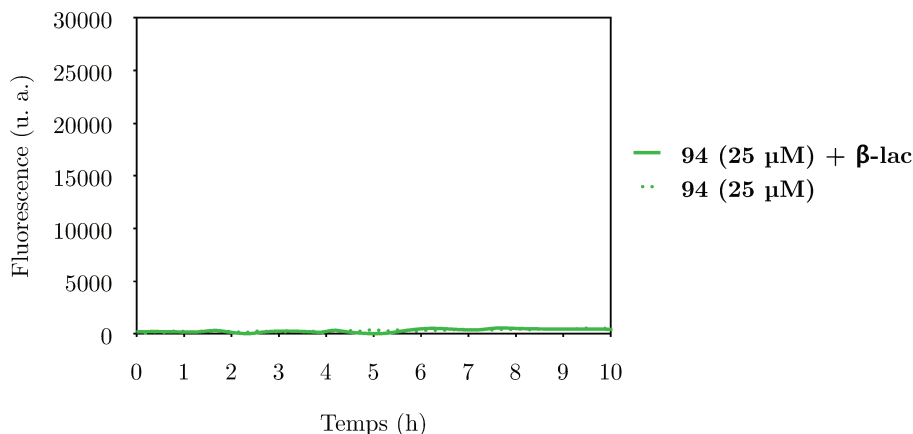


FIGURE 97 – Fluorescence de la sonde **94** en fonction du temps; concentration : 25  $\mu\text{M}$ , solvant : PBS, température : 37  $^{\circ}\text{C}$ , enzyme ajoutée : 2.5  $\text{U.mL}^{-1}$ .

Pour essayer d'obtenir plus d'information, une tentative de détection *in cellulo* de la  $\beta$ -lac a été effectuée. L'activité  $\beta$ -lac est alors intracellulaire (transfection de cellules HeLa par un plasmide pcDNA3.1  $\beta$ -lac). Pour obtenir un marquage, la nouvelle sonde **94** doit donc pouvoir traverser les membranes. Malheureusement, dans des conditions proches de celles utilisées pour la première sonde **73**, aucun signal fluorescent n'a également pu être observé, confirmant le résultat *in vitro*. L'absence de perméabilité n'est pas à écarter mais contrairement à la première sonde, une lyse des cellules pourrait potentiellement ne pas être utile. En effet, si le problème n'est pas la perméabilité mais une absence de conversion par l'enzyme (comme il semblerait au vue des résultats *in vitro*), aucun signal ne serait à attendre après la lyse des parois cellulaires.

Plusieurs options s'offrent alors. Une nouvelle synthèse sur plus grande échelle est possible, mais ne garantit pas l'obtention de meilleurs résultats *in vitro* et *in cellulo*. Elle serait quand même nécessaire pour confirmer les structures chimiques des molécules obtenues afin d'écarter toute confusion éventuelle. Comme détaillé précédemment, d'autres possibilités sont envisageables pour obtenir une sonde ELF-97- $\beta$ -lac perméable. On peut imaginer éloigner encore plus la charge positive du site réactionnel par fonctionnalisation de l'azote avec un groupement adapté (proline par exemple, voire lysine pour ajouter une deuxième charge positive), ou bien considérer l'autre alternative en tentant une estérification de la sonde modèle **73** (voir Figure 99). Le groupement protecteur thiophène n'ayant pas besoin d'être enlevé en fin de synthèse,

on pourrait également tenter de fonctionnaliser ce dernier pour ajouter une charge positive sur une autre partie de la molécule. L'oxydation du soufre du noyau céphalosporine en sulfoxyde est bien connue et pourrait constituer une alternative pour modifier les propriétés électrostatiques des sondes, potentiellement suffisante pour apporter une perméabilité.

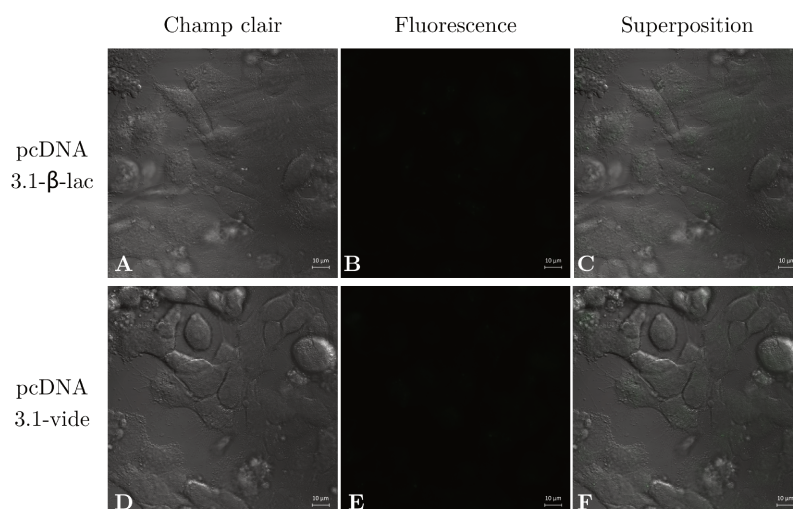


FIGURE 98 – Images par microscopie de fluorescence (de gauche à droite : champ clair, canal fluorescent puis superposition des deux premières images) de cellules HEK-293T transfectées par (A,B,C) : un plasmide pcDNA3.1- $\beta$ -lac et (D,E,F) : un plasmide pcDNA3.1-vidé. Les cellules ont ensuite été incubées avec 25  $\mu$ M de sonde **94** pendant 2 h à 37 °C (milieu : DMEM-Fluorobright).

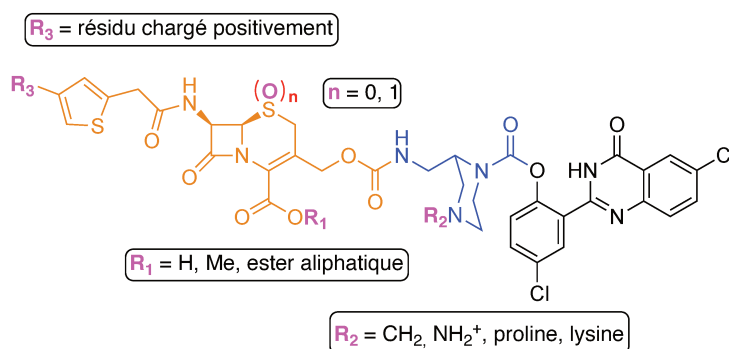


FIGURE 99 – Structures moléculaires de variantes structurales à la sonde **73**, pouvant présenter une meilleure perméabilité membranaire.

## II.5 Conclusions et perspectives du chapitre II

Ce deuxième chapitre marque la possibilité de cibler une nouvelle famille d'enzymes présentant de multiples applications : les  $\beta$ -lactamases. Ces dernières s'ajoutent aux peptidases et glycosidases et démontrent ainsi la versatilité de la technologie. La synthèse d'une sonde modèle a pu être effectuée, malgré les difficultés synthétiques inhérentes à ces molécules relativement complexes (plus de 40 carbones et 3 centres stéréogènes) ainsi qu'à l'instabilité intrinsèque aux cycles  $\beta$ -lactames. Une validation de la performance de cette sonde **73** *in vitro* et *in cellulo* nous a incité à viser des applications plus complexes. Dans ce cadre, un séjour de recherche à l'Université d'Osaka a permis l'obtention de résultats préliminaires encourageants, qui appellent à être poursuivis.

Un problème récurrent à travailler avec des noyaux pénicillines ou céphalosporines est la faible perméabilité membranaires des molécules les incorporant. Pour contourner cette difficulté, une sonde analogue a été synthétisée. Inspirée par la littérature abondante sur les pro-médicaments antibiotiques, elle porte une charge positive supplémentaire, compensant alors la charge négative du carboxylate à l'origine de l'imperméabilité. Pour ajouter cette charge, un espaceur, dit tripartite, et développé par Maxime Prost, a été incorporé. Sa synthèse a dans le même temps été améliorée pour éviter l'utilisation de réactifs dangereux (tel le *s*-BuLi, notamment à grande échelle). Malheureusement, cette sonde n'a pas présenté les performances espérées, que ce soit *in vitro* ou *in cellulo*. Plusieurs perspectives persistent ainsi sur ce projet. L'obtention d'un analogue perméable est évidemment un objectif majeur. Pour cela, des variations au niveau de la charge positive ajoutée, ou sur une possible estérification du carboxylate sont envisageables (Figure 99).

D'autres membres de la large famille des  $\beta$ -lactamases pourraient également être ciblés et constituent une autre perspective de travail. Pour autant, tous les noyaux  $\beta$ -lactames ne sont pas utilisables. Il faut, en effet, qu'ils possèdent une double liaison conjuguée avec l'azote du  $\beta$ -lactame. Nous pourrions donc envisager d'utiliser les noyaux pénème, carbapénème, carbacéphème ou encore oxacéphème (Figure 100). Pouvoir cibler uniquement un type de  $\beta$ -lactamase parmi les autres pourrait être un énorme avantage pour la discrimination de la nature d'une souche résistante chez un patient contaminé.

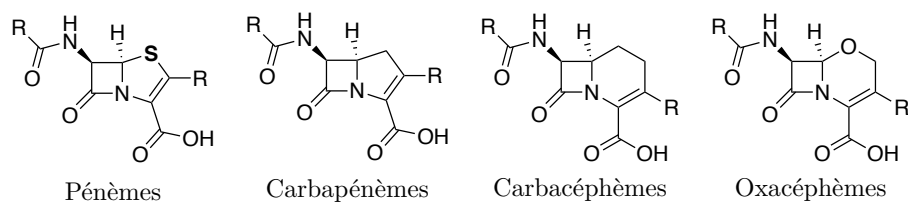


FIGURE 100 – Exemples de noyaux  $\beta$ -lactames possiblement intégrables dans une technologie de sonde ELF-97.

Pour l'autre application visée de ces sondes (en tant qu'outil pour la biologie moléculaire), la collaboration avec l'équipe japonaise est toujours en cours. Une fois les deux sondes, perméable ou non, obtenues, il faudra éventuellement pouvoir les utiliser conjointement. Pour cela, ces deux sondes ne devront pas relarguer le même fluorophore, sans quoi la discrimination du signal provenant de chaque sonde ne sera pas possible. Il faudra alors pouvoir proposer une structure de sonde libérant un autre fluorophore que l'ELF-97. Cette possibilité ouvrirait également de nombreuses possibilités d'applications à toutes les sondes de l'équipe. Ce projet fera l'objet du troisième et dernier chapitre de cette thèse.

## Chapitre III

Fluorophore rouge et NIR, en route  
vers l'*in vivo*



## Chapitre III

# Fluorophore rouge et NIR, en route vers l'*in vivo*

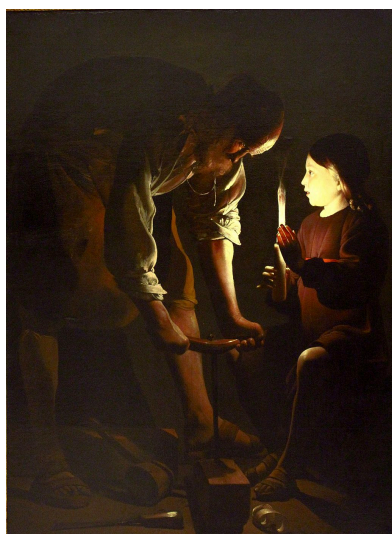
Les sondes présentées dans les deux premiers chapitres ciblent des activités enzymatiques assez variées, elles ont cependant toutes un point commun : le fluorophore utilisé. Ces sondes, en présence de peptidases, glycosidases et maintenant  $\beta$ -lactamases, relarguent l'ELF-97 afin de développer leur signal. Malgré ses propriétés exceptionnelles, il pourrait être intéressant de changer de fluorophore utilisé pour plusieurs raisons. On pourrait imaginer améliorer encore les caractéristiques de l'ELF-97 comme son rendement quantique de fluorescence ou son insolubilité. Toutefois, la priorité était plutôt la recherche de composés fluorescents à d'autres longueurs d'onde, tout en gardant certains éléments essentiels à la technologie : forte insolubilité et mécanisme ES IPT notamment. Utiliser d'autres couleurs d'émission pourrait permettre la détection simultanée de multiples activités enzymatiques en utilisant plusieurs sondes avec des fluorophores différents. Mais le principal objectif est d'obtenir des sondes fluorogènes, à rétention du signal par précipitation, émettant dans le rouge ou le proche infrarouge, ou *Near-Infrared* (NIR). Cette caractéristique est, comme on va le voir par la suite, nécessaire pour envisager une imagerie *in vivo*.



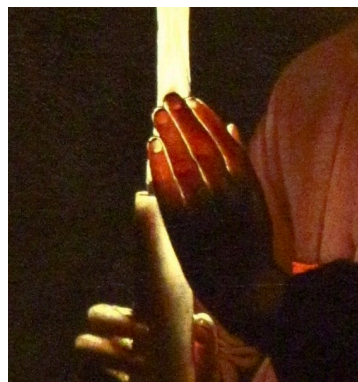
## III.1 Feu vert ? On ne traverse pas...

### III.1.1 Les fenêtres de transparence biologique

Le fait qu'une lumière assez intense puisse traverser les tissus biologiques humains est sûrement connu depuis des siècles. À première vue pourtant, notre corps semble opaque à la lumière. Toutefois, en appliquant une source lumineuse assez puissante sur une zone où les tissus ne sont pas trop épais (mains, joue, etc.) il est possible d'observer le passage de certains photons. Une première preuve remonte au milieu du 17<sup>e</sup> siècle sur une peinture de Georges de la Tour : "Saint Joseph Charpentier", dans laquelle on peut observer une lueur rouge passer à travers les doigts d'un enfant, éclairés en transmission par une bougie. Cette expérience, très facile à reproduire (avec un flash de portable par exemple), montre également un premier point : la gamme spectrale qui semble le mieux traverser les tissus est située dans le rouge.



(a)



(b)

FIGURE 101 – Illustration du tableau "Saint Joseph Charpentier" du peintre Georges de la Tour, milieu du 17<sup>e</sup> siècle, avec (b) : zoom sur la main éclairée en transmission par une bougie, présentant une lueur rouge.

Nous avons vu dans l'introduction de l'imagerie optique (section 1.4, p. 17) les premières applications de transilluminations pour tenter d'utiliser cette faible traversabilité à des fins médicales. Cependant, les faibles cas concrets où ces méthodes sont applicables (tissus fins, sources lumineuses assez puissantes) n'ont pas permis un essor de l'imagerie optique des milieux biologiques. Par rapport aux autres modalités (IRM et médecine nucléaire principalement), son principal défaut est, en effet, la mauvaise

pénétration des rayons lumineux dans les milieux biologiques. Avant même de parler de l'autofluorescence des tissus, deux phénomènes limitent grandement le libre déplacement des photons : l'absorption et la diffusion. Il faut aussi garder en tête que le trajet est double : la lumière doit effectivement traverser une première fois les tissus pour atteindre l'objet d'étude, puis faire le même parcours en sens inverse pour parvenir au détecteur. Une partie du signal peut également être perdu par réflexion sur la peau, ou la première couche rencontrée.

Les tissus biologiques sont des milieux complexes, composés de fluides et matrices solides dans lesquels on peut retrouver une énorme variété de composés chimiques. Ceux-ci peuvent présenter des caractéristiques d'absorbance des ondes électromagnétiques, notamment dans le visible et les zones spectrales proches (**UV** et **Infrarouge (IR)**). Les principaux exemples sont probablement l'hémoglobine donnant la couleur rouge au sang et la mélanine, désignant de nombreux colorants de la peau, des cheveux et des yeux. Ces derniers jouent notamment un rôle de protection des rayons **UV** du soleil et présentent, de ce fait, une absorbance intense dans cette zone. L'hémoglobine présentant une couleur rouge, elle absorbe également davantage dans la zone bleu-vert. D'autres (bio)molécules telles les protéines présentent également des absorptions variées, mais aussi des composés plus simples dont un que l'on peut retrouver partout dans le corps : l'eau. Bien qu'incolore, cette dernière présente une absorption dans l'infrarouge, globalement croissante avec la longueur d'onde.

En sommant ces absorptions, on peut retrouver certaines zones spectrales où la lumière traversera de manière préférentielle : on parle de fenêtres de transparence biologique. Selon les sources ces fenêtres sont au nombre de 2 à 4, mais 3 sont souvent retenues : la première entre 600 et 1000 nm, la deuxième de 1000 à 1350 nm et la dernière de 1550 à 1850 nm. La première, et dans une moindre mesure, la deuxième, constituent la majorité des applications pour la plus grande simplicité d'obtention de composés luminescents à ces longueurs d'onde proches du visible (on parle d'ailleurs du domaine du proche infrarouge, ou **NIR**).

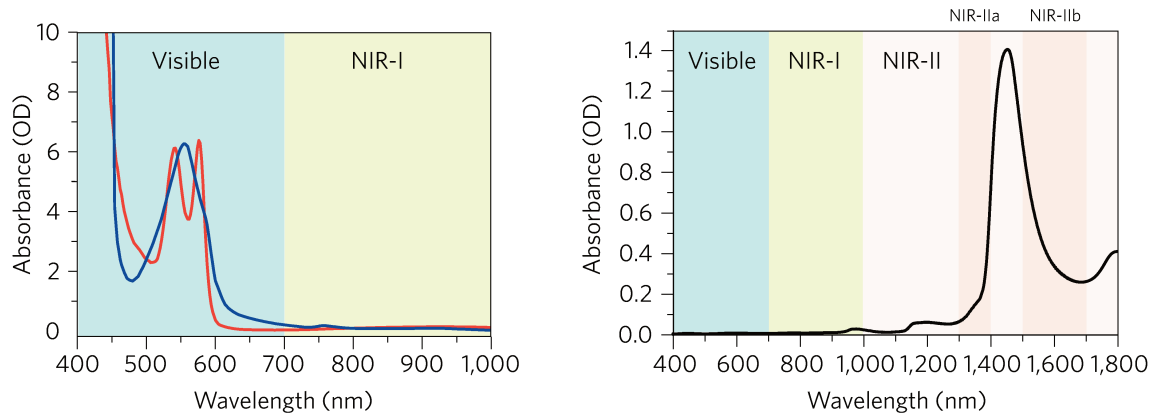


FIGURE 102 – Absorptions des composés principalement responsables de la diminution d'intensité des rayons lumineux dans les tissus biologiques : l'hémoglobine oxygénée (image de gauche, en rouge), l'hémoglobine désoxygénée (image de gauche, en bleue) et l'eau (image de droite).<sup>[394]</sup>

Les autres types de tissus absorbent de manière beaucoup moins intense la lumière, comme on peut l'observer dans la Figure 103 ci-dessous.

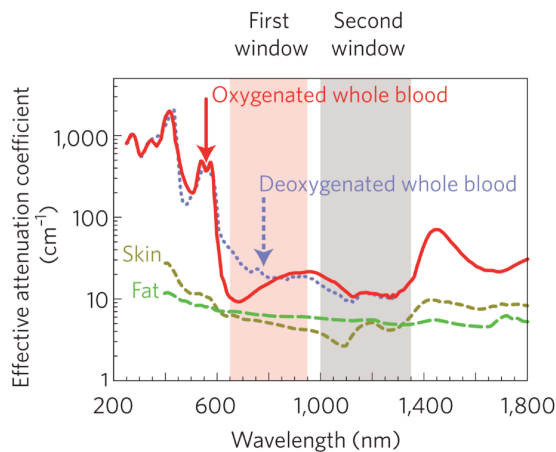


FIGURE 103 – Comparaison des absorptions des composés principalement responsables de la diminution d'intensité des rayons lumineux et d'autres types de tissus (peau et graisse).<sup>[395]</sup>

Toutefois, cette absorption peut être compensée en augmentant les intensités lumineuses utilisées. En effet, à part des dégâts oculaires facilement évitables, les rayons lumineux sont inoffensifs pour l'organisme. On peut, de plus, essayer de se placer dans ces fenêtres de transparence pour minimiser les pertes en signal. Le deuxième phénomène, la diffusion de la lumière par les tissus, est donc le principal facteur limitant pour l'application *in vivo*.

Un rayon lumineux parcourant le corps va rencontrer sur son trajet de nombreuses variations de milieux aux indices de réfraction variés. À l'échelle des organes déjà, dont

l'indice dépend principalement de la teneur en eau, mais plus finement également à l'échelle cellulaire, les différentes organelles présentant aussi des indices différents selon leur nature. À chaque rencontre, un phénomène de diffraction se produit dont le régime dépend de la taille de la particule ou du milieu rencontrés. Pour les petites particules (taille inférieure au dixième de la longueur d'onde) la diffusion de Rayleigh domine, pour les particules plus grosses, c'est le régime de Mie qui l'emporte. Enfin, pour les structures plus grandes, à échelle macroscopique, c'est la diffusion géométrique qui prend le dessus, régie par les lois de l'optique de Snell-Descartes.

En moyenne, un photon parcourt environ 100  $\mu\text{M}$  entre deux événements de diffraction. On comprend ainsi le rapide affaiblissement d'un signal lumineux traversant un organisme, les photons ayant alors des trajectoires quasi-aléatoires. En plus de limiter les signaux excitateurs et émis par les fluorophores, la diffusion rend également difficile la localisation précise de la source : on perd alors en résolution spatiale. En comparant les trois régimes dans ce cadre, le plus important est celui de Rayleigh, les deux autres s'effectuant globalement vers l'avant. En diffusion de Rayleigh, l'intensité de diffusion est proportionnelle à  $1/\lambda^4$ , en se plaçant à des longueurs d'onde plus élevées (rouge ou NIR) on limite ainsi son effet.

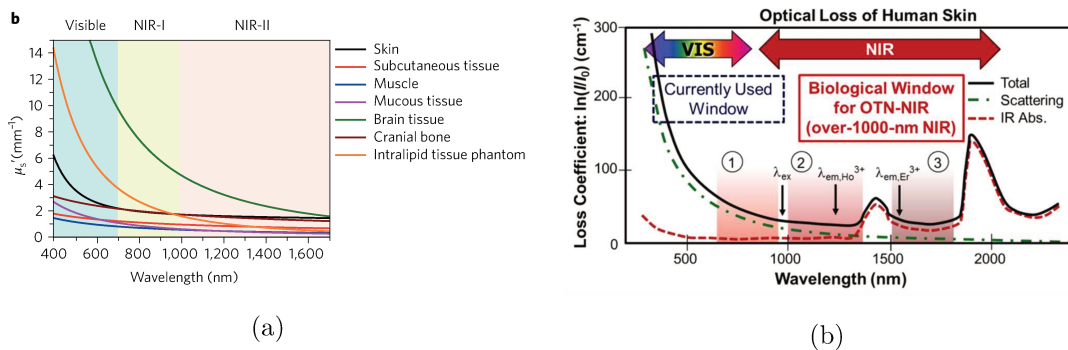


FIGURE 104 – Illustration (a) de la diminution des coefficients de diffusion  $\mu_s$  de différents types de tissus biologiques aux plus grandes longueurs d'onde<sup>[394]</sup>, et (b) Influence de la longueur d'onde sur l'absorption, la diffusion (et la combinaison des deux) par la peau.<sup>[396]</sup>

On comprend ainsi que la zone NIR permet d'atténuer les deux phénomènes limitant la traversée de la lumière dans les tissus, il est donc nécessaire de se placer dans cette zone pour envisager des application *in vivo*. Le dernier avantage à souligner dans le NIR est l'atténuation des phénomènes d'autofluorescence (voir section 1.4, p. 17) quand on se place à de grandes longueurs d'onde.<sup>[80]</sup> Une étude de 2003 avait notamment comparé l'autofluorescence de l'intérieur d'une souris, selon trois jeux d'excitation/collecte (Figure 106a). L'intensité du signal est alors maximal pour une excitation bleue/collecte

verte, diminue pour une excitation verte/collecte rouge et devient négligeable pour une excitation et collecte dans le NIR.<sup>[397]</sup>

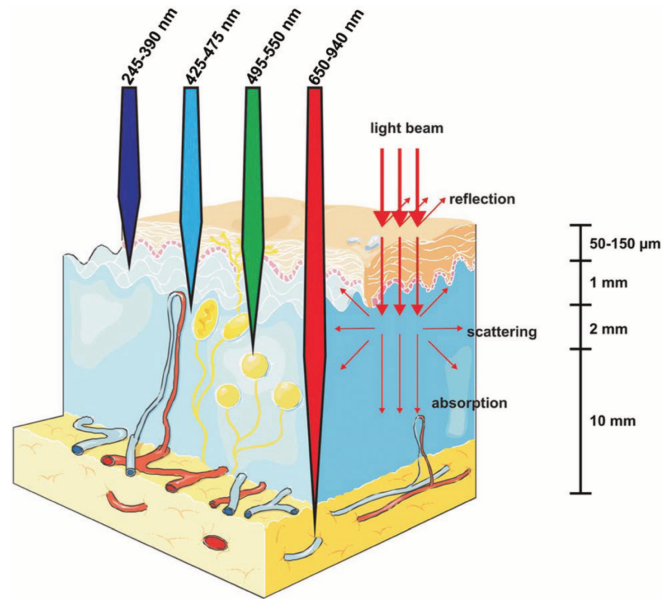


FIGURE 105 – Comparaison des pénétrations de rayons lumineux de différentes couleurs.<sup>[398]</sup>

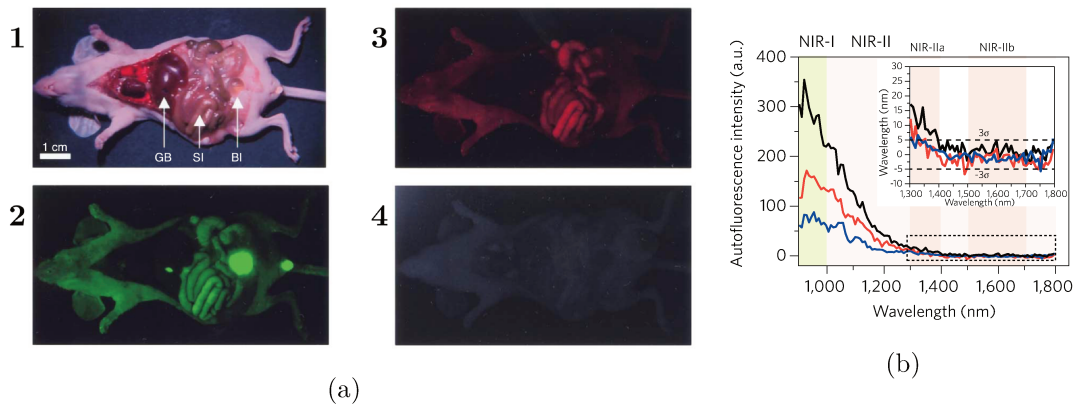


FIGURE 106 – Illustration (a) de l'auto fluorescence de l'intérieur d'une souris selon plusieurs conditions d'illumination ; 1 : sous lumière blanche (les flèches représentent la vésicule biliaire (GB), l'intestin grêle (SI) et la vessie (BI)), 2,3,4 : avec différents jeux d'excitation/collecte : (2) bleu/vert (460-500 nm/505-560 nm), (3) vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm) et (4) NIR/NIR (725-775 nm/790-830 nm). Conditions d'excitation identiques ( $2 \text{ mW}/\text{Cm}^2$ ). Les temps d'exposition ont été ajustés pour compenser la taille des fenêtres de collecte ainsi que la sensibilité du détecteur.<sup>[397]</sup> Et (b) : Spectres d'auto fluorescence *ex vivo* d'un foie (en noir), d'une rate (en rouge) et de tissus cardiaques de souris, sous excitation à 808 nm, on observe alors la disparition de signal parasite aux grandes longueurs d'onde d'émission.<sup>[394]</sup>

En conclusion, pour les trois raisons d'absorption, de diffusion et d'autofluorescence, la fenêtre spectrale du rouge lointain/NIR, voire NIR II est la condition optimale de travail pour réaliser de l'imagerie (moléculaire).

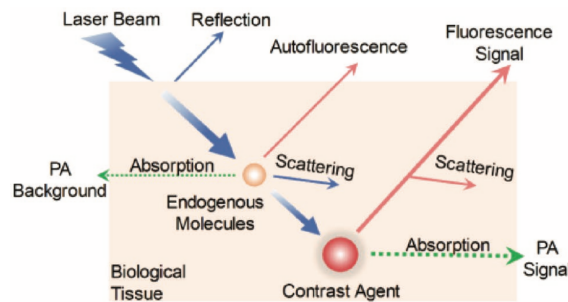


FIGURE 107 – Schéma bilan des principaux facteurs limitant la traversée des rayons lumineux dans les tissus biologiques (PA = Photoacoustique, voir 1.3.4, p. 15).<sup>[399]</sup>

### III.1.2 Une solution : les fluorophores NIR

Ces constats ne sont pas vraiment nouveaux mais ils ont longtemps limité l'applicabilité de l'imagerie optique à l'Homme. Les solutions techniques pour contourner ces limitations sont donc plus récentes. Dans le cadre de l'imagerie par fluorescence, une littérature assez fournie existe sur l'utilisation des fluorophores émettant dans le rouge ou le NIR.<sup>[394,400,401]</sup>

Les deux principaux exemples sont sûrement l'*indocyanine green* et le bleu de méthylène, étant les premiers composés approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour une utilisation clinique. Les applications de ces fluorophores pour l'imagerie médicale, éventuellement intégrés sous forme de sondes, se multiplient<sup>[402-405]</sup> et s'étendent également au bloc opératoire avec la chirurgie guidée par fluorescence.<sup>[406]</sup>

La deuxième fenêtre de transparence, qu'on appellera NIR II par la suite, constitue un champ de recherche très actif et des fluorophores émettant au-delà de 1000 nm sont de plus en plus nombreux.<sup>[407-413]</sup> Initialement, l'imagerie après 1000 nm se réalisait par l'utilisation du résidu d'émission de fluorophores NIR I ayant des bandes assez larges.<sup>[414]</sup> Désormais, les applications d'imagerie utilisent directement ces nouveaux composés émissifs dans le NIR II.<sup>[399,415,416]</sup> Parmi elles, certaines prétendent déjà réaliser de l'imagerie moléculaire, par la réalisation de composés bioconjugués ou de sondes pour activités enzymatiques.<sup>[417,418]</sup>



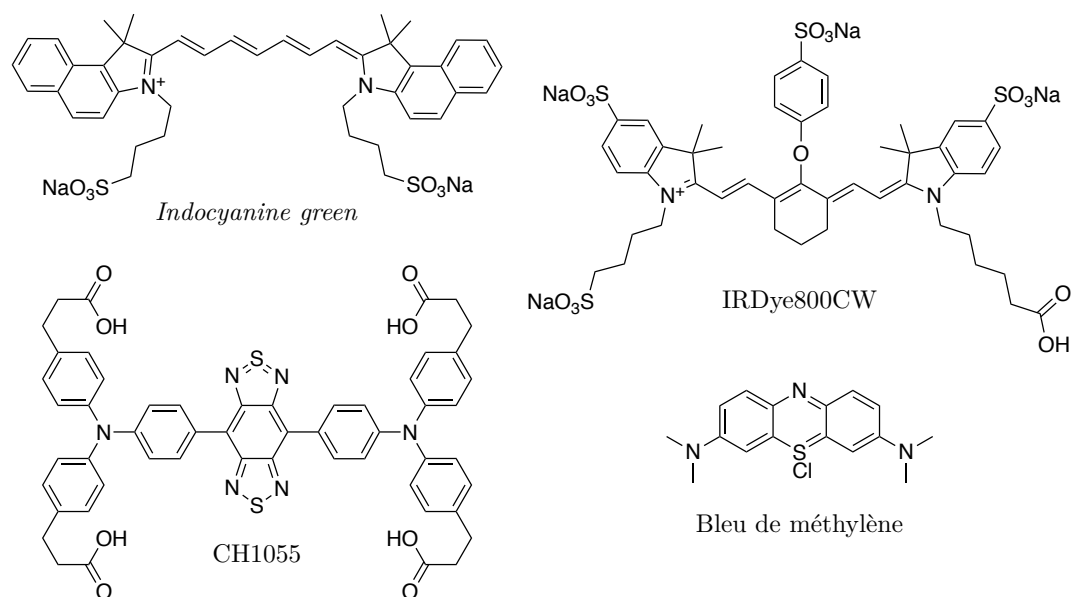


FIGURE 108 – Structure de certains composés connus pour leur fluorescence décalée vers le rouge et le NIR.

Pouvoir réaliser la localisation et donc l'imagerie d'activités enzymatiques chez l'Homme est le but ultime affiché de notre technologie. Cependant, le fluorophore actuellement incorporé dans nos sondes, l'**ELF-97**, présente une bande d'excitation dans l'**UV** et d'émission dans le vert. Ces deux facteurs sont, pour les raisons évoquées précédemment, loin d'être optimaux. Le rayonnement dans l'**UV**, en plus d'être quasiment absorbé instantanément, présente une intense toxicité envers les cellules. Grâce à l'important décalage de Stokes, l'émission est relativement décalée vers le rouge mais son maximum reste autour des 525 nm. Ce fort déplacement permet tout de même une certaine atténuation de l'autofluorescence, les composés en étant responsables présentant souvent des décalages de Stokes bien plus faibles et seront donc négligés par l'application de filtres optiques adéquats. Sa forte intensité d'émission nous a ainsi poussé à tenter d'imager une activité enzymatique *in vivo*, dans un premier temps sur le petit animal : la souris. Pour cela, une collaboration est née avec les docteurs Jean-Luc Coll et Véronique Josserand, à la tête de la plateforme d'Imagerie Optique du Petit Animal (OPTIMAL), au sein de l'*Institute for Advanced Biosciences* à Grenoble. Spécialistes de l'imagerie murine, notamment dans le domaine du NIR, leur maîtrise des outils optiques dans les grandes longueurs d'onde pourrait permettre de tester d'éventuelles sondes incorporant des fluorophores NIR.

### III.1.3 L'ELF-97 et l'*in vivo*, un mariage quasiment impossible

La sonde **15**, relargant l'ELF-97 en présence d'une activité  $\beta$ -gal a été choisie comme objet de cette étude primaire pour plusieurs raisons. Au-delà de ces excellentes propriétés *in vitro* comme *in cellulo* (voir section I.1, p. 62), cette sonde est jusqu'alors une des plus étudiées et optimisées de l'équipe. De plus, il est relativement aisé d'obtenir des modèles de souris présentant une activité localisée de la  $\beta$ -gal, notamment par l'utilisation de xéno greffes de tumeurs dont on connaît le panel d'expressions enzymatiques. Avant d'effectuer une telle expérience, une première validation de la technologie dans leurs mains a été réalisée avec succès. Toutefois, après injection de la sonde **15** sur un spécimen présentant une tumeur  $\beta$ -gal-positif, aucun signal n'a pu être observé, même après le retrait chirurgical de la tumeur. Afin d'approfondir le résultat, une dissection de la tumeur a, par la suite, été effectuée et une fluorescence verte a alors pu être constatée à l'intérieur de cette dernière.

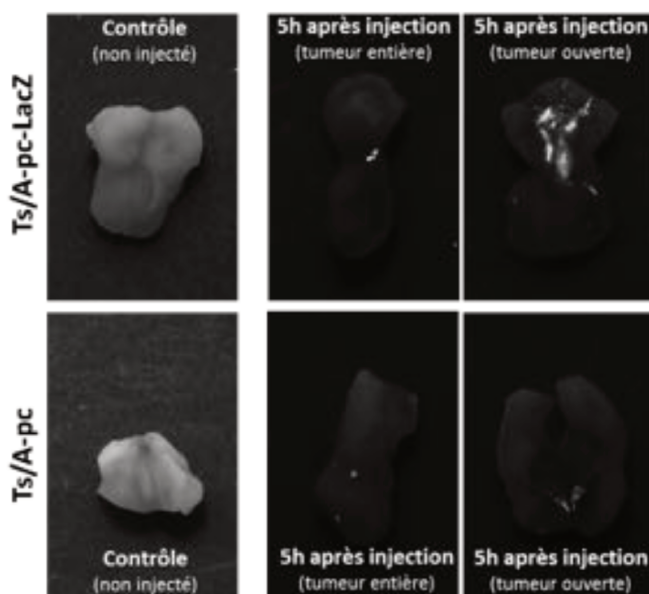


FIGURE 109 – Imagerie par fluorescence de tumeurs *ex vivo*, issues de cellules  $\beta$ -gal-positives (en haut), ou non (en bas). Les images sont obtenues après 5 heures d'incubation *in vivo* avec la sonde **15** (concentration : 1 mM, injection intratumorale).

Il s'agit d'une bonne et mauvaise nouvelle à la fois : sans être une surprise, le signal fluorescent vert ne traverse pas suffisamment les tissus pour être observable, même après ouverture de la peau pour éliminer des couches de tissus à traverser. Il en est de même pour le signal excitateur dans les UV, l'absorption à ces longueurs d'onde est si intense que les molécules d'ELF-97 ne sont peut-être même jamais excitées. Cela



conforte alors le projet de travailler à de plus grandes longueurs d'onde. Toutefois, la fluorescence reste très localisée au sein de la tumeur, attestant de la bonne rétention du signal sur place, confirmant ainsi pour la première fois les observations faites *in cellulo*. L'ELF-97 ne semble donc pas être un bon choix de fluorophore pour des applications où plusieurs couches de tissus sont à traverser.

Mais avant de mettre de côté l'ELF-97, il faut tout de même lui reconnaître un dernier avantage : la possibilité d'effectuer de l'imagerie avec excitation biphotonique, aussi appelée **absorption à deux photons (ADP)**. Sans rentrer dans trop de détails, ce phénomène d'optique non linéaire fut théorisé par Maria Göppert Mayer en 1931 et observé expérimentalement 30 ans plus tard. En présence d'une intensité lumineuse assez puissante pour observer ces effets non-linéaires, une molécule peut absorber deux photons de basse énergie en passant par un état virtuel. Elle se retrouve finalement dans un état excité d'ordinaire atteint par l'absorption d'un seul photon. Le flux important de photons nécessaire requiert une focalisation de la source lumineuse, généralement un laser, en un point. Cette condition entraîne une réduction du bruit de fond en réduisant la quantité de molécules excitées en dehors du champ d'intérêt. Mais le principal avantage est le décalage vers le rouge de l'excitation, une molécule ayant un maximum d'excitation à  $\lambda$  aura un maximum d'excitation ADP à  $2\lambda$ , ou un peu moins si elle n'est pas centrosymétrique. Pour les mêmes raisons étudiées précédemment ce décalage permet d'optimiser la quantité de lumière excitatrice traversant les tissus, et donc améliore les performances *in vivo*. Mais pour être observable, il faut que le fluorophore utilisé présente une section efficace  $\sigma$  suffisamment élevée. Cette section efficace quantifie en effet l'ADP et dépend notamment de la susceptibilité non-linéaire de troisième ordre de la molécule. La section efficace de l'ELF-97 n'est pas référencée mais des applications d'imagerie ont déjà été publiées ou réalisées dans l'équipe.<sup>[282]</sup>

Cette possibilité d'appliquer la méthode d'ADP à l'ELF-97 pourrait améliorer certaines performances en imagerie, mais ne serait probablement pas suffisante pour une application *in vivo*, comme la détection de tumeur. Même avec une excitation dans le rouge ou le NIR, la lumière émise dans le vert n'est pas assez pénétrante : un rayon lumineux autour de 520 nm parcourt en moyenne 2 cm avant d'être complètement absorbé.<sup>[80]</sup> Toutefois, pour des applications *in cellulo*, l'ADP pourrait permettre une réduction de l'autofluorescence et donc une amélioration de la résolution des images obtenues. Elle permet aussi de s'affranchir de l'excitation UV habituellement employée pour l'ELF-97, évitant ainsi les effets cytotoxiques.

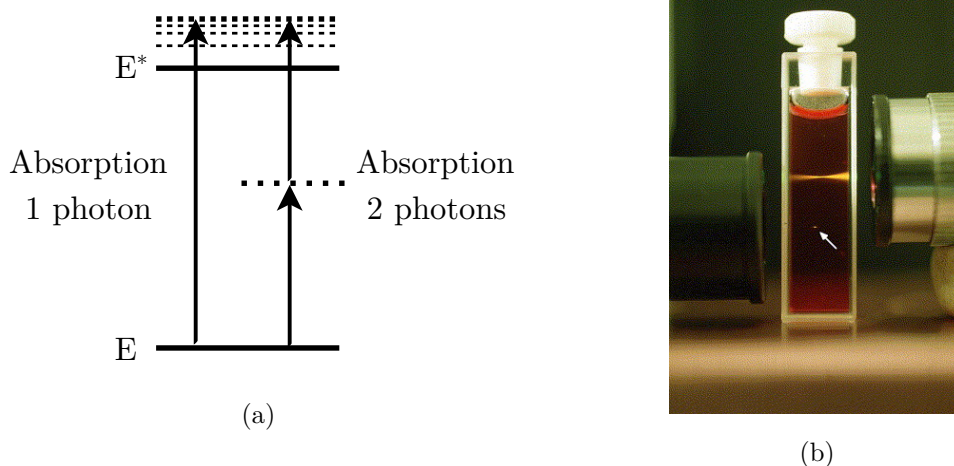


FIGURE 110 – Illustration (a) du principe d'ADP et (b) comparaison de la fluorescence du safranin O, excité à 1 photon ( $\lambda_{ex} = 543$  nm, en haut) et à 2 photons ( $\lambda_{ex} = 1046$  nm, flèche), on remarquera la différence de focalisation du signal avec l'ADP.<sup>[419]</sup>

Dans le cadre de l'imagerie *in vivo*, l'objectif est donc clair : il faut trouver un fluorophore alternatif à l'ELF-97, dont l'émission serait décalée autant que possible vers le NIR, tout en conservant le côté précipitant pour la résolution et bien sûr une émission assez intense pour être applicable (la possibilité d'exciter à deux photons serait également un plus). Le mécanisme ES IPT devrait être aussi conservé pour permettre l'extinction totale de la fluorescence une fois le fluorophore couplé au reste de la sonde, en plus d'entraîner de forts déplacements de Stokes.

### III.1.4 Pour traverser, on passe au rouge

Pour décaler une émission fluorescente vers le rouge, il existe plusieurs stratégies connues. La première, très répandue, joue sur la conjugaison électronique. Les fluorophores sont des molécules souvent composées de cycles aromatiques. En étendant la conjugaison, par exemple par ajout de ponts éthylènes, on augmente schématiquement le nombre d'états électroniques accessibles aux molécules. L'écart énergétique entre état fondamental et excité est alors possiblement réduit, augmentant alors la longueur d'onde d'une émission de photons due à une désexcitation entre ces deux états. Une autre stratégie est d'utiliser des molécules dipolaires, notamment à l'état excité. En plaçant des groupements électroattracteurs et électrodonneurs sur une molécule, reliés entre eux par un système  $\pi$ -conjugué, on obtient souvent des composés dont la polarité augmente fortement à l'état excité par réorganisation spatiale des charges (phénomène

de ICT). Le solvant, plus ou moins polaire, peut également se réorganiser pour stabiliser le fluorophore à l'état excité, abaissant ainsi son niveau énergétique (Figure 111). L'écart d'énergie avec l'état fondamental diminue, entraînant une augmentation du déplacement de Stokes et donc les longueurs d'onde d'émission. Cette stabilisation de l'état excité se retrouve d'une autre manière dans le phénomène d'ESIPT, où le transfert de proton abaisse le niveau énergétique de la forme initiale énolique. Toutefois, en jouant avec des groupements électrodonneurs ou électroaccepteurs, on peut renforcer cette stabilisation et abaisser encore plus le niveau de la forme cétone. En conclusion, pour décaler une émission de fluorescence vers le rouge, on joue le plus souvent sur la conjugaison et les effets électroniques, souvent mésomères (donneurs/accepteurs). Ces stratégies sont souvent combinées, et leurs résultats sont très dur à prévoir à l'avance, d'autant plus lorsque l'on considère la fluorescence à l'état solide. D'autres paramètres jouent effectivement sur les propriétés d'émission, comme l'arrangement des molécules entre elles (agrégats J et H), la phase cristalline obtenue, la taille des cristaux, etc.

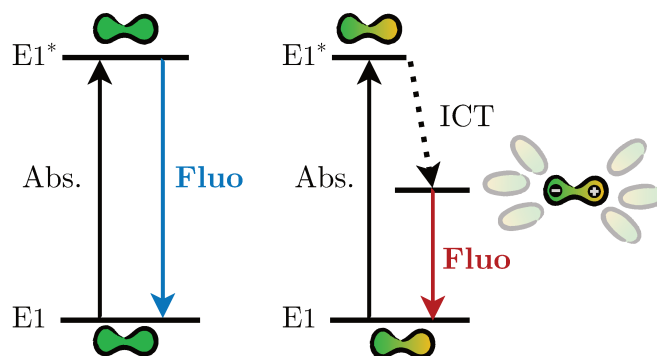


FIGURE 111 – Stratégie de déplacement vers le rouge d'une émission fluorescente grâce au principe d'ICT.

L'objectif de trouver des variantes de l'ELF-97 n'étant pas nouveau dans l'équipe, plusieurs structures ont déjà été envisagées et testées. Maxime Prost pendant sa thèse avait, par exemple, considéré la 10-hydroxybenzo[h]quinoline (HBQ) comme fluorophore. Celui-ci, très étudié pour ses propriétés spectroscopiques, présente en effet une fluorescence ESIPT autour de 630 nm.<sup>[420]</sup> Cependant, cette émission est assez faible : son rendement quantique à l'état solide est inférieur à 1 %). Cette cible a donc été abandonnée. Un papier, publié en 2010 par l'équipe du Pr Stefani, décrit une émission vers 650 nm pour un composé ESIPT à l'état solide.<sup>[421]</sup> Malheureusement, le rendement quantique dans cet état n'est pas donné et la synthèse, bien que décrite, est loin d'être efficace (trois étapes dont la dernière avec un rendement inférieur à 10 %). Sa synthèse avait pu être réalisée par Delphine Pitrat, mais les très faibles quantités obte-

nues n'avaient pas permis une analyse spectroscopique. Finalement, le Dr Martin Ipyu avait effectué son stage M2 dans l'équipe avec, comme projet de recherche, la synthèse de nouveaux composés HPQ avec système conjugué étendu, ou des analogues de type hydroxyphenyl-benzothiazoles. De la même manière, l'impossibilité d'obtenir les cibles moléculaires (notamment à cause de l'insolubilité des intermédiaires) n'a pas permis d'identifier de variantes intéressantes. Des exemples de ces structures sont donnés dans la Figure 112 ci-dessous.

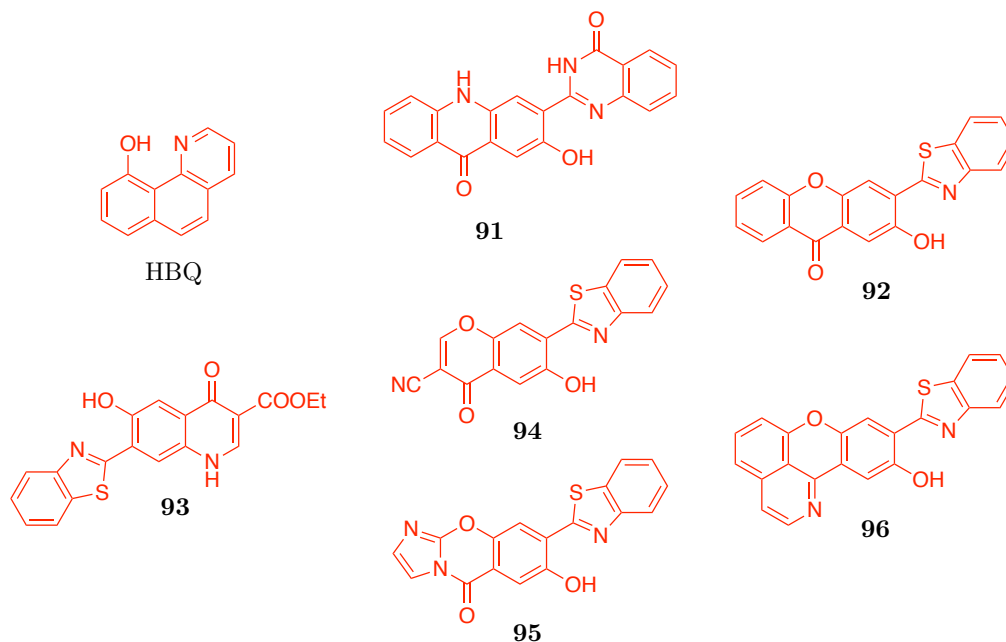


FIGURE 112 – Structures moléculaires des précédentes cibles de fluorophores ES IPT rouges ou NIR de l'équipe.

Avant mon stage expérimental de M2 dans l'équipe, j'ai également effectué un stage bibliographique sur l'identification de nouvelles cibles de fluorophores ES IPT, avec une émission décalée vers le rouge. L'état de l'art de l'époque a pu faire ressortir une structure commune semblant favoriser une émission conséquente après 600 nm. Un groupement phénol central est toujours utilisé comme groupement donneur de liaisons hydrogènes pour l'effet ES IPT. Les groupements accepteurs varient et peuvent être des dérivées azotés ou oxygénés, placés en position *ortho* du phénol, et formant le plus souvent un cycle à 6 membres lorsque la liaison hydrogène est présente. Pour intensifier l'émission, on retrouve le plus souvent un groupement électrodonneur en position *para* du phénol (éventuellement aussi sur l'autre position *ortho*) ainsi qu'un groupement électroaccepteur en position *meta*. Cette structure globale est représentée dans la Figure 113. Celle-ci ne permet pas d'assurer une émission rouge intense du fait des nombreux paramètres influençant de tels phénomènes à l'état solide, mais elle

est intéressante à garder en tête pour la réflexion autour de nouvelles structures ou de modification de composés existants. Pour l'application visée, il n'est pas possible de maîtriser la phase ou la taille des cristaux obtenus, si des cristaux sont par ailleurs obtenus. Il faut donc sélectionner les meilleurs candidats et espérer que leur propriétés spectroscopiques soient maintenues *in cellulo*.

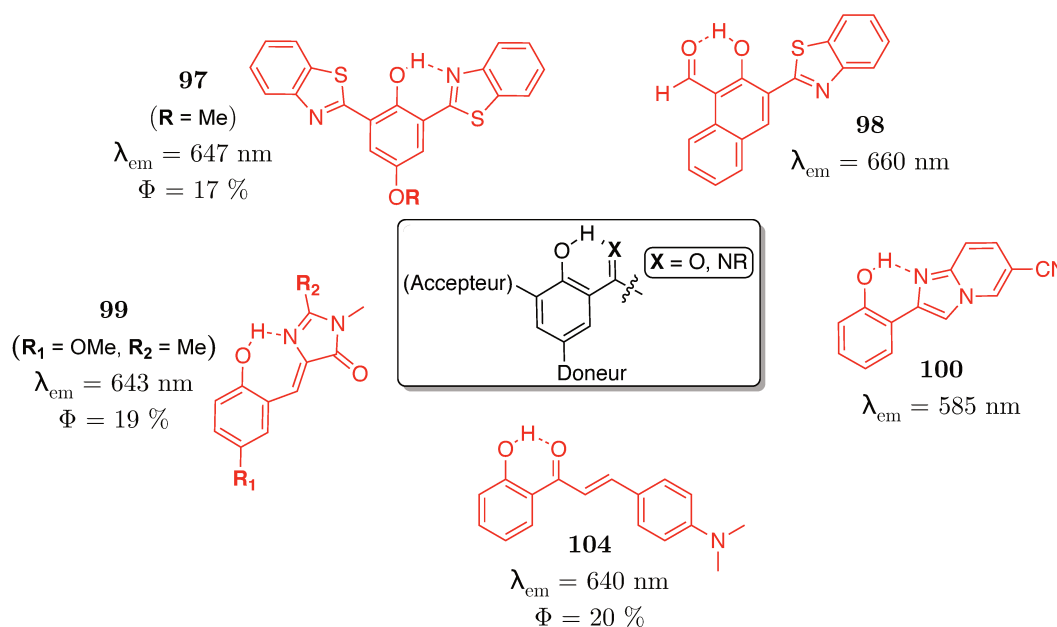


FIGURE 113 – Structures moléculaires des cibles identifiées durant mon stage bibliographique, et structure commune (encadrée) semblant favoriser une fluorescence ES IPT décalée vers le rouge.

Ce projet, commencé avant le début du stage M2 et ayant continué pendant ces trois années, a ainsi constitué (sans mauvais jeu de mots) le fil rouge de cette thèse. En parallèle des autres projets de nouveaux substrats et espaceurs, la reproduction de composés décrits dans la littérature a été poursuivie. Le développement de variantes ou de nouvelles cibles a aussi nécessité la mise au point de voies de synthèse originales.

## III.2 Synthèse et étude de nouveaux fluorophores ESIPT émettant dans le rouge

### III.2.1 La famille Stefani

Comme indiqué précédemment, l'équipe du Pr Stefani de l'Université de São Paulo s'intéresse à la fluorescence ESIPT, parfois à l'état solide.<sup>[421-423]</sup> Dans leur papier de 2010, ils décrivent les propriétés spectroscopiques de deux composés ESIPT : les molécules **102** et **103** (Figure 114), basées sur un motif hydroxyquinolone, substitué par un benzoxazole (**102**) ou un benzothiazole (**103**). Le deuxième semble plus intéressant pour son émission davantage dans le rouge et avec de meilleurs rendements quantiques de fluorescence, en solution du moins. Des spectres d'excitation/émission ainsi que des photographies sont présentées pour ces deux composés à l'état de poudre. Malheureusement, aucun rendement quantique n'est donné. Cependant, le cliché pris sous lampe UV semble montrer une émission non-négligeable.

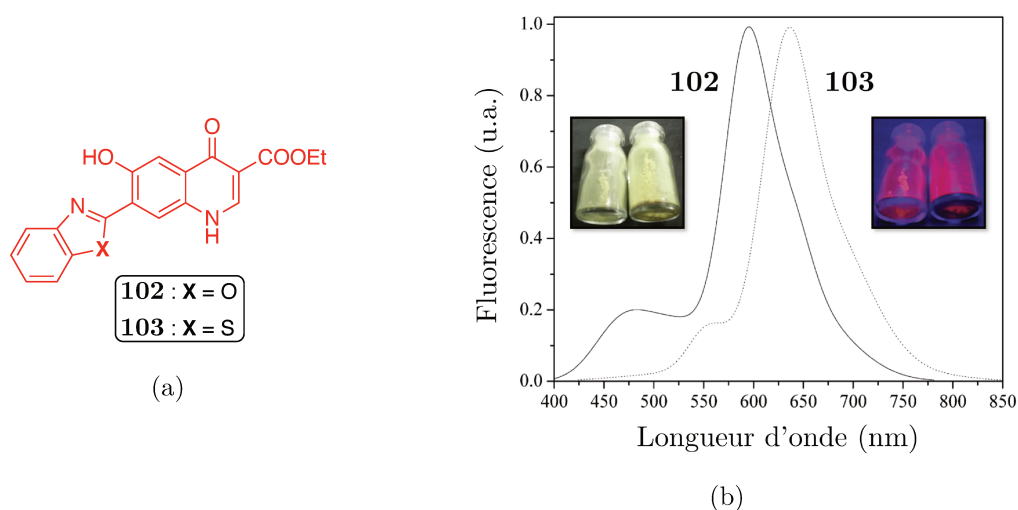
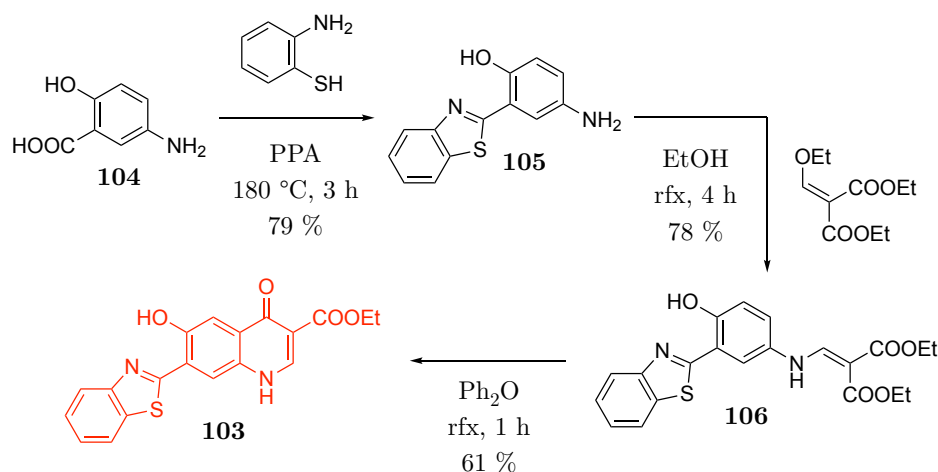


FIGURE 114 – Illustration (a) : des fluorophores ESIPT développés par l'équipe du Pr Stefani et (b) de leur émissions à l'état solide (rendements quantiques non donnés).<sup>[421]</sup>

L'objectif était alors de reproduire sa synthèse, en améliorant les rendements obtenus (notamment dans l'équipe), afin d'obtenir une quantité suffisante pour une analyse spectroscopique, avec mesure du rendement quantique. Pour cela, une étude de la bibliographie a permis d'identifier des conditions alternatives pour la première et surtout la dernière étape, qui semble la plus limitante avec moins de 10 % de rendement.<sup>[424,425]</sup> La voie de synthèse suivie est ainsi présentée dans la Figure 115 ci-dessous.

FIGURE 115 – Voie de synthèse améliorée pour l’obtention du fluorophore **103**.

Cette voie de synthèse a ainsi permis d’augmenter le rendement de la dernière étape à 61 %, permettant d’obtenir assez de poudre pour envisager une analyse au fluorimètre. Visuellement, une poudre verte, légèrement fluorescente rouge sous lampe UV est observable. Une mesure des spectres d’excitation et d’émission ainsi que de rendement quantique a été effectuée grâce à une sphère d’intégration. Celle-ci permet une mesure absolue de ce rendement quantique, en s’affranchissant des mesures d’absorbance (difficiles à l’état solide), en comparaison avec un composé de référence. Un maximum d’émission est obtenu à 665 nm, ce qui semble légèrement supérieur à celui obtenu dans l’étude initiale. Le rendement quantique a aussi pu être déterminé mais s’avère plutôt décevant : seulement 2 %. Cette valeur confirme l’observation visuelle d’une intensité de fluorescence trop faible. Cette cible a donc été abandonnée avec regrets, le composé **103** présente, en effet, une insolubilité plutôt intéressante pour la rétention du signal. Durant sa synthèse, il n’a, par exemple, pas été possible de solubiliser le fluorophore dans des solvants organiques classiques (le produit est même lavé au diméthylformamide (DMF)), seule une très faible solubilité dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) a permis la réalisation du spectre RMN.

### III.2.2 La famille des chalcones

Identifié tout d’abord lors de mon stage bibliographique de M2, le motif 2’-hydroxychalcone semble favoriser une fluorescence intense à l’état solide, par un phénomène d’ESIPT. De nombreux composés basés sur cette structure ont été étudiés pour leur propriétés de luminescence, appliqués aux matériaux optiques (propriété d’*Amplified Spontaneous Emission* (ASE)) ou pour le développement de lasers.<sup>[426–431]</sup> Ces fluo-

rophores ont également été utilisés pour la détection de protéines comme la *Human Serum Albumin* (HSA)<sup>[432]</sup>, d'empreintes digitales<sup>[433]</sup>, de la cystéine<sup>[434]</sup>, ou encore en application théranostique pour le cancer, par un double pro-médicament activé par le glutathion.<sup>[435]</sup> La détection d'une activité enzymatique phosphatase a même pu être démontrée avec une sonde ratiométrique à base de ce motif chalcone.<sup>[200]</sup> Les émissions sont, en général, au-delà des 600 nm mais certains groupes ont tenté de décaler encore davantage cette valeur en utilisant la stratégie d'extension du système  $\pi$ .<sup>[436-438]</sup> Dans ces molécules, la partie phénol est remplacée par un groupement 1-naphthol. Ces composés utilisent alors les trois principales stratégies de décalage vers le rouge (extension du système  $\pi$ , caractère dipolaire avec un groupement donneur dialkylamine et accepteur hydroxyacétonaphtone et mécanisme ESIPT), leur permettant de dépasser les 700 nm en maximum d'émission.

En se basant sur cette étude bibliographique, un protocole expérimental a été déterminé. Pour obtenir cette structure commune, une réaction d'aldolisation/crotonisation entre un motif arylméthylcétone et un benzaldéhyde est nécessaire. Après plusieurs essais de changement de base, solvant et temps réactionnel, une procédure simplifiée a pu être obtenue : un mélange équimolaire des deux réactifs est placé dans l'éthanol, puis une quantité stœchiométrique de pyrrolidine est ajoutée. Après réaction sur la nuit, le produit précipite et une filtration permet d'obtenir le produit final, sous forme pure après un rapide lavage.

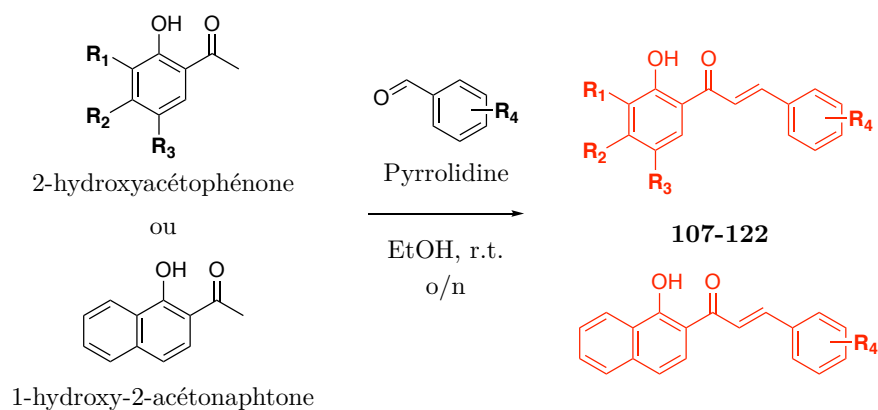


FIGURE 116 – Schéma de synthèse des fluorophores de la famille des chalcones.

Grâce à ce protocole, de nombreux composés, déjà décrits ou non, ont été synthétisés ; leurs structures sont regroupées dans la Figure 117 ci-dessous.



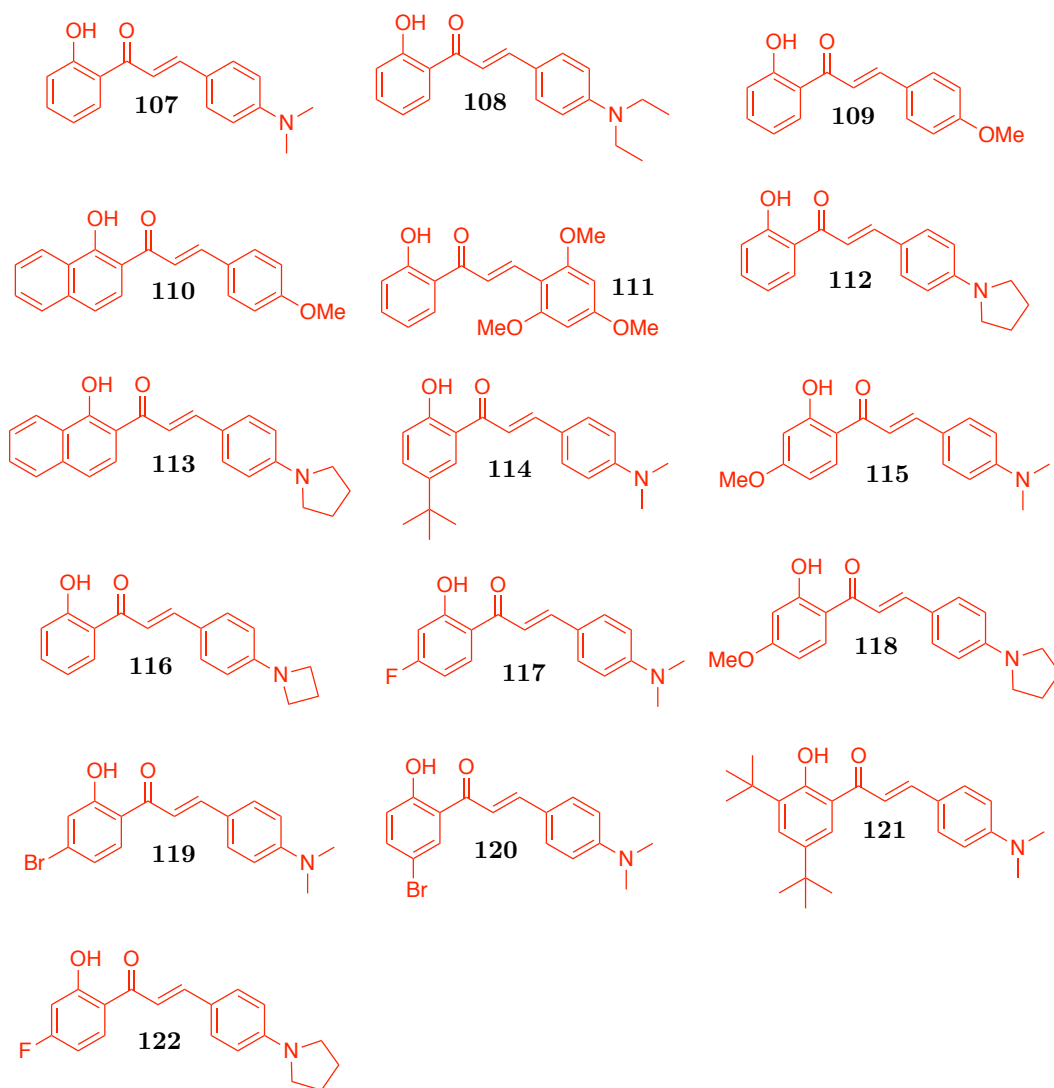


FIGURE 117 – Cibles moléculaires de la famille des chalcones.

Des premiers spectres d'émission à différentes longueurs d'onde d'excitation ont été mesurés pour repérer les cibles les plus intéressantes. Plus précisément, les poudres obtenues sont placées en suspension (mêmes concentrations) dans du PBS afin de se rapprocher au maximum des conditions dans lesquelles elles devront être détectées. Pour ces meilleures cibles, une analyse plus poussée au spectrofluorimètre pour déterminer les maximums d'excitation et d'émission ainsi que les rendements quantiques à l'état solide (toujours à l'aide d'une sphère d'intégration). Ces courbes et valeurs sont regroupées dans la Figure 118 ci-dessous. Certaines valeurs de composés d'intérêt ont été mesurées plus récemment par Alix Tordo, actuellement en thèse dans l'équipe, et continuant ce projet de nouveaux fluorophores.

Pour les composées en suspension, plusieurs valeurs d'excitation ont été testées, à savoir 355 nm, 405 nm et 488 nm. Ces dernières correspondent, en effet, aux longueurs d'ondes couramment disponibles pour les lasers d'excitation des dispositifs d'imagerie ou de cytométrie en flux. Nous avons choisi de se focaliser sur les spectres d'émission obtenus après excitation à 488 nm, car c'est l'excitation la plus avantageuse pour minimiser la perte de signal *in vivo* (la plus décalée vers le rouge). Les spectres aux autres longueurs d'onde peuvent être trouvés en Annexes (voir section III.5, p. 249).

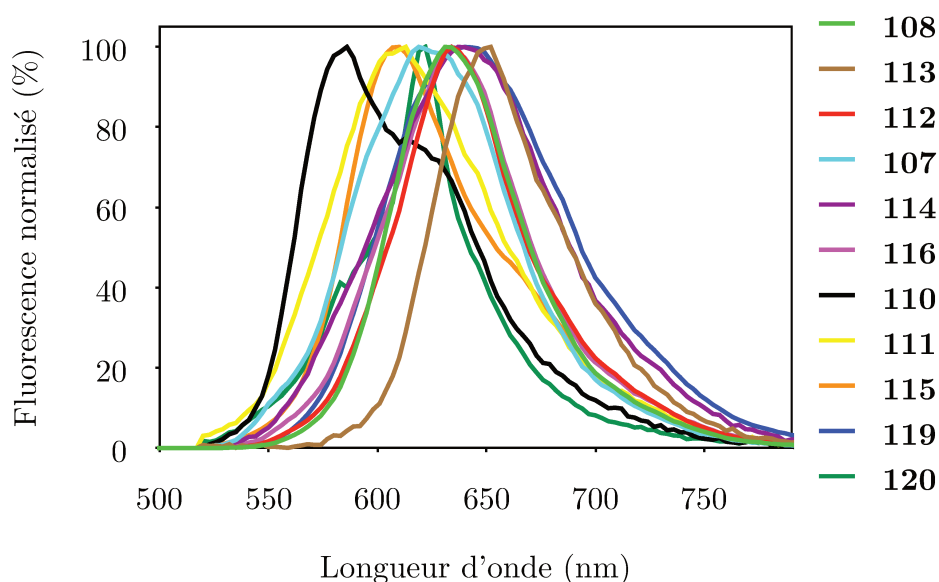


FIGURE 118 – Spectres d'émission de suspensions dans le PBS de différents composés de la famille des chalcones ( $\lambda_{ex} = 488$  nm).

Dans ces conditions, certains composés (**109** et **121** notamment) n'émettent quasiment aucune fluorescence, ce qui correspond souvent aux observations faites des poudres sous lampe UV (365 nm). En revanche, les autres fluorophores présentent

des émissions plus ou moins intenses, avec des maximums d'émission allant de 586 nm à 652 nm. Pour analyser plus finement ces émissions, certains composés ont donc été analysés au fluorimètre (courbes d'émission données en Annexes, voir section 141, p. 250). Les valeurs de rendements quantiques de fluorescence à l'état solide, des maximums d'émission sont présentées dans le tableau ci-dessous (Figure 119).

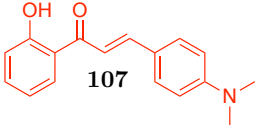
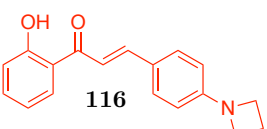
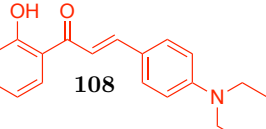
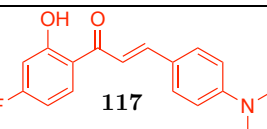
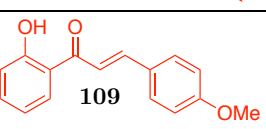
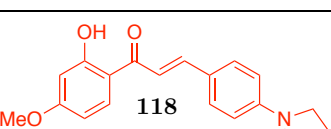
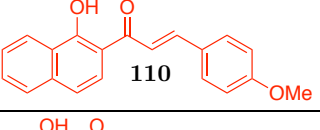
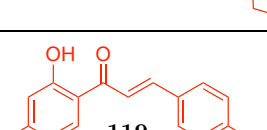
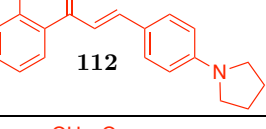
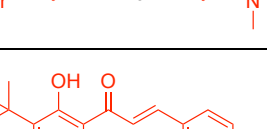
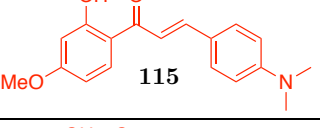
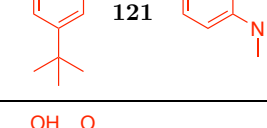
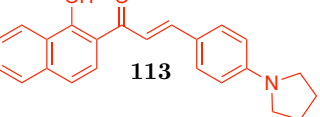
	$\Phi$ (%)	$\lambda_{em}$ (nm)		$\Phi$ (%)	$\lambda_{em}$ (nm)
	5	662		7	654
	15	658		9	655
	0	/		12	691
	< 1	632		7	677
	25	670		< 1	710
	36	670		8	670
	10	700			

FIGURE 119 – Rendements quantiques de fluorescence et maximum d'émission de certains composés de la famille des chalcones.

Il est assez ardu d'essayer de rationaliser les valeurs obtenus, car l'arrangement des molécules à l'état solide, dont dépends l'émission, est relativement empirique. La présence de groupements *tert*-butyles, très encombrant, favorise d'ordinaire la fluorescence à l'état solide par un éloignement des molécules entre elles, limitant alors les interactions intermoléculaires souvent responsable d'une extinction de la fluorescence. Mais ici, les deux composés portant un (**114**) ou deux (**121**) groupements *tert*-butyle(s) possèdent des émissions quasi négligeables. L'extension du système en utilisant un noyau naphtyle semble lui favoriser une émission décalée vers le rouge pour le composé **113**

tout en conservant un rendement quantique correct (10 %). Le changement de groupement donneur dialkylaniline par des dérivés méthoxylés (**109** et **110**) éteint en revanche quasiment complètement la fluorescence, montrant la nécessité de l'atome d'azote dans ce processus. L'ajout d'un atome d'halogène sur l'unité acétophénone permet de décaler les émissions vers le rouge (composés **117**, **119** et **122**), ces derniers présentant tous un maximum d'émission dépassant les 655 nm, au prix de rendements quantiques modestes (7 ou 8 %). La présence d'un cycle sur l'aniline (notamment pyrrolidine pour les composés **112**, **113** et **118**) semble favoriser grandement la fluorescence, avec des maximums d'émission assez décalés vers le rouge et avec des rendements quantiques supérieurs à 10 %. Le composé **115**, avec un groupement méthoxy sur l'unité acétophénone présente un bon rendement quantique de 36 % pour une émission à 670 nm.

Malgré ces résultats encourageant, une certaine déception est apparue après la mesure de ces données. En effet, les études de la littérature présentent des valeurs de rendements quantiques en solide plus élevées, approchant les 50 % par exemple pour le composé **112**.<sup>[434]</sup> Cette différence peut s'expliquer par la grande marge d'erreur présente lors d'une telle mesure (en général on parle d'une erreur moyenne de 5 %). Cependant, la différence est ici de plus de 20 %, et elle se fait toujours à notre désavantage pour les autres composés déjà décrits. Il semble donc qu'une différence au niveau de l'appareillage, des méthodes de corrections des spectres ou des calculs de rendements entraînent ces différences. Ces valeurs permettent toutefois de comparer les fluorophores entre eux, ayant tous été analysés dans les mêmes conditions. Un tableau récapitulatif présente les différents fluorophores, classés par rendement quantique et maximums d'émission (Figure 120).

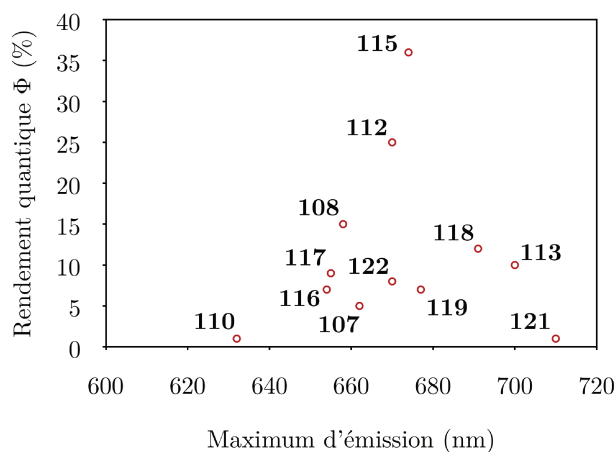


FIGURE 120 – Tableau de comparaison des fluorophores chalcones, classés en fonction de leur rendements quantiques  $\Phi$  et de leur maximum d'émission  $\lambda_{ex}$ .

Malgré des performances en deçà des valeurs rapportées dans la littérature, nous sommes tout de même en possession de (nouveaux) composés **ESIPT** approchant les 700 nm en émission, avec des rendements quantiques suffisants pour envisager une incorporation dans des sondes. Néanmoins, un paramètre pourrait poser problème : la solubilité de ces produits. En effet, le cahier des charges pour l'émission est respecté mais ces nouvelles cibles doivent toujours conserver le critère d'insolubilité pour obtenir une technologie viable. Sans précipitation on risque évidemment une diffusion du signal mais peut-être même une absence de ce signal. Ces dérivées de chalcones sont des molécules présentant un effet **AIE** intense : elles ne fluorescent quasiment pas lorsqu'elles sont solubilisées.<sup>[200,433]</sup> En absence de précipité, il serait donc logique de ne pas observer de fluorescence. Cette inquiétude au niveau de la solubilité naît d'observations expérimentales : ces chalcones sont très solubles dans les solvants apolaires comme le dichlorométhane (DCM) (contrairement à l'**ELF-97**) et partiellement dans les solvants polaires tel le méthanol. Même si la solubilité semble très faible lorsque l'on place un peu d'un fluorophore dans l'eau, cela pourrait poser problème si le fluorophore est peu à peu relargué dans le milieu aqueux, additionné à la faible concentration de travail, il est possible que cela empêche la précipitation d'avoir lieu. Pour ces raisons, une nouvelle gamme de composés a été envisagée.

### III.2.3 La famille Akutagawa

Cette famille de composés a également été identifiée lors de mon stage bibliographique de M2 et est issue d'un papier publié en 2014 par l'équipe du Pr Akutagawa. La structure de cette famille de quatre composés se rapproche très fortement de la structure paraissant optimale pour obtenir des fluorophores **ESIPT** rouges performants (Figure 121). On retrouve ainsi un phénol, substitué par deux groupements fortement électroattracteurs (benzothiazoles) au niveau des positions *ortho*, tous deux accepteurs de liaisons hydrogène pour le mécanisme d'**ESIPT**. La variation s'observe au niveau de la position *para*, avec la présence d'un groupement électrodonneur : méthoxy, éthoxy, propoxy ou butoxy. À l'état solide, les quatre présentent une intense émission fluorescente, rouge pour les deux premiers et orange pour les deux derniers. Ces différences de couleur d'émission sont expliquées par une rationalisation des arrangements moléculaires des différents composés, obtenus par les structures aux rayons X. Le composé méthoxy présente un maximum d'émission à 647 nm pour un rendement quantique de 17 %, 633 nm et 32 % pour l'analogue éthoxy.

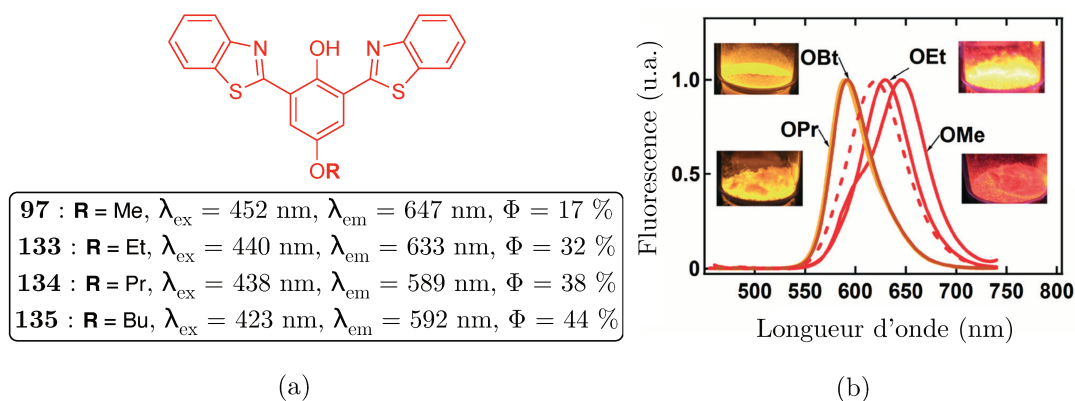


FIGURE 121 – Illustration (a) : des fluorophores ESIPT développés par l'équipe du Pr Akutagawa et (b) de leurs émissions à l'état solide.<sup>[439]</sup>

L'intérêt porté à cette famille, au delà des émissions dans le rouge, vient d'un détail observé durant la synthèse de l'analogue méthoxy : la solubilité du produit final pose en effet problème pour la réalisation de spectres RMN. Il est nécessaire d'ajouter du TFA pour permettre une faible solubilité dans le DMSO. Cette insolubilité, couplée aux propriétés spectrales intéressantes pourrait donc permettre de remplir toutes les conditions requises pour une alternative viable. La synthèse est globalement décrite et a pu être effectuée avec succès par Léa Mélin lors de son stage M2 sous ma responsabilité. L'analogue méthoxy a été choisi comme cible, pour son émission la plus décalée vers le rouge, et la voie de synthèse suivie pour l'obtenir est décrite dans la Figure 122 ci-dessous. Une diformylation du 4-méthoxyphénol constitue la première étape, suivie de la formation des unités benzothiazoles par couplage avec le 2-aminothiophénol.

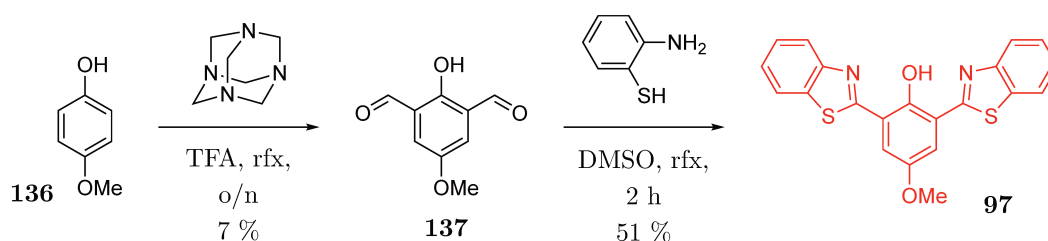


FIGURE 122 – Voie de synthèse pour l'obtention du composé **97**.

Le produit final est une poudre verte, visuellement légèrement fluorescente rouge sous lampe UV (365 nm). Les spectres d'émission/excitation ont été mesurés et le rendement quantique à l'état solide déterminé. Un maximum d'émission à 660 nm est observé, avec un rendement quantique de 3 %. À nouveau, cette valeur est plutôt faible mais légèrement supérieure à celle du fluorophore "Stefani". La solubilité, ou plutôt l'insolubilité, est intéressante ici aussi, car le produit n'est, en effet, pas soluble dans les solvants organiques (dont le DMSO), ainsi que dans l'eau.

Pour plusieurs raisons, des variantes de cette structure ont été envisagées. La principale correspond aux échecs des premiers couplages avec ce fluorophore, en utilisant les conditions appliquées d'ordinaire à l'**ELF-97**. Sans être démontré, un encombrement stérique trop important du phénol a été avancé. De plus, tester des variations structurales pourrait amener un nouveau candidat avec une émission plus intense ou plus décalée vers le rouge. Dans cette optique, une stratégie d'éloignement d'un des groupes benzothiazoles a été tenté. Pour conserver l'effet électroattracteur supposé bénéfique pour la fluorescence, l'ajout d'un pont éthylène a été choisi. Le phénomène **ESIPT** aura alors normalement lieu avec le benzothiazole non touché, tandis que le second exercera toujours son côté électroattracteur. L'extension du système conjugué pourrait également participer à un décalage de l'émission vers le rouge.

La synthèse est par ailleurs simplifiée car aucune double formylation n'est à réaliser, comme c'était le cas pour la première version (Figure 123). Cette étape était limitante pour la synthèse du composé **97** avec un rendement maximal obtenu de 7 %. Ici, une première formylation du 4-méthoxyphénol est effectuée, suivie par la formation du benzothiazole par réaction avec le 2-aminothiophénol (ce rendement de 24 % pourrait facilement être amélioré). La deuxième formylation est ici très efficace (rendement de 99 %) et une réaction de Knoevenagel avec le 2-benzothiazol-acétonitrile permet d'obtenir le composé final **142**.

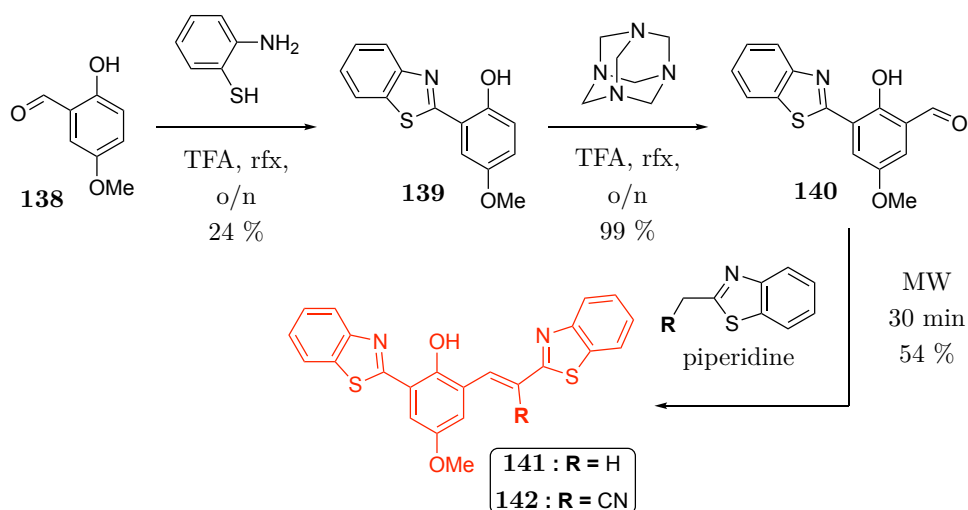


FIGURE 123 – Voie de synthèse pour l'obtention de variantes structurales au fluorophore **97**, présentant un accès plus important au phénol.

Le choix de travailler avec le 2-benzothiazolacétonitrile a été fait pour tenter de renforcer davantage l'effet électroattracteur. La synthèse a été également effectuée par Léa Mélin et après la réaction finale, un produit a précipité (comme c'est d'habitude le

cas pour ce protocole) et a pu être isolé. Il s'agit alors d'une poudre jaune, fluorescente rouge sous lampe UV (365 nm). Ces indices laissent donc penser à l'obtention du composé attendu. Malheureusement, aucun spectre RMN n'a pu être obtenu, quelque soit le solvant utilisé, et même en présence de TFA. Cette impossible caractérisation n'est pas pratique mais reste un bon signe pour le critère d'insolubilité maximale. Une étude spectroscopique de ce composé a été effectuée récemment par Alix Tordo et a montré un maximum d'excitation à 700 nm pour un rendement quantique à l'état solide de 7 %. On a donc obtenu une nouvelle structure, avec une émission d'une part plus intense et d'autre part davantage vers le NIR, tout en conservant (voire accentuant) le côté insoluble.

Toutes ces structures présentent des potentiels variés en vue d'une intégration dans une sonde à activité enzymatique. Toutefois, aucun fluorophore ne dépasse les 700 nm en émission. La fluorescence obtenue reste donc dans le rouge en se rapprochant du NIR, mais sans l'atteindre. L'obtention de composés ESIPT émettant au-delà de 700 nm serait donc un objectif important, notamment pour minimiser les phénomènes de diffusion et d'autofluorescence.



### III.3 Projet exploratoire de développement d'un fluorophore NIR I

#### III.3.1 Un faux espoir

Récemment, une étude a décrit un nouvelle structure de fluorophore présentant un effet **ESIPT**, annonçant une émission maximum à 738 nm avec un rendement quantique de 9 % à l'état solide. Intéressés par cette structure, nous avons voulu la reproduire pour confirmer cette émission prometteuse. La synthèse nécessite un intermédiaire réactionnel déjà disponible au laboratoire car utilisé pour la synthèse du composé **97** (première cible de la famille Akutagawa) : le 2,6-diformyl-4-méthoxyphénol. Une seule étape de couplage avec la 4-thiométhoxyaniline est nécessaire pour obtenir la molécule cible (Figure 125).

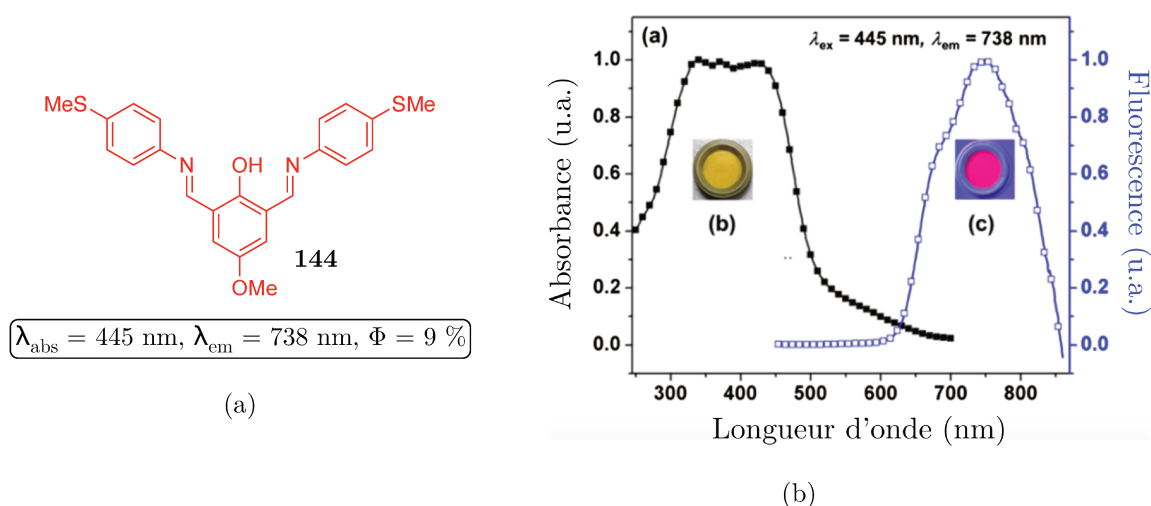


FIGURE 124 – Illustration (a) de la cible moléculaire de l'équipe du Pr Pradeep et de sa voie d'accès synthétique, et (b) de son émission à l'état solide. [440]

La molécule a pu être obtenue sous forme de poudre et de cristaux. Très faiblement fluorescente sous lampe UV (365 nm), l'hypothèse alors formulée était le manque de sensibilité de nos yeux pour des longueurs d'onde supérieures à 700 nm ou bien la longueur d'onde d'excitation non optimale (lampe UV à 365 nm). Malheureusement, après analyse des spectres et du rendement quantique de fluorescence à l'état solide au fluorimètre, les résultats obtenus sont bien différents de ceux décrits. En effet, la très faible émission observée n'a pas permis la détermination des valeurs recherchées, longueur d'onde maximum d'émission et rendement quantique. Cette cible a donc été mise

de côté sans avoir de réelle explication sur ces différences. Une différence d'arrangement des molécules entre elles à l'état solide entre leur synthèse et la notre pourrait être avancée. L'obtention de la structure aux rayons X de notre échantillon pour examiner les possibles différences pourrait apporter un éclairage sur la question.

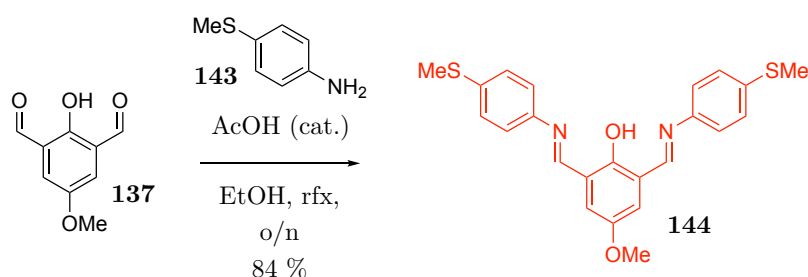


FIGURE 125 – Voie de synthèse du fluorophore 144.

Les autres rares composés présentant une émission **ESIPT** au-delà des 700 nm ne le font qu'en solution (aucune valeur à l'état solide n'est, à notre connaissance, décrite). Pour ne citer qu'un exemple, l'équipe du Pr Pi Tai Chou a réussi, en utilisant un groupement aniline comme donneur de liaisons hydrogène, à obtenir des émissions jusqu'à 770 nm. Toutefois, les rendements quantiques (en solution) obtenus sont très faibles, si ce n'est infimes (moins de 0,01 %).<sup>[441]</sup> Il faudrait donc disposer d'une nouvelle structure permettant d'obtenir une meilleure intensité d'émission à ces longueurs d'onde, mais également que cette émission soit présente à l'état solide.

### III.3.2 Un nouvel espoir

Le groupement hydroxyindénone est connu pour présenter un mécanisme d'**ESIPT** entre le phenol donneur et le carbonyle accepteur. Plusieurs composés incorporant ce motif présentent une émission fluorescente à l'état solide grâce à ce phénomène, on peut par exemple citer l'hydroxyfluorénone, connu pour présenter une telle fluorescence. En ajoutant un cycle aromatique supplémentaire (hydroxybenzofluorénone), on peut modifier partiellement ses propriétés spectroscopiques et se décaler vers le rouge, voire obtenir une émission double : depuis la forme énol et cétone simultanément.<sup>[442,443]</sup> Cependant une publication récente a attiré notre attention. Dans celle-ci, une équipe s'est intéressée à cette structure hydroxybenzofluorénone, pour étudier l'importance du placement du cycle benzénique supplémentaire ainsi que de sa substitution par divers groupements.<sup>[444]</sup> Cette étude est réalisée uniquement par des outils théoriques mais les émissions modélisées ont montré des valeurs dépassant les 800, voire 900 nm en

maximum d'émission. Pour cela, une position du cycle a été retenue (Figure 126a). Celle-ci n'est pas surprenante car elle respecte la théorie du plan nodal, utilisée pour prédire un décalage vers le rouge d'une émission **ESIPT** dont le système aromatique est étendu "à l'opposé" des groupements réalisant le transfert de protons.<sup>[445]</sup>

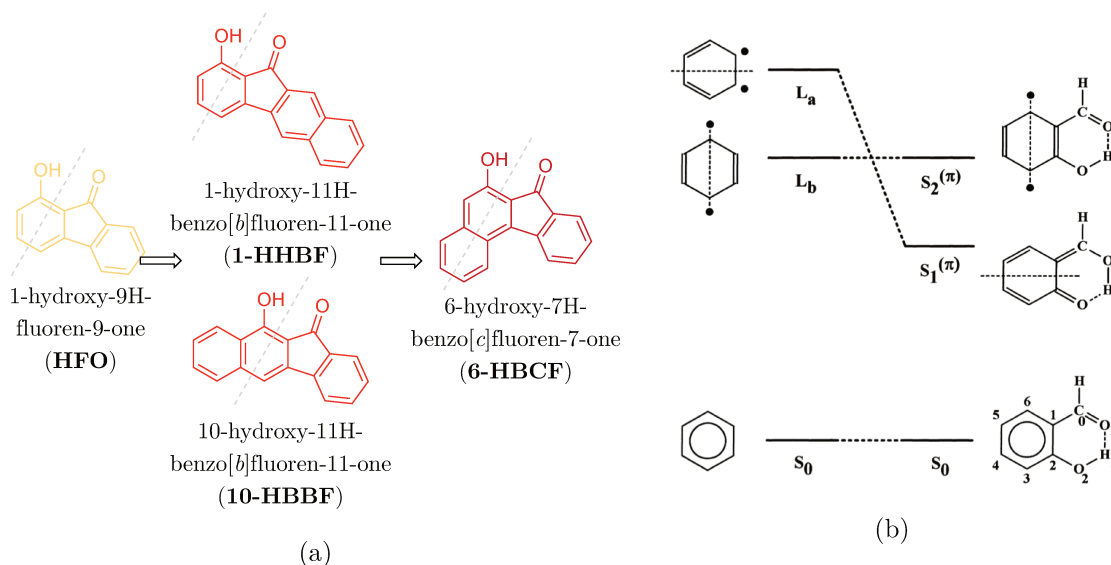


FIGURE 126 – Illustration (a) des composés de la famille des hydroxyfluorénones, dont l'émission se déplace vers le rouge par ajout d'un cycle benzénique, et (b) du schéma de stabilisation de la forme cétone par orientation de la conjugaison selon le plan nodal.<sup>[445]</sup> Appliqué aux hydroxyfluorénones, il expliquerait le décalage supplémentaire pour la cible moléculaire (6-HBCF).<sup>[444]</sup>

Cette famille de composés n'ayant jamais été synthétisée, une voie de synthèse a donc dû être créée. Nous avons choisi de nous intéresser au composé non substitué dans un premier temps, pour des raisons de simplicité. En se basant sur certaines voies de synthèse de l'hydroxyfluorénone, une retrosynthèse a été proposée (Figure 127). Les deux premières étapes sont décrites dans des études récentes et n'ont pas posé de problèmes particuliers. La troisième étape est également décrite récemment, pour des composés très proches (sans le phényl supplémentaire), celle-ci a également très bien fonctionné. La dernière étape de cyclisation a toutefois été plus délicate. Les conditions réactionnelles sont très dures : le composé est directement placé dans l'acide sulfurique concentré jouant alors le rôle de solvant. Les deux premiers essais sur petites quantités n'ont pas permis d'isoler le produit désiré. La pureté du produit de départ n'était peut-être pas suffisante pour supporter ces conditions opératoires. Plus récemment, un nouvel essai a été réalisé par Alix Tordo, en purifiant davantage l'intermédiaire **149**, ce qui a permis cette-fois d'obtenir le produit désiré.

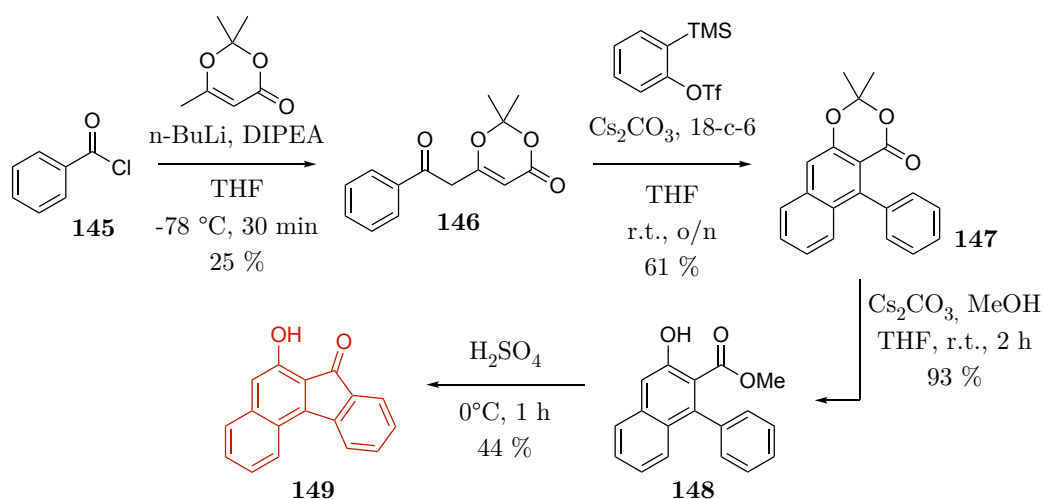


FIGURE 127 – Voie de synthèse développée pour la synthèse du fluorophore 149.

Le composé est une poudre rouge ne présentant pas d'émission visible lorsqu'elle est placée sous lampe UV (365 nm). Ce n'est, à première vue, pas une mauvaise nouvelle car les émissions prédites dépassent les 800 nm, zone où l'œil humain n'est plus sensible. Pour analyser plus finement cette possible fluorescence, le composé a été une nouvelle fois analysé au fluorimètre. Malheureusement aucune fluorescence n'a pu être détectée dans les conditions testées (poudre dans une sphère d'intégration). Cette absence peut s'expliquer par plusieurs raisons. La plus simple étant que le composé n'est peut-être pas fluorescent : les émissions calculées restent théoriques et ne sont jamais garanties dans les conditions expérimentales. De plus, les calculs n'ont pas été effectués sur le fluorophore à l'état solide. Il est, en effet, très compliqué de prévoir l'arrangement spatial des molécules dans cet état, et donc aussi dur de prédire les interactions moléculaires qui pourraient empêcher les désexcitations radiatives de se produire. Enfin, l'explication est éventuellement matérielle : les deux fluorimètres à disposition du laboratoire sont optimisés pour les zones du visible et du NIR II respectivement. Ils ne sont ainsi pas du tout adaptés pour la zone 800-1000 nm où l'émission pourrait se trouver, et ne serait pas détectable le cas échéant. Ce souci de détection est renforcé par la probable faible intensité du signal attendu, un décalage vers le rouge s'accompagne le plus souvent d'une perte de rendement quantique. Le faible écart énergétique entre état excité et fondamental permettant à d'autres processus de désexcitation non radiatifs de se produire. Des études plus poussées sont donc nécessaires pour confirmer cette absence, ou non, de fluorescence.

Nous ne disposons donc toujours pas dans l'équipe de fluorophores compatibles émettant dans la fenêtre NIR, au-delà de 700 nm. Par compatible, on entend un fluo-

rophore **ESIPT** pour l'extinction facile et complète de l'émission un fois incorporé dans une sonde, ainsi que les grands décalages de Stokes atteignables. Ce fluorophore doit également présenter un seuil de solubilité aussi faible que possible pour conserver voire renforcer le côté précipitant, nécessaire à la rétention efficace du signal. Enfin, l'émission fluorescente se doit d'être suffisamment intense pour permettre la détection avec une résolution performante. Certains candidats obtenus, présentent tout de même des émissions **ESIPT** dans le rouge lointain avec des propriétés de solubilités parfois très intéressantes. Il serait donc séduisant d'étudier leur intégration dans des sondes à activités enzymatiques.

## III.4 Tentative d'incorporation dans des sondes pour activités enzymatiques

### III.4.1 La méthode traditionnelle

La procédure classique de couplage d'un fluorophore, donc l'ELF-97 jusqu'à maintenant, implique l'activation au triphosgène du phénol (fluorophore) suivie par l'ajout de l'amine pour compléter la formation du carbamate tertiaire. Ces conditions sont plutôt atypiques, compte-tenu du fait que la procédure majoritairement utilisée dans la littérature est inverse : activation de l'amine puis ajout du phénol. Ces conditions avaient logiquement été envisagées dans un premier temps, notamment par Maxime Prost durant sa thèse. Dans ce cas, aucun couplage n'a jamais pu être observé, à cause de la formation d'un sous-produit indésirable. Une fois l'amine activée par un agent carbonylant (type *1,1'*-carbonyl-di-imidazole (CDI), *1,1'*-carbonyl-di-(1,2,4-triazole) (CDT), 4-nitrophénylchloroformiate ou encore triphosgène), la très forte préorganisation due à l'espaceur permet en effet une cyclisation intramoléculaire par attaque nucléophile du carbamate secondaire déjà présent sur le carbonyle nouvellement ajouté (Figure 129). L'"urée" ainsi formée ne permet plus le couplage avec le fluorophore. Ce sous-produit a pu être détecté et isolé pour confirmer l'explication.

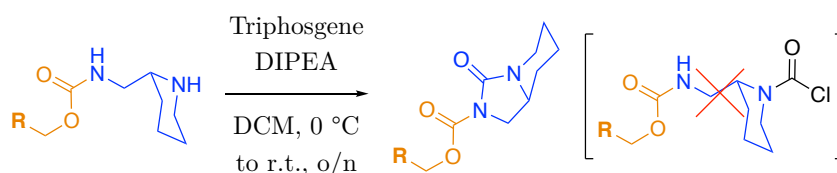


FIGURE 128 – Réaction parasite menant à la formation de l'"urée" cyclique au lieu du chlorure de carbamoyle.

L'activation du fluorophore est alors une bonne alternative, malgré l'utilisation indispensable du triphosgène. Les autres agents carbonylants ne permettant pas l'activation de l'ELF-97, probablement à cause de sa forte insolubilité abaissant fortement sa réactivité.

En utilisant ce protocole développé pour l'ELF-97, plusieurs fluorophores nouvellement obtenus ont tenté d'être activés. Les composés **107** et **97** ont notamment été choisis comme représentants modèles de leur famille respectives (chalcones et "Akutagawa"). Sur les différents essais effectués, aucun produit d'activation (chloroformiate)

n'a pu être isolé ou même détecté malgré des changements de couleurs observables indiquant une certaine réactivité. L'ajout d'amine pour tenter un couplage a tout de même été tenté mais sans succès. Après réaction, un mélange complexe de produits est obtenu, dont aucun n'est réellement identifiable (par RMN ou MS), même après colonne chromatographique. Il est ainsi compliqué de comprendre les raisons de l'absence de produit désiré.

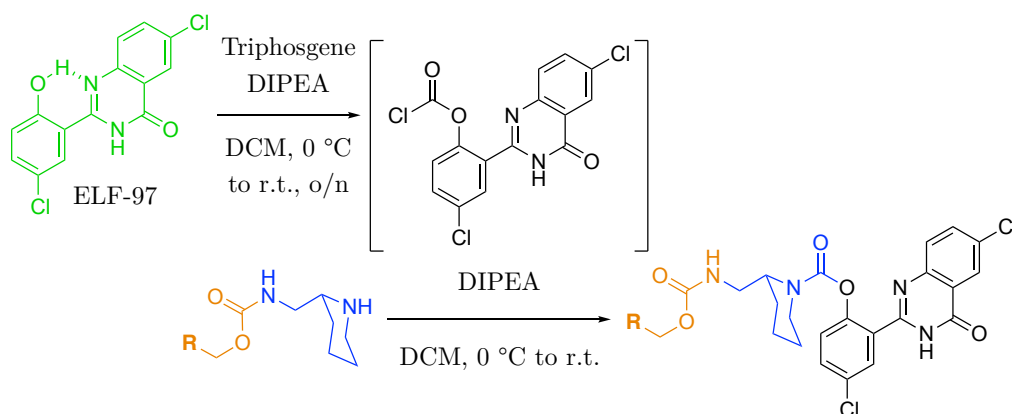


FIGURE 129 – Protocole usuel pour l'activation puis le couplage de l'ELF-97.

Quelques explications peuvent être avancées pour tenter de comprendre cet échec synthétique. La solubilité du fluorophore engagé peut jouer un rôle important. Le composé **107**, contrairement à l'ELF-97, est soluble dans le DCM, ce dernier étant le solvant réactionnel de la réaction de chloroformylation. On peut alors penser à une possible réaction croisée : un composé **107** chloroformylé pourrait réagir avec un analogue non-activé, formant alors un carbonate (Figure 130).

Au contraire, le composé **97** semble encore moins soluble que l'ELF-97. Cette intense insolubilité pourrait empêcher une réactivité suffisante pour l'activation. Les groupes présents sur ces nouvelles cibles peuvent aussi être à l'origine du problème. Comme évoqué précédemment, les unités benzothiazoles, de taille non-négligeable, peuvent créer une gêne stérique empêchant l'activation ou le couplage. La présence d'une amine tertiaire sur le composé **107** pourrait aussi être problématique.

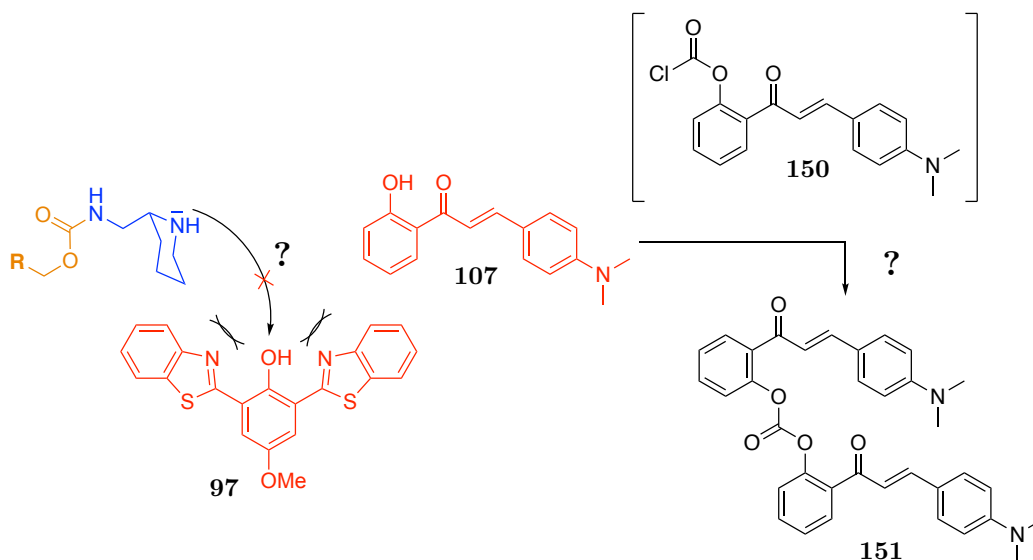


FIGURE 130 – Possibles raisons expliquant l'absence de couplage avec d'autres fluorophores que l'ELF-97.

### III.4.2 Autres solutions et nouvelles possibilités

Pour étudier les propriétés de rétention du signal, une comparaison est parfois effectuée avec des sondes possédant le même substrat déclencheur, mais libérant un fluorophore hydrosoluble. La 4-méthylumbelliférone (4-MU) est souvent employée dans ce cas pour son extinction efficace de fluorescence une fois couplée par la fonction phénol. Pour intégrer un tel fluorophore dans une sonde, un protocole différent de l'ELF-97 est utilisé. L'utilisation du triphosgène est toujours présente mais s'effectue en milieu biphasique soude/DCM (Figure 131). Une possible interprétation serait l'extraction en phase organique du chloroformiate pour l'empêcher de réagir avec le fluorophore toujours présent en phase aqueuse basique (sous forme de phénolate). Ces conditions ont donc été testées récemment avec un candidat soluble, du moins en milieu organique, la chalcone **107**.

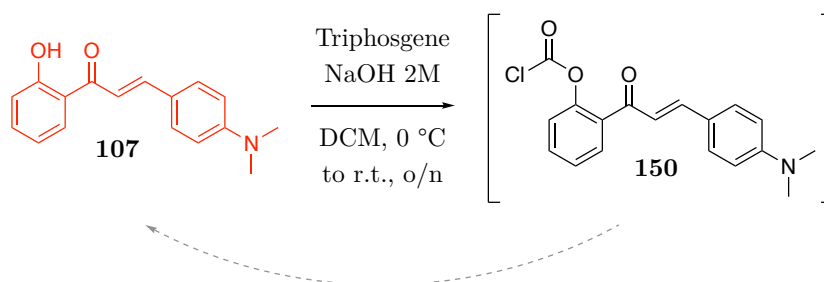


FIGURE 131 – Conditions expérimentales alternatives pour l'activation de fluorophore.



Lors de cet essai, de nombreux changements de couleurs ont été observés, attestant une certaine réactivité. Un suivi réactionnel par MS et RMN a été effectué sans pouvoir conclure sur l'apparition du produit. Une tentative d'isolation a laissé progressivement apparaître un précipité rouge lors de l'évaporation. Celui-ci présente une fluorescence rouge et a été identifié comme étant le produit de départ **107**. Sans pouvoir l'affirmer, il semble que le chloroformiate puisse se former dans ces conditions, mais qu'une isolation est rendue impossible par l'instabilité d'un tel composé (comme c'est le cas pour l'ELF-97). Il faudrait donc retenter la manipulation en rajoutant l'amine *in situ*, sans isoler l'intermédiaire activé. Toutefois, cette expérience n'a pas été tentée car une autre stratégie a fonctionné dans le même temps.

Mise au point par Quentin Glenadel, en post-doctorat dans l'équipe, elle permet l'activation de l'amine à la place du fluorophore. Pour ce faire, il faut pouvoir empêcher la cyclisation intramoléculaire en urée de se faire. Il faut donc inhiber totalement la faible nucléophilie de l'azote du carbamate secondaire, suffisante pour réaliser l'attaque nucléophile grâce à la forte préorganisation. Pour cela, il s'est inspiré des travaux que j'avais effectués avec Corentin Gondrand lors de mon stage de M2 (voir section 3.2.3, p. 56). Nous avons, à l'époque, comparé les unités carbamate secondaire et tertiaire entre les deux espaceurs en tandem, pour tenter d'améliorer les cinétiques d'effondrement et la stabilité de la sonde. L'idée nouvelle est de profiter du carbamate tertiaire ne présentant plus aucune nucléophilie pour tenter d'activer l'amine. Cette stratégie a donc fonctionné puisqu'une preuve de concept a pu être mise en œuvre avec succès.

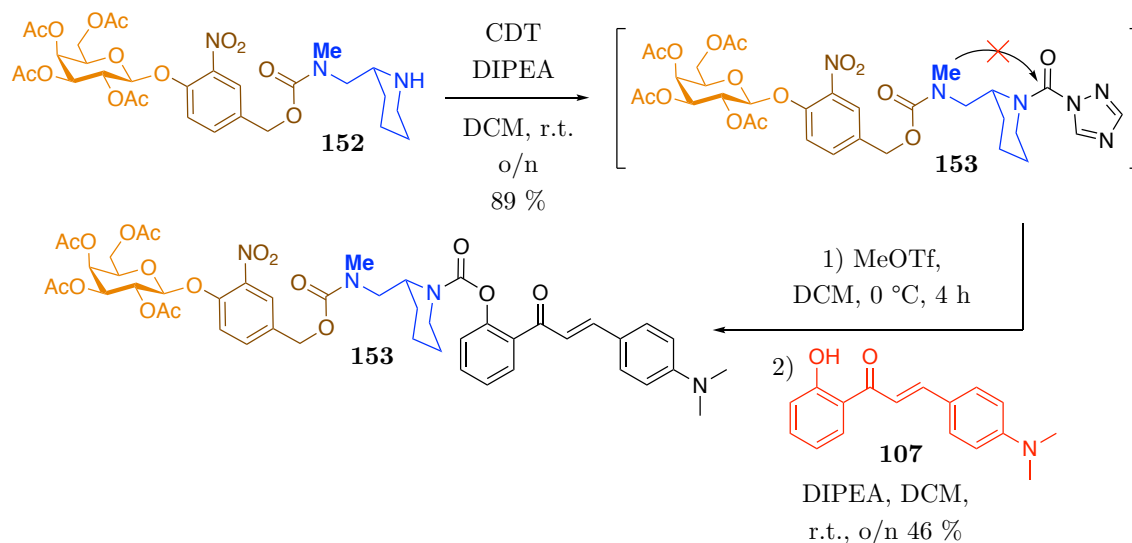


FIGURE 132 – Illustration de la nouvelle stratégie d'activation développée par Quentin Glenadel.

Grâce à cette méthodologie, on peut imaginer coupler de nombreux fluorophores différents sur un même précurseur de sonde réalisé en plus grosses quantités, et ainsi vérifier les propriétés réelles des nouveaux candidats en situations concrètes. Ce projet, toujours en cours, est actuellement entre les mains d'Alix Tordo. Des structures dérivées de l'HPQ, ou s'inspirant d'autres fluorophores ES IPT sont par ailleurs à l'étude. L'optimisation du couplage avec le reste des sondes devrait permettre, très prochainement, l'obtention de sondes alternatives à l'ELF-97. Leurs applications dans des contextes biologiques variés constituera la suite logique de l'étude, notamment *in vivo* grâce à notre collaboration avec l'équipe grenobloise.

## III.5 Conclusions et perspectives du chapitre III

L'**ELF-97** est un fluorophore très performant pour de nombreuses applications. Cependant, ces majeurs défauts (excitation **UV** et émission dans le vert) peuvent gêner les expériences *in cellulo* (toxicité des rayons **UV**) voire empêcher une application *in vivo* à cause du manque de pénétration des rayons lumineux de faibles longueurs d'onde. L'utilisation de fluorophores rouges ou **NIR** pour ces problématiques n'est pas récente et de nombreux candidats sont d'ores et déjà décrits dans la littérature. C'est un peu moins vrai si on se limite aux fluorophores **NIR** dont l'émission provient d'un mécanisme **ESIPT**, propriété essentielle dans notre technologie de sonde. Il faut, de plus, qu'ils conservent une forte insolubilité en milieu aqueux afin de précipiter sur le lieu de l'activité enzymatique, assurant alors la rétention du signal fluorescent.

Deux projets naissent ainsi de ces constats : le développement d'analogues à l'**ELF-97**, pour leurs propriétés d'émission ou d'insolubilité, et la mise au point d'une stratégie efficace d'incorporation de ces cibles dans des sondes moléculaires. En parallèle des autres projets décrits dans cette thèse, la synthèse de cibles décrites dans la littérature, ou bien de nouvelles structures inspirées de ces cibles, a été entreprise. Parmi elles, plusieurs familles de composés se sont révélées potentiellement intéressantes pour différentes raisons. La famille des chalcones tout d'abord, présentent une accessibilité synthétique très avantageuse : de nombreux variants peuvent être obtenus et testés dans un temps réduit, laissant la place à l'empirisme pour l'obtention des meilleurs candidats. C'est par ailleurs dans cette famille que les fluorophores avec les émissions les plus décalées vers le rouge ont été obtenus. L'autre famille, basée sur une étude du Pr Akutagawa, présente quant à elle des candidats dont les émissions sont tout de même relativement décalées vers le rouge, mais surtout dont l'insolubilité semble considérable. D'autres structures ont été testées, mais n'ont pas permis l'obtention de cibles intéressantes.

Une étude répétée de la littérature fait régulièrement apparaître de nouvelles cibles, pouvant parfois prétendre à de meilleures propriétés que celles actuellement possédées dans l'équipe. Toutefois, avoir de tels fluorophores n'est utile que s'il est possible de les incorporer dans des sondes. Les tentatives effectuées durant le temps de cette thèse n'ont pas apporté les résultats attendus car aucune sonde n'a pu être synthétisée. Certaines pistes ont tout de même permis un certain espoir. Plus récemment, une sonde  **$\beta$ -gal** incorporant un fluorophore de la famille des chalcones a même pu être obtenue

dans l'équipe, en profitant de travaux effectués sur l'optimisation des espaceurs de type PABA. Cette première réussite ouvre alors la voie à d'autres structures pour pouvoir tester les fluorophores en conditions réelles. En effet, l'apparition de signal fluorescent dépend de nombreux facteurs empiriques, et, pour l'instant, cette nouvelle sonde n'a pas permis la détection de l'activité  $\beta$ -gal, du moins *in vitro*.

Les perspectives de travail constituent un projet de thèse dans l'équipe, actuellement poursuivi par Alix Tordo. L'optimisation du couplage de ces fluorophores devrait permettre l'obtention de nombreux variants et la possibilité d'obtenir une sonde fonctionnelle, relargant un fluorophore émettant dans le rouge, est toute proche. L'application de ces sondes dans les multiples applications déjà effectuées pour l'ELF-97 permettra de juger de l'importance du développement de ces nouveaux variants. Il n'y a cependant pas de doute sur leur absolue nécessité pour continuer les prémices d'application de nos sondes *in vivo*, rendue possible par la collaboration avec une équipe spécialiste de l'imagerie murine.



# Conclusion générale



# Conclusion générale

Nous avons cherché durant ces trois années de thèse, et presque quatre dans l'équipe, à développer une technologie de sondes fluorogènes pour activités enzymatiques, basée sur le relargage original de fluorophores précipitants. Dans ce manuscrit est rassemblé une partie des résultats obtenus pendant ces travaux de recherche, visant principalement à diversifier les activités ciblées, ainsi qu'à améliorer les outils moléculaires employés dans ces sondes. Grâce à certains succès de prédécesseurs dans l'équipe (Maxime Prost et Corentin Gondrand principalement), les perspectives de développement étaient innombrables. Loin d'en avoir fait le tour, ces travaux en ont probablement ouvert encore davantage.

Au cours de ces recherches, nous avons pu contribuer au développement des trois principales composantes des sondes produites dans l'équipe du Pr Hasserodt. Le fluorophore utilisé est le cœur de la technologie, c'est de lui que vont dépendre les propriétés du signal observé. La partie substrat n'est pas moins importante car c'est elle qui apporte la sélectivité du système rapporteur. Sans cette dernière, il n'est pas possible d'espérer obtenir un outil performant, à cause du signal non-spécifique. Enfin, la partie espaceur permet de lier ces deux premières composantes, assurant la stabilité de l'édifice complet et une reconnaissance enzymatique optimale. Il assure la traduction de la réaction chimique de l'enzyme en un signal fluorescent observable, par un mécanisme d'auto-effondrement qui a nécessité plusieurs années de mises au point.

Concernant la partie substrat, la famille des sondes pour glycosidases a tout d'abord été étoffée. L'optimisation de la sonde modèle pour la  $\beta$ -galactosidase a permis d'appréhender le potentiel de la technologie. Les résultats concluants sont variés en terme de robustesse et d'applicabilité à divers systèmes, ce qui nous a poussé à exemplifier davantage cette famille. Une sonde pour la  $\beta$ -glucuronidase a ainsi été synthétisée et validée *in vitro*, des applications biologiques sont en cours de mises au point. Un



système de sonde à double substrat a également été développé, combinant la sélectivité pour deux enzymes : la  $\alpha$ -glucosidase et la  $\beta$ -glucosidase. Sans avoir d'application concrète actuellement, ce concept pourrait être étendu à d'autres couples d'enzymes dont la détection simultanée serait nécessaire. Une nouvelle génération de sonde a vu le jour avec la première sonde pour la détection d'activité  $\beta$ -lactamase. Celle-ci montre des résultats encourageants et sera potentiellement un outil de choix pour la détection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Appliquée à la biologie moléculaire, cette nouvelle technologie fait aussi l'objet d'une collaboration en cours avec une équipe de l'Université d'Osaka pour le suivi actif de protéines. Enfin, d'autres familles d'enzyme pourraient prochainement être imaginées. Une sonde pour la DT-diaphorase — une réductase surexprimée dans certains cancers — a récemment montré des résultats encourageants *in cellulo*.

Un travail sur la partie signalante a également été entrepris. Les premières générations de sondes n'utilisaient en effet qu'un seul fluorophore (ou ses versions non chlorées) : l'ELF-97. Celui-ci possède des propriétés physico-chimiques et spectrales très intéressantes pour une utilisation comme marqueur fluorescent. Émission ES IPT intense, grand décalage de Stokes, photostabilité et intense insolubilité sont des exemples de ces caractéristiques particulières. Il souffre toutefois d'une limitation majeure : une excitation dans l'UV et une émission verte, convenant à des applications *in vitro* mais limitant très fortement l'utilisation *in vivo*. De nombreux analogues ont été synthétisés et analysés pour finalement obtenir des cibles moléculaires dont l'émission est décalée vers le rouge, tout en conservant, au maximum, les propriétés de l'ELF-97. Certains composés possèdent ainsi des émissions aux alentours des 700 nm, avec des rendements quantiques avoisinant les 10 %. Malgré quelques tentatives infructueuses, l'incorporation de ces nouveaux fluorophores pose toujours problème. Des avancées synthétiques récentes de l'équipe laissent néanmoins l'espoir d'obtenir prochainement des sondes libérant une gamme de fluorophores variés, ouvrant la voie à certaines applications, du *multiplexing* à l'imagerie d'activités enzymatiques *in vivo*.

Finalement, les problématiques rencontrées lors de ses synthèses ont créé la nécessité de développement ou d'optimisation de nouveaux espaceurs éliminants. Maxime Prost avait développé un espaceur dit tripartite durant sa thèse, précisant que la mise au point d'une synthèse efficace d'obtention restait nécessaire. C'est maintenant chose faite avec une voie synthétique optimisée, qui a permis l'intégration dans certaines sondes, dont une variante de sonde  $\beta$ -lactamase. Un nouvel espaceur, dit méthoxy, a dans un autre

---

temps été élaboré. Initialement prévu pour améliorer les performances de la sonde  $\beta$ -gal dans le cadre de la sénescence cellulaire, il pourrait en fait s'étendre à d'autres sondes. Les performances de cinétiques d'effondrement semblent être grandement améliorées grâce à son incorporation, et tout particulièrement dans un contexte de détection en milieu acide. Enfin, l'ajout d'un groupement alcyne au sein du tandem d'espaceur des sondes glycosidases devrait permettre la fonctionnalisation des sondes finales par chimie "Click". Les possibilités de greffage étant alors nombreuses, cette variation pourrait permettre l'ajout de groupements ciblant pour augmenter la sélectivité (par exemple l'acide folique), ou le couplage avec des biomolécules d'intérêt comme des anticorps.

Cette thèse a donc été l'occasion de toucher à toutes les problématiques de recherche liées aux sondes développées dans l'équipe. Beaucoup de chantiers restent ouverts mais l'idée principale de ces travaux était de montrer la grande versatilité de la technologie. Les nombreux outils maintenant à notre disposition devraient permettre la fine adaptation des nouvelles sondes développées à leur contexte d'application. Pour une même activité enzymatique, on peut ainsi désormais imaginer modifier de nombreux paramètres cruciaux, tels que la solubilité, la sélectivité, le ciblage et donc la répartition spatiale, mais également l'émission fluorescente ou la vitesse d'apparition du signal. Tous ces ajustements seront primordiaux pour pouvoir espérer un jour appliquer ces sondes à l'imagerie moléculaire du corps humain, objectif ultime de la technologie.



# Partie expérimentale



# Partie expérimentale

## General consideration about Chemistry

Available reagents and solvents were purchased (from Sigma-Aldrich Co., Acros Organics, Alfa Aesar, Tokyo Chemical Industries, Fluorochem or Carbosynth) and used without further purification. When required, solvents were dried by thermally activated molecular sieves (3 Å for ethanol, methanol and acetonitrile, 4 Å for others, sieves activated by 24 h at 315 °C) except dichloromethane, toluene and tetrahydrofuran that were obtained by passing commercially available solvents through a column containing activated alumina, followed by degassing with argon.

Analytical *Thin-Layer Chromatography* (TLC) was carried out on Merck 60 F254 precoated silica gel plate (0.2 mm thickness). Visualization was performed using a UV lamp (254 nm or 365 nm) or chemical revelators. Column chromatography was performed using Merck silica gel Si-60 (40–63 µM), Acros activated neutral alumina (Brockmann I, 60 Å, 50–200 µM), Acros activated basic alumina (Brockmann I, 60 Å, 50–200 µM) or Agilent Bond Elute C18 cartridge (20 mL of immobilized phase).

*Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) spectra were acquired at 297 K on a Bruker AVANCE 300 (300 MHz and 75 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively) or a AVANCE 400 (400 MHz and 100 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , respectively). Chemical shifts  $\delta$  are given in ppm, and reported relative to *tetramethylsilane* (TMS) using the residual solvent peak as internal standard.  $^1\text{H}$  NMR patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), multiplet (m), broad (b), or combination such as doublet of doublets (dd). NMR coupling constants  $J$  are reported in Hertz and refer to (H-H) coupling.

Low resolution mass spectra were measured at 297 K, by direct injection of diluted

samples into the mass analyzer of an Agilent Technologies 1260 Infinity LC-MS system running in *Electrospray Ionization* (ESI). HRMS were acquired by the "Centre Commun de Spectrométrie de Masse" of the *Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire* (Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France) with a ESI-QTOF (Bruker Daltonics MicroTOF-Q II)

## General consideration about Biology

### Cell culture

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum, 50 U.mL<sup>-1</sup> penicillin, and 50 µg.mL<sup>-1</sup> streptomycin (Gibco ThermoFisher Scientific.) in a humidified incubator containing 5 % CO<sub>2</sub> in air at 37 °C.

### *In vitro* kinetics

10 mM stock solutions of probes in DMSO were diluted with PBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) to obtain a final concentration of probe in a range between 5 µM and 100 µM; 10 µL aliquots of each of these solutions were added to 80 µL PBS in a 96-well black plate, and heated to 37 °C before adding 10 µL of a solution of enzyme at the indicated concentration. The plate was then incubated at 37 °C and fluorescence was recorded over the course of time by a fluorescence plate reader (EnSpire, Perkin Elmer). Acquisition wavelengths :  $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ . The resulting curves are the mean of triplicates.

Studies of the sensitivity of probes to pH changes were performed by adjusting the pH of the reaction medium by addition of NaOH or HCl in PBS. The fluorescence measurements were then quickly conducted.

Studies of the sensitivity of the  $\beta$ -gal probe **15** to heat variations were carried out by heating a solution of the probe (10 µM) at different temperatures for 20 minutes. Fluorescence measurements were then performed according to classic procedure.

*In vitro* bacteria experiments were realized by incubating  $1.10^6$  *E. coli* expressing,

or not, the *lacZ* activity, with 50  $\mu\text{M}$  of probe **15** or the diffusible **FDG** (Carbosynth).

## Fluorescence microscopy of cells

50,000 **HeLa** cells were seeded into each well of the  $\mu$ -Slide 4 Well (Ibidi). Cells were transfected (70 % confluence) with lipofectamine 3000 reagent (ThermoFisher Scientific.). After 24 hours of incubation, the medium was removed, cells were washed with **PBS** and the medium was replaced by an appropriate volume of DMEM-fluorobright containing the desired probe at the specified concentration. After a the indicated incubation time, fluorescence images were captured using a Zeiss Confocal LSM 710 instrument with an objective Plan-Apochromat 40 et 63X. By default, the power excitation laser is 5 % at  $\lambda_{ex} = 405$  nm and the emission window is  $\lambda_{em} \in = 500\text{--}600$  nm.

## Flow cytometry experiments (**FACS**)

70,000 cells are seeded per well in 24-well plates 24 hours prior to transfection. Cells are transfected (70 % confluence) with lipofectamine 3000 reagent (ThermoFisher Scientific.). After 24 hours of incubation post transfection, the cells are washed by **PBS** and the probe at the specified concentration is added into the media. When indicated incubation time is over, cells are washed with **PBS** and trypsinised to put them in flow cytometry tubes. The fluorescence is then analysed in a BD LSRII flow cytometer with **UV** laser (355, 488, 561 or 633 nm) after the change of adapted filters ( $\lambda_{em} \in = 525$  nm) and the optimization of setting voltages for maximum sensitivity.

## Viability tests

$5 \cdot 10^6$  **HeLa** cells were seeded in 200  $\mu\text{L}$  of supplemented DMEM in a clear 96-well plate (Corning Costar). After 24 hours of incubation the medium was removed, cells were washed with **PBS** and medium was replaced by an appropriate volume of DMEM. A desired volume of stock solutions of probe (in **DMSO**) was added to create a range of concentrations with a final volume of 100  $\mu\text{L}$  and the cells were then incubated for 6 hours. 20  $\mu\text{L}$  of the MTS reagent (CellTiter 96 AQueous NonRadioactive Cell Proliferation Assay, Promega.) were added. Cells were incubated for another 1 hour



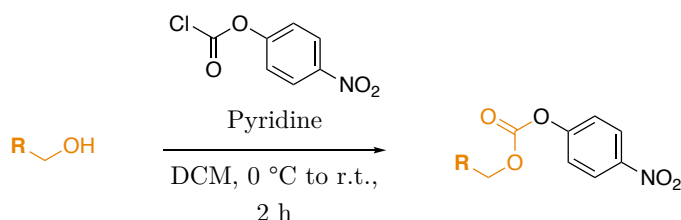
period and absorbance at 490 nm was measured with a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer). The percentage of viable cells is calculated by dividing the absorbance at a given concentration by the absorbance at 0  $\mu\text{M}$ . The given results are the mean of triplicate.

### *In vivo* tumor imaging

Two immunodeficient nude mice were subcutaneously implanted with  $1.10^6$  Ts/A cells on the left flank and  $1.10^6$  Ts/A-*LacZ* cells on the right flank, the weight of the mice and the size of the tumors were measured every 3 days until their sizes are suitable for treatment (about 100 mm<sup>3</sup>). Then, 300  $\mu\text{L}$  of a 1 mmol solution of probe **15** was injected (intratumoral) with a syringe and a 30G needle. After 5 h of incubation, images of the *in vivo* tumors were acquired thanks to a Leica®Fluorescence Macroscope (Andor™ iKon-M camera, 0.8 lens and 0.8 zoom); excitation at  $\lambda_{ex} = 365$  nm (CoolLED®pE-4000 system) and emission at  $\lambda_{em} = 527 \pm 30$  nm (L5 PB (bandpass) filter). Then, the tumors were extracted and new images were taken with the same configuration. Finally, tumors were opened in half and images were again acquired.

## General procedures and common intermediates

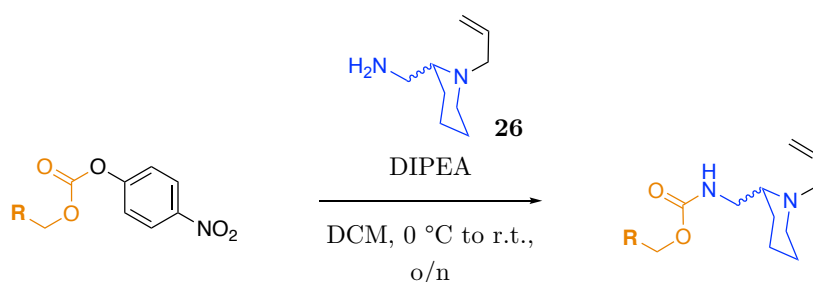
### General procedure A : Alcohol activation with 4-nitrophenyl chloroformate



To an ice-cold solution of alcohol (1.0 eq.) in dry DCM was added successively 4-nitrophenyl chloroformate (2.2 eq.) and pyridine (2.5 eq.) dropwise. The reaction mixture was stirred at 0 °C during 30 min and at r.t. for 2 h. After the completion of the reaction, the mixture was quenched using 1 M HCl aqueous solution and the layers were separated. Organic layer was washed with 1 M HCl, and combined aqueous layers were extracted with DCM. Organic layers were dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated

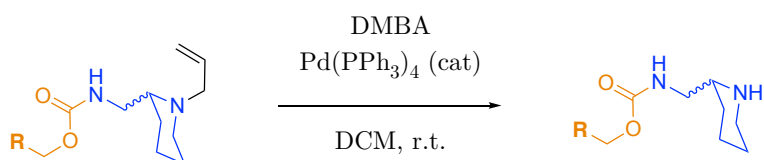
under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography on silica gel (*petroleum ether* (PE)/*ethyl acetate* (EtOAc), 8/2 v/v) to obtain the desired carbonate.

### General procedure B : Coupling with cyclizing spacer



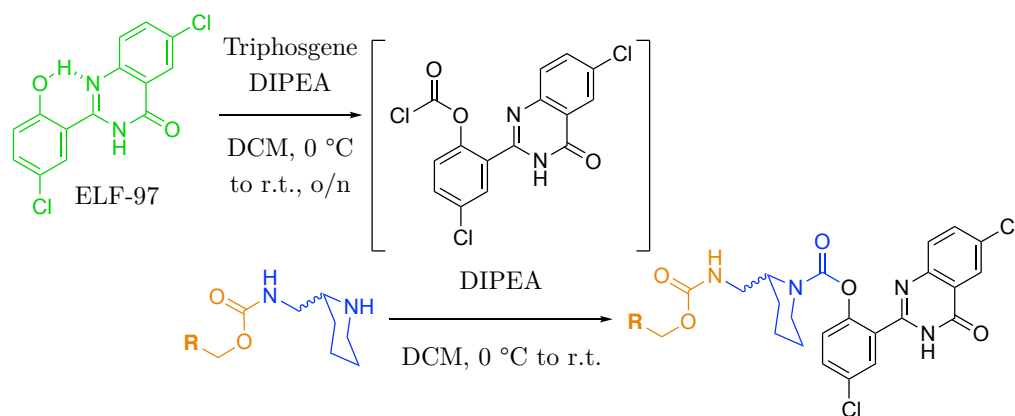
To a solution of carbonate (1.0 eq.) in DCM was added the protected spacer **26** (1.0 eq.); the mixture was put in an ice-bath and DIPEA (3.0 eq.) was added. After 5 min, ice bath was removed and the solution was stirred at 30 °C overnight. The mixture was then washed using saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and NaHCO<sub>3</sub> aqueous solutions, dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude oil was purified via column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 99/1 v/v) to obtain the desired carbamate.

### General procedure C : Deprotection of allyl moiety



A solution of allylamine (1.0 eq.) and *1,3-dimethylbarbituric acid* (DMBA) (5.0 eq.) in dry DCM was degassed using an argon flux, then tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.01 eq.) was added. After completion of the reaction (typically around 4 h), the reaction mixture was evaporated to dryness and purified via column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 99/1 v/v) to obtain the desired secondary amine.

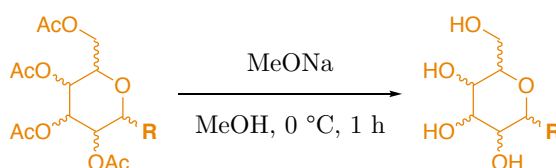
## General procedure D : Coupling with ELF-97



To an ice-cold suspension of **ELF-97** (1.0 eq.) in dry **DCM** under an argon atmosphere was added dropwise *N,N*-diisopropylethylamine (**DIPEA**) (5.0 eq.) followed by a solution of triphosgene (3.0 eq.) in dry **DCM**. This solution was stirred at 0 °C for 1 h and overnight at r.t. The resulting mixture was then evaporated to dryness under reduced pressure and the volatiles were trapped in a liquid nitrogen trap (and the appropriately quenched). The resulting solid residue was used without further purification.

To an ice-cold suspension of the freshly prepared chloroformate of the **ELF-97** (1.0 eq.) in dry **DCM** (5 mL) under argon was added dropwise a clear solution of the secondary amine (1.0 eq.) and **DIPEA** (3.0 eq.). After the addition, the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 min and at r.t. overnight. The reaction mixture was then washed three times with saturated  $\text{NaHCO}_3$  solution and the organic layer was dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified via column chromatography on silica gel (**PE/EtOAc**, 8/2 v/v) to obtain the desired protected probe.

## General procedure E : Acetate deprotection



To a solution of protected probe (1.0 eq.) in dry methanol in an ice-bath was added sodium methoxide (3.5 eq.). The mixture was stirred 1 h at 0 °C and quenched

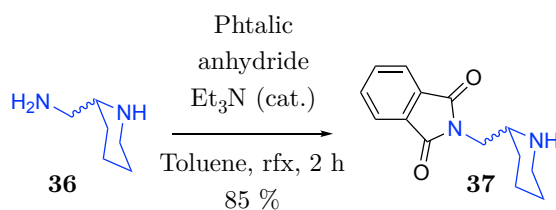
using Dowex 50X8-100 resin, then filtered and concentrated under reduced pressure. The product is usually obtained as a white resin. High purity was obtained using preparative-reverse phase C18 column (gradient of *acetonitrile* (ACN)/H<sub>2</sub>O 0/100 to 50/50 v/v) or HPLC (same conditions) to give the desired probe.

## General procedure F : TFA deprotection



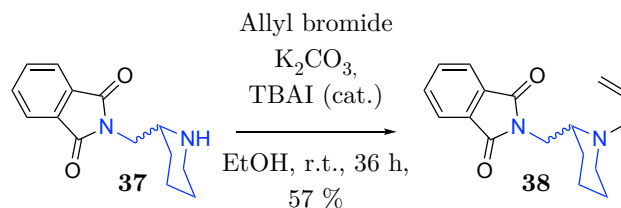
To an ice-cold solution of protected compound (1,0 eq.) in dry DCM was added dropwise TFA (1/1 v/v) and sometimes anisole (5.5 eq.). The resulting mixture was stirred, with increased temperature from 0 °C to r.t., until completion of the reaction followed by MS (usually 1 or 2 h). Solvent and remaining acid were then evaporated under reduced pressure. The crude residue was further purified using preparative-reverse phase C18 column (gradient of ACN/H<sub>2</sub>O 0/100 to 50/50 v/v) or HPLC (same conditions) to obtain desired deprotected product.

## Synthesis of cyclising spacer



To a solution of 2-aminomethylpiperidine (3.0 g, 26.3 mmol, 1.0 eq.) in toluene (50 mL) was added portionwise phthalic anhydride (3.89 g, 26.3 mmol, 1.0 eq.) and dropwise triethylamine (550  $\mu$ L, 3.95 mmol, 0.15 eq.). The mixture was then refluxed during 2 h using a Dean-Stark apparatus. Then the mixture was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The product **37** (5.42 g, 22.2 mmol, 85 %) was obtained as a light yellow solid and used without further purification.

To an ice-cold solution of compound **37** (5.42 g, 22.2 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (45 mL), potassium carbonate (3.99 g, 28.9 mmol, 1.3 eq.), tetra-*n*-butylammonium iodide (820 mg, 2.2 mmol, 0.10 eq.) and allyl bromide (2.50 mL, 28.9 mmol, 1.3 eq.)

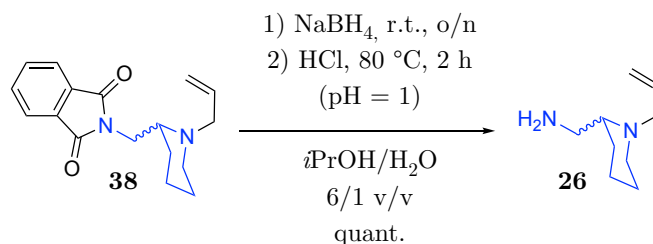


were added. Cooling was removed and the mixture was stirred for 36 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered off over a pad of Celite and evaporated under reduced pressure. The residual oil was dissolved in EtOAc and a saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; both layers were separated and organic extract was washed twice with saturated aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Combined aqueous washings were extracted 3 times with EtOAc. Combined organic extracts were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to dryness. The crude oil was purified via column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 80/20 to 60/40 v/v) to yield **38** (3.582 g, 12.6 mmol, 57 %) as a light yellow oil.

NMR :  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.89–7.82 (m, 2H), 7.75–7.68 (m, 2H), 3.68 (d,  $J = 4$  Hz, 2H), 3.13–3.05 (m, 1H), 2.98–2.88 (m, 1H), 2.64–2.54 (m, 1H), 1.87–1.78 (m, 1H), 1.76–1.68 (m, 1H), 1.63–1.54 (m, 1H), 1.45–1.34 (m, 2H), 1.30–1.15 (m, 1H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 168.4, 133.7, 131.9, 123.0, 55.5, 46.4, 43.4, 30.6, 26.1, 24.1.

HRMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 245.1290, calc. 245.1290.



In an ice-cold solution of **38** (3.582 g, 12.6 mmol, 1.0 eq.) in  $i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  6/1 v/v (175 mL) was added portionwise sodium borohydride (665 mg, 17.58 mmol, 5.0 eq.). After stirring overnight (o/n) at room temperature the pH was acidified to 1 using concentrated HCl aqueous solution; the mixture was filtered and then heated to 80 °C during 2 h.  $i\text{PrOH}$  was removed under reduced pressure and the resulting aqueous solution was washed 5 times with diethyl ether, re-acidified with 2 M NaOH aqueous solution, and extracted with diethyl ether. Combined organic extracts were dried with

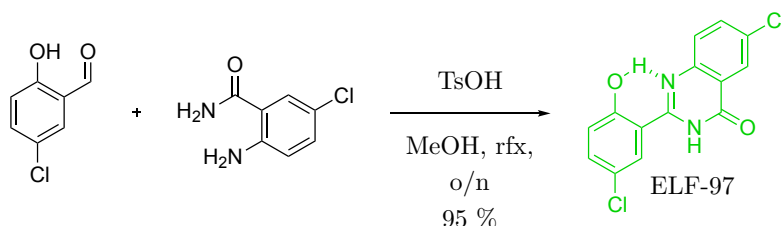
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and evaporated to dryness to obtain the product **26** as a light yellow oil (1.939 g, 12.6 mmol, quantitative yield).

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 5.99–5.86 (m, 1H), 5.24–5.13 (m, 2H), 3.41 (ddt,  $J = 14$  Hz,  $J = 6$  Hz,  $J = 1.5$  Hz, 1H), 3.04–2.90 (m, 3H), 2.74 (dd,  $J = 13$  Hz,  $J = 3$  Hz, 1H), 2.21 (tt,  $J = 9.6$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 2 Hz), 1.80–1.71 (m, 1H), 1.68–1.43 (m, 2H), 1.39–1.25 (m, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 157.34, 134.50, 117.71, 58.62, 56.29, 51.90, 42.31, 28.85, 24.92, 23.58.

HRMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 155.1543, calc. 155.1548.

## Synthesis of ELF-97



To a solution of anthranilamide (2.000 g, 11.7 mmol, 1.0 eq.) in dry EtOH (20 mL) was added 5-chlorosalicylaldehyde (1.831 g, 11.7 mmol, 1.0 eq.), the mixture was refluxed during 30 min. *para*-toluenesulfonic acid (PTSA) (40 mg, 0.234 mmol, 0.02 eq.) was then added before an additional 1 h reflux. The reaction mixture was then cooled to r.t. and 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) (2.678 g, 11.8 mmol, 1.01 eq.) was added portionwise, the mixture was stirred overnight at r.t.. The resulting crude was filtered and the obtained solid was washed two times with EtOH and two times with diethyl ether. ELF-97 (3.41 g, 11.11 mmol, 95 %) was obtained as a light beige powder and used without further purification.

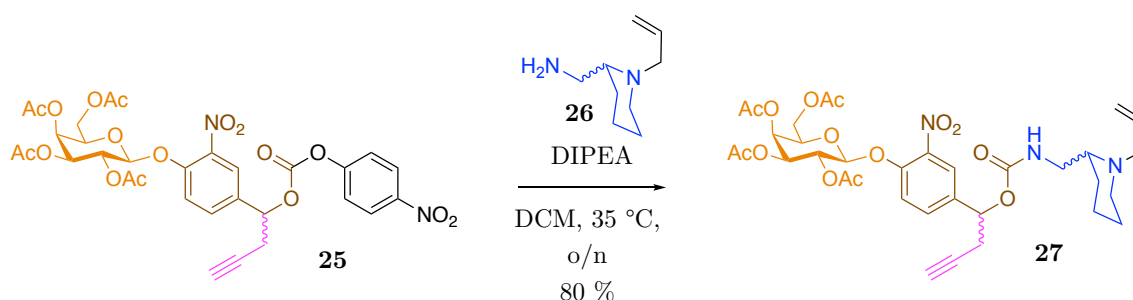
NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 13.38 (s, 1H), 12.64 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.88 (q,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.49 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.05 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H)

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[281]</sup>

# Partie expérimentale du chapitre 1

## Synthesis of probes

### Synthesis of "clickable" $\beta$ -gal-analogue probe **20**

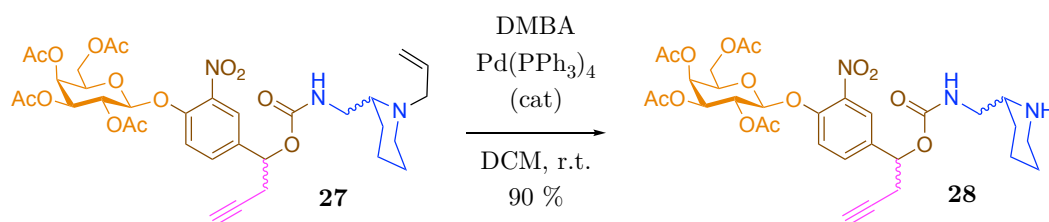


According to general procedure **B** and using the carbonate **25** (100 mg, 0.142 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **26** (24 mg, 0.157 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (124  $\mu$ L, 0.712 mmol, 5.0 eq.) in DCM (2 mL), the tertiary amine **27** (82 mg, 0.114 mmol, 80%) was obtained as an off white foam.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.82 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 5.92–5.75 (m, 1H), 5.71 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 5.50 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 8$  Hz, 1H), 5.43 (d,  $J = 3$  Hz, 1H), 5.35 (br, s, 1H), 5.20–5.01 (m, 4H), 4.27–4.00 (m, 3H), 3.40–3.09 (m, 3H), 2.97–2.81 (m, 2H), 2.81–2.59 (m, 2H), 2.49–2.41 (br, m, 1H), 2.38–2.28 (br, m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.73–1.15 (br, m, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 170.36, 170.23, 169.43, 155.44, 149.15, 141.22, 135.91, 134.67, 132.14, 131.98, 123.37, 123.13, 119.53, 117.90, 117.49, 78.75, 77.36, 72.40, 71.79, 71.53, 70.66, 67.95, 66.83, 61.45, 56.45, 52.05, 42.55, 29.00, 26.62, 25.04, 23.77, 20.75, 20.72, 20.64.

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 717.5, calc. 717.3.



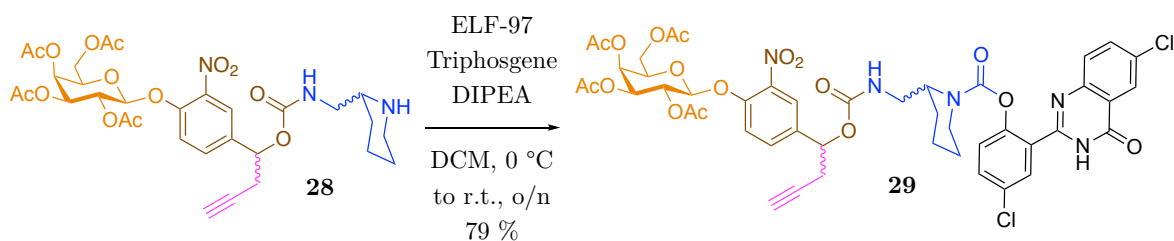
According to general procedure **C** and using the tertiary amine **27** (82 mg, 0.114 mmol,

1.0 eq.), **DMBA** (89 mg, 0.571 mmol, 5.0 eq.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1 mg, 0.0011 mmol, 0.01 eq.) in **DCM** (2 mL), the secondary amine **28** (70 mg, 0.103 mmol, 90 %) was obtained as a light-yellow oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 7.83 (br, s, 1H), 7.52 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 5.73 (t,  $J$  = 6 Hz, 1H), 5.53 (dd,  $J$  = 9 Hz,  $J$  = 8 Hz, 1H), 5.48–5.37 (br, m, 2H), 5.12–5.03 (m, 2H), 4.29–4.02 (m, 3H), 3.29–2.62 (m, 7H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.85–1.74 (br, m, 1H), 1.64–1.53 (br, m, 2H), 1.41–1.22 (br, m, 3H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 170.36, 170.21, 169.42, 155.23, 149.09, 141.05, 135.68, 132.05, 123.29, 123.10, 119.38, 100.66, 78.62, 77.27, 72.28, 71.75, 71.40, 70.55, 67.80, 66.69, 61.34, 55.94, 46.79, 46.63, 30.21, 26.55, 26.43, 24.21, 20.72, 20.68, 20.60.

LCMS : ESI : [M+H]<sup>+</sup> m/z found 677.5, calc. 677.7.



According to general procedure **D** and using the amine **28** (70 mg, 0.103 mmol, 1.0 eq.), **ELF-97** (31 mg, 0.103 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (92 mg, 0.310 mmol, 3.0 eq.) and **DIPEA** (90  $\mu$ L, 0.516 mmol, 5.0 eq.) in **DCM** (2 x 1.5 mL), the protected probe **29** (82 mg, 0.081 mmol, 79 %) was obtained as a light yellow oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 10.51 (br, s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.11–7.85 (m, 1H), 7.85–7.61 (m, 3H), 7.54–7.32 (m, 2H), 7.28–7.01 (m, 2H), 5.73–5.59 (br, m, 1H), 5.52 (t,  $J$  = 9 Hz, 1H), 5.45 (br, s, 1H), 5.16–4.96 (m, 2H), 4.59–4.33 (m, 1H), 4.28–3.94 (m, 4H), 3.73–2.68 (br, m, 4H), 2.51 (br, s, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.94 (br, m, 6H).

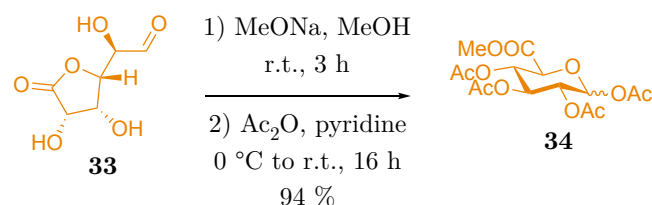
<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 170.43, 170.27, 169.46, 163.61, 161.30, 155.67, 154.12, 152.56, 151.50, 149.14, 147.66, 141.02, 135.50, 133.39, 132.34, 131.84, 131.07, 130.56, 129.74, 127.84, 127.65, 126.02, 125.29, 123.19, 122.19, 119.37, 100.67, 78.59, 77.37, 72.35, 71.73, 71.46, 70.64, 67.90, 66.79, 61.38, 52.42, 51.63, 40.79, 26.65,



26.23, 25.29, 25.09, 20.75, 20.67, 18.94.

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$   $m/z$  found 1009.3, calc. 1009.2.

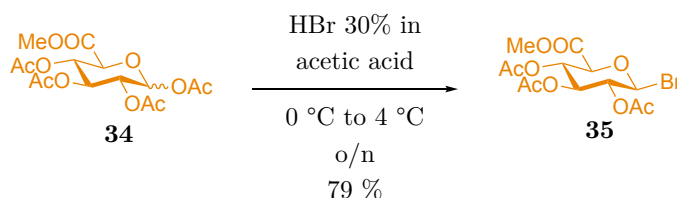
### Synthesis of $\beta$ -gus probe **31**



To a solution of D(+)-glucurono-3,6-lactone **33** (3.000 g, 17.0 mmol, 1.0 eq.) in dry methanol (18 mL) was added sodium methoxide (30 mg, 0.56 mmol, 0.03 eq.) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. After evaporation, the solid was dissolved in pyridine (15 mL) and acetic anhydride (12 mL) was added at 0 °C under argon. The reaction mixture was allowed to warm to room temperature, and stirred for 16 h. After evaporation, the crude was purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 50/50 to 30/70 v/v) to provide **34** (6.01 g, 16 mmol, 94 %) as a brown solid, and mix of  $\alpha/\beta$  isomers in 1 :1 ratio.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, acetone) :  $\delta$  (ppm) = 6.32 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 5.96 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 5.55–5.40 (m, 2H), 5.23 – 5.05 (m, 4H), 4.50 (dd,  $J = 11.9, 10.2$  Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 2.00 (s, 12H), 1.97 (s, 3H).

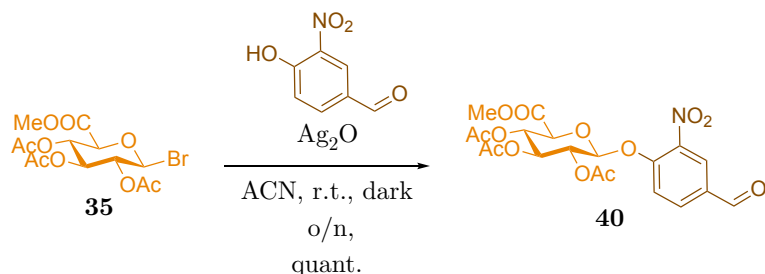
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[446]</sup>



To the acetylated glucuronide **34** (6.01 g, 16.0 mmol, 1.0 eq.) was added dropwise at 0 °C a solution of HBr, 30 % in acetic acid (43 mL). The reaction mixture was put at 0 °C for 13 h without stirring. After evaporation of the acetic acid, the reaction mixture was redissolved in DCM. The organic layer was washed with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, with H<sub>2</sub>O, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated under reduced pressure to give the bromo-glucuronide **35** (4.99 g, 12.6 mmol, 79 %) as a brown foam.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 6.64 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 5.62 (t,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 5.26 (dd,  $J = 18.6, 8.5$  Hz, 2H), 4.85 (dd,  $J = 10.0, 4.1$  Hz, 1H), 4.58 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.05 (d,  $J = 1.7$  Hz, 6H)

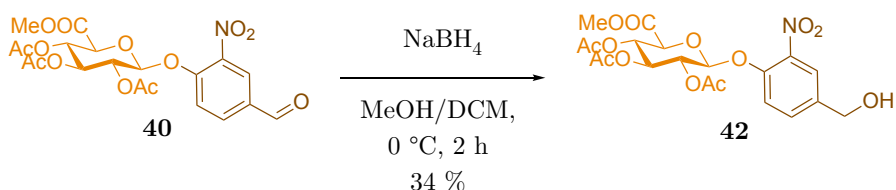
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[446]</sup>



Compound **35** (4.99 g, 12.6 mmol, 1 eq.) and 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (2.11 g, 12.6 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in acetonitrile (130 mL). Silver oxide (3.22 g, 13.9 mmol, 1.1 eq.) was added to the reaction mixture. Protected from the light, the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The crude mixture was then filtered over a pad of Celite and concentrated under reduced pressure. The light-yellow solid obtained **40** (6.09 g, 12.6 mmol, quantitative yield) was used without further purification.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 9.98 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.09 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 5.42 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 5.31 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 4.32 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.08 (d,  $J = 3.0$  Hz, 6H)

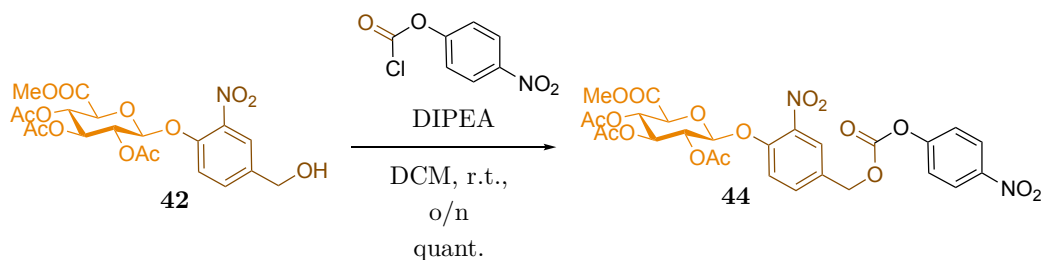
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[446]</sup>



To a solution of aldehyde **40** (2.60 g, 5.38 mmol, 1.0 eq.) in **DCM** (63 mL) was added at 0 °C a solution of  $\text{NaBH}_4$  (224 mg, 5.92 mmol, 1.1 eq.) in **MeOH** (63 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C and quenched by adding saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . After 5 min of stirring, both layers were separated. The aqueous layer was extracted with **DCM**. All organic layers were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated under reduced pressure to give the alcohol **42** as a light yellow solid (847 mg, 1.74 mmol, 34 %) which was used without further purification.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.82 (s, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 5.39–5.28 (m, 3H), 5.19 (d,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 4.73 (d,  $J = 5.4$  Hz, 2H), 4.20 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).

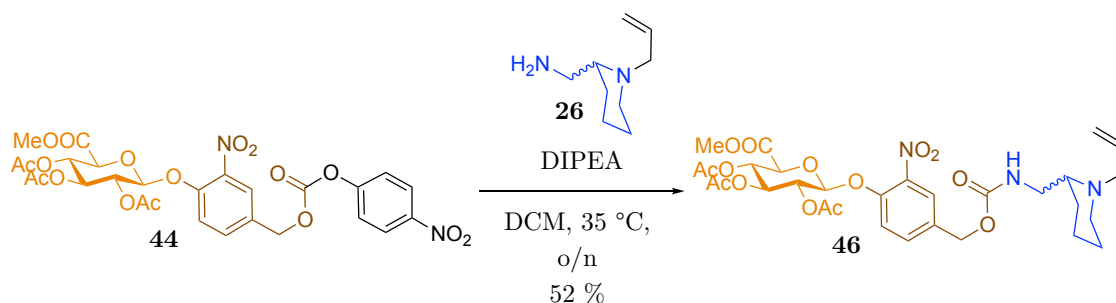
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 207.23, 170.20, 169.50, 166.87, 148.35, 137.45, 132.09, 123.40, 120.48, 100.05, 72.70, 71.23, 70.31, 68.87, 63.63, 53.23, 31.10, 20.76, 20.72, 20.68.



According to general procedure **A** and using **42** (847 mg, 1.74 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (772 mg, 3.83 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (370  $\mu\text{L}$ , 4.35 mmol, 2.5 eq.) in **DCM** (20 mL), the carbonate **44** (1.130 g, 1.74 mmol, quantitative yield) was obtained as a light-yellow powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.29 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J = 11.2, 9.0$  Hz, 3H), 5.42–5.32 (m, 2H), 5.30 – 5.26 (m, 5H), 4.23 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 170.18, 169.48, 169.40, 166.83, 154.96, 150.21, 149.59, 146.03, 134.17, 130.45, 125.71, 125.59, 125.54, 125.49, 121.88, 121.81, 120.23, 99.62, 72.73, 70.97, 70.21, 68.98, 68.69, 53.58, 53.27, 20.68, 1.17.

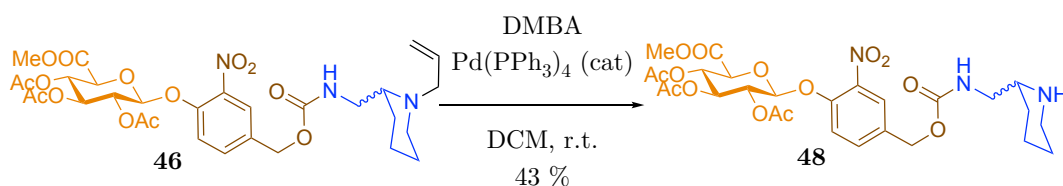


According to general procedure **B** and using the carbonate **44** (500 mg, 0.70 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **26** (131 mg, 0.85 mmol, 1.1 eq.) and **DIPEA** (670  $\mu\text{L}$ ,

3.85 mmol, 5.0 eq.) in DCM (12 mL), the tertiary amine **46** (266 mg, 0.40 mmol, 52%) was obtained as a yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.81 (s, 1H), 7.52 (t,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.36 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 5.84 (s, 3H), 5.27–5.24 (m, 1H), 5.21–5.14 (m, 6H), 5.08 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.33–3.19 (m, 4H), 2.99–2.93 (m, 2H), 2.41–2.37 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.71–1.67 (m, 2H), 1.59–1.55 (m, 4H).

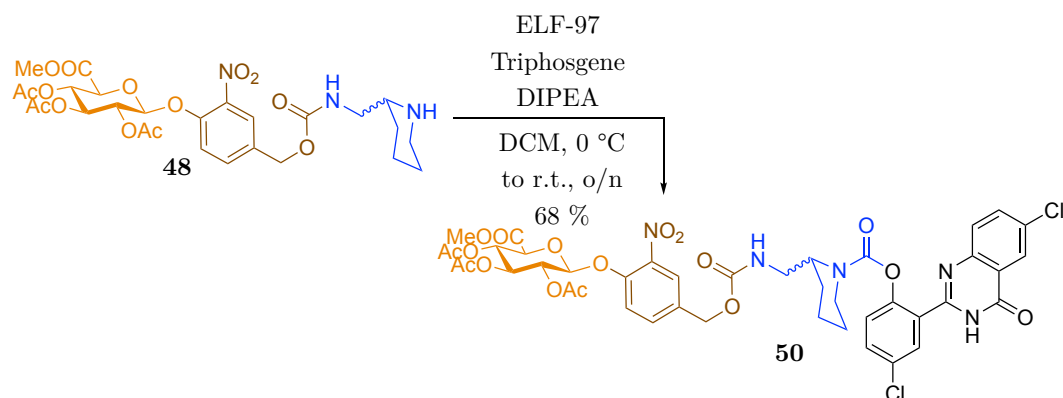
LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 665.5, calc. 665.2.



According to general procedure **C** and using the tertiary amine **46** (266 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq.), **DMBA** (312 mg, 2.0 mmol, 5.0 eq.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4 mg, 0.004 mmol, 0.01 eq.) in DCM (15 mL), the secondary amine **48** (107 mg, 0.17 mmol, 43 %) was obtained as a light-yellow solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.80 (s, 1H), 7.54 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.41 (dd,  $J = 36.0, 8.6$  Hz, 1H), 6.39–5.90 (m, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.53 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 5.37–5.29 (m, 2H), 5.22 (dd,  $J = 17.4, 5.6$  Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.20 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 3.78 (d,  $J = 23.1$  Hz, 3H), 3.36–3.23 (m, 1H), 3.12 (d,  $J = 10.2$  Hz, 2H), 2.72–2.59 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.82 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 1.73–1.54 (m, 3H), 1.40–1.32 (m, 1H), 1.31–1.23 (m, 1H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 625.5, calc. 625.2.

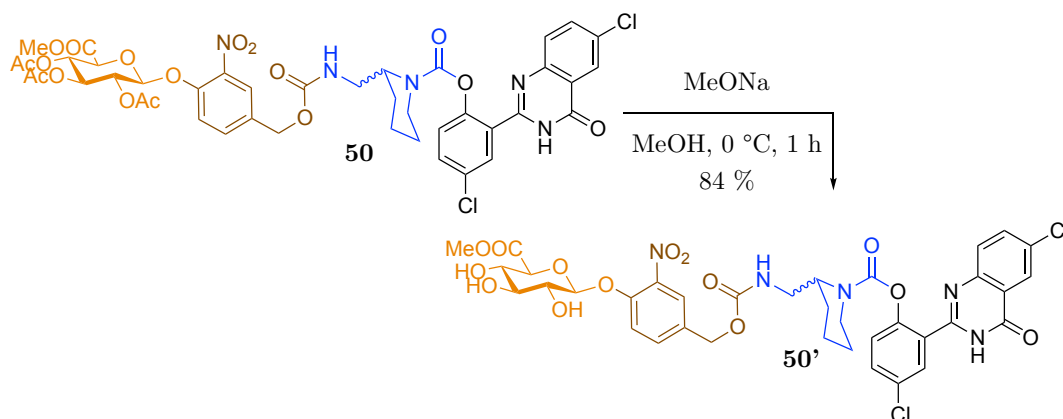


According to general procedure **D** and using the amine **48** (107 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.), **ELF-97** (52 mg, 0.17 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (151 mg, 0.51 mmol, 3.0 eq.)

and DIPEA (150  $\mu$ L, 0.85 mmol, 5.0 eq.) in DCM (2 x 1.5 mL), the double protected probe **50** (110 mg, 0.115 mmol, 68 %) was obtained as a brown oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 10.30 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.08 (d,  $J = 23.4$  Hz, 1H), 7.72 (s, 2H), 7.52 (d,  $J = 19.0$  Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.20–7.06 (m, 2H), 6.35 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.31 (s, 2H), 5.25 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 5.17–4.93 (m, 1H), 4.89–4.76 (m, 2H), 4.57 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.74 (s, 2H), 3.38 – 3.18 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.83–1.65 (m, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 957.0, calc. 957.2

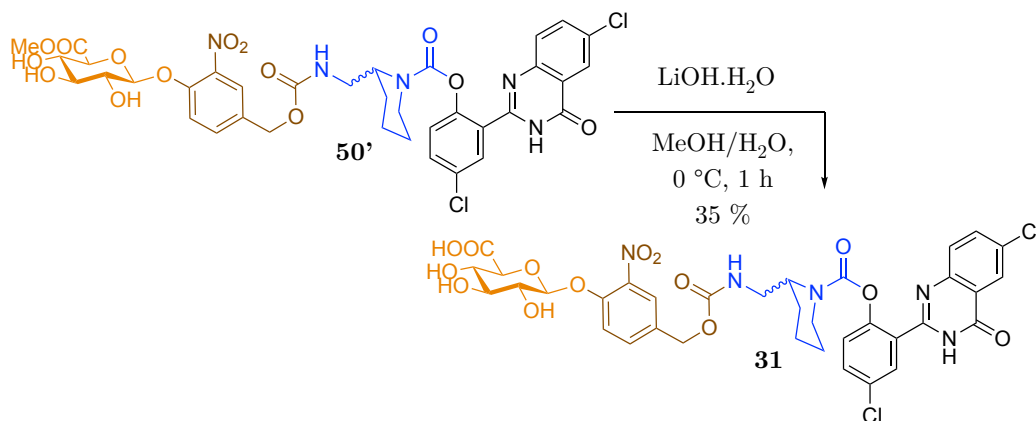


According to general procedure **E** and using the double protected probe **50** (110 mg, 0.115 mmol, 1.0 eq.), sodium methoxide (22 mg, 0.403 mmol, 3.5 eq.) in MeOH (4.5 mL), the mono protected probe **50'** (80 mg, 0.096 mmol, 84 %) was obtained as a yellow oil, and was used without further purification.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD) :  $\delta$  (ppm) = 8.13 (s, 1H), 7.89 – 7.63 (m, 4H), 7.57 – 7.38 (m, 3H), 7.14 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 5.15 – 4.86 (m, 3H), 4.50 (s, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.63 – 3.45 (m, 2H), 3.20 – 3.00 (m, 2H), 2.98 – 2.76 (m, 1H), 1.70 – 1.41 (m, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 831.3, calc. 831.2.

To a solution of the mono protected probe **50'** (40 mg, 0.048 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (3.2 mL) was added dropwise at 0 °C a solution of monohydrate lithium hydroxide (17 mg, 0.408 mmol, 8.5 eq.) in water (3.2 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 45 min, and then quenched with Dowex®50X8-100 resin, filtered and evaporated. Final probe **30** (14 mg, 0.017 mmol, 35 %) was obtained as a white powder with high purity thanks to a preparative reverse phase C18 column (ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  0/100 to 20/80 v/v).

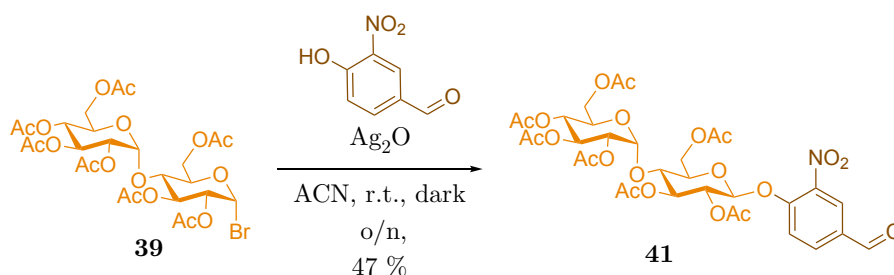


NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD) :  $\delta$  (ppm) = 8.13, 7.83, 7.79, 7.77, 7.71, 7.69, 7.53, 7.48, 7.45, 7.43, 7.19, 7.15, 7.13, 7.10, 6.22, 5.85, 5.06, 5.03, 5.00, 4.94, 4.92, 4.52, 4.17, 4.14, 4.06, 3.78, 3.55, 3.51, 3.28, 3.16, 3.13, 3.09, 2.95, 1.59, 1.54.

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 165.83, 162.97, 158.54, 154.43, 152.35, 149.09, 148.57, 142.27, 141.59, 136.24, 134.07, 132.95, 132.11, 130.98, 130.41, 129.86, 126.44, 126.03, 123.45, 120.02, 112.54, 99.78, 70.46, 66.83, 65.73, 65.58, 53.14, 52.64, 41.53, 41.18, 40.88, 27.20, 26.80, 26.40, 26.15, 19.86.

LCMS : ESI :  $[\text{M-H}_2\text{O}]^-$  m/z found 798.0, calc. 798.12,  $[\text{M-H}]^-$  m/z found 816.4, calc. 816.13,  $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$  m/z found 838.5, calc. 838.5.

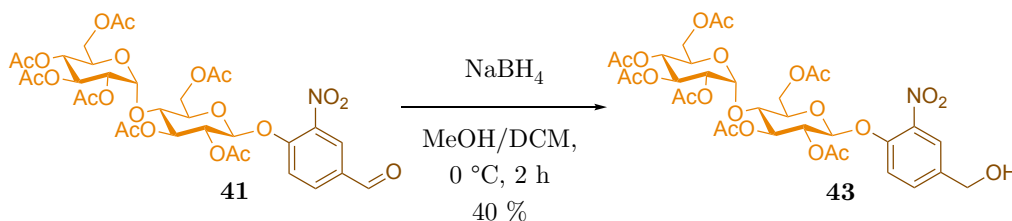
### Synthesis of double-selectivity probe **31**



Acetobromomaltose **39** (3.00 g, 4.29 mmol, 1.0 eq.) and 4-hydroxy-3-nitrobenzaldehyde (718 mg, 4.29 mmol, 1.0 eq.) were dissolved in acetonitrile (130 mL). Silver oxide (1.10 g, 4.73 mmol, 1.1 eq.) was added to the reaction mixture. Protected from the light, the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The crude mixture was then filtered over a pad of Celite and concentrated under reduced pressure. The light-yellow solid obtained **41** (1.597 g, 2.03 mmol, 47 %) was used without further purification.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 10.00 (s, 1H), 8.34 (d,  $J = 2\text{ Hz}$ , 1H), 8.11 (dd,  $J = 9\text{ Hz}$ ,  $J = 2\text{ Hz}$ , 1H), 7.48 (d,  $J = 9\text{ Hz}$ , 1H), 5.47 (d,  $J = 4\text{ Hz}$ , 1H), 5.40 (m, 2H), 5.3 (m, 1H), 5.17 (dd,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $J = 6\text{ Hz}$ , 1H), 5.09 (t,  $J = 10\text{ Hz}$ , 1H), 4.90 (dd,  $J = 10\text{ Hz}$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ , 1H), 4.59 (dd,  $J = 12\text{ Hz}$ ,  $J = 2\text{ Hz}$ , 1H), 4.31–4.24 (m, 2H), 4.19 (t,  $J = 8\text{ Hz}$ , 1H), 4.09 (dd,  $J = 12\text{ Hz}$ ,  $J = 3\text{ Hz}$ , 1H), 4.04–4.00 (b, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H).

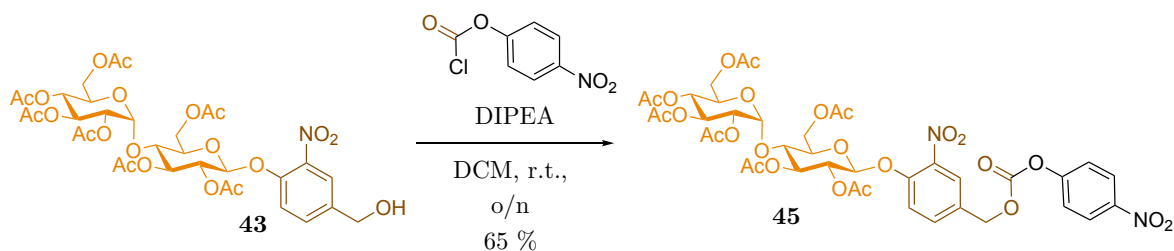
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 188.53, 170.54, 170.46, 170.21, 170.19, 170.02, 169.44, 169.38, 153.34, 141.26, 134.21, 131.39, 126.77, 118.51, 98.49, 95.89, 74.51, 72.87, 72.36, 71.11, 70.09, 69.28, 68.70, 68.03, 62.40, 61.57, 20.85, 20.68, 20.65, 20.62, 20.59, 20.56, 20.51.



To a solution of aldehyde **41** (1.597 g, 2.03 mmol, 1.0 eq.) in **DCM** (25 mL) was added at 0 °C a solution of  $\text{NaBH}_4$  (92 mg, 2.44 mmol, 1.2 eq.) in **MeOH** (25 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C and quenched by adding saturated aqueous solution of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . After 5 min of stirring, both layers were separated. The aqueous layer was extracted with **DCM**. All organic layers were combined, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was purified by column chromatography on silica gel (**PE/EtOAc** 50/50 v/v) to give the alcohol **43** as a light-yellow powder (652 mg, 0.83 mmol, 40 %).

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.83 (d,  $J = 2\text{ Hz}$ , 1H), 7.56 (dd,  $J = 8\text{ Hz}$ ,  $J = 2\text{ Hz}$ , 1H), 7.34 (d,  $J = 9\text{ Hz}$ , 1H), 5.47 (d,  $J = 4\text{ Hz}$ , 1H), 5.39 (t,  $J = 9\text{ Hz}$ , 1H), 5.32 (t,  $J = 8\text{ Hz}$ , 1H), 5.23–5.05 (m, 3H), 4.89 (dd,  $J = 10\text{ Hz}$ ,  $J = 4\text{ Hz}$ , 1H), 4.59 (dd,  $J = 12\text{ Hz}$ ,  $J = 3\text{ Hz}$ , 1H), 4.32–4.23 (m, 2H), 4.19–4.09 (m, 4H), 4.03–3.97 (m, 1H), 3.94–3.87 (m, 1H), 2.13 (s, 6H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

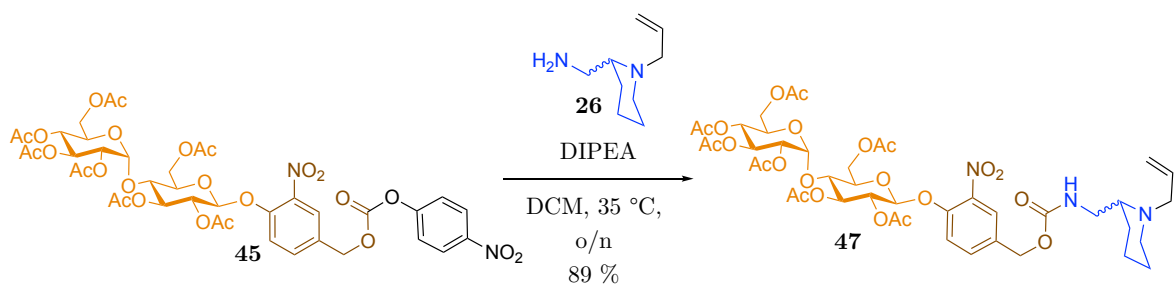
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 171.17, 170.56, 170.50, 170.31, 170.21, 170.01, 169.65, 169.41, 148.37, 141.35, 137.04, 131.89, 123.29, 119.76, 99.49, 95.74, 74.78, 72.62, 72.39, 71.37, 70.06, 69.31, 68.62, 68.05, 62.42, 61.54, 20.87, 20.73, 20.69, 20.62, 20.59, 20.56, 20.55.



According to general procedure **A** and using **43** (652 mg, 0.83 mmol, 1.0 eq.), 4-nitrophenyl chloroformate (579 mg, 2.90 mmol, 2.2 eq.) and pyridine (260  $\mu$ L, 3.25 mmol, 2.5 eq.) in DCM (20 mL), the carbonate **45** (516 g, 0.54 mmol, 65 %) was obtained as a light-yellow powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.3 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.93 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.65 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.43–7.37 (m, 3H), 5.47 (d,  $J = 4$  Hz, 1H), 5.4 (t,  $J = 10$  Hz, 1H), 5.35–5.29 (m, 3H) 5.26 (d,  $J = 7$  Hz, 1H), 5.18–5.05 (m, 2H), 4.89 (dd,  $J = 10$  Hz,  $J = 4$  Hz, 1H), 4.61 (dd,  $J = 12$  Hz, 3 Hz, 1H), 4.32–4.23 (m, 2H), 4.22–4.06 (m, 3H), 4.03–3.97 (m, 1H), 3.96–3.90 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.1 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.04 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 170.54, 170.48, 170.25, 170.20, 170.01, 169.56, 169.38, 155.26, 152.30, 149.56, 145.60, 141.23, 133.96, 130.12, 125.39, 121.71, 119.62, 99.15, 95.78, 74.67, 72.72, 72.29, 71.30, 70.08, 69.28, 68.85, 68.63, 68.04, 62.33, 61.52, 20.87, 20.71, 20.69, 20.62, 20.59, 20.56, 20.54.



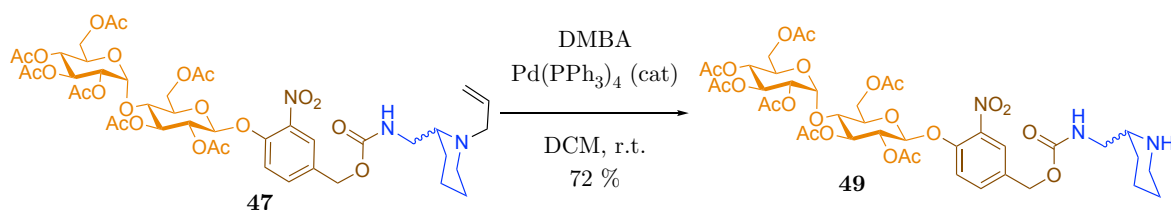
According to general procedure **B** and using the carbonate **45** (516 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **26** (92 mg, 0.60 mmol, 1.1 eq.) and DIPEA (470  $\mu$ L, 2.70 mmol, 5.0 eq.) in DCM (15 mL), the tertiary amine **47** (465 mg, 0.48 mmol, 89%) was obtained as a yellow solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.81 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 5.93–5.78 (m, 1H), 5.50–5.26 (m, 4H),



5.24-5.03 (m, 8H), 4.87 (dd,  $J = 10$  Hz,  $J = 4$  Hz, 1H), 4.57 (dd,  $J = 12$  Hz,  $J = 3$  Hz, 1H), 4.30-4.21 (m, 2H), 4.14 (t,  $J = 9$  Hz, 1H), 4.07 (dd,  $J = 12$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 4.02-3.95 (m, 1H), 3.92-3.86 (m, 1H), 3.43-3.21 (m, 4H), 3.00-2.82 (m, 5H), 2.44-2.36 (b, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.06 (s, 6H), 2.03 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 170.52, 170.47, 170.27, 170.18, 169.97, 169.58, 169.39, 156.22, 148.76, 141.07, 134.64, 133.31, 133.04, 124.63, 119.48, 117.81, 99.33, 95.79, 74.74, 72.61, 72.39, 71.32, 70.04, 69.29, 68.60, 68.04, 64.67, 62.40, 61.53, 58.30, 56.32, 51.95, 42.47, 28.92, 24.93, 23.68, 20.86, 20.71, 20.67, 20.60, 20.57, 20.55, 20.52.



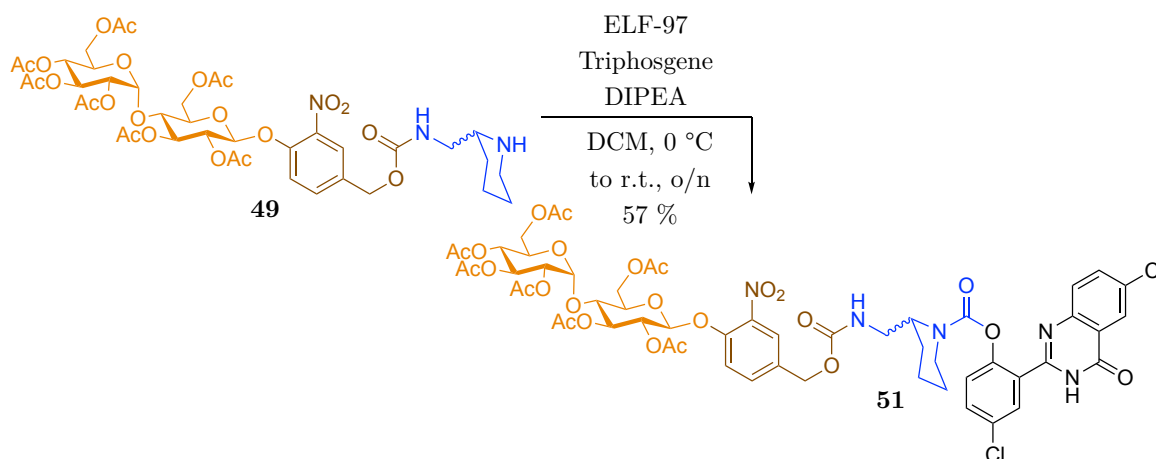
According to general procedure **C** and using the tertiary amine **47** (465 mg, 0.48 mmol, 1.0 eq.), **DMBA** (375 mg, 2.4 mmol, 5.0 eq.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (3 mg, 0.005 mmol, 0.01 eq.) in **DCM** (20 mL), the secondary amine **49** (318 mg, 0.34 mmol, 72 %) was obtained as a light-yellow solid.

NMR :  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d,  $J = 1$  Hz, 1H), 7.51 (dd,  $J = 8$  Hz,  $J = 1$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.41 (d,  $J = 4$  Hz, 1H), 5.39–5.23 (m, 2H), 5.18–4.99 (m, 5H), 4.84 (dd,  $J = 10$  Hz,  $J = 4$  Hz, 1H), 4.54 (dd,  $J = 12$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 4.28–4.17 (m, 2H), 4.11 (t,  $J = 9$  Hz, 1H), 4.03 (dd,  $J = 12$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 3.99–3.84 (b, 2H), 3.43–3.15 (b, 2H), 2.75–2.62 (b, 1H), 2.09–2.05 (m, 9H), 2.02 (s, 6H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.88–1.31 (b, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 928.3, calc. 928.3.

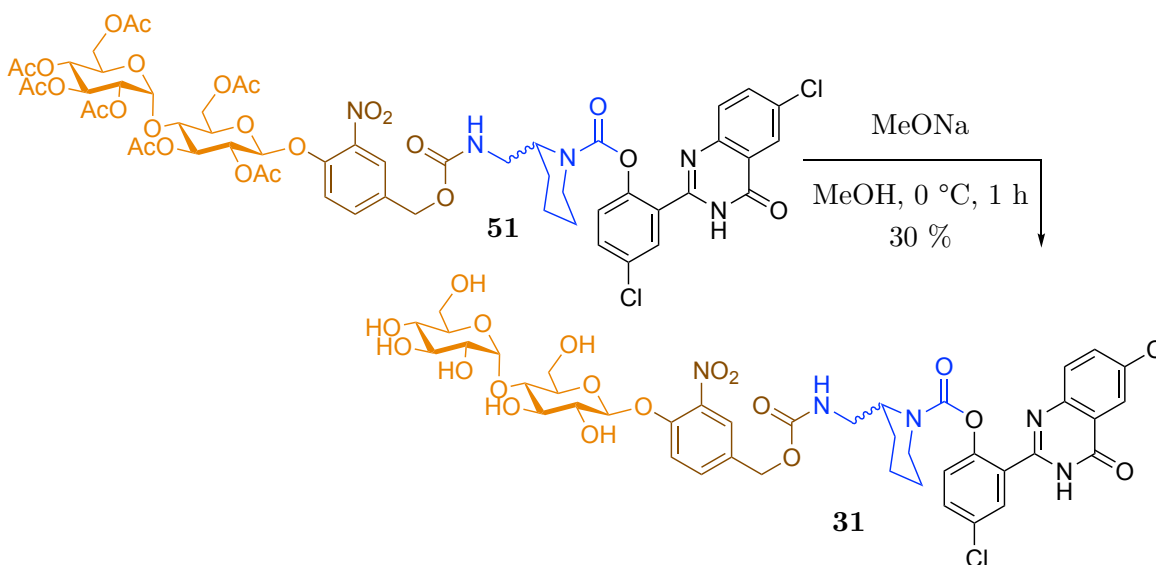
According to general procedure **D** and using the amine **49** (150 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.), **ELF-97** (50 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (144 mg, 0.49 mmol, 3.0 eq.) and **DIPEA** (141  $\mu\text{L}$ , 0.81 mmol, 5.0 eq.) in **DCM** (2 x 1.5 mL), the protected probe **51** (116 mg, 0.092 mmol, 57 %) was obtained as a yellow oil.

NMR :  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 10.54–10.31 (b, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.11–7.95 (m, 1H), 7.76–7.62 (m, 2H), 7.57–7.40 (m, 2H), 7.32–7.20 (m, 1H), 7.20–7.05 (m, 2H), 5.45–5.40 (m, 1H), 5.36 (d,  $J = 10$  Hz, 1H), 5.33–5.24 (b, 1H), 5.16–5.08



(m, 2H), 5.08–5.01 (m, 1H), 4.90–4.75 (m, 2H), 4.60–4.45 (b, 2H), 4.01–3.93 (m, 1H), 3.90–3.76 (b, 1H), 3.71–3.54 (b, 1H), 3.36–2.94 (b, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.80–1.43 (b, 6H)

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$  m/z found 1260.1, calc. 1260.3.



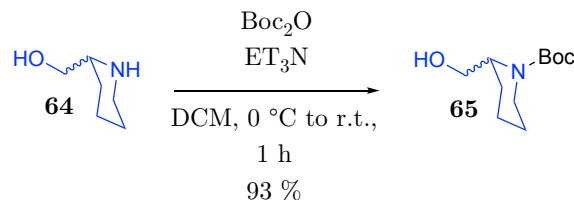
According to general procedure **E** and using the protected probe **51** (70 mg, 0.056 mmol, 1.0 eq.), sodium methoxide (11 mg, 0.195 mmol, 3.5 eq.) in MeOH (3.5 mL), the probe **32** (19 mg, 0.020 mmol, 30 %) was obtained as a white powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, MeOD) :  $\delta$  (ppm) = 8.19–8.15 (m, 1H), 7.86–7.77 (m, 2H), 7.77–7.68 (m, 2H), 7.62–7.44 (m, 2H), 7.40–7.30 (m, 1H), 7.25–7.13 (m, 1H), 5.23–5.18 (m, 1H), 5.15–5.00 (m, 2H), 4.99–4.92 (b, 1H), 4.62–4.49 (b, 1H), 4.25–4.13 (b, 1H), 3.95–3.77 (m, 4H), 3.77–3.51 (m, 7H), 3.46 (dd,  $J = 10$  Hz,  $J = 4$  Hz, 1H),

3.29–3.24 (m, 1H), 3.23–2.96 (b, 2H), 1.71–1.33 (b, 6H).

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$  m/z found 966.3, calc. 966.2.

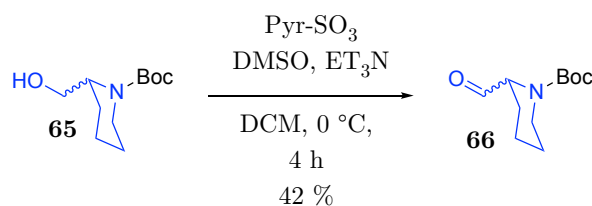
### Synthesis of methoxy-spacer probe **57**



To a stirred solution of 2-piperidinemethanol **64** (2.000 g, 17.36 mmol, 1.0 eq.) and Et<sub>3</sub>N (7.26 mL, 52.09 mmol, 3.0 eq.) in DCM (70 mL), was added Boc<sub>2</sub>O (4.388 mL, 19.10 mmol, 1.1 eq.) dropwise at 0 °C. The reaction mixture was further stirred at the same temperature for 1 h. It was then treated with saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl. The organic layer was separated, washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then concentrated under reduced pressure to obtain a light-yellow oil which crystallised overnight in the fridge. Filtration and washes with PE yielded the desired protected alcohol **65** as white crystals (3.477 g, 93 %)

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 4.34–4.23 (m, 1H), 3.93 (br, d, *J* = 13 Hz, 1H), 3.86–3.75 (m, 1H), 3.65–3.55 (m, 1H), 2.86 (t, *J* = 13 Hz, 1H), 2.29–2.01 (br, s, 1H), 1.73–1.54 (m, 4H) and 1.50–1.34 (m, 11H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[447]</sup>

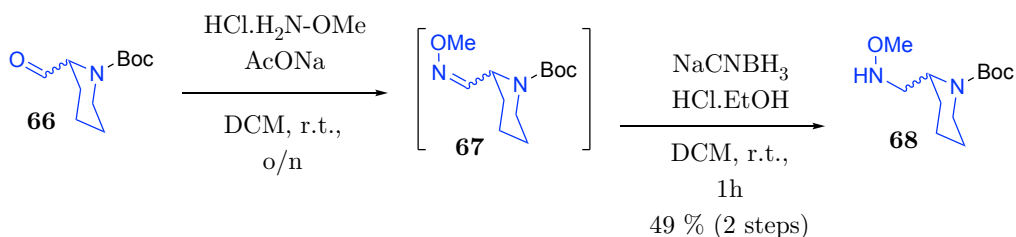


A solution of alcohol **65** (1.350 g, 6.27 mmol, 1.0 eq.) in DMSO (10 mL) was treated with Et<sub>3</sub>N (3.06 mL, 21.95 mmol, 3.5 eq.), and stirred 15 min at 0 °C, pyridine-S<sub>0</sub>3 complex (3.493 g, 21.95 mmol, 3.5 eq.) was added portionwise, and the resulting mixture was stirred for 3 h at 0 °C. Icy water was added and the mixture was extracted with DCM (4 x 20 mL). The combined organic extracts were washed with citric acid (50 % in water, 20 mL), water (20 mL), saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) and water (20 mL), dried with Na<sub>2</sub>S<sub>0</sub>4, and concentrated under reduced pressure. The resulting

oil was purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 90/10 v/v) to give the aldehyde **66** as a light-yellow oil (562 mg, 2.63 mmol, 42 %).

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 9.58 (s, 1H), 4.68–4.43 (br, s, 1H), 4.08–3.77 (br, s, 1H), 3.05–2.76 (br, s, 1H), 2.21–2.11 (br, m, 1H), 1.74–1.18 (m, 5H) and 1.46 (9H, s)

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[447]</sup>

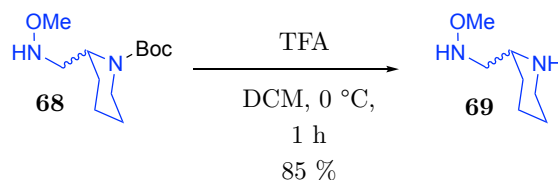


To a solution of the aldehyde **66** (250 mg, 1.17 mmol, 1.0 eq.) in DCM (3 mL), methoxyamine hydrochloride (118 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq.) and sodium acetate (193 mg, 2.34 mmol, 2.0 eq.) were added at r.t. and the reaction mixture was stirred at r.t. for 16 h. The reaction mixture was then quenched by the addition of saturated aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and extracted with DCM. The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and filtered. To the solution of crude product **67** in DCM,  $\text{NaCNBH}_3$  (89 mg, 1.41 mmol, 1.2 eq.) was added, followed by dropwise addition of 1 M ethanolic HCl (1.4 mL, freshly prepared from AcCl and EtOH) and the reaction mixture was stirred at r.t. for 1 h. The crude mixture was concentrated under reduced pressure and the white solid was suspended in saturated aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and extracted with DCM. The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure. Purification of the residue by silica gel column chromatography (MeOH/DCM 0/100 to 1/99 v/v) yielded oxyamine **68** (140 mg, 0.57 mmol, 49 % over 2 steps) as a light-yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 5.52 (br, s, 1H), 4.45–4.33 (m, 1H), 3.95 (br, d,  $J = 13$  Hz, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.12 (dd,  $J = 13$  Hz,  $J = 8$  Hz, 1H), 2.91 (dd,  $J = 13$  Hz,  $J = 6$  Hz, 1H), 2.71 (br, t,  $J = 13$  Hz), 1.68–1.27 (br, m, 6H), 1.41 (s, 9H).

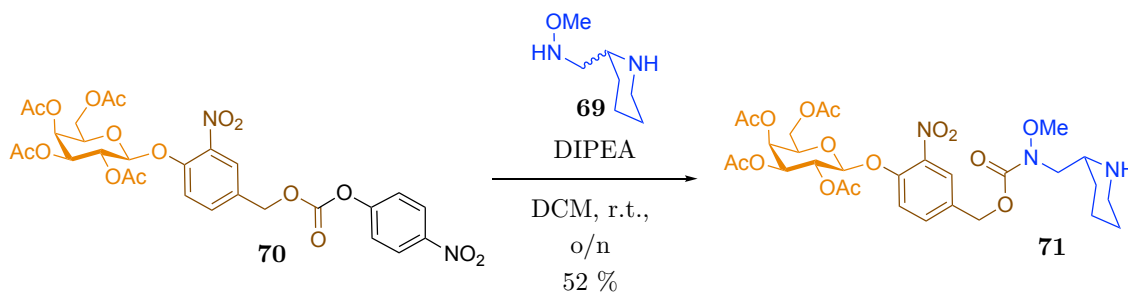
LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 245.2, calc. 245.2.

To an ice-cold solution of protected amine **68** (50 mg, 0.205 mmol, 1.0 eq.) in dry DCM (1 mL) was added dropwise TFA (1 mL). The resulting mixture was stirred, with



increased temperature from 0 °C to r.t. for 2 h. Then  $\text{CHCl}_3$  (5 mL) was added and the mixture was washed 50 % saturated aqueous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  until the pH was stabilized around the value of 13. The mixture was extracted with  $\text{CHCl}_3$  (4 x 10 mL). The combined organic extracts were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated under reduced pressure to obtain the deprotected amine **69** (25 mg, 0.17 mmol, 85 %) as a colorless oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 5.90 (br, s, 1H), 5.59 (br, s, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.20 (br, d,  $J = 12$  Hz, 1H), 3.02–2.80 (m, 3H), 3.67 (td,  $J = 12$  Hz,  $J = 3$  Hz, 1H), 1.87–1.19 (m, 6H).

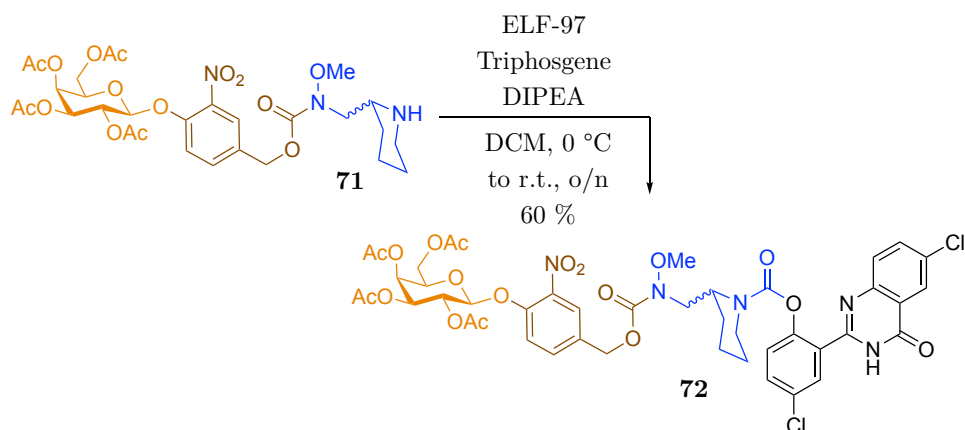


According to general procedure **B** and using the carbonate **70** (50 mg, 0.075 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **69** (13 mg, 0.090 mmol, 1.2 eq.) and **DIPEA** (66  $\mu\text{L}$ , 0.376 mmol, 5.0 eq.) in **DCM** (3 mL), the secondary amine **71** (27 mg, 0.040 mmol, 54%) was obtained as a yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.81 (br, s, 1H), 7.52 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 7.38–7.30 (m, 1H), 5.60–5.44 (m, 3H), 5.16–5.03 (m, 4H), 4.56–4.46 (br, m, 1H), 4.28–4.12 (m, 2H), 4.12–4.01 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.19 (dd,  $J = 13$  Hz,  $J = 9$  Hz, 1H), 2.97 (dd,  $J = 13$  Hz,  $J = 6$  Hz, 1H), 2.91–2.77 (br, m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.71–1.38 (br, m, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 670.3, calc. 670.3.

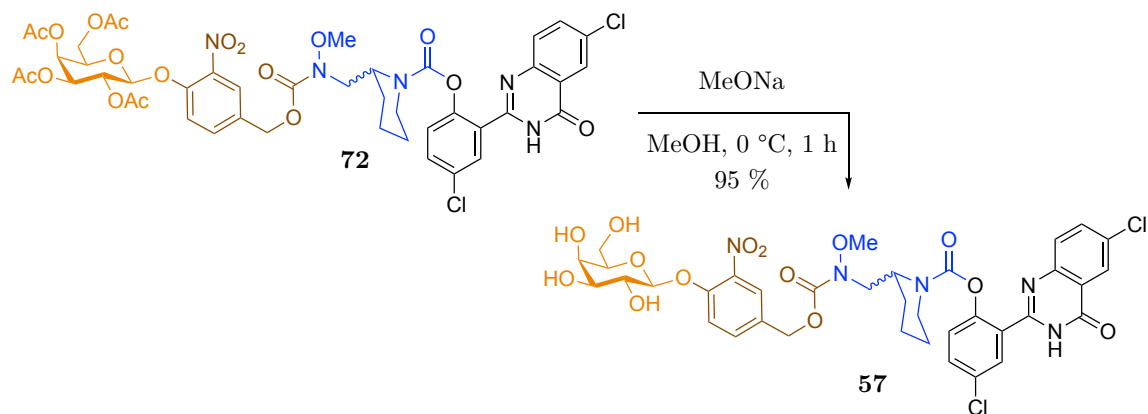
According to general procedure **D** and using the amine **71** (17 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq.), **ELF-97** (7.8 mg, 0.025 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (23 mg, 0.076 mmol, 3.0 eq.) and **DIPEA** (22  $\mu\text{L}$ , 0.127 mmol, 5.0 eq.) in **DCM** (2 x 1 mL), the protected probe **72**



(15 mg, 0.015 mmol, 60 %) was obtained as a yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.29–8.09 (m, 2H), 7.89–7.62 (m, 3H), 7.56–7.31 (m, 3H), 7.31–7.16 (m, 1H), 5.58–5.45 (m, 2H), 5.15–4.96 (m, 3H), 4.92–4.70 (m, 2H), 4.31–3.98 (m, 5H), 3.87–3.70 (m, 3H), 3.52 (br, d,  $J = 14$  Hz, 1H), 3.09–2.88 (br, m, 1H), 2.20 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.72–1.30 (br, m, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 1002.2, calc. 1002.2.



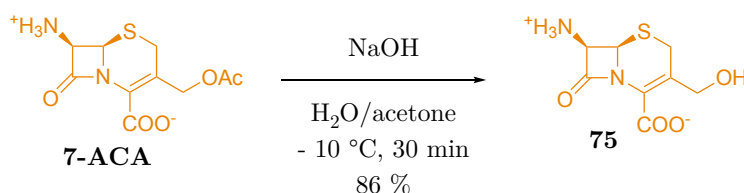
According to general procedure **E** and using the protected probe **72** (8.0 mg, 0.0080 mmol, 1.0 eq.), sodium methoxide (1.5 mg, 0.028 mmol, 3.5 eq.) in MeOH (1.5 mL), the probe **57** (6.3 mg, 0.0076 mmol, 95 %) was obtained as a white powder.

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  found 834.2, calc. 834.2.

## Partie expérimentale du chapitre 2

### Synthesis of probes

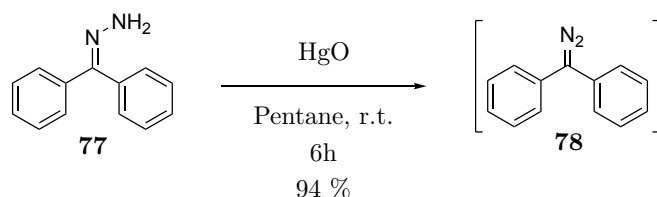
#### Synthesis of $\beta$ -lac probe **73**



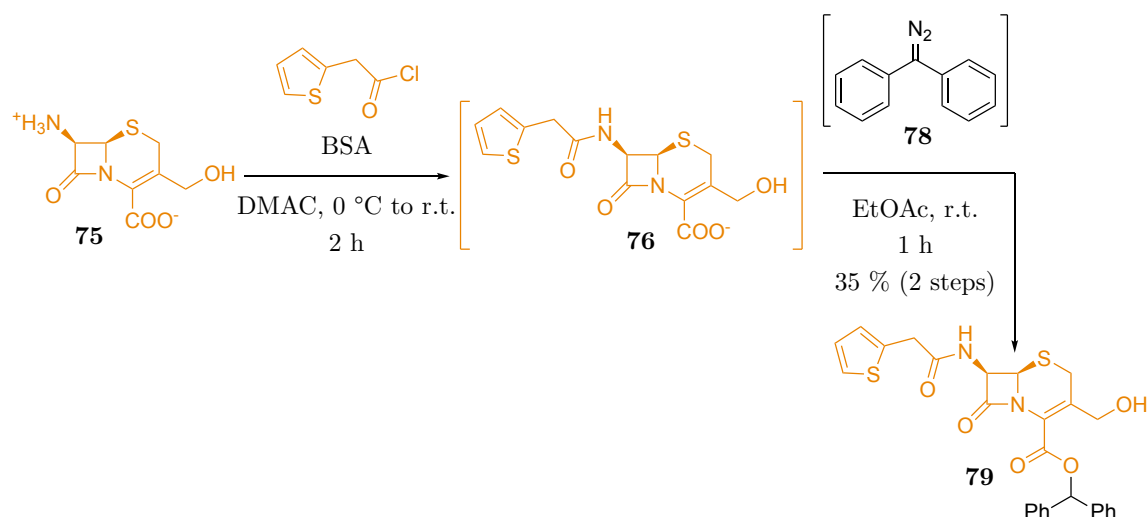
A solution of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) (2.000 g, 7.345 mmol, 1.0 eq.) in H<sub>2</sub>O/MeOH (20 mL, 1/1 v/v) was cooled to -20 °C, then a solution of 10 M NaOH was added and the resulting mixture was stirred at this temperature for 30 min. The pH was then adjusted to 3 by adding concentrated HCl. The temperature was increased to 0 °C and the precipitated light yellow solid was filtered, and washed with MeOH, acetone, and ether before drying. The desired alcohol **75** (1.451 mg, 6.302 mmol, 86 %) was obtained as an off white powder.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 4.83 (AB system,  $\Delta\mu = 59$  Hz,  $J = 5$  Hz, 2H), 4.21 (AB system,  $\Delta\mu = 17$  Hz,  $J = 13$  Hz, 2H), 3.52 (AB system,  $\Delta\mu = 26$  Hz,  $J = 18$  Hz, 2H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[448]</sup>



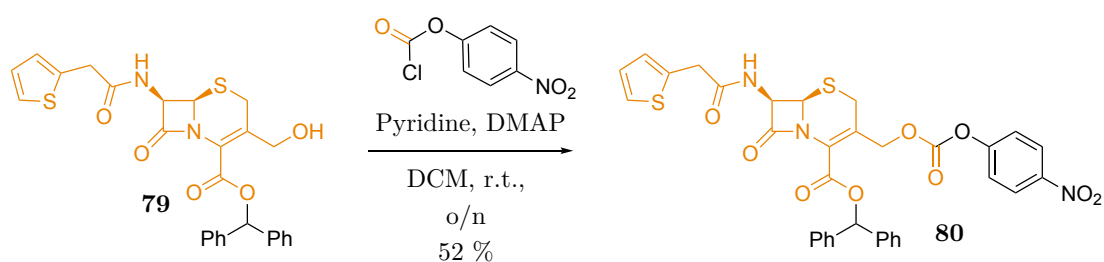
To a solution of benzophenone hydrazone (4.906 g, 25.00 mmol, 1.0 eq.) in PE (30 mL) was added mercury oxide (II) (25.469 g, 25.25 mmol, 1.01 eq.) and the resulting mixture was stirred, protected from light, for 6 h at room temperature. The purple mixture was filtered to remove mercury residues and the resulting solution was evaporated under reduced pressure. The purple liquid obtained was dissolved in EtOAc (15 mL) to reduce its instability. Diazodiphenylmethane **78** (4.570 g, 23.53 mmol, 94 %) solution in EtOAc was used quickly and without further purification.



To a solution of compound **75** (5.000 g, 21.72 mmol, 1.0 eq.) in dimethylacetamide (DMAC) (80 mL) was added bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) (13.3 mL, 54.29 mmol, 2.5 eq.) and the resulting mixture was stirred for 30 min at room temperature. Then the clear solution was cooled to  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 2-thiopheneacetyl chloride (3.48 mL, 28.23 mmol, 1.3 eq.) was added dropwise, the mixture was stirred for 2 h at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , poured into icy water and extracted with EtOAc. The combined organic solution was washed with brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the volume of solvent was adjusted to 80 mL by evaporation under reduced pressure. Then, the solution was cooled to  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  and diazodiphenylmethane (4.429 g, 22.80 mmol, 1.05 eq.) in solution in EtOAc was added until persistence of the purple color. The solvent was almost completely evaporated under reduced pressure and the remaining concentrated solution was added dropwise to a solution of pentane (300 mL), a yellow solid then separated. Filtration of the mixture provided the double protected product **79** (3.957 g, 7.601 mmol, 35 % over two steps) as a light yellow solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 9.23–9.12 (m, 1H), 7.54–7.46 (m, 11H), 7.01–6.88 (m, 3H), 5.89–5.67 (m, 1H), 5.20–5.02 (m, 2H), 4.21 (d,  $J = 4\text{ Hz}$ , 1H), 3.78 (s, 2H), 3.62 (s, 1H), 2.95 (s, 1H), 2.79 (s, 1H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[448]</sup>

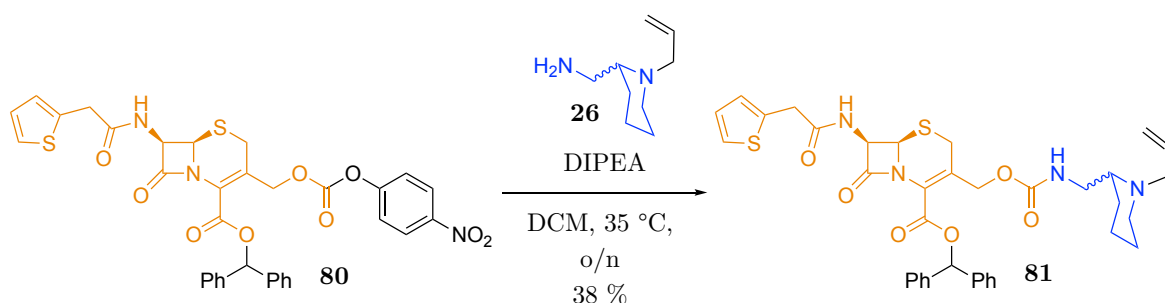




To an ice-cold solution of alcohol **79** (1.000 g, 1.921 mmol, 1.0 eq.) in DCM (50 mL) was added 4-nitrophenyl chloroformate (775 mg, 3.842 mmol, 2.0 eq.), pyridine (155  $\mu$ L, 1.921 mmol, 1.0 eq.) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (24 mg, 0.192 mmol, 0.1 eq.). The resulting mixture was stirred for 2 h at room temperature, then washed with water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by flash column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 70/30) to provide the desired carbonate **80** (685 g, 0.999 mmol, 52 %) as a light yellow solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 8.26 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 7.43 (d,  $J$  = 7 Hz, 2H), 7.40–7.23 (m, 11H), 7.03–6.98 (m, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 11 Hz, 2H), 6.65 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 5.89 (dd,  $J$  = 9 Hz,  $J$  = 5 Hz, 1H), 5.26 (d,  $J$  = 13 Hz, 1H), 5.04–4.95 (m, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.52 (AB system,  $\Delta\mu$  = 55 Hz,  $J$  = 19 Hz, 2H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[448]</sup>

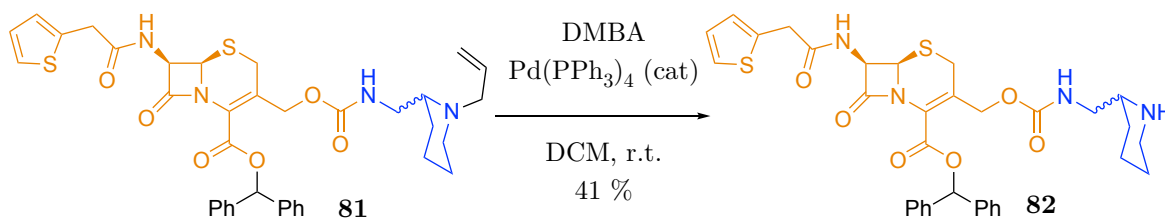


According to general procedure **B** and using the carbonate **80** (100 mg, 0.146 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **26** (25 mg, 0.160 mmol, 1.2 eq.) and DIPEA (127  $\mu$ L, 0.729 mmol, 5.0 eq.) in DCM (2 mL), the secondary amine **81** (39 mg, 0.056 mmol, 38%) was obtained as a yellow oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 7.57–7.48 (m, 1H), 7.42–7.22 (m, 11H), 7.09–6.84 (m, 3H), 5.94–5.75 (m, 1H), 5.25–4.94 (m, 3H), 3.94–3.63 (m, 2H), 3.49–3.12 (m, 4H), 3.04–2.74 (m, 2H), 2.53–1.98 (m, 4H), 1.81–1.37 (m, 6H).

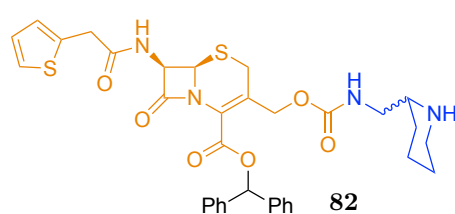
LCMS : ESI : [M+H]<sup>+</sup> m/z found 701.2, calc. 701.2.

According to general procedure **C** and using the tertiary amine **81** (39 mg, 0.056 mmol, 1.0 eq.), DMBA (43 mg, 0.278 mmol, 5.0 eq.) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1 mg, 0.0006 mmol, 0.01 eq.) in DCM (1.5 mL), the secondary amine **82** (15 mg, 0.023 mmol, 41 %) was obtained as a yellow oil.

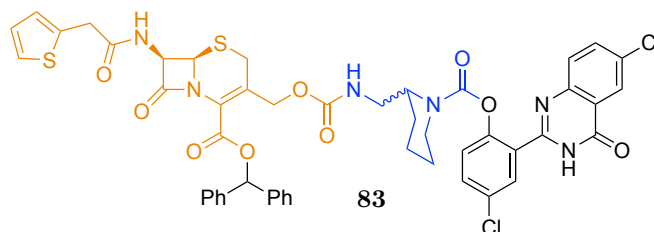


NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.46–7.17 (m, 10H), 7.04–6.84 (m, 2H), 5.53–5.32 (m, 1H), 5.08–4.92 (m, 1H), 4.30–4.03 (m, 1H), 4.00–3.88 (m, 2H), 3.79–3.71 (m, 2H), 3.55–3.40 (m, 2H), 3.40–2.85 (m, 4H), 2.85–2.59 (m, 1H), 1.88–1.45 (m, 6H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 661.2, calc. 661.2.



ELF-97  
Triphosgene  
DIPEA  
DCM, 0 °C  
to r.t., o/n  
53 %



According to general procedure **D** and using the amine **82** (15 mg, 0.023 mmol, 1.0 eq.), **ELF-97** (7 mg, 0.023 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (20 mg, 0.068 mmol, 3.0 eq.) and **DIPEA** (20  $\mu\text{L}$ , 0.113 mmol, 5.0 eq.) in **DCM** (2 x 1.0 mL), the protected probe **83** (12 mg, 0.012 mmol, 53 %) was obtained as an off white solid.

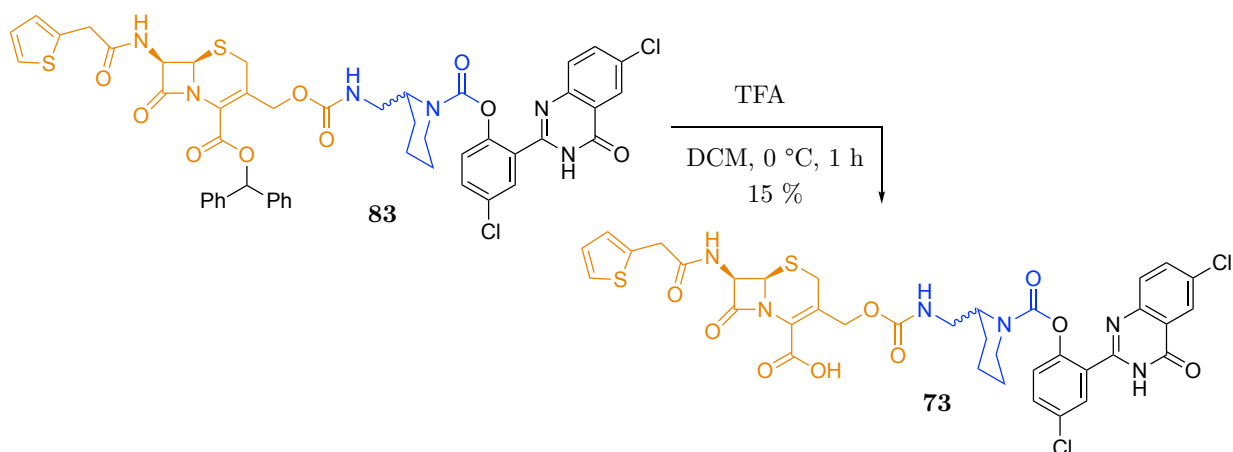
The NMR spectra were too complicated to be attributed.

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 992.0, calc. 992.3.

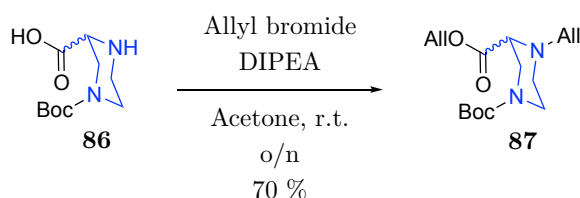
According to general procedure **F** and using the protected probe **83** (12 mg, 0.012 mmol, 1.0 eq.), **TFA** (500  $\mu\text{L}$ , excess) and anisole (7.2  $\mu\text{g}$ , 0.66 mmol, 5.5 eq.) in **DCM** (1.0 mL), the probe **73** (1.5 mg, 0.0018 mmol, 15 %) was obtained as a white powder.

The NMR spectra were too complicated to be attributed.

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 826.3, calc. 826.1.



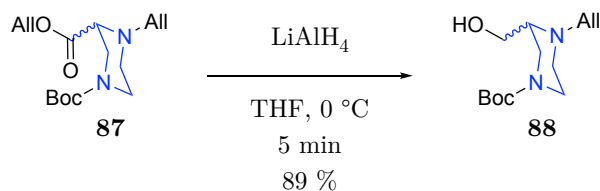
### Synthesis of tripartite spacer 90



To a solution of 4-Boc-piperazine-2-carboxylic acid (**86**) (2.514 g, 10.918 mmol, 1.0 eq.) in acetone (25 mL) was added DIPEA (8.000 mL, 45.930 mmol, 4.21 eq.) and allyl bromide (4.000 mL, 46.223 mmol, 4.23 eq.) and the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then the mixture was filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was solubilised in ethyl acetate and washed with aqueous saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 90/10 to 80/20 v/v) to provide the double allylated product **87** (2.372 g, 7.643 mmol, 70 %) as a colorless oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 6.00–5.75 (m, 2H), 5.38–5.12 (m, 4H), 4.61 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 3.83–3.67 (br, m, 1H), 3.67–3.46 (br, m, 2H), 3.45–3.35 (br, s, 1H), 3.35–3.23 (m, 2H), 3.16–3.01 (m, 2H), 2.43–2.26 (br, s, 1H), 1.44 (s, 9H).

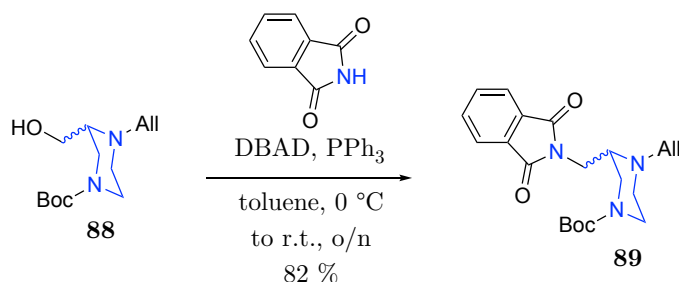
LCMS : ESI : [M+H]<sup>+</sup> m/z found 310.9, calc. 311.2.



To an ice-cold solution of allyl ester **87** (700 mg, 2.255 mmol, 1.0 eq.) in *tetrahydrofuran* (THF) under argon atmosphere was added dropwise a 1 M solution of LiAlH<sub>4</sub> in THF (4.500 mL, 4.500 mmol, 2.0 eq.). After 5 min of stirring, the reaction mixture was quenched using the Fieser method (water, NaOH, and water again) and filtered over a pad of Celite, which was rinsed with DCM. The crude solution was evaporated under reduced pressure and the resulting oil was purified by flash column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 30/70 to 0/100 v/v) to provide the desired alcohol **88** (517 mg, 2.017 mmol, 89 %) as a colorless oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 5.92–5.77 (m, 1H), 5.31–5.14 (m, 2H), 3.79 (dd,  $J = 11$  Hz,  $J = 5$  Hz, 1H), 3.72 (m, 2H), 3.51 (dd,  $J = 11$  Hz,  $J = 4$  Hz, 1H), 3.43 (dd,  $J = 14$  Hz,  $J = 5$  Hz, 1H), 3.34–3.10 (br, m, 2H), 3.04 (dd,  $J = 14$  Hz,  $J = 7$  Hz, 1H), 2.91–2.79 (br, m, 1H), 2.52 (br, s, 1H), 2.41–2.30 (m, 1H), 1.46 (s, 9H).

LCMS : ESI : [M+H]<sup>+</sup> m/z found 257.0, calc. 257.2.

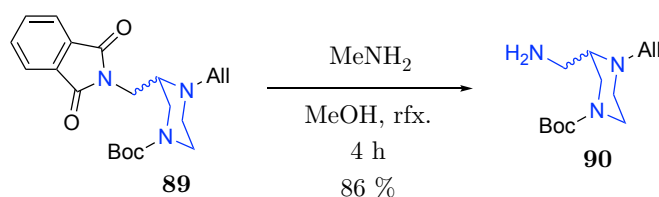


To an ice-cold solution of alcohol **88** (278 mg, 1.084 mmol, 1.0 eq.) in toluene (1.5 mL) was added phthalimide (239 mg, 1.624 mmol, 1.5 eq.), triphenylphosphine (426 mg, 1.624 mmol, 1.5 eq.) and Di-*tert*-butyl azodicarboxylate (DBAD) (375 mg, 1.629 mmol, 1.5 eq.), the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. Then magnesium chloride (hexahydrate) was added with PE (3 mL) and the mixture stirred for 2 h at 60 °C. The resulting mixture was cooled to 0 °C and filtered, the filter was rinsed with EtOAc and the combined organic solutions were evaporated under reduced pressure. The resulting crude mixture was purified by flash column chromatography on silica gel (PE/acetone) 95/5 to 85/15 v/v) to provide the desired phtalimide derivative **89** (345 mg, 0.895 mmol, 82 %) as a light yellow solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  (ppm) = 7.90–7.80 (m, 2H), 7.77–7.66 (m, 2H), 5.90–5.72 (m, 1H), 5.25–5.08 (m, 2H), 4.01–3.82 (br, m, 1H), 3.82–3.64 (br, m, 1H), 3.64–3.28 (br, m, 4H), 3.28–3.12 (m, 2H), 3.01–2.83 (m, 2H), 2.42 (br, s, 1H), 1.41

(s, 9H).

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$  m/z found 386.4, calc. 386.2.

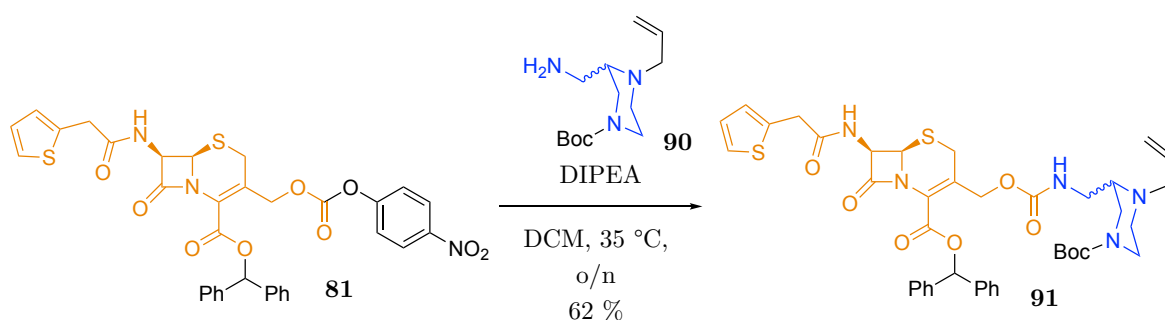


To a solution of phthalimide derivative **89** (50 mg, 0.124 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (2 mL) was added a solution of 33 % (v/v) ethanolic solution of methylamine (2 mL, excess). The resulting solution was refluxed for 4 h. Then the solution was cooled to room temperature and the solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting crude was put in water and the solution was acidified with 1 M HCl to pH = 3, washed with diethyl ether, basified to pH = 12 with 2 M NaOH, extracted with EtOAc, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under reduced pressure. The protected tripartite spacer **90** (23 mg, 0.091 mmol, 86 %) was obtained as light yellow oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 6.40 (br, s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 5.93–5.76 (m, 1H), 5.28–5.10 (m, 2H), 3.71–3.54 (m, 2H), 3.37 (dd, *J* = 14 Hz, *J* = 6 Hz, 1H), 3.32–3.16 (m, 2H), 3.08–2.83 (m, 2H), 2.83–2.72 (m, 2H), 2.41–2.26 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$  m/z found 256.3, calc. 256.2.

### Synthesis of tripartite analogue probe 94

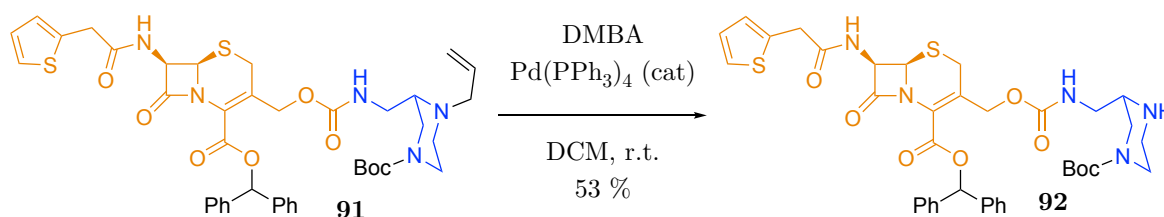


According to general procedure **B** and using the carbonate **80** (300 mg, 0.437 mmol, 1.0 eq.), protected spacer **90** (134 mg, 0.525 mmol, 1.2 eq.) and DIPEA (381 μL,

2.19 mmol, 5.0 eq.) in DCM (7.0 mL), the tertiary amine **91** (220 mg, 0.274 mmol, 62%) was obtained as a yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.43–7.27 (m, 10H), 7.04–6.91 (m, 2H), 6.47–6.31 (m, 1H), 5.90–5.75 (m, 1H), 5.24–5.05 (m, 3H), 4.63–4.47 (m, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.71–3.47 (m, 2H), 3.39–2.97 (m, 5H), 2.84–2.67 (br, s, 1H), 2.62–2.45 (br, s, 1H), 2.38–2.26 (br, s, 1H), 1.45 (s, 9H).

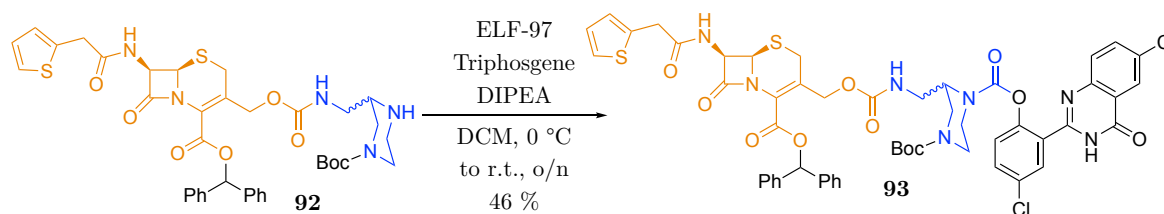
LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 802.3, calc. 802.3.



According to general procedure **C** and using the tertiary amine **91** (100 mg, 0.125 mmol, 1.0 eq.), DMBA (98 mg, 0.628 mmol, 5.0 eq.) and  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1 mg, 0.0011 mmol, 0.01 eq.) in DCM (3 mL), the secondary amine **92** (50 mg, 0.066 mmol, 53 %) was obtained as a light yellow oil.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.43–7.28 (m, 10H), 7.02–6.95 (m, 2H), 6.90–6.86 (m, 1H), 6.44–6.35 (m, 1H), 5.22–5.05 (m, 1H), 4.60–4.51 (m, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.41–3.17 (m, 1H), 3.17–2.80 (m, 4H), 2.76–2.65 (m, 2H), 1.46 (s, 9H).

LCMS : ESI :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  m/z found 762.3, calc. 762.3.

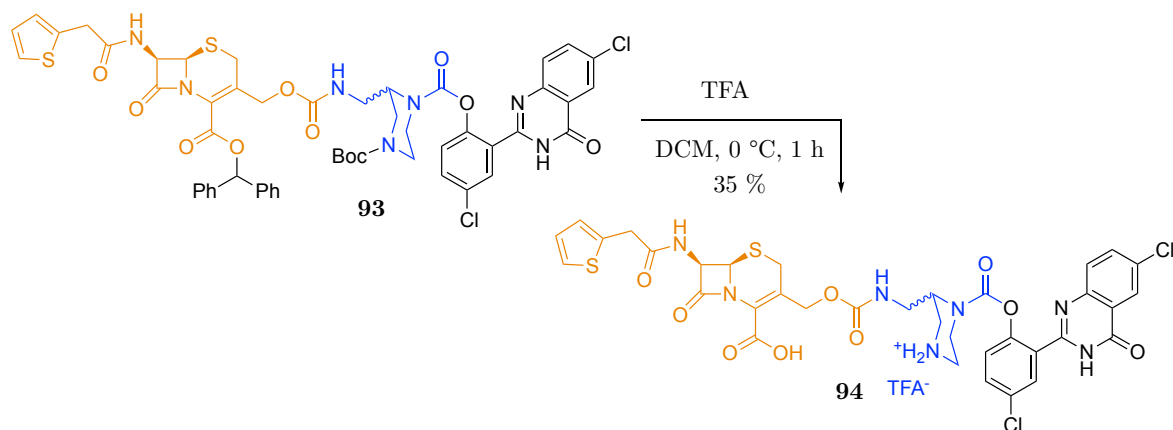


According to general procedure **D** and using the amine **92** (50 mg, 0.066 mmol, 1.0 eq.), ELF-97 (20 mg, 0.066 mmol, 1.0 eq.), triphosgene (58 mg, 0.197 mmol, 3.0 eq.) and DIPEA (57  $\mu\text{L}$ , 0.328 mmol, 5.0 eq.) in DCM (2 x 1.5 mL), the protected probe **93** (33 mg, 0.030 mmol, 46 %) was obtained as a light yellow solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.29–7.92 (m, 1H), 7.73 (s, 2HH),

7.53–7.39 (m, 1H), 7.39–7.27 (m, 10H), 7.18–7.05 (m, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.42–6.15 (m, 1H), 5.87–5.40 (m, 1H), 5.24–5.07 (m, 1H), 4.06–3.89 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.58–2.80 (m, 5H), 1.47 (s, 9H).

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$   $m/z$  found 1094.1, calc. 1094.2.



According to general procedure **F** and using the protected probe **93** (20 mg, 0.018 mmol, 1.0 eq.), **TFA** (200  $\mu$ L, excess) and anisole (11  $\mu$ L, 0.101 mmol, 5.5 eq.) in **DCM** (2.0 mL), the probe **94** (0.8 mg, 0.001 mmol, 5 %) was obtained as a white powder.

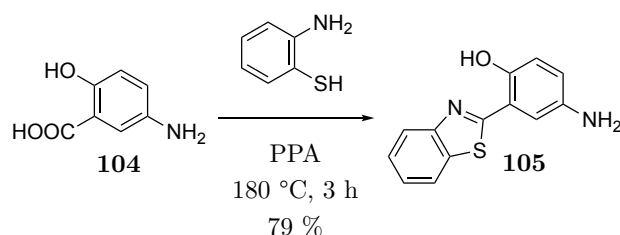
The NMR spectra were too complicated to be attributed.

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$   $m/z$  found 828.1, calc. 828.1.

## Partie expérimentale du chapitre 3

### Synthesis of fluorophores

#### Synthesis du fluorophore "Stefani"

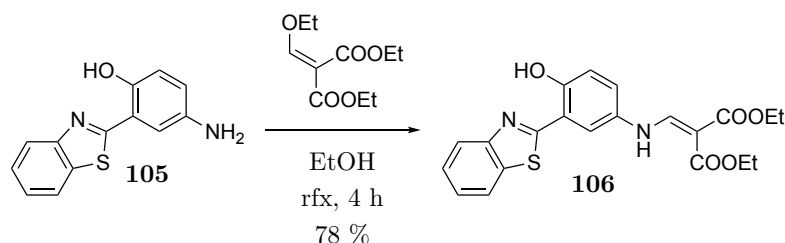


To a solution of *p*-aminosalicylic acid (3.829 g, 25.0 mmol, 1 eq.) in polyphosphoric acid (12.5 mL) was added 2-aminothiophenol (2.698 mL, 25.0 mmol, 1 eq.), the resulted

mixture was stirred for 3 h at 180 °C. The reaction mixture was poured into distilled water and the pH was adjusted to 7 with 30 % NaOH solution. The precipitate green solid was collected by filtration and washed with water till colorless. After drying under high vacuum, 2-(5-amino-2-hydroxyphenyl)benzothiazole (HBT) **105** (4.785 g, 19.75 mmol, 79 %) was obtained as a light green powder.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 10.67 (br, s, 1H), 8.12 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 8.01 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.53 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.43 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.37 (d,  $J$  = 3 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 6.71 (dd,  $J$  = 9 Hz,  $J$  = 3 Hz, 1H), 4.83 (br, s, 2H).

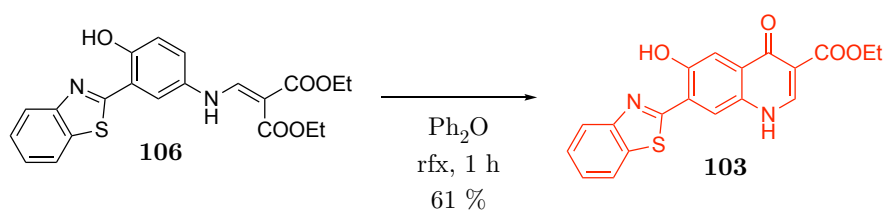
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[424]</sup>



An equimolar solution of compound **105** (1.212 g, 5.00 mmol, 1 eq.) and diethyl ethoxymethylenemalonate (1.081 g, 5.00 mmol, 1 eq.) in ethanol (15 ml) was refluxed for 4 h, the reaction mixture was evaporated under reduced pressure and the separated solid was crystallised from ethanol to provide the desired product **106** (1.606 g, 3.89 mmol, 78 %) as a dark green solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 11.55 (br, s, 1H), 10.76 (d,  $J$  = 14 Hz, 1H), 8.37 (d,  $J$  = 14 Hz, 1H), 8.21–8.13 (m, 2H), 8.09 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.60–7.52 (m, 1H), 7.51–7.42 (m, 2H), 7.10 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 4.22 (q,  $J$  = 7 Hz, 2H), 4.14 (q,  $J$  = 7 Hz, 2H), 1.26 (q,  $J$  = 7 Hz, 6H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[425]</sup>



A solution of compound **106** (412 mg, 1.00 mmol, 1 eq.) in diphenyl ether (5 ml) was refluxed for 1 h, cooled to room temperature, diluted with Et<sub>2</sub>O (100 ml) and

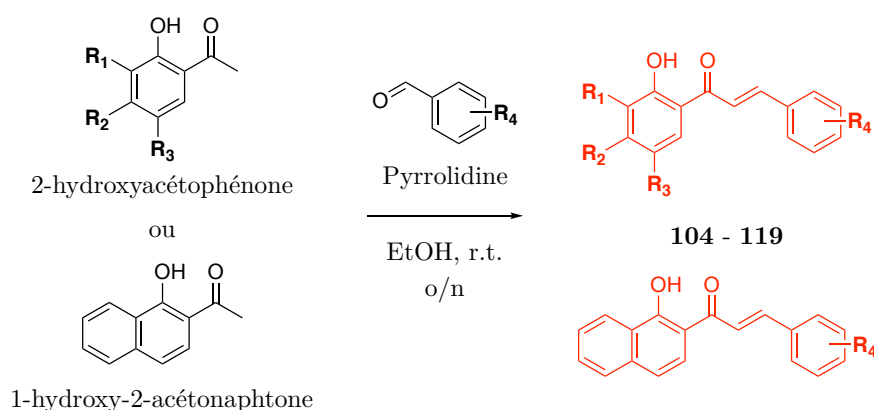


filtered. The obtained precipitate was washed with PE and DMF, then dried under high vacuum to provide the desired fluorophore **104** (252 mg, 0.61 mmol, 61 %) as a light green solid.

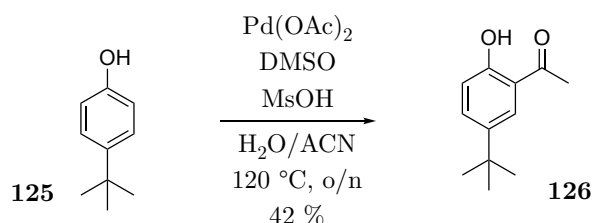
NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 12.10 (br, s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.18 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 8.09 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.57 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 4.20 (q,  $J = 7$  Hz, 2H), 1.28 (t,  $J = 7$  Hz, 3H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[425]</sup>

### Synthèses des fluorophores de la famille des chalcones



**General protocol G** To a solution of methylcetone (1 eq.) in EtOH was added the benzaldehyde (1 eq) and pyrrolidine (1 eq). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The precipitated solid was filtered and washed with cold EtOH and PE to obtain the desired condensed product. If necessary, crystallization from minimum DCM solution in MeOH give the purified product.

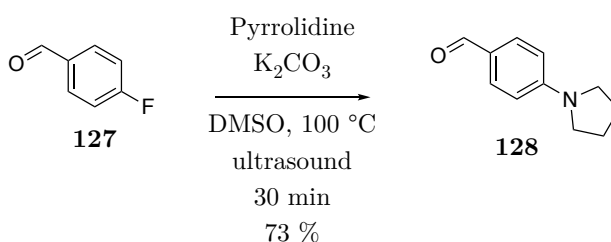


**Synthesis of precursors** To a solution of phenol **125** (608 mg, 4.00 mmol, 1.0 eq.) in acetonitrile (10 mL) was added  $\text{Pd(OAc)}_2$  (88 mg, 0.4 mmol, 0.1 eq.), DMSO (568  $\mu\text{L}$ , 8.0 mmol, 2.0 eq.), MsOH (2.5 mL) and  $\text{H}_2\text{O}$  (2.0 mL), the resulting mixture was stirred at 120 °C for 24 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure.

The residue was purified by flash column chromatography on a silica gel (PE/EtOAc 4/1 v/v) to provide the desired cetone **126** (323 mg, 1.68 mmol, 42 %) as a yellow solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 12.12 (s, 1H), 7.68 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.54 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 2.65 (s, 3H), 1.32 (s, 9H).

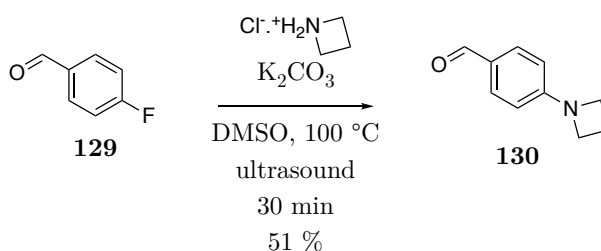
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[449]</sup>



To a solution of pyrrolidine (882  $\mu\text{L}$ , 10.0 mmol, 1.0 eq.) in DMSO (10 mL) was added 4-fluorobenzaldehyde (1.073 mL, 10.0 mmol, 1.0 eq.) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.520 g, 11.0 mmol, 1.1 eq.). The resulting mixture was sonicated for 30 min, the temperature of the reaction mixture raised to approximately 100  $^\circ\text{C}$  at the end of the sonication. The reaction mixture was cooled down to 60  $^\circ\text{C}$  and then poured into distilled water (200 mL). The emulsion formed was extracted with diethyl ether. The ether solution was washed with water, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. Repetitive filtration of this ether solution provided several batches of the pure aldehyde **128** (1.281 mg, 7.31 mmol, 73 %) as a pale orange solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 9.72 (s, 1H), 7.73 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 6.57 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.44–3.35 (m, 4H), 2.09–2.02 (m, 4H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[450]</sup>

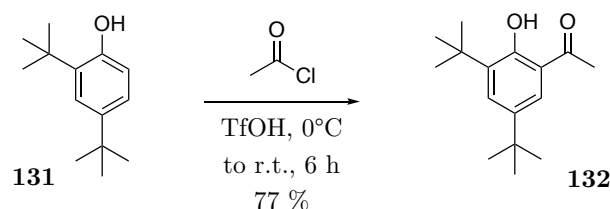


To a solution of aztidine hydrochloride (468 mg, 5.0 mmol, 1.0 eq.) in DMSO (5 mL) was added 4-fluorobenzaldehyde (536  $\mu\text{L}$ , 5.0 mmol, 1.0 eq.) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.520 g, 11.0 mmol, 2.2 eq.). The resulting mixture was sonicated for 30 min, the temperature

of the reaction mixture raised to approximately 100 °C at the end of the sonication. The reaction mixture was cooled down to 60 °C and then poured into distilled water (200 mL). The emulsion formed was extracted with diethyl ether. The ether solution was washed with water, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The resulting yellow oil was further purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc, 10/0 to 8/2 v/v) to provide the pure aldehyde **130** (410 mg, 2.54 mmol, 51 %) as a yellow solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 9.70 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.36 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 4.00 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 2.42 (quintuplet, *J* = 7 Hz, 2H).

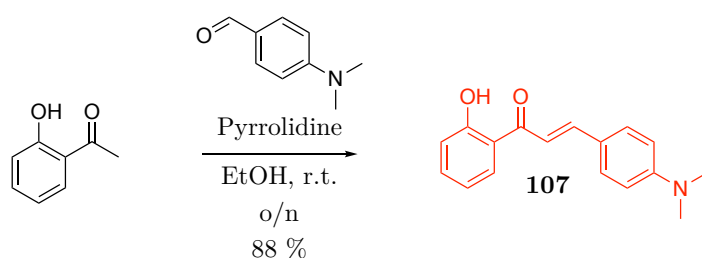
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[450]</sup>



To a solution of 2,4-di-*tert*-butylphenol **131** (385 mg, 1.87 mmol, 1.0 eq.) in TfOH (10 mL) at 0 °C was added acetyl chloride (139 μL, 1.87 mmol, 1.0 eq.). The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 6 h, then poured into cold water and EtOAc. The organic layer was washed with 1 M HCl, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was subjected silica column chromatography (PE/EtOAc, 8/2 v/v) to provide the cetone **132** (358 mg, 1.43 mmol, 77 %) as a yellow oil.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 12.96 (s, 1H), 7.59–7.55 (m, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.32 (s, 9H).

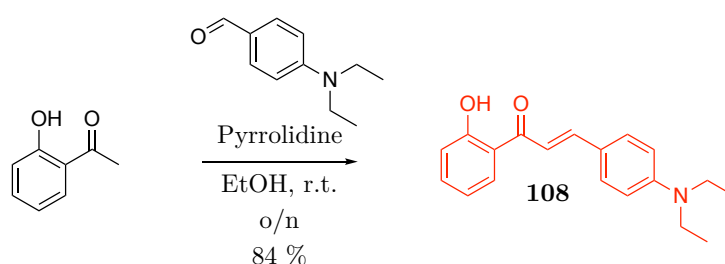
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[451]</sup>



**Synthesis of fluorophores** According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (602  $\mu$ L, 5.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (748 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (441  $\mu$ L, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (15 mL), the fluorophore **107** (1176 mg, 4.40 mmol, 88 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 13.19 (s, 1H), 7.97–7.88 (m, 2H), 7.58 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.50–7.41 (m, 2H), 7.03–6.88 (m, 2H), 6.70 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.10 (s, 6H).

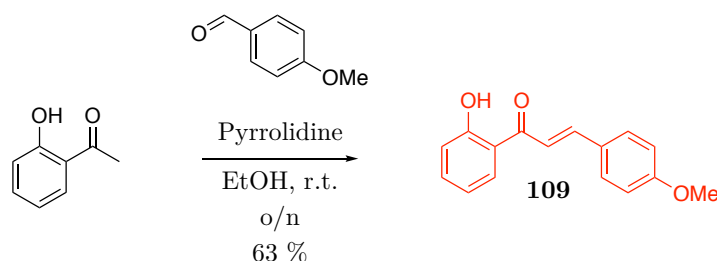
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[200]</sup>



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (602  $\mu$ L, 5.00 mmol, 1.0 eq.), diethylaminobenzaldehyde (886 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (441  $\mu$ L, 5.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (15 mL), the fluorophore **108** (1235 mg, 4.18 mmol, 84 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 13.23 (s, 1H), 7.97–7.87 (m, 2H), 7.56 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.50–7.39 (m, 2H), 7.01 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.92 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.67 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.43 (q,  $J = 7$  Hz, 4H), 1.22 (t,  $J = 7$  Hz, 6H).

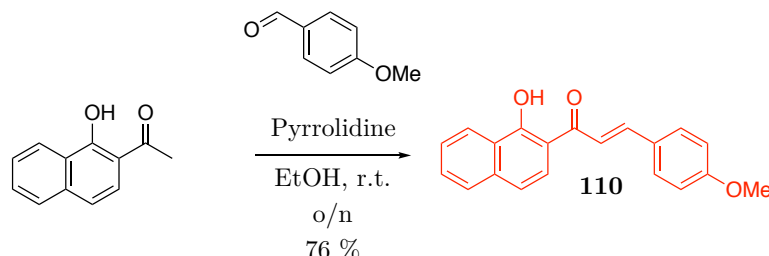
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[452]</sup>



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (120  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-methoxybenzaldehyde (121  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), the fluorophore **109** (159 mg, 0.63 mmol, 63 %) was obtained as a yellow powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.96–7.88 (m, 2H), 7.64 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H), 7.59–7.46 (m, 2H), 7.07–6.91 (m, 4H), 3.87 (s, 3H).

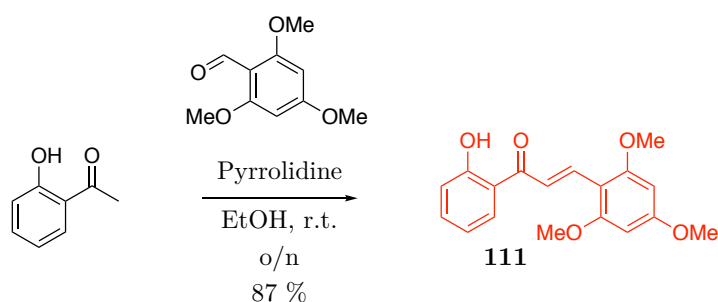
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 193.84, 163.71, 162.19, 145.51, 136.30, 130.70, 128.68, 127.51, 120.28, 118.90, 118.75, 117.77, 114.68, 55.61.



According to general procedure **G** and using 1'-hydroxy-2'-acetonaphthone (186 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-methoxybenzaldehyde (121  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), the fluorophore **110** (232 mg, 0.76 mmol, 76 %) was obtained as an orange powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.50 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.96 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H), 7.85 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 7.77 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.69–7.59 (m, 4H), 7.54 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.30 (d,  $J$  = 9 Hz, 1H), 6.96 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H).

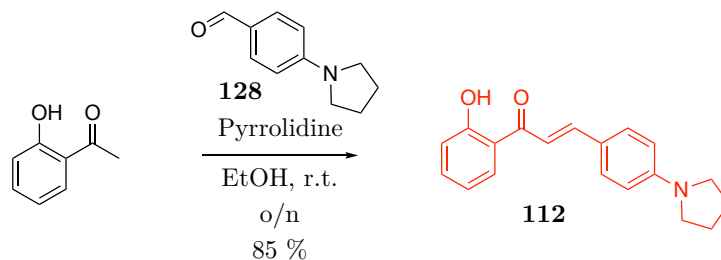
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 193.23, 164.29, 161.99, 144.99, 137.32, 130.57, 130.07, 127.55, 127.39, 125.88, 125.57, 124.49, 123.97, 118.11, 117.97, 114.54, 113.54, 55.47.



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (120  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.), 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (196 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), the fluorophore **111** (273 mg, 0.87 mmol, 87 %) was obtained as a yellow powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.39 (d,  $J$  = 16 Hz, 1H), 8.02 (d,  $J$  = 16 Hz, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.45 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.00 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6.91 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6.15 (s, 2H), 3.94 (s, 6H), 3.87 (s, 3H).

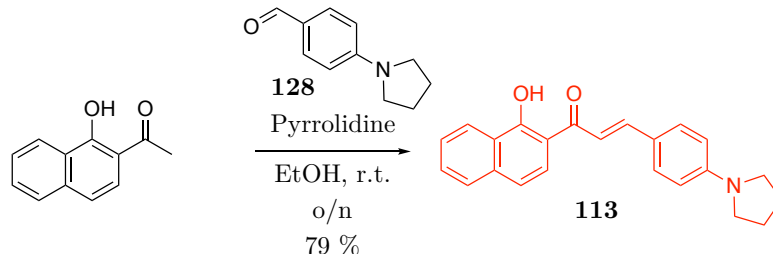
$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 195.32, 163.67, 163.51, 162.05, 136.79, 135.52, 129.64, 120.66, 119.50, 118.49, 118.38, 106.53, 90.58, 55.91, 55.46.



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (120  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-(1-pyrrolidinyl)benzaldehyde **128** (175 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **112** (249 mg, 0.85 mmol, 85 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 13.23 (s, 1H), 7.99–7.87 (m, 2H), 7.57 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.49–7.39 (m, 2H), 7.00 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.92 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 6.57 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.44–3.31 (m, 4H), 2.11–1.99 (m, 4H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[434]</sup>

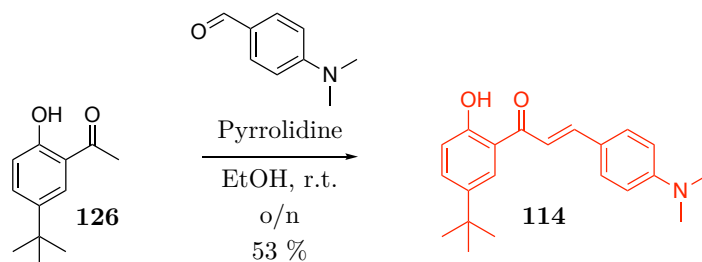


According to general procedure **G** and using 1'-hydroxy-2'-acetonaphthone (136 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-(1-pyrrolidinyl)benzaldehyde **128** (175 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **113** (271 mg, 0.79 mmol, 79 %) was obtained as a purple powder.

NMR :  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.49 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.99 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 7.87 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.65–7.57 (m, 3H), 7.57–7.48 (m, 2H), 7.29 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 6.58 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.44–3.34 (m, 4H), 2.10–2.02 (m, 4H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[453]</sup>

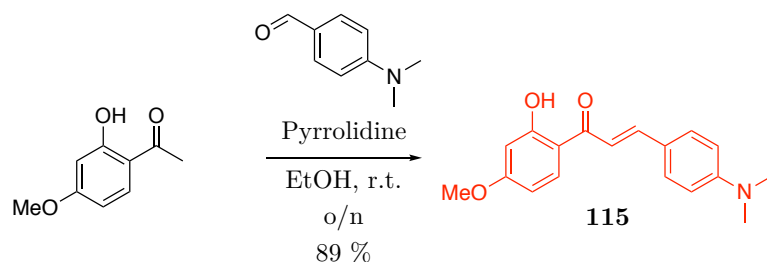
According to general procedure **G** and using cetone **126** (192 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine



(88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **114** (171 mg, 52.8 mmol, 53 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.92 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 7.87 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.59 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.53 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.07 (s, 3H), 1.36 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 193.87, 161.44, 152.45, 146.41, 141.88, 141.23, 133.55, 130.92, 125.33, 122.62, 119.80, 118.17, 114.72, 111.99, 40.28, 34.32, 31.57.

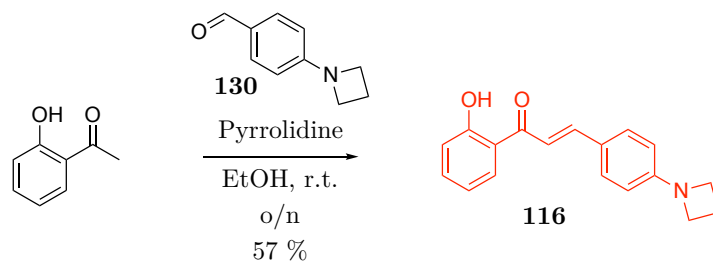


According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-4-methoxyacetophenone (166 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **115** (265 mg, 0.89 mmol, 89 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.92–7.81 (m, 2H), 7.56 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.38 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 6.70 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 6.50–6.44 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.05 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 192.04, 166.62, 165.81, 152.30, 145.57, 131.08, 130.75, 122.68, 114.72, 114.49, 111.96, 107.48, 101.18, 55.67, 40.26.

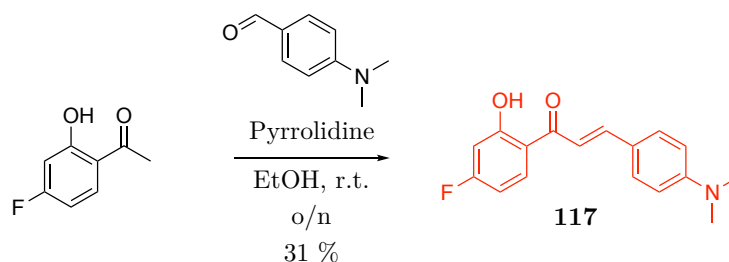
According to general procedure **G** and using 2'-hydroxyacetophenone (120  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-(azetid-1-yl)benzaldehyde **130** (161 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **116** (158 mg,



0.57 mmol, 57 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.96–7.87 (m, 2H), 7.54 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H), 7.50–7.41 (m, 2H), 7.01 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6.92 (t,  $J$  = 8 Hz, 1H), 6.40 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H), 4.00 (t,  $J$  = 7 Hz, 4H), 2.43 (quintuplet,  $J$  = 7 Hz, 2H).

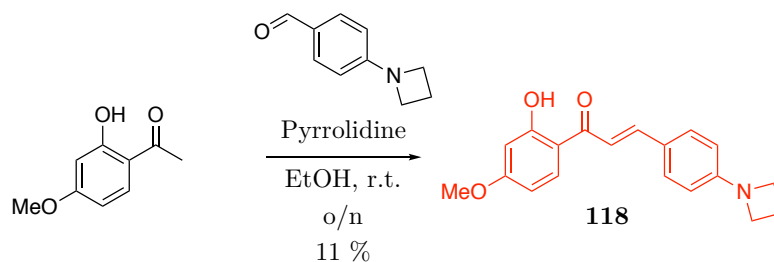
NMR :  $^{13}\text{C-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 193.65, 163.63, 153.55, 146.81, 135.82, 130.83, 129.51, 123.21, 120.53, 118.71, 118.63, 114.59, 110.84.



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-4-fluoro-acetophenone (154 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu\text{L}$ , 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **117** (89 mg, 0.31 mmol, 31 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.92 (d,  $J$  = 15 Hz, 2H), 7.57 (d,  $J$  = 8 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H), 6.74–6.59 (m, 4H), 3.07 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 192.49, 168.43, 166.24, 166.18, 165.89, 152.55, 146.92, 131.70, 131.05, 122.34, 117.54, 114.10, 111.94, 106.83, 105.12, 40.24.



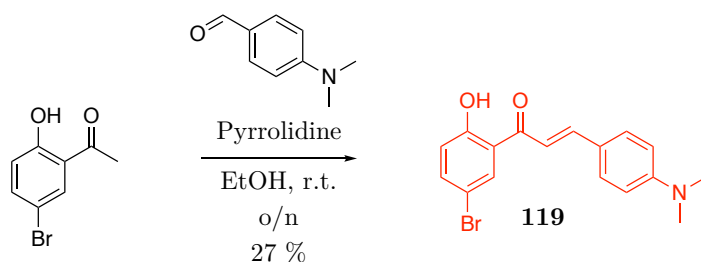
According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-4-methoxy-acetophenone (166 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-(1-pyrrolidinyl)benzaldehyde **128** (175 mg, 1.00 mmol,



1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **118** (35 mg, 0.11 mmol, 11 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.92–7.81 (m, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H), 6.56–6.53 (m, 2H), 6.49–6.43 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.41–3.33 (m, 4H), 2.07–1.99 (m, 4H).

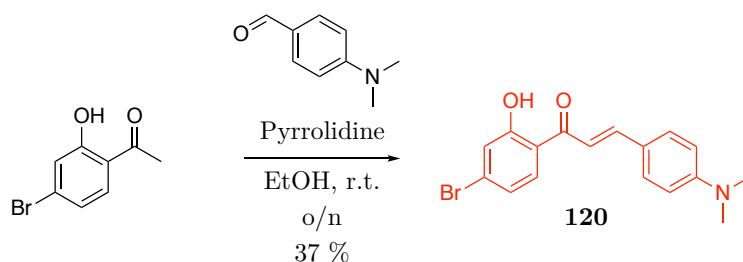
$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 192.01, 166.59, 165.73, 152.11, 145.94, 132.31, 131.01, 124.99, 122.11, 114.54, 113.98, 111.34, 107.42, 101.17, 47.75, 25.58.



According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-4-bromoacetophenone (215 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **119** (95 mg, 0.27 mmol, 27 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.93 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8 Hz, 1H), 7.57 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H), 7.05 (dd,  $J$  = 9 Hz,  $J$  = 2 Hz, 1H), 6.70 (d,  $J$  = 9 Hz, 2H), 3.07 (s, 6H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[454]</sup>

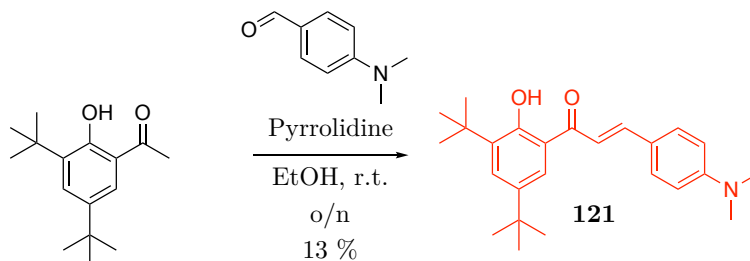


According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-5-bromoacetophenone (215 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **120** (127 mg, 0.37 mmol, 37 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.02–7.97 (m, 1H), 7.93 (d,  $J$  =

15 Hz, 1H), 7.58 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.52 (dd,  $J = 9$  Hz,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 6.69 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.07 (s, 6H).

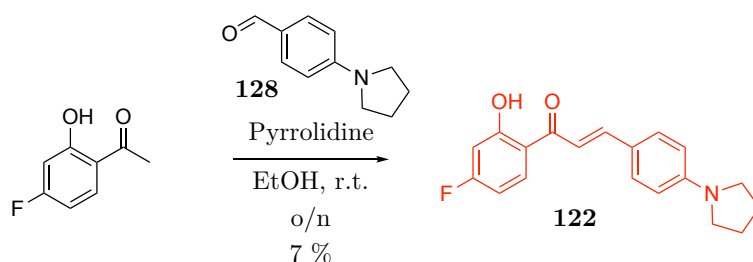
Spectral data were in accordance with literature.<sup>[454]</sup>



According to general procedure **G** and using cetone **132** (248 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **121** (51 mg, 0.13 mmol, 13 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.89 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.61–7.53 (m, 3H), 7.48 (d,  $J = 15$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 3.06 (s, 6H), 1.45 (s, 9H), 1.36 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 194.64, 161.23, 152.32, 145.86, 139.68, 138.04, 130.77, 123.25, 122.78, 119.51, 115.59, 111.99, 40.28, 35.32, 34.48, 31.62, 29.55.



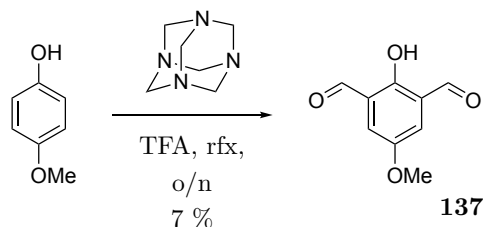
According to general procedure **G** and using 2'-hydroxy-4-fluoro-acetophenone (154 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.), 4-(1-pyrrolidinyl)benzaldehyde **128** (175 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) and pyrrolidine (88  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (3 mL), fluorophore **122** (23 mg, 0.07 mmol, 7 %) was obtained as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.98–7.87 (m, 2H), 7.56 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.33 (d,  $J = 15$  Hz, 2H), 6.72–6.50 (m, 4H), 3.38 (br, s, 4H), 2.05 (br, s, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 192.42, 190.40, 168.37, 166.18, 165.84,

152.11, 150.19, 147.27, 131.63, 131.30, 124.99, 121.82, 117.59, 113.37, 111.98, 111.34, 106.80, 105.09, 99.85, 47.76, 25.59.

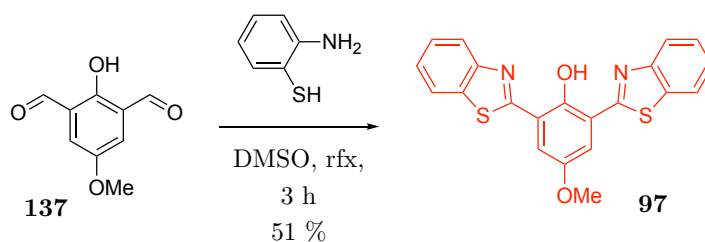
### Synthèses des fluorophores de la famille "Akutagawa"



To a solution of 4-methoxyphenol (3.000 g, 24.2 mmol, 1.0 eq.) in TFA (15 mL) under argon was added hexamethylenetetramine (6.790 g, 48.4 mmol, 2.0 eq.) in one portion. The yellow solution was refluxed until full conversion of started material (20 h). The reaction mixture was then cooled to room temperature and poured into 4 M HCl solution (100 mL) and stirred for 15 min. The product was then extracted with DCM and the combined organic extracts were washed with 4 M HCl, brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The yellow residue was purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 100/0 to 40/60 v/v) to provide the desired bis-formylated product **137** (308 mg, 1.71 mmol, 7 %) as a yellow solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 11.12 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 7.51 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[455]</sup>

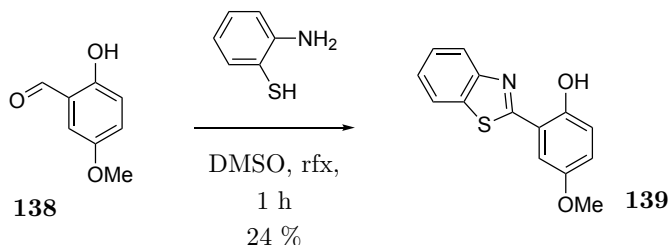


To a solution of di-aldehyde **137** (250 mg, 1.39 mmol, 1.0 eq.) in DMSO (8 mL) was added 2-aminothiophenol (348 mg, 2.78 mmol, 2.0 eq.), the resulting mixture was heated until the temperature of the vapours reached 180 °C (about 2 h). The reaction mixture was then cooled and the precipitate was filtered and dried to provide the desired fluorophore **97** (277 mg, 0.71 mmol, 51 %) as a green powder.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  (ppm) = 13.67 (s, 1H), 8.22 (d,  $J = 8$  Hz,

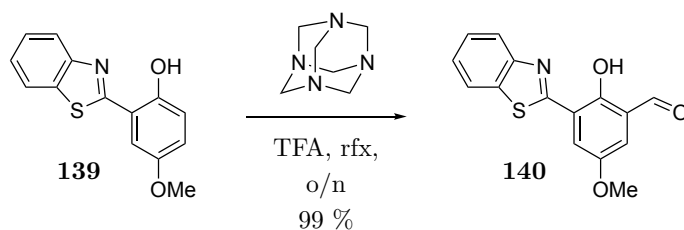
2H), 8.18 (d,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.61 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 7.89 (s, 2H), 7.53 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 3.94 (s, 3H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[439]</sup>



To a solution of 2-hydroxy-5-methoxybenzaldehyde (820  $\mu$ L, 6.58 mmol, 1.0 eq.) in DMSO (30 mL) was added 2-aminothiophenol (710  $\mu$ L, 6.58 mmol, 1.0 eq.), the resulting mixture was refluxed for 1 h, cooled to room temperature and water was added, the resulting precipitate was filtered and washed with cold methanol to provide the desired compound **139** (415 mg, 1.61 mmol, 24 %) as a yellow powder.

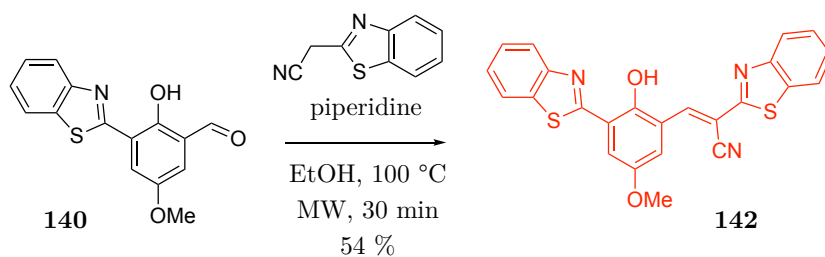
NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 12.10 (s, 1H), 8.00 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.91 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.52 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.42 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.08–6.97 (m, 2H), 3.85 (s, 3H).



To a solution of product **139** (200 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq.) in TFA (1.5 mL) under argon was added hexamethylenetetramine (109 mg, 0.78 mmol, 1.0 eq.) in one portion. The resulting mixture was refluxed overnight, cooled to room temperature, poured into 1 M HCl solution (25 mL) and stirred for 10 min. The resulting mixture was then extracted with DCM and the combined organic extracts were washed with 1 M HCl, brine, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure to provide the desired formylated product **140** (220 mg, 0.77 mmol, 99 %) as an orange solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 12.79 (s, 1H), 10.55 (s, 1H), 8.04 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.95 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.64 (br, d,  $J = 2$  Hz, 1H), 7.55 (t,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.50–7.43 (m, 2H), 3.89 (s, 3H).

To a solution of aldehyde **140** (50 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) in EtOH (1 mL) was

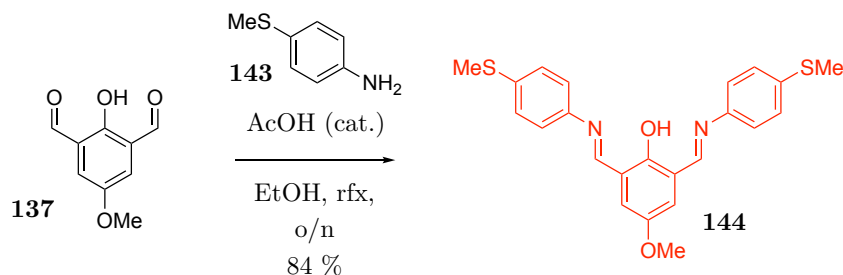


added benzothiazole-2-acetonitrile (37 g, 0.21 mmol, 1.15 eq.) and piperidine (2 drops). The resulting brown mixture was stirred at 100 °C by microwave irradiation in a sealed-tube, for 30 min. The purple reaction mixture was cooled to room temperature and filtered to provide the desired fluorophore **142** (43 mg, 0.097 mmol, 54 %) as a green powder.

Product was not soluble enough in any solvent (or mixture of solvents tested) to be analysed by NMR.

LCMS : ESI :  $[M+H]^+$  m/z found 441.6, calc. 442.1.

### Synthese du fluorophore "Pradeep"

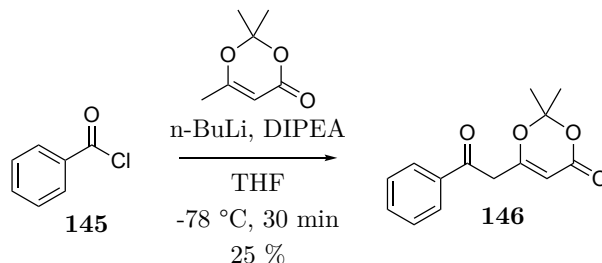


A solution of 2,6-diformyl-4-methoxyphenol **137** (180 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq.) in ethanol (5 mL) was heated at 60 °C until becoming clear, cooled down to room temperature and put under argon atmosphere. A solution of 4-(methylthio)aniline (279 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq.) in ethanol (5 mL) was added dropwise, followed by the addition of two drops of acetic acid (catalytic). The resulting mixture was refluxed overnight. Upon cooling to room temperature, a solid precipitated and was filtered off, washed with cold ethanol and dried under high vacuum to provide the desired fluorophore **144** (353 mg, 0.835 mmol, 84 %) as a golden powder. Crystallization from ethanol gave golden yellow crystals.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 13.53 (s, 1H), 8.83 (br, s, 2H), 7.32 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 9$  Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 2.52 (s, 6H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[440]</sup>

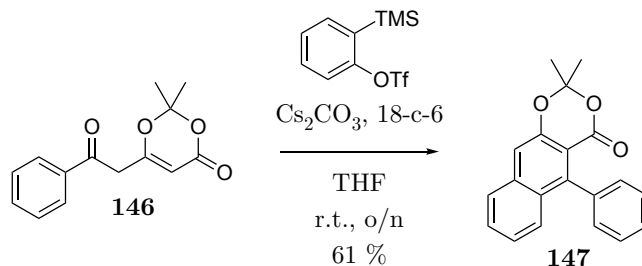
### Synthese du fluorophore 6-hydroxy-11*H*-benzo[*c*]fluoren-11-one (6-HBCF)



To a stirred solution of **DIPEA** (6.968 mL, 40.0 mmol, 2.0 eq.) in **THF** (40 mL) at  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  was added 1.6 M in hexane solution of *n*-BuLi (25.0 mL, 40.0 mmol, 2.0 eq.). The resulting mixture was heated to  $0\text{ }^\circ\text{C}$  and stirred for 30 min before it was cooled to  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  and 2,2,6-trimethyl- 2,4-dihydro-1,3-dioxin-4-one (2.657 mL, 20.0 mmol, 1.0 eq.) was added. The resulting mixture was stirred at  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  for 30 min before benzoyl chloride (2.324 mL, 20.0 mmol, 1.0 eq. was added. The resulting mixture was warmed to  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  and stirred for 2 h before it was quenched at  $0\text{ }^\circ\text{C}$  with 1 M HCl. The layers were separated and the aqueous layer was extracted with **EtOAc**. The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under reduced pressure. Precipitation in a mixture of  $\text{Et}_2\text{O}$ /pentane (1/10 v/v) gave a solid which was further purified by column chromatography on silica gel (**PE**/**EtOAc** 8/2 v/v) to provide the desired dioxinone **146** (1.248 g, 5.06 mmol, 25 %) as an off white solid.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 7.94 (d,  $J = 7\text{ Hz}$ , 2H), 7.63 (t,  $J = 7\text{ Hz}$ , 1H), 7.51 (t,  $J = 7\text{ Hz}$ , 2H), 5.42 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 1.70 (s, 6H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[456]</sup>

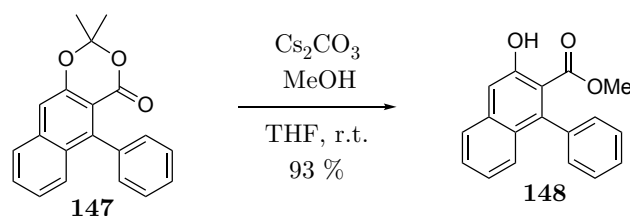


A flame-dried two-necked flask charged with 18-crown-6 (1.654 g, 6.257 mmol, 3.1 eq.) was evacuated under high vacuum at room temperature for 1 h, to which were added *o*-silylaryl triflate (909 mg, 3.046 mmol, 1.5 eq.), dioxinone **146** (500 mg,

2.030 mmol, 1.0 mmol), and THF (100 mL). To this mixture was added Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.997 g, 6.130 mmol, 3.0 eq.) and stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by adding saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (PE/DCM 1/1 v/v) to afford the desired dioxinone **147** (377 mg, 1.238 mmol, 61 %) as a light yellow solid.

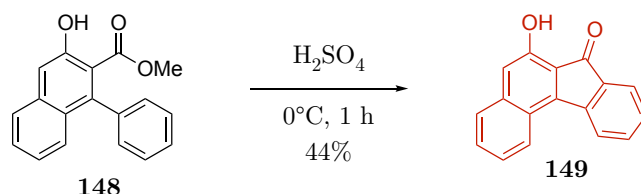
NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 7.78 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.58–7.45 (m, 5H), 7.42 (s, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.26–7.24 (m, 1H), 1.77 (s, 6H).

Spectral data were in accordance with literature.<sup>[457]</sup>



To a solution of compound **147** (100 mg, 0.329 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (3.3 mL) and THF (3.3 mL) was added Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (321 mg, 0.986 mmol, 3.0 eq.). After stirring for 2 h at room temperature, the reaction was quenched by adding saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl, and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (PE/EtOAc 2/1 v/v) to afford the desired phenol **148** (85 mg, 0.305 mmol, 93 %) as a yellow solid.

NMR : <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ (ppm) = 7.71 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7.51 (m, 6H), 7.26–7.14 (m, 3H), 3.46 (s, 3H).



To the ester **148** (40 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) at 0 °C was added dropwise concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 mL) at 0 °C and the mixture was stirred for 1 h until the conversion was complete (TLC control). The mixture was poured into icy water and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated

under reduced pressure to provide the desired fluorophore **149** (15 mg, 0.061 mmol, 44 %) as a red powder.

NMR :  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  (ppm) = 8.58 (s, 1H), 8.29 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.97 (d,  $J = 8$  Hz, 1H), 7.66 (t,  $J = 7$  Hz, 2H), 7.56–7.36 (m, 3H), 7.30 (t,  $J = 7$  Hz, 1H), 7.13 (s, 1H).

## Spectroscopy

Absorption spectra (UV-Vis) were recorded on a dual beam JASCO 670 spectrometer. Fluorescence spectra were performed on a Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3 $\ddot{o}$  spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive Hamamatsu R928 or R2658 photomultiplier tubes. Spectra were reference corrected for both the excitation source light intensity variation (lamp and grating) and the emission spectral response (detector and grating).

The absolute fluorescence quantum yield of solids were determined using an integrating sphere collecting all the emission ( $2\pi$  steradians covered with spectralon $\ddot{o}$ ) : Horiba Jobin Yvon, F-3018, according to known procedure<sup>[458,459]</sup> The sphere was corrected for both excitation and emission with standards. The principle is illustrated in the Figure 133 below.

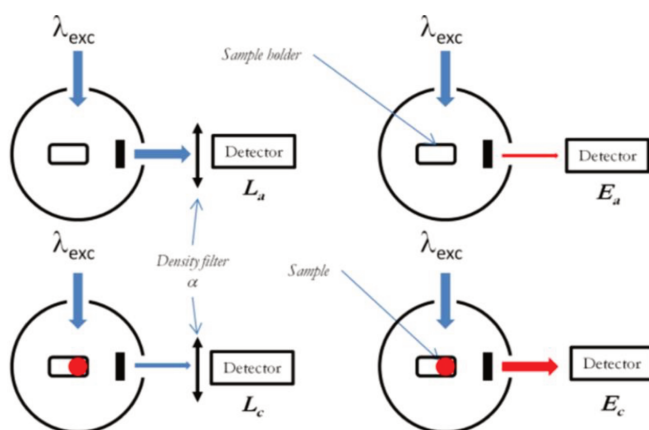


FIGURE 133 – Method for absolute quantum yield measurements with an integrated sphere.<sup>[460]</sup>

For each sample, 4 measurements were made giving four integrated intensities  $E_a$ ,  $E_c$ ,  $L_a$  and  $L_c$ . The fluorescence quantum yield  $\Phi$  is given by the equation :



$$\Phi = \frac{E_c - E_a}{\alpha(L_a - L_c)} \quad (\text{III.1})$$

With

- $E_a$  is the integrated fluorescence measured with the sphere empty without any sample (background).
- $E_c$  is the integrated fluorescence of the sample.
- $L_a$  is the integrated excitation profile of the empty sphere (detection between  $\lambda_{ex} - 10$  and  $\lambda_{ex} + 10$ ).
- $L_c$  is the integrated excitation profile of the sample (detection between  $\lambda_{ex} - 10$  and  $\lambda_{ex} + 10$ ).
- $\alpha$  is the inverse of the density filter ( $\approx 0.5\%$ ) used to reduce the amount of light sent to the detector (to avoid saturation) without changing the excitation profile.

All spectra were recorded using the same instrument configuration (excitation and emission slits opening and range of detection, integration time).

# Annexes



# Annexes

## Microscopie confocale

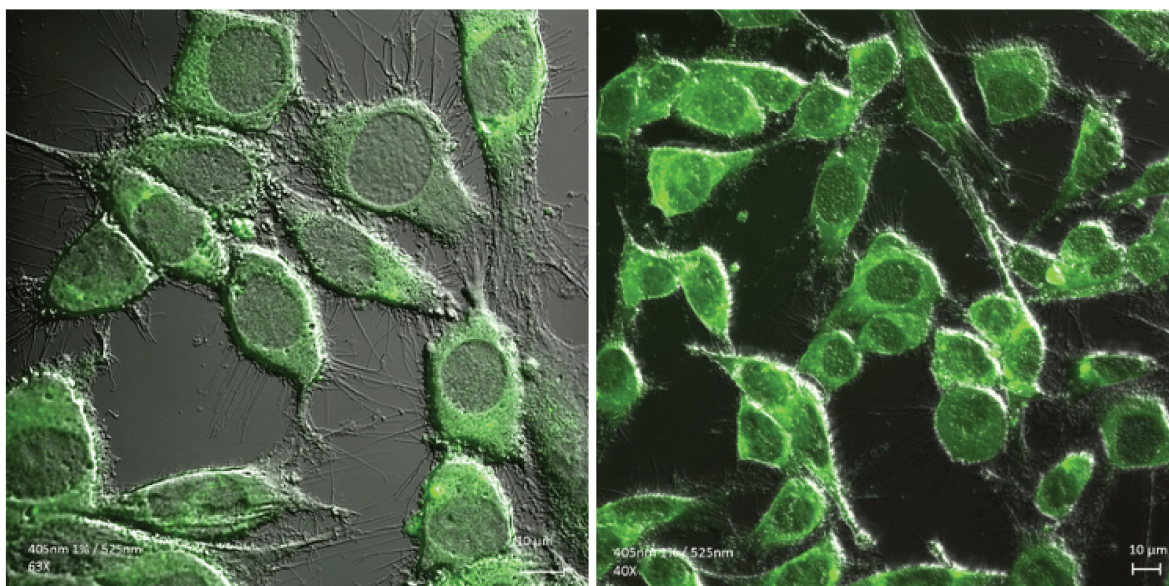


FIGURE 134 – Images par microscopie confocale de fluorescence de cellule C17.2 ( $\beta$ -gal-positives), incubées avec 10  $\mu$ M de sonde **15** pendant 2 h à 37 °C ( $\lambda_{ex}$  = 405 nm /  $\lambda_e$  = 525 nm)

## Cytométrie en flux

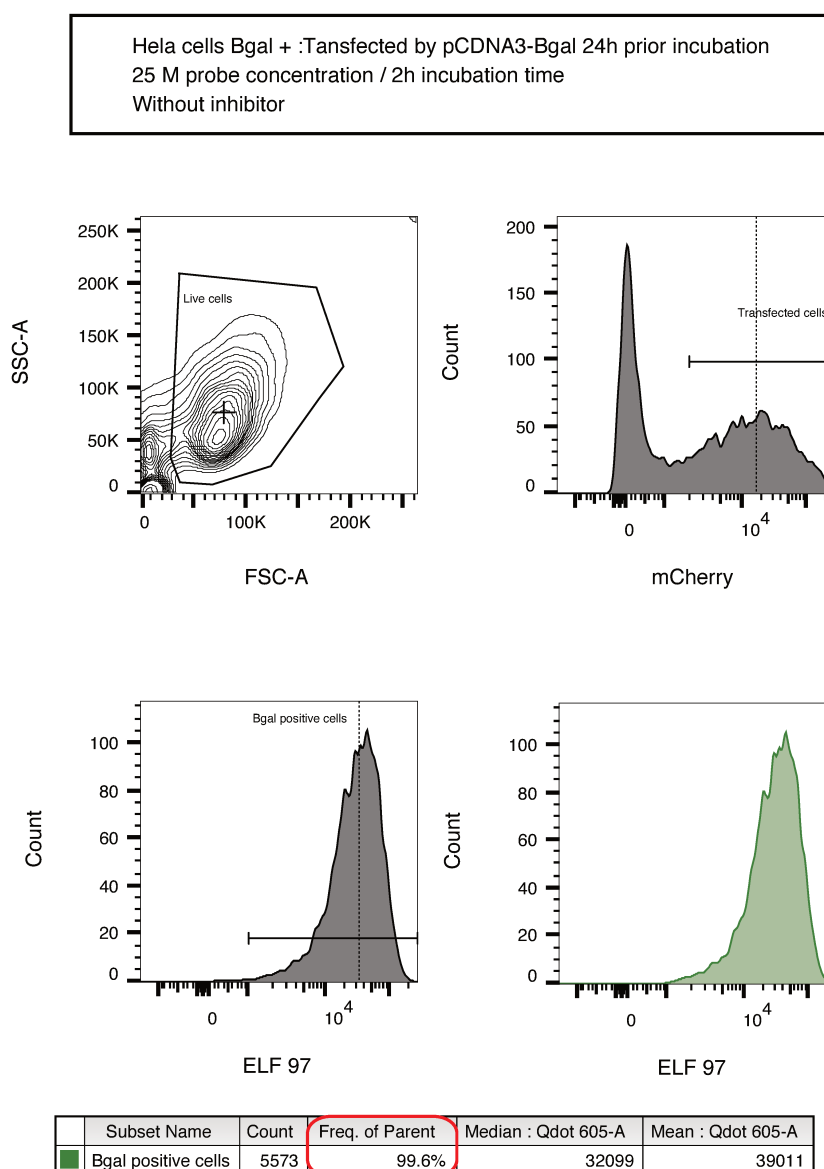
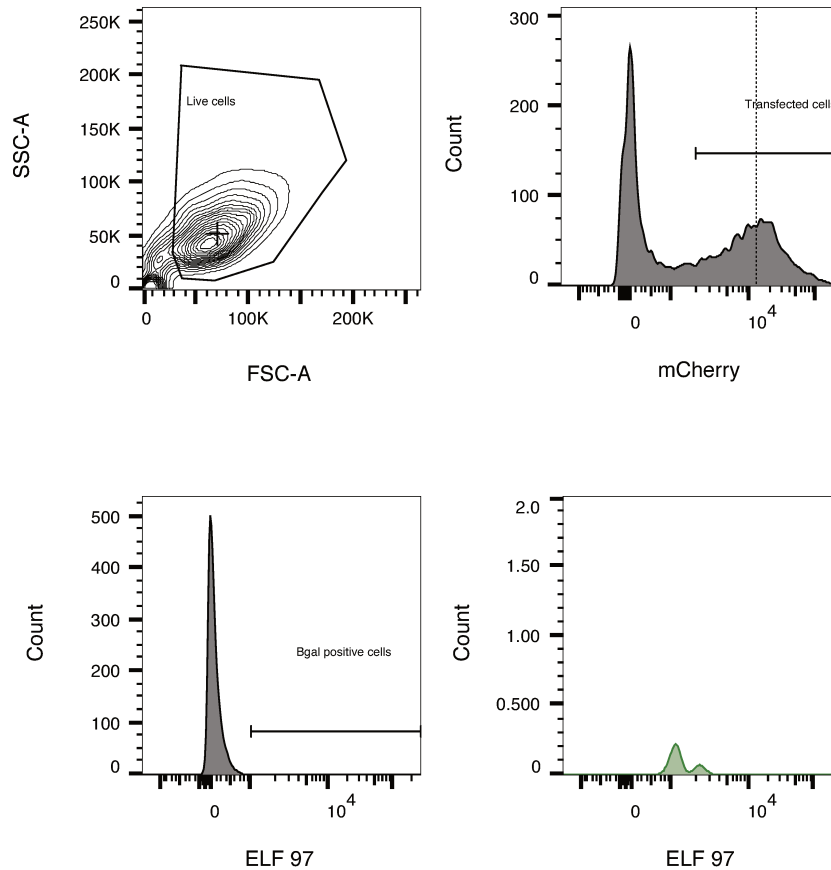


FIGURE 135 – Exemple d’analyse de cytométrie en flux de cellules  $\beta$ -gal-positives, incubées pendant 2 h à 37 °C avec la sonde **15** (12,5  $\mu$ M). En haut à gauche : analyse des diffusions (tailles et granularité), en haut à droite : quantification des cellules présentant une fluorescence rouge (donc transfectées), en bas à gauche : quantification des cellules présentant une fluorescence verte (définition d’un même seuil pour toutes les analyses), en bas à droite : population finale de cellules marquées par la sonde **15**.

Hela cells : Transfected by pCDNA3-empty 24h prior incubation  
 25 M probe concentration / 2h incubation time  
 With competitive inhibitor (lactose)



	Subset Name	Count	Freq. of Parent	Median : Qdot 605-A	Mean : Qdot 605-A
■	Bgal positive cells	4.00	0.080%	1195	1429

FIGURE 136 – Exemple d’analyse de cytométrie en flux de cellules  $\beta$ -gal-négatives, incubées pendant 2 h à 37 °C avec la sonde **15** (12,5  $\mu$ M). En haut à gauche : analyse des diffusions (tailles et granularité), en haut à droite : quantification des cellules présentant une fluorescence rouge (donc transfectées), en bas à gauche : quantification des cellules présentant une fluorescence verte (définition d’un même seuil pour toutes les analyses), en bas à droite : population finale de cellules marquées par la sonde **15**.

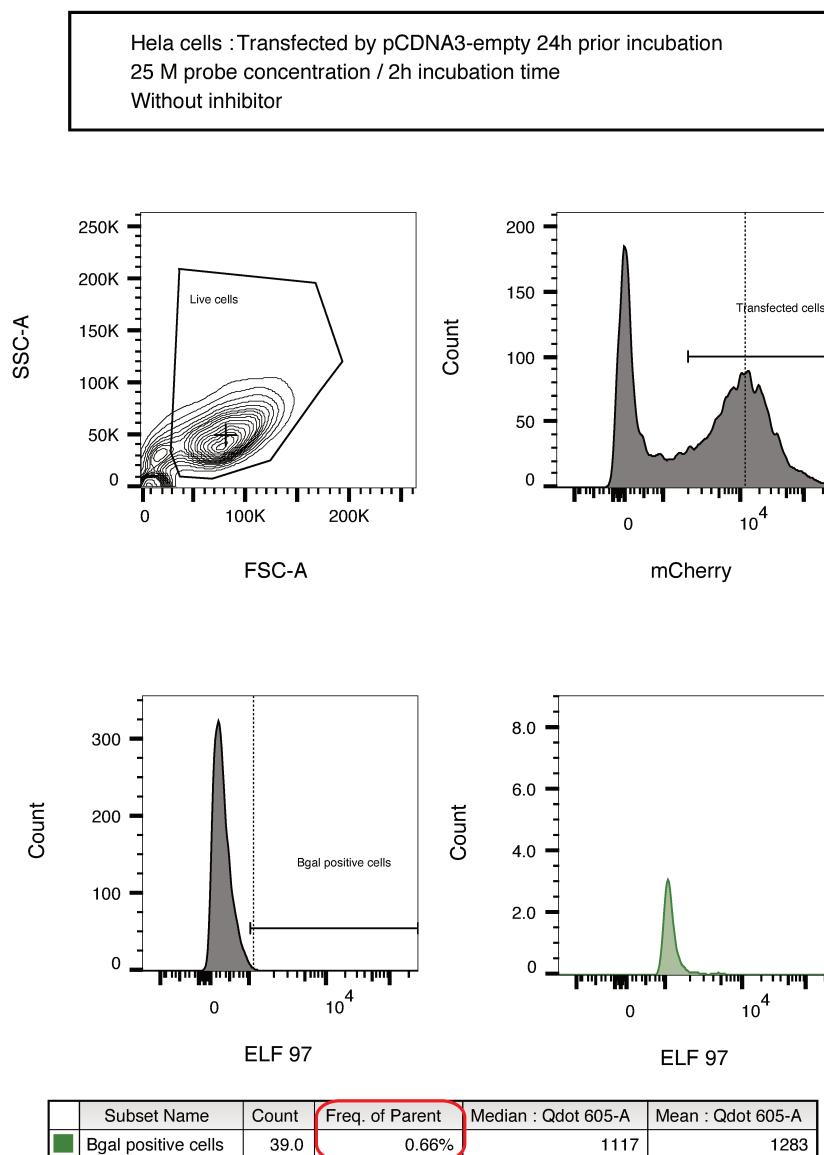


FIGURE 137 – Exemple d’analyse de cytométrie en flux de cellules  $\beta$ -gal-négatives, incubées pendant 2 h à 37 °C avec la sonde **15** (12,5  $\mu$ M) et du **lactose** (500 mM). En haut à gauche : analyse des diffusions (tailles et granularité), en haut à droite : quantification des cellules présentant une fluorescence rouge (donc transfectées), en bas à gauche : quantification des cellules présentant une fluorescence verte (définition d’un même seuil pour toutes les analyses), en bas à droite : population finale de cellules marquées par la sonde **15**.

## Viabilité cellulaire

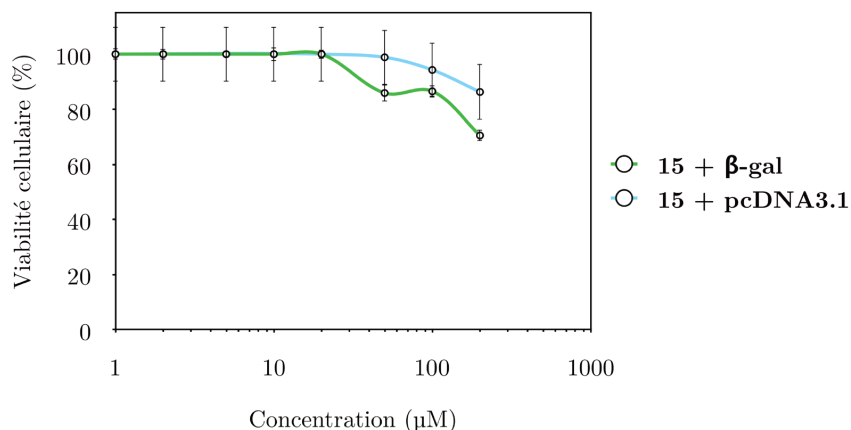


FIGURE 138 – Viabilité cellulaire de cellules HeLa, transfectées avec un plasmide contenant le gène *LacZ* ( $\beta$ -gal positives), ou transfectées avec un plasmide vide ( $\beta$ -gal-négatives).

## Émissions des fluorophores (poudres) en suspension

### Excitation à 355 nm

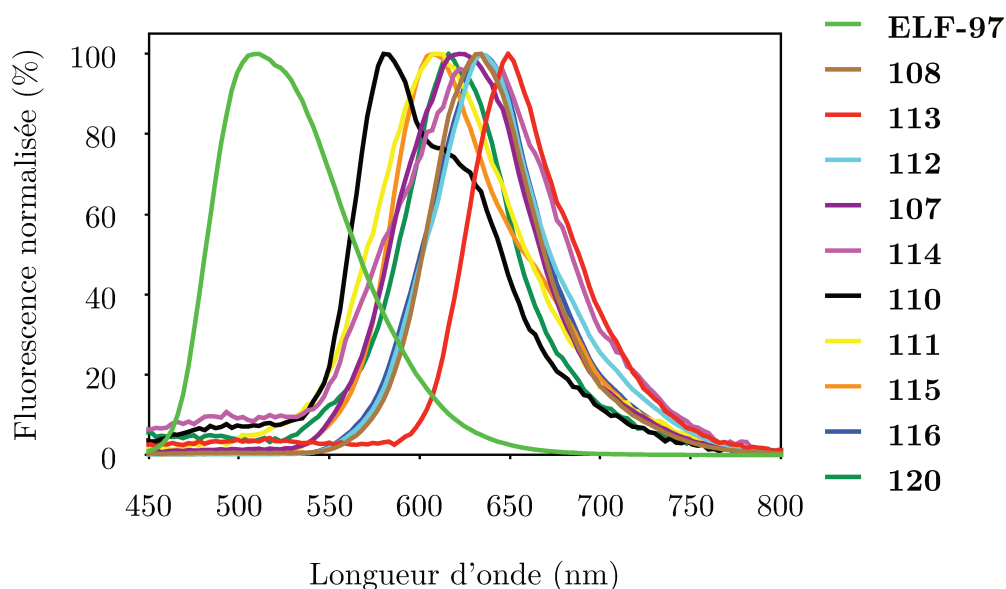


FIGURE 139 – Spectres d'émission de suspensions dans le PBS de différents composés de la famille des chalcones ( $\lambda_{ex} = 355$  nm).



## Excitation à 405 nm

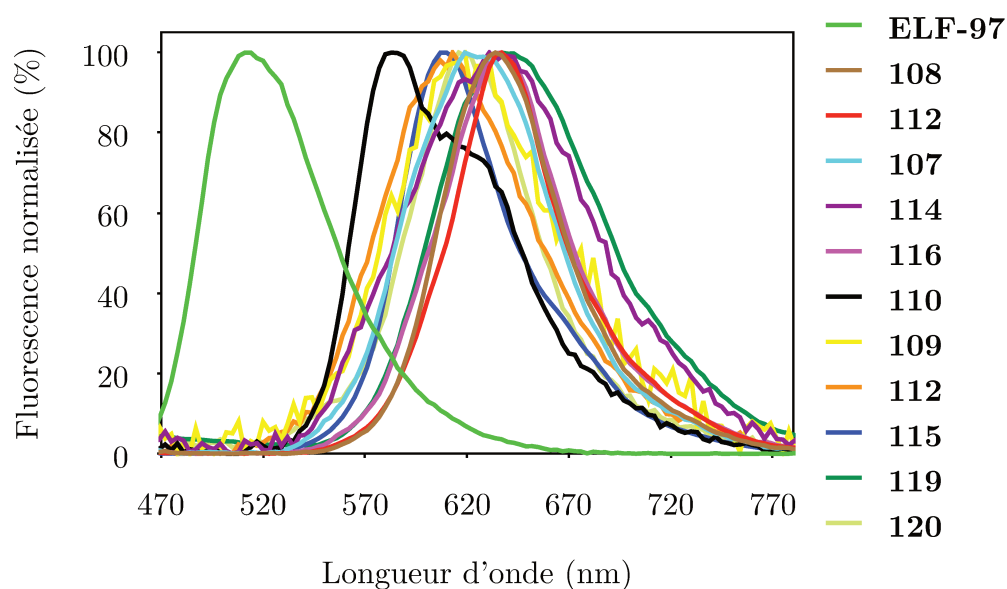


FIGURE 140 – Spectres d'émission de suspensions dans le PBS de différents composés de la famille des chalcones ( $\lambda_{ex} = 405$  nm).

## Émissions des fluorophores (poudres) à l'état solide

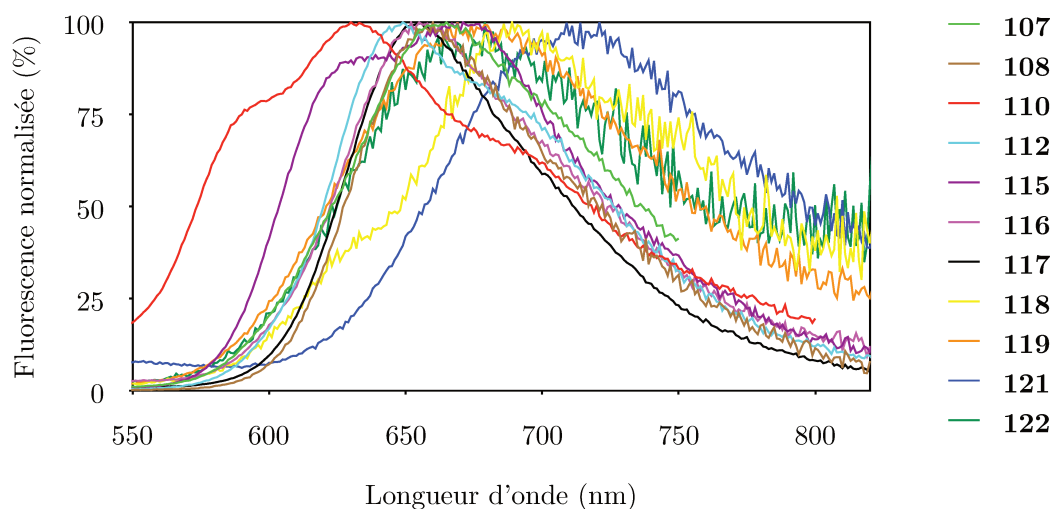


FIGURE 141 – Spectres d'émission de différents composés de la famille des chalcones à l'état solide (poudre), longueur d'onde d'excitation et ouverture des fentes optimisées selon les composés.

# Bibliographie



# Bibliographie

- [1] G. S. Ginsburg, J. J. McCarthy. Personalized medicine : revolutionizing drug discovery and patient care. *Trends in Biotechnology* **2001**, *19*, 491–496. *Cité page 3*
- [2] L. Hood, J. R. Heath, M. E. Phelps, B. Lin. Systems Biology and New Technologies Enable Predictive and Preventative Medicine. *Science* **2004**, *306*, 640–643.  
*Cité page 3*
- [3] M. A. Hamburg, F. S. Collins. The Path to Personalized Medicine. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 301–304. *Cité page 3*
- [4] L. J. van 't Veer, R. Bernards. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature* **2008**, *452*, 564–570. *Cité page 3*
- [5] N. S. Abul-Husn, E. E. Kenny. Personalized Medicine and the Power of Electronic Health Records. *Cell* **2019**, *177*, 58–69. *Cité page 3*
- [6] P. D. Stenson, M. Mort, E. V. Ball, K. Shaw, A. D. Phillips, D. N. Cooper. The Human Gene Mutation Database : building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum Genet* **2014**, *133*, 1–9. *Cité page 3*
- [7] M. Whirl-Carrillo, E. M. McDonagh, J. M. Hebert, L. Gong, K. Sangkuhl, C. F. Thorn, R. B. Altman, T. E. Klein. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2012**, *92*, 414–417. *Cité page 3*
- [8] M. Rudin, R. Weissleder. Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 123–131. *Cité page 4*
- [9] J. K. Willmann, N. van Bruggen, L. M. Dinkelborg, S. S. Gambhir. Molecular imaging in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 591–607. *Cité page 4*

- [10] R. Weissleder, B. D. Ross, A. Rehemtulla, S. S. Gambhir (Eds.), *Molecular imaging : principles and practice*, People's Medical Pub. House—USA, Shelton, Conn, **2010**. *Cité page 4*
- [11] M. A. Pysz, S. S. Gambhir, J. K. Willmann. Molecular imaging : current status and emerging strategies. *Clinical Radiology* **2010**, *65*, 500–516. *Cité page 4*
- [12] R. Weissleder. Molecular Imaging : Exploring the Next Frontier. *Radiology* **1999**. *Cité page 4*
- [13] P. Suetens, *Fundamentals of medical imaging 2nd ed.*, Cambridge University Press, New York, **2009**. *Cité page 4*
- [14] M. Analoui, J. D. Bronzino, D. R. Peterson (Eds.), *Medical imaging : principles and practices*, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, **2013**. *Cité page 4*
- [15] D. Pressman, G. Keighley. The Zone of Activity of Antibodies As Determined by the Use of Radioactive Tracers ; The Zone of Activity of Nephritoxic Antikidney Serum. *J. Immunol.* **1948**, *59*, 141–146. *Cité page 4*
- [16] D. M. Goldenberg, D. F. Preston, F. J. Primus, H. J. Hansen. Photoscan Localization of GW-39 Tumors in Hamsters Using Radiolabeled Anticarcinoembryonic Antigen Immunoglobulin G. *Cancer Res* **1974**, *34*, 1–9. *2 citations pages 4 et 5*
- [17] D. J. Hnatowich, F. Virzi, M. Rusckowski. Investigations of Avidin and Biotin for Imaging Applications. *J Nucl Med* **1987**, *28*, 1294–1302. *Cité page 4*
- [18] J. G. Tjuvajev, G. Stockhammer, R. Desai, H. Uehara, K. Watanabe, B. Gansbacher, R. G. Blasberg. Imaging the Expression of Transfected Genes in Vivo. *Cancer Res* **1995**, *55*, 6126–6132. *Cité page 5*
- [19] D. W. Ow, J. R. D. Wet, D. R. Helinski, S. H. Howell, K. V. Wood, M. Deluca. Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science* **1986**, *234*, 856–859. *2 citations pages 5 et 6*
- [20] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, *263*, 802–805. *3 citations pages 5, 6, et 21*
- [21] A. Bogdanov, R. Weissleder. The development of *in vivo* imaging systems to study gene expression. *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 5–10. *Cité page 6*

- [22] R. F. Service. New Probes Open Windows on Gene Expression, and More. *Science* **1998**, *280*, 1010–1011. *Cité page 6*
- [23] R. Weissleder. Molecular Imaging in Cancer. *Science* **2006**, *312*, 1168–1171. *Cité page 6*
- [24] W. C. Röntgen. Ueber eine neue Art von Strahlen. Vorläufige Mitteilung. *Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft Würzburg* **1895**, 137–147. *Cité page 6*
- [25] W. C. Röntgen. On a New Kind of Rays. *Science* **1896**, *3*, 227–231. *Cité page 6*
- [26] H. E. Martz, C. M. Logan, D. J. Schneberk, P. J. Shull, *X-ray imaging : fundamentals, industrial techniques, and applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, **2017**. *Cité page 7*
- [27] P. K. Spiegel. The first clinical X-ray made in America—100 years. *American Journal of Roentgenology* **1995**, *164*, 241–243. *Cité page 7*
- [28] A. Feldman. A sketch of the technical history of radiology from 1896 to 1920. *RadioGraphics* **1989**, *9*, 1113–1128. *Cité page 7*
- [29] E. C. Beckmann. CT scanning the early days. *BJR* **2006**, *79*, 5–8. *Cité page 7*
- [30] G. T. Herman, *Fundamentals of Computerized Tomography : Image Reconstruction from Projections 2nd ed.*, of *Advances in Computer Vision and Pattern Recognition*, Springer-Verlag, London, **2009**. *Cité page 8*
- [31] T. F. Budinger, T. Jones, *1.01 - History of Nuclear Medicine and Molecular Imaging in Comprehensive Biomedical Physics*, A. Brahme (Ed.), Elsevier, Oxford, **2014**, pp. 1–37. *Cité page 9*
- [32] A. H. Bécquerel. Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **1896**, *122*, 501. *Cité page 9*
- [33] P. Curie, M. Curie, G. Bémont. Sur une nouvelle substance fortement radioactive, contenue dans la pechblende. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* **1898**, *127*, 1215–1217. *Cité page 9*
- [34] E. Rutherford, F. Soddy. XLI. The cause and nature of radioactivity.—Part I. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1902**, *4*, 370–396. *Cité page 9*

- [35] E. Rutherford. LIV. Collision of  $\alpha$  particles with light atoms. IV. An anomalous effect in nitrogen. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1919**, *37*, 581–587. *Cité page 9*
- [36] F. Joliot, I. Curie. Artificial Production of a New Kind of Radio-Element. *Nature* **1934**, *133*, 201–202. *Cité page 9*
- [37] G. Hevesy. The Absorption and Translocation of Lead by Plants : A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *Biochemical Journal* **1923**, *17*, 439–445. *Cité page 9*
- [38] H. Ziessman, J. O'Malley, *Nuclear Medicine : The Requisites*, Elsevier Health Sciences, **2013**, Google-Books-ID : qydf6ghdNwC. *Cité page 9*
- [39] I. Brüser, H. Kallmann. Über die Anregung von Leuchtstoffen durch schnelle Korpuskularteilchen I (Eine neue Methode zur Registrierung und Energiemessung schwerer geladener Teilchen). *Zeitschrift Naturforschung Teil A* **1947**, *2*, 441–446. *Cité page 10*
- [40] R. Hofstadter. Alkali Halide Scintillation Counters. *Phys. Rev.* **1948**, *74*, 100–101. *Cité page 10*
- [41] F. A. Mettler, Jr, M. J. Guiberteau, *Essentials of Nuclear Medicine Imaging 6th ed.*, Saunders, **2011**. *Cité page 10*
- [42] M. M. Khalil, J. L. Tremoleda, T. B. Bayomy, W. Gsell. Molecular SPECT Imaging : An Overview. *Int J Mol Imaging* **2011**, *2011*. *Cité page 10*
- [43] A. Skarlovnik, D. Hrastnik, J. Fettich, M. Grmek. Lung scintigraphy in the diagnosis of pulmonary embolism : current methods and interpretation criteria in clinical practice. *Radiol Oncol* **2014**, *48*, 113–119. *Cité page 10*
- [44] M. E. Phelps. PET, The Merging of Biology and Imaging into Molecular Imaging. *J Nucl Med* **2000**, *41*, 661–681. *Cité page 11*
- [45] S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger. Molecular Imaging with PET. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501–1516. *Cité page 11*
- [46] M. E. Phelps, E. J. Hoffman, N. A. Mullani, M. M. Ter-Pogossian. Application of Annihilation Coincidence Detection to Transaxial Reconstruction Tomography. *J Nucl Med* **1975**, *16*, 210–224. *Cité page 11*

- [47] M. E. Phelps. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *PNAS* **2000**, *97*, 9226–9233. *Cité page 11*
- [48] E. Even-Sapir, U. Metser, E. Mishani, G. Lievshitz, H. Lerman, I. Leibovitch. The Detection of Bone Metastases in Patients with High-Risk Prostate Cancer : 99mTc-MDP Planar Bone Scintigraphy, Single- and Multi-Field-of-View SPECT, 18F-Fluoride PET, and 18F-Fluoride PET/CT. *J Nucl Med* **2006**, *47*, 287–297. *Cité page 12*
- [49] Reivich M, Kuhl D, Wolf A, Greenberg J, Phelps M, Ido T, Casella V, Fowler J, Hoffman E, Alavi A, Som P, Sokoloff L. The [18F]fluorodeoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization in man. *Circulation Research* **1979**, *44*, 127–137. *Cité page 12*
- [50] M. Schelling, N. Avril, J. Nährig, W. Kuhn, W. Römer, D. Sattler, M. Werner, J. Dose, F. Jänicke, H. Graeff, M. Schwaiger. Positron Emission Tomography Using [18F]Fluorodeoxyglucose for Monitoring Primary Chemotherapy in Breast Cancer. *JCO* **2000**, *18*, 1689–1695. *Cité page 12*
- [51] S. L. Pimlott, A. Sutherland. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *40*, 149–162. *Cité page 12*
- [52] A. C. Begg, F. A. Stewart, C. Vens. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer* **2011**, *11*, 239–253. *Cité page 13*
- [53] R. W. Brown, Y.-C. N. Cheng, E. M. Haacke, M. R. Thompson, R. Venkatesan, *Magnetic Resonance Imaging : Physical Principles and Sequence Design 2nd ed.*, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, **2014**. *Cité page 13*
- [54] P. C. Lauterbur. Image Formation by Induced Local Interactions : Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature* **1973**, *242*, 190. *Cité page 13*
- [55] P. C. Lauterbur. Magnetic resonance zeugmatography. *Pure and Applied Chemistry* **1974**, *40*, 149–157. *Cité page 13*
- [56] P. Mansfield, P. K. Grannell. "Diffraction" and microscopy in solids and liquids by NMR. *Phys. Rev. B* **1975**, *12*, 3618–3634. *Cité page 13*
- [57] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, R. B. Lauffer. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents : Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293–2352. *Cité page 14*



- [58] D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza. Manganese-based MRI contrast agents : past, present, and future. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8431–8444.  
*Cité page 14*
- [59] C. Gondrand, F. Touti, E. Godart, Y. Berezhansky, E. Jeanneau, P. Maurin, J. Hasserodt. Spring-Loaded Iron(II) Complexes as Magnetogenic Probes Reporting on a Chemical Analyte in Water. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015*, 1376–1382.  
*Cité page 14*
- [60] P. M. Winter, S. D. Caruthers, S. A. Wickline, G. M. Lanza. Molecular imaging by MRI. *Curr Cardiol Rep* **2006**, *8*, 65–69.  
*Cité page 15*
- [61] F. Touti, *Synthèse et caractérisation d'agents magnétogéniques à base de Fe(II) pour l'IRM moléculaire*, thesis, Lyon, École normale supérieure, **2013**.  
*Cité page 15*
- [62] C. Gondrand, *Étude chémobiologique de sondes magnétogènes et fluorogènes pour l'imagerie moléculaire*, thesis, Lyon, **2016**. *4 citations pages 15, 78, 85, et 109*
- [63] J. Lee, J. E. Burdette, K. W. MacRenaris, D. Mustafi, T. K. Woodruff, T. J. Meade. Rational Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Progesterone-Modified MRI Contrast Agents. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 824–834.  
*Cité page 15*
- [64] A. G. Bell. On the production and reproduction of sound by light. *Am J Sci* **1880**, *Series 3 Vol. 20*, 305–324.  
*Cité page 16*
- [65] M. Xu, L. V. Wang. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Review of Scientific Instruments* **2006**, *77*, 041101.  
*Cité page 16*
- [66] L. V. Wang, S. Hu. Photoacoustic Tomography : In Vivo Imaging from Organelles to Organs. *Science* **2012**, *335*, 1458–1462.  
*Cité page 16*
- [67] Y. Matsumoto, Y. Asao, A. Yoshikawa, H. Sekiguchi, M. Takada, M. Furu, S. Saito, M. Kataoka, H. Abe, T. Yagi, K. Togashi, M. Toi. Label-free photoacoustic imaging of human palmar vessels : a structural morphological analysis. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 786.  
*Cité page 16*
- [68] P. Török, F.-J. Kao (Eds.), *Optical Imaging and Microscopy : Techniques and Advanced Systems 2nd ed.*, of *Springer Series in Optical Sciences*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2007**.  
*Cité page 17*

- [69] M. Cutler. Transillumination of the breast. *Ann Surg* **1931**, *93*, 223–234.  
*2 citations pages 17 et 18*
- [70] A. U. Acuña, F. Amat-Guerri, *Early History of Solution Fluorescence : The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes in Fluorescence of Supermolecules, Polymers, and Nanosystems*, of *Springer Series on Fluorescence*, M. N. Berberan-Santos (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**, pp. 3–20.  
*Cité page 18*
- [71] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos. A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory. *J. Chem. Educ.* **2011**, *88*, 731–738.  
*Cité page 18*
- [72] E. Becquerel. *Annales de Chimie et de Physique* **1842**, *9*, 257–322. *Cité page 18*
- [73] G. G. Stokes. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463–562. *Cité page 18*
- [74] G. G. Stokes. On the change of refrangibility of light.—No. II. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1853**, *143*, 385–396. *Cité page 18*
- [75] R. Dubois, *Les Elaterides Lumineux : Contribution A L'Etude de La Production de La Lumiere Par Les Etres Vivants.*, Imprimerie E. Lebrault, Le Mans, **1886**.  
*Cité page 18*
- [76] J. Poisson. Raphaël Dubois, de la pharmacie à la bioluminescence. *Revue d'Histoire de la Pharmacie* **2010**, *97*, 51–56. *Cité page 18*
- [77] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence : Principles and Applications 2nd ed.*, Wiley VCH, Weinheim, Germany, **2013**. *Cité page 19*
- [78] F. Rost, *Fluorescence Microscopy, Applications in Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, J. C. Lindon (Ed.), Elsevier, Oxford, **1999**, pp. 565–570.  
*Cité page 20*
- [79] M. Monici, *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications in Biotechnology Annual Review, Vol. 11*, Elsevier, **2005**, pp. 227–256.  
*Cité page 20*
- [80] Y. W. Jun, H. R. Kim, Y. J. Reo, M. Dai, K. H. Ahn. Addressing the Autofluorescence Issue in Deep Tissue Imaging by Two-Photon Microscopy : Significance of Far-Red Emitting Dyes. *Chem. Sci.* **2017**. *3 citations pages 20, 149, et 154*

- [81] L. D. Lavis, R. T. Raines. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chemical Biology* **2008**, *3*, 142–155. *Cité page 20*
- [82] J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis, *The Chemistry of Small-Molecule Fluorogenic Probes in Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 113 of *Fluorescence-Based Biosensors*, M. C. Morris (Ed.), Academic Press, **2013**, pp. 1–34. *Cité page 20*
- [83] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, *59*, 223–239. *Cité page 21*
- [84] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656–2662. *Cité page 21*
- [85] R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544. *Cité page 21*
- [86] R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature* **1995**, *373*, 663. *Cité page 21*
- [87] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* **2005**, *2*, 905. *Cité page 21*
- [88] I. Bronstein, B. Edwards, J. C. Voyta. 1,2-Dioxetanes : Novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* **1989**, *4*, 99–111. *Cité page 21*
- [89] J. W. Hastings. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol* **1983**, *19*, 309–321. *Cité page 21*
- [90] R. M. Levenson, D. T. Lynch, H. Kobayashi, J. M. Backer, M. V. Backer. Multiplexing with Multispectral Imaging : From Mice to Microscopy. *ILAR J* **2008**, *49*, 78–88. *Cité page 21*
- [91] W. F. Cheong, S. A. Prahl, A. J. Welch. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics* **1990**, *26*, 2166–2185. *Cité page 22*

- [92] J. Beuthan, O. Minet, J. Helfmann, M. Herrig, G. Müller. The spatial variation of the refractive index in biological cells. *Phys Med Biol* **1996**, *41*, 369–382. *Cité page 22*
- [93] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry 5th ed.*, W H Freeman, **2002**. *Cité page 23*
- [94] T. Palmer, P. L. R. Bonner, *Enzymes : biochemistry, biotechnology and clinical chemistry 2nd ed.*, Horwood, Chichester, **2007**, OCLC : ocn192026804. *Cité page 23*
- [95] I. U. of Biochemistry and Molecular Biology, E. C. Webb (Eds.), *Enzyme nomenclature 1992 : recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press, San Diego, **1992**. *Cité page 23*
- [96] M. R. Singleton, M. S. Dillingham, D. B. Wigley. Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases. *Annual Review of Biochemistry* **2007**, *76*, 23–50. *Cité page 23*
- [97] R. A. Copeland, *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis 2nd ed.*, Wiley, New York, **2000**. *Cité page 24*
- [98] L. H. Chen, G. L. Kenyon, F. Curtin, S. Harayama, M. E. Bembenek, G. Hajipour, C. P. Whitman. 4-Oxalocrotonate tautomerase, an enzyme composed of 62 amino acid residues per monomer. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17716–17721. *Cité page 24*
- [99] S. Smith. The animal fatty acid synthase : one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* **1994**, *8*, 1248–1259. *Cité page 24*
- [100] C. B. Bruni, V. Sica, F. Auricchio, I. Covelli. Further kinetic and structural characterization of the lysosomal  $\alpha$ -D-glucoside glucohydrolase from cattle liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **1970**, *212*, 470–477. *Cité page 24*
- [101] H. Watanabe, G. Tokuda. Animal cellulases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1167–1178. *Cité page 24*

- [102] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level 4th ed.*, Wiley, Hoboken, NJ, **2013**, OCLC : ocn738349533.  
*Cité page 24*
- [103] A. C. Maritim, R. A. Sanders, J. B. Watkins. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants : A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2003**, *17*, 24–38.  
*Cité page 25*
- [104] S. Okada, J. S. O'Brien. Tay-Sachs Disease : Generalized Absence of a  $\beta$ -D-N-Acetylhexosaminidase Component. *Science* **1969**, *165*, 698–700. *Cité page 25*
- [105] C. J. Van Noorden. Imaging Enzymes at Work : Metabolic Mapping by Enzyme Histochemistry. *J Histochem Cytochem.* **2010**, *58*, 481–497.  
*3 citations pages 25, 41, et 72*
- [106] W. J. Dreyer, H. Neurath. The Activation of Chymotrypsinogen Isolation and Identification of a Peptide Liberated During Activation. *J. Biol. Chem.* **1955**, *217*, 527–540.  
*Cité page 26*
- [107] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogyo. Enzyme activity – it's all about image. *Trends in Cell Biology* **2004**, *14*, 29–35.  
*Cité page 26*
- [108] S. Hanash. Disease proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 226.  
*Cité page 26*
- [109] S.-L. Liang, D. W. Chan. Enzymes and related proteins as cancer biomarkers : A proteomic approach. *Clinica Chimica Acta* **2007**, *381*, 93–97. *Cité page 26*
- [110] M. Watabe-Rudolph, Z. Song, L. Lausser, C. Schnack, Y. Begus-Nahrman, M.-O. Scheithauer, G. Rettinger, M. Otto, H. Tumani, D. R. Thal, J. Attems, K. A. Jellinger, H. A. Kestler, C. A. F. von Arnim, K. L. Rudolph. Chitinase enzyme activity in CSF is a powerful biomarker of Alzheimer disease. *Neurology* **2012**, *78*, 569–577.  
*Cité page 26*
- [111] N. Dada, N. W. Kim, R. L. Wolfert. Lp-PLA2 : an emerging biomarker of coronary heart disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2002**, *2*, 17–22.  
*Cité page 26*
- [112] H. Komeda, Y. Asano. A DmpA-homologous protein from *Pseudomonas* sp. is a dipeptidase specific for  $\beta$ -alanyl dipeptides. *The FEBS Journal* **2005**, *272*, 3075–3084.  
*Cité page 26*

- [113] L. Váradi, D. E. Hibbs, S. Orenge, M. Babolat, J. D. Perry, P. W. Groundwater.  $\beta$ -Alanyl aminopeptidase-activated fluorogenic probes for the rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 58884–58889. *Cité page 26*
- [114] R. J. Roberts. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *PNAS* **2005**, *102*, 5905–5908. *Cité page 26*
- [115] I. R. Lehman. DNA Ligase : Structure, Mechanism, and Function. *Science* **1974**, *186*, 790–797. *Cité page 26*
- [116] S. Shuman. DNA Ligases : Progress and Prospects. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17365–17369. *Cité page 26*
- [117] J. Alam, J. L. Cook. Reporter genes : Application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry* **1990**, *188*, 245–254. *Cité page 27*
- [118] H. D. Jones, *Genetic Modification / Transformation, General Principles in Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, B. Thomas (Ed.), Elsevier, Oxford, **2003**, pp. 377–382. *Cité page 27*
- [119] C. Mühlhardt, E. W. Beese, *9 - Investigating the Function of DNA Sequences in Molecular Biology and Genomics, of The Experimenter Series*, C. Mühlhardt, E. W. Beese (Eds.), Academic Press, Burlington, **2007**, pp. 169–221. *Cité page 27*
- [120] J. A. Kiernan. Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotechnic & Histochemistry* **2007**, *82*, 73–103. *3 citations pages 27, 45, et 56*
- [121] H. R. Herschman, *Noninvasive Imaging of Reporter Gene Expression in Living Subjects in Advances in Cancer Research, Vol. 92*, Academic Press, **2004**, pp. 29–80. *Cité page 27*
- [122] G. Sundaresan, S. S. Gambhir, *29 - Radionuclide Imaging of Reporter Gene Expression in Brain Mapping : The Methods (Second Edition)*, A. W. Toga, J. C. Mazziotta (Eds.), Academic Press, San Diego, **2002**, pp. 799–818. *Cité page 27*
- [123] Y. Sun, J. Cheng. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresource Technology* **2002**, *83*, 1–11. *Cité page 28*

- [124] C. Dulieu, M. Moll, J. Boudrant, D. Poncelet. Improved Performances and Control of Beer Fermentation Using Encapsulated  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase and Modeling. *Biotechnology Progress* **2000**, *16*, 958–965. *Cité page 28*
- [125] O. Kirk, T. V. Borchert, C. C. Fuglsang. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, *13*, 345–351. *Cité page 28*
- [126] C. H. Wong. Enzymatic catalysts in organic synthesis. *Science* **1989**, *244*, 1145–1152. *Cité page 28*
- [127] K. Drauz, H. Gröger, O. May (Eds.), *Enzyme catalysis in organic synthesis : a comprehensive handbook third, completely revised and enlarged edition ed.*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2012**. *Cité page 28*
- [128] C. J. F. Van Noorden, G. N. Jonges. Analysis of enzyme reactions in situ. *Histochem J* **1995**, *27*, 101–118. *Cité page 28*
- [129] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *PNAS* **1979**, *76*, 4350–4354. *Cité page 28*
- [130] W. N. Burnette. “Western Blotting” : Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **1981**, *112*, 195–203. *Cité page 28*
- [131] J. Renart, J. Reiser, G. R. Stark. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera : a method for studying antibody specificity and antigen structure. *PNAS* **1979**, *76*, 3116–3120. *Cité page 29*
- [132] T. Mahmood, P.-C. Yang. Western blot : Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **2012**, *4*, 429. *Cité page 29*
- [133] D. Mukhopadhyay, H. Riezman. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science* **2007**, *315*, 201–205. *Cité page 29*
- [134] K. Haglund, I. Dikic. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO Journal* **2005**, *24*, 3353–3359. *Cité page 29*



- [135] M. S. Brown, J. L. Goldstein. The SREBP Pathway : Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* **1997**, *89*, 331–340. *Cité page 29*
- [136] K. M. Sakamoto. Ubiquitin-dependent proteolysis : its role in human diseases and the design of therapeutic strategies. *Molecular Genetics and Metabolism* **2002**, *77*, 44–56. *Cité page 29*
- [137] E. Engvall, P. Perlmann. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa : III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *The Journal of Immunology* **1972**, *109*, 129–135. *Cité page 30*
- [138] E. Engvall, *Enzyme immunoassay ELISA and EMIT in Methods in Enzymology*, Vol. 70 of *Immunochemical Techniques, Part A*, Academic Press, **1980**, pp. 419–439. *Cité page 30*
- [139] F. X. R. Sutandy, J. Qian, C.-S. Chen, H. Zhu. Overview of Protein Microarrays. *Current Protocols in Protein Science* **2013**, *72*, 27.1.1–27.1.16. *Cité page 30*
- [140] R. M. Lequin. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry* **2005**, *51*, 2415–2418. *Cité page 30*
- [141] C. H. Fox, F. B. Johnson, J. Whiting, P. P. Roller. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem.* **1985**, *33*, 845–853. *Cité page 30*
- [142] J. A. Ramos-Vara, M. A. Miller. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along : Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology* **2013**. *Cité page 30*
- [143] S. Renshaw (Ed.), *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry : essential methods second edition ed.*, Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, **2017**. *2 citations pages 30 et 31*
- [144] R. W. Burry, *Immunocytochemistry a Practical Guide for Biomedical Research*, Springer Science+Business Media, LLC, New York, NY, **2010**, OCLC : 984836946. *Cité page 31*
- [145] T. Ito, N. Morita, M. Nishi, M. Kawata. *In vitro* and *in vivo* immunocytochemistry for the distribution of mineralocorticoid receptor with the use of specific antibody. *Neuroscience Research* **2000**, *37*, 173–182. *Cité page 31*



- [146] M. E. Kimple, A. L. Brill, R. L. Pasker. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science* **2013**, *73*, 9.9.1–9.9.23. *Cité page 31*
- [147] S. Costa, A. Almeida, A. Castro, L. Domingues. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli* : the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*. *Cité page 31*
- [148] G. Crivat, J. W. Taraska. Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends in Biotechnology* **2012**, *30*, 8–16. *Cité page 31*
- [149] P. van Roessel, A. H. Brand. Imaging into the future : visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nature Cell Biology* **2002**, *4*, E15–E20. *Cité page 32*
- [150] E. A. Rodriguez, R. E. Campbell, J. Y. Lin, M. Z. Lin, A. Miyawaki, A. E. Palmer, X. Shu, J. Zhang, R. Y. Tsien. The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **2017**, *42*, 111–129. *Cité page 32*
- [151] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *in vivo*. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 86. *Cité page 32*
- [152] A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson. Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *PNAS* **2004**, *101*, 9955–9959. *Cité page 32*
- [153] A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson. An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 128–136. *Cité page 32*
- [154] G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klauert, R. F. Bulleit, K. V. Wood. HaloTag : A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 373–382. *Cité page 33*
- [155] Y. Hori, T. Norinobu, M. Sato, K. Arita, M. Shirakawa, K. Kikuchi. Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12360–12365. *Cité page 33*

- [156] M. P. Bruchez. Dark dyes–bright complexes : fluorogenic protein labeling. *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, *27*, 18–23. *Cité page 33*
- [157] L. Jullien, A. Gautier. Fluorogen-based reporters for fluorescence imaging : a review. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042007. *Cité page 33*
- [158] C. Li, A. G. Tebo, A. Gautier. Fluorogenic Labeling Strategies for Biological Imaging. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 1473. *Cité page 33*
- [159] M.-A. Plamont, E. Billon-Denis, S. Maurin, C. Gauron, F. M. Pimenta, C. G. Specht, J. Shi, J. Quérard, B. Pan, J. Rossignol, K. Moncoq, N. Morellet, M. Volovitch, E. Lescop, Y. Chen, A. Triller, S. Vríz, T. L. Saux, L. Jullien, A. Gautier. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging *in vivo*. *PNAS* **2016**, *113*, 497–502. *Cité page 33*
- [160] C. Li, M.-A. Plamont, H. L. Sladitschek, V. Rodrigues, I. Aujard, P. Neveu, T. L. Saux, L. Jullien, A. Gautier. Dynamic multicolor protein labeling in living cells. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5598–5605. *Cité page 33*
- [161] A. F. L. Schneider, C. P. R. Hackenberger. Fluorescent labelling in living cells. *Current Opinion in Biotechnology* **2017**, *48*, 61–68. *Cité page 33*
- [162] J. Wilson, T. Hunt, *Molecular biology of the cell : the problems book 6th ed.*, Garland Science, New York, NY, **2015**, OCLC : 919425520. *Cité page 33*
- [163] J. C. Alwine, D. J. Kemp, G. R. Stark. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5350–5354. *Cité page 33*
- [164] G. M. Durand, R. S. Zukin. Developmental Regulation of mRNAs Encoding Rat Brain Kainate/AMPA Receptors : A Northern Analysis Study. *Journal of Neurochemistry* **1993**, *61*, 2239–2246. *Cité page 33*
- [165] K. J. Livak, T. D. Schmittgen. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-delta-deltaCT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. *Cité page 33*
- [166] H. D. VanGuilder, K. E. Vrana, W. M. Freeman. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* **2008**, *44*, 619–626. *Cité page 33*

- [167] J. G. Gall, M. L. Pardue. Formation and Detection of Rna-Dna Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *PNAS* **1969**, *63*, 378–383. *Cité page 33*
- [168] L. Jin, R. V. Lloyd. In situ hybridization : Methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **1997**, *11*, 2–9. *Cité page 33*
- [169] L. G. Hazen, F. E. Bleeker, B. Lauritzen, S. Bahns, J. Song, A. Jonker, B. E. Van Driel, H. Lyon, U. Hansen, A. Köhler, C. J. Van Noorden. Comparative localization of cathepsin B protein and activity in colorectal cancer. *J. Histochem. Cytochem.* **2000**, *48*, 1421–1430. *Cité page 34*
- [170] M. Bogyo, B. F. Cravatt. Genomics and proteomics : advances in applications of chemical and systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 1–3. *Cité page 34*
- [171] D. R. Marsh, K. D. Holmes, G. A. Dekaban, L. C. Weaver. Distribution of an NMDA receptor : GFP fusion protein in sensory neurons is altered by a C-terminal construct. *Journal of Neurochemistry* **2001**, *77*, 23–33. *Cité page 34*
- [172] J. L. Cook, R. Re, J. Alam, M. Hart, Z. Zhang. Intracellular angiotensin II fusion protein alters AT1 receptor fusion protein distribution and activates CREB. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2004**, *36*, 75–90. *Cité page 34*
- [173] E. Boonacker, C. J. F. V. Noorden. Enzyme Cytochemical Techniques for Metabolic Mapping in Living Cells, with Special Reference to Proteolysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2001**, *49*, 1473–1486. *Cité page 34*
- [174] E. Boonacker, J. Stap, A. Koehler, C. J. F. Van Noorden. The need for metabolic mapping in living cells and tissues. *Acta Histochemica* **2004**, *106*, 89–96. *Cité page 34*
- [175] A. Razgulin, N. Ma, J. Rao. Strategies for *in vivo* imaging of enzyme activity : an overview and recent advances. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4186–4216. *Cité page 34*
- [176] R. Yan, D. Ye. Molecular imaging of enzyme activity *in vivo* using activatable probes. *Science Bulletin* **2016**, *61*, 1672–1679. *Cité page 34*
- [177] B. P. Rempel, E. W. Price, C. P. Phenix. Molecular Imaging of Hydrolytic Enzymes Using PET and SPECT. *Mol Imaging* **2017**, *16*, 1536012117717852. *Cité page 34*

- [178] T. Chauvin, P. Durand, M. Bernier, H. Meudal, B.-T. Doan, F. Noury, B. Badet, J.-C. Beloeil, Tóth. Detection of Enzymatic Activity by PARACEST MRI : A General Approach to Target a Large Variety of Enzymes. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 4370–4372. *Cité page 34*
- [179] D. V. Hingorani, B. Yoo, A. S. Bernstein, M. D. Pagel. Detecting Enzyme Activities with Exogenous MRI Contrast Agents. *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 9840–9850. *Cité page 34*
- [180] D. V. Hingorani, A. S. Bernstein, M. D. Pagel. A review of responsive MRI contrast agents : 2005–2014. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2015**, *10*, 245–265. *Cité page 34*
- [181] X. Xia, M. Yang, L. K. Oetjen, Y. Zhang, Q. Li, J. Chen, Y. Xia. An enzyme-sensitive probe for photoacoustic imaging and fluorescence detection of protease activity. *Nanoscale* **2011**, *3*, 950–953. *Cité page 34*
- [182] K. Yang, L. Zhu, L. Nie, X. Sun, L. Cheng, C. Wu, G. Niu, X. Chen, Z. Liu. Visualization of Protease Activity In Vivo Using an Activatable Photo-Acoustic Imaging Probe Based on CuS Nanoparticles. *Theranostics* **2014**, *4*, 134–141. *Cité page 34*
- [183] J. Zhou, H. Ma. Design principles of spectroscopic probes for biological applications. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6309–6315. *Cité page 35*
- [184] W. Chyan, R. T. Raines. Enzyme-Activated Fluorogenic Probes for Live-Cell and in Vivo Imaging. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1810–1823. *Cité page 35*
- [185] M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler. Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4185–4191. *Cité page 35*
- [186] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440–3450. *Cité page 35*
- [187] T. Terai, T. Nagano. Fluorescent probes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **2008**, *12*, 515–521. *Cité page 35*
- [188] J. A. Thomas. Optical imaging probes for biomolecules : an introductory perspective. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4494–4500. *Cité page 35*

- [189] A. Periasamy, R. N. Day, A. P. S. (1887-) (Eds.), *Molecular imaging : FRET microscopy and spectroscopy*, of *The American Physiological Society methods in physiology series*, Published for the American Physiological Society by Oxford University Press, Oxford ; New York, **2005**. *Cité page 35*
- [190] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd ed.*, Springer-Verlag New York Inc., New York, **2006**. *2 citations pages 35 et 40*
- [191] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55–75. *Cité page 35*
- [192] R. Y. Tsien, B. J. Bacskai, S. R. Adams. FRET for studying intracellular signaling. *Trends Cell Biol.* **1993**, *3*, 242–245. *Cité page 35*
- [193] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin. FRET imaging. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1387. *Cité page 35*
- [194] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin. Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 409–416. *Cité page 35*
- [195] L. Yuan, W. Lin, K. Zheng, S. Zhu. FRET-Based Small-Molecule Fluorescent Probes : Rational Design and Bioimaging Applications. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1462–1473. *Cité page 35*
- [196] W. Gao, B. Xing, R. Y. Tsien, J. Rao. Novel Fluorogenic Substrates for Imaging  $\beta$ -Lactamase Gene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11146–11147. *2 citations pages 36 et 116*
- [197] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice. Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566. *2 citations pages 36 et 37*
- [198] J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri. Luminescent sensors and switches in the early 21st century. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551–8588. *2 citations pages 36 et 37*
- [199] K. Gu, Y. Xu, H. Li, Z. Guo, S. Zhu, S. Zhu, P. Shi, T. D. James, H. Tian, W.-H. Zhu. Real-Time Tracking and In Vivo Visualization of  $\beta$ -Galactosidase Activity in Colorectal Tumor with a Ratiometric Near-Infrared Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5334–5340. *3 citations pages 37, 56, et 94*

- [200] Z. Song, R. T. K. Kwok, E. Zhao, Z. He, Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Liu, B. Z. Tang. A Ratiometric Fluorescent Probe Based on ESIPT and AIE Processes for Alkaline Phosphatase Activity Assay and Visualization in Living Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 17245–17254. 4 citations pages 37, 161, 166, et 229
- [201] B. K. Grillo-Hill, B. A. Webb, D. L. Barber, *Ratiometric Imaging of pH Probes in Methods in Cell Biology*, Vol. 123 of *Quantitative Imaging in Cell Biology*, J. C. Waters, T. Wittman (Eds.), Academic Press, **2014**, pp. 429–448. Cité page 37
- [202] Y. Yang, Q. Zhao, W. Feng, F. Li. Luminescent Chemodosimeters for Bioimaging. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 192–270. Cité page 37
- [203] X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma. Design Strategies for Water-Soluble Small Molecular Chromogenic and Fluorogenic Probes. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590–659. Cité page 37
- [204] M. R. Eftink, *Fluorescence Quenching : Theory and Applications in Topics in Fluorescence Spectroscopy : Principles*, of *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz (Ed.), Springer US, Boston, MA, **2002**, pp. 53–126. Cité page 37
- [205] B. M. Luby, D. M. Charron, C. M. MacLaughlin, G. Zheng. Activatable fluorescence : From small molecule to nanoparticle. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2017**, *113*, 97–121. 2 citations pages 37 et 40
- [206] R. A. Bissell, A. Prasanna de Silva, H. Q. Nimal Gunaratne, P. L. Mark Lynch, G. E. M. Maguire, C. P. McCoy, K. R. A. Samankumara Sandanayake, *Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors in Photoinduced Electron Transfer V*, of *Topics in Current Chemistry*, J. Mattay (Ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1993**, pp. 223–264. Cité page 37
- [207] A. P. d. Silva, T. S. Moody, G. D. Wright. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **2009**, *134*, 2385–2393. Cité page 38
- [208] B. Daly, J. Ling, A. P. d. Silva. Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4203–4211. Cité page 38
- [209] A. Weller. Innermolekularer Protonenübergang im angeregten Zustand. *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1956**, *60*, 1144–1147. Cité page 38

- [210] A. Heller, D. L. Williams. Intramolecular proton transfer reactions in excited fluorescent compounds. *The Journal of Physical Chemistry* **1970**, *74*, 4473–4480.  
*2 citations pages 38 et 39*
- [211] J. Goodman, L. E. Brus. Proton transfer and tautomerism in an excited state of methyl salicylate. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7472–7474. *Cité page 38*
- [212] P. K. Sengupta, M. Kasha. Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin. *Chemical Physics Letters* **1979**, *68*, 382–385.  
*Cité page 38*
- [213] A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko. Electrochromic Modulation of Excited-State Intramolecular Proton Transfer : The New Principle in Design of Fluorescence Sensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12372–12379. *Cité page 38*
- [214] J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, P. Yang. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) : from principal photophysics to the development of new chromophores and applications in fluorescent molecular probes and luminescent materials. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803–8817. *2 citations pages 38 et 40*
- [215] V. S. Padalkar, S. Seki. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT)-inspired solid state emitters. *Chemical Society Reviews* **2015**.  
*2 citations pages 38 et 39*
- [216] W. Klöpffer, *Intramolecular Proton Transfer in Electronically Excited Molecules* in *Advances in Photochemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**, pp. 311–358.  
*Cité page 39*
- [217] C. Azarias, Budzák, A. D. Laurent, G. Ulrich, D. Jacquemin. Tuning ESIPT fluorophores into dual emitters. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3763–3774. *Cité page 39*
- [218] N. Kagiya, S. Fujita, M. Momiyama, H. Saito, H. Shirahama, S. H. Hori. A fluorescent detection method for DNA hybridization using 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate as a substrate for alkaline phosphatase. *Acta Histochem. Cytochem.* **1992**, *25*, 467–471. *Cité page 40*
- [219] A. Sytnik, M. Kasha. Excited-state intramolecular proton transfer as a fluorescence probe for protein binding-site static polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 8627–8630.  
*Cité page 40*



- [220] J. Wu, W. Liu, J. Ge, H. Zhang, P. Wang. New sensing mechanisms for design of fluorescent chemosensors emerging in recent years. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3483–3495. *Cité page 40*
- [221] R. Hu, J. Feng, D. Hu, S. Wang, S. Li, Y. Li, G. Yang. A Rapid Aqueous Fluoride Ion Sensor with Dual Output Modes. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 4915–4918. *Cité page 40*
- [222] M. Lan, J. Wu, W. Liu, H. Zhang, W. Zhang, X. Zhuang, P. Wang. Highly sensitive fluorescent probe for thiols based on combination of PET and ESIPT mechanisms. *Sensors and Actuators B : Chemical* **2011**, *156*, 332–337. *Cité page 40*
- [223] R. Brock, I. H. Hamelers, T. M. Jovin. Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* **1999**, *35*, 353–362. *Cité page 41*
- [224] M. Cañete, A. Juarranz, P. López-Nieva, C. Alonso-Torcal, A. Villanueva, J. C. Stockert. Fixation and permanent mounting of fluorescent probes after vital labelling of cultured cells. *Acta Histochemica* **2001**, *103*, 117–126. *Cité page 41*
- [225] U. Schnell, F. Dijk, K. A. Sjollem, B. N. G. Giepmans. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. *Nature Methods* **2012**, *9*, 152–158. *Cité page 41*
- [226] G. P. Nolan, S. Fiering, J. F. Nicolas, L. A. Herzenberg. Fluorescence-activated cell analysis and sorting of viable mammalian cells based on  $\beta$ -D-galactosidase activity after transduction of *Escherichia coli lacZ*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1988**, *85*, 2603–2607. *2 citations pages 41 et 67*
- [227] G. Liang, H. Ren, J. Rao. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells. *Nature Chemistry* **2010**, *2*, 54–60. *Cité page 42*
- [228] H. Yu, Y. Xiao, L. Jin. A Lysosome-Targetable and Two-Photon Fluorescent Probe for Monitoring Endogenous and Exogenous Nitric Oxide in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17486–17489. *Cité page 43*
- [229] S. Kamino, H. Ichikawa, S.-i. Wada, Y. Horio, Y. Usami, T. Yamaguchi, T. Koda, A. Harada, K. Shimanuki, M. Arimoto, M. Doi, Y. Fujita. Design and synthesis of regioisomerically pure unsymmetrical xanthene derivatives for staining live cells



- and their photochemical properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 4380–4384. *Cité page 43*
- [230] M. Kamiya, D. Asanuma, E. Kuranaga, A. Takeishi, M. Sakabe, M. Miura, T. Nagano, Y. Urano.  $\beta$ -Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12960–12963. *Cité page 43*
- [231] M. J. Evans, B. F. Cravatt. Mechanism-Based Profiling of Enzyme Families. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301. *Cité page 43*
- [232] G. Blum, G. von Degenfeld, M. J. Merchant, H. M. Blau, M. Bogoy. Noninvasive optical imaging of cysteine protease activity using fluorescently quenched activity-based probes. *Nature Chemical Biology* **2007**, *3*, 668–677. *Cité page 43*
- [233] E. E. Weinert, R. Dondi, S. Colloredo-Melz, K. N. Frankenfield, C. H. Mitchell, M. Freccero, S. E. Rokita. Substituents on Quinone Methides Strongly Modulate Formation and Stability of Their Nucleophilic Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11940–11947. *Cité page 44*
- [234] M. M. Toteva, J. P. Richard, *The generation and reactions of quinone methides in Advances in Physical Organic Chemistry, Vol. 45*, J. P. Richard (Ed.), Academic Press, **2011**, pp. 39–91. *Cité page 44*
- [235] T. Doura, M. Kamiya, F. Obata, Y. Yamaguchi, T. Y. Hiyama, T. Matsuda, A. Fukamizu, M. Noda, M. Miura, Y. Urano. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9620–9624. *2 citations pages 44 et 56*
- [236] D. C. Thompson, K. Perera, E. S. Krol, J. L. Bolton. *o*-Methoxy-4-alkylphenols That Form Quinone Methides of Intermediate Reactivity Are the Most Toxic in Rat Liver Slices. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 323–327. *Cité page 44*
- [237] T. J. Monks, D. C. Jones. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 425–438. *2 citations pages 44 et 51*
- [238] M. L. Menten, J. Junge, M. H. Green. A Coupling Histochemical Azo Dye Test for Alkaline Phosphatase in the Kidney. *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 471–477. *Cité page 45*

- [239] S. J. Holt, R. F. J. Withers. Cytochemical Localization of Esterases Using Indoxyl Derivatives. *Nature* **1952**, *170*, 1012. *Cité page 45*
- [240] M. S. Burstone. Postcoupling, noncoupling, and fluorescence techniques for the demonstration of alkaline phosphatase. *J. Natl. Cancer Inst.* **1960**, *24*, 1199–1217. *Cité page 45*
- [241] C. A. Ziomek, M. L. Lepire, I. Torres. A highly fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of nonspecific alkaline phosphatase activity. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* **1990**, *38*, 437–442. *Cité page 46*
- [242] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang. Aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361–5388. *Cité page 46*
- [243] K. D. Larison, R. BreMiller, K. S. Wells, I. Clements, R. P. Haugland. Use of a new fluorogenic phosphatase substrate in immunohistochemical applications. *J Histochem Cytochem.* **1995**, *43*, 77–83. *2 citations pages 47 et 49*
- [244] V. B. Paragas, J. A. Kramer, C. Fox, R. P. Haugland, V. L. Singer. The ELF-97 phosphatase substrate provides a sensitive, photostable method for labelling cytological targets. *Journal of Microscopy* **2002**, *206*, 106–119. *3 citations pages 47, 48, et 49*
- [245] Z. Diwu, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *Spectral properties and biological applications of ELF enzyme substrates that yield fluorescent precipitates at the enzymatic activity sites* in *Advances in Fluorescence Sensing Technology IV*, International Society for Optics and Photonics, pp. 265–275. *2 citations pages 48 et 49*
- [246] Z. Huang, E. Terpetschnig, W. You, R. P. Haugland. 2-(2-Phosphoryloxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone derivatives as fluorogenic precipitating substrates of phosphatases. *Analytical Biochemistry* **1992**, *207*, 32–39. *Cité page 49*
- [247] R. Haugland, *Enzymatic Analysis Using Substrates That Yield Fluorescent Precipitates*, WO 1993/004077, **1993**. *Cité page 49*
- [248] R. P. Haugland, I. D. Johnson. Detecting enzymes in living cells using fluorogenic substrates. *J Fluoresc* **1993**, *3*, 119–127. *Cité page 49*

- [249] Z. Huang, W. You, R. P. Haugland, V. B. Paragas, N. A. Olson, R. P. Haugland. A novel fluorogenic substrate for detecting alkaline phosphatase activity in situ. *J Histochem Cytochem.* **1993**, *41*, 313–317. *Cité page 49*
- [250] J. J. Naleway, C. M. J. Fox, D. Robinhold, E. Terpetschnig, N. A. Olson, R. P. Haugland. Synthesis and use of new fluorogenic precipitating substrates. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 8569–8572. *Cité page 49*
- [251] R. P. Haugland. Detecting Enzymatic Activity in Cells Using Fluorogenic Substrates. *Biotechnic & Histochemistry* **1995**, *70*, 243–251. *Cité page 49*
- [252] M. Zhou, R. H. Upson, Z. Diwu, R. P. Haugland. A fluorogenic substrate for  $\beta$ -glucuronidase : Applications in fluorometric, polyacrylamide gel and histochemical assays. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1996**, *33*, 197–205. *Cité page 49*
- [253] V. B. Paragas, Y.-Z. Zhang, R. P. Haugland, V. L. Singer. The ELF-97 Alkaline Phosphatase Substrate Provides a Bright, Photostable, Fluorescent Signal Amplification Method for FISH. *J Histochem Cytochem.* **1997**, *45*, 345–357. *Cité page 49*
- [254] Z. Diwu, Y. Lu, R. H. Upson, M. Zhou, D. H. Klaubert, R. P. Haugland. Fluorescent molecular probes I. The synthesis and biological properties of an ELF®  $\beta$ -glucuronidase substrate that yields fluorescent precipitates at the enzymatic activity sites. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7159–7164. *Cité page 49*
- [255] F. van Ommen Kloeke, A. M. Baty III, C. C. Eastburn, Z. Diwu, G. G. Geesey. Novel method for screening bacterial colonies for phosphatase activity. *Journal of Microbiological Methods* **1999**, *38*, 25–31. *Cité page 49*
- [256] C. Kragelund, J. L. Nielsen, T. R. Thomsen, P. H. Nielsen. Ecophysiology of the filamentous  $\alpha$ proteobacterium *Meganema perideroedes* in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* **2005**, *54*, 111–112. *Cité page 49*
- [257] S. T. Dyhrman, B. Palenik. Phosphate Stress in Cultures and Field Populations of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum* Detected by a Single-Cell Alkaline Phosphatase Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 3205–3212. *Cité page 49*
- [258] S. Dyhrman. Ectoenzymes in *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* **2005**, *4*, 619–627. *Cité page 49*

- [259] M. Dignum, H. L. Hoogveld, H. C. P. Matthijs, H. J. Laanbroek, R. Pel. Detecting the phosphate status of phytoplankton by enzyme-labelled fluorescence and flow cytometry. *FEMS Microbiology Ecology* **2004**, *48*, 29–38. *Cité page 49*
- [260] W. G. Cox, V. L. Singer. A High-resolution, Fluorescence-based Method for Localization of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity. *J Histochem Cytochem.* **1999**, *47*, 1443–1455. *Cité page 49*
- [261] R. P. Haugland, *The Handbook : A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, Molecular Probes, **2005**, Google-Books-ID : Fsoamx5abTcC. *Cité page 49*
- [262] W. G. Telford, W. G. Cox, V. L. Singer. Detection of endogenous and antibody-conjugated alkaline phosphatase with ELF-97 phosphate in multicolor flow cytometry applications. *Cytometry* **2001**, *43*, 117–125. *Cité page 49*
- [263] J. Aw, Q. Shao, Y. Yang, T. Jiang, C. Ang, B. Xing. Synthesis and Characterization of 2-(2-hydroxy-5-chlorophenyl)-6-chloro-4(3 H)-Quinazolinone-Based Fluorogenic Probes for Cellular Imaging of Monoamine Oxidases. *Chemistry – An Asian Journal* **2010**, *5*, 1317–1321. *Cité page 49*
- [264] A. Rukavishnikov, K. R. Gee, I. Johnson, S. Corry. Fluorogenic cephalosporin substrates for  $\beta$ -lactamase TEM-1. *Analytical Biochemistry* **2011**, *419*, 9–16. *3 citations pages 49, 116, et 121*
- [265] D. Shabat, R. J. Amir, A. Gopin, N. Pessah, M. Shamis. Chemical Adaptor Systems. *Chemistry – A European Journal* **2004**, *10*, 2626–2634. *2 citations pages 50 et 51*
- [266] A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien. Self-immolative spacers : kinetic aspects, structure-property relationships, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed* **2015**, *54*, 7492–7509. *Cité page 51*
- [267] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke. Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20–53. *Cité page 51*
- [268] F. M. H. de Groot, W. J. Loos, R. Koekkoek, L. W. A. van Berkom, G. F. Busscher, A. E. Seelen, C. Albrecht, P. de Bruijn, H. W. Scheeren. Elongated Multiple Electronic Cascade and Cyclization Spacer Systems in Activatable Anti-cancer Prodrugs for Enhanced Drug Release. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8815–8830. *Cité page 51*

- [269] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen. A novel connector linkage applicable in prodrug design. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479–480. *Cité page 51*
- [270] M. N. Levine, R. T. Raines. Trimethyl lock : a trigger for molecular release in chemistry, biology, and pharmacology. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2412–2420. *Cité page 51*
- [271] N. Sträter, W. N. Lipscomb, *Chapter 329 - Leucyl Aminopeptidase (Animal)* in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, N. D. Rawlings, G. Salvesen (Eds.), Academic Press, **2013**, pp. 1465–1470. *Cité page 52*
- [272] M. Matsui, J. H. Fowler, L. L. Walling. Leucine aminopeptidases : diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **2006**, *387*, 1535–1544. *Cité page 52*
- [273] L. L. Walling, *Chapter 330 - Leucyl Aminopeptidase (Plant)* in *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)*, N. D. Rawlings, G. Salvesen (Eds.), Academic Press, **2013**, pp. 1471–1476. *Cité page 52*
- [274] S. Mizutani, K. Shibata, F. Kikkawa, A. Hattori, M. Tsujimoto, M. Ishii, H. Kobayashi. Essential role of placental leucine aminopeptidase in gynecologic malignancy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2007**, *11*, 453–461. *Cité page 52*
- [275] Q. Gong, W. Shi, L. Li, H. Ma. Leucine aminopeptidase may contribute to the intrinsic resistance of cancer cells toward cisplatin as revealed by an ultrasensitive fluorescent probe. *Chem. Sci.* **2015**, *7*, 788–792. *Cité page 52*
- [276] X.-b. Zhang, M. Waibel, J. Hasserodt. An Autoimmolative Spacer Allows First-Time Incorporation of a Unique Solid-State Fluorophore into a Detection Probe for Acyl Hydrolases. *Chemistry – A European Journal* **2010**, *16*, 792–795. *Cité page 53*
- [277] O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon, J. Hasserodt. A robust, high-sensitivity stealth probe for peptidases. *Chemical Communications* **2012**, *48*, 6253. *Cité page 54*
- [278] J. Hasserodt, O. Thorn-Seshold, *Fluorogenic peptidase substrate, WO 2013/045854A1*, **2013**. *Cité page 54*
- [279] L. W. Dittert, T. Higuchi. Rates of hydrolysis of carbamate and carbonate esters in alkaline solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, *52*, 852–857. *Cité page 54*

- [280] M. Prost, *Sondes moléculaires comprenant des espaceurs auto-effondrables multifonctionnels pour la détection d'activités enzymatiques*, Thèse de doctorat, Lyon, École normale supérieure, Lyon, France, **2014**.  
*5 citations pages 55, 56, 65, 109, et 136*
- [281] M. Prost, L. Canaple, J. Samarut, J. Hasserodt. Tagging Live Cells that Express Specific Peptidase Activity with Solid-State Fluorescence. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1413–1417. *3 citations pages 55, 109, et 199*
- [282] E. Lindberg, N. Winssinger. High Spatial Resolution Imaging of Endogenous Hydrogen Peroxide in Living Cells by Solid-State Fluorescence. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1612–1615. *2 citations pages 55 et 154*
- [283] K. Li, X.-X. Hu, H.-W. Liu, S. Xu, S.-Y. Huan, J.-B. Li, T.-G. Deng, X.-B. Zhang. In Situ Imaging of Furin Activity with a Highly Stable Probe by Releasing of Precipitating Fluorochrome. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 11680–11687. *Cité page 56*
- [284] J. Ou-Yang, Y.-F. Li, P. Wu, W.-L. Jiang, H.-W. Liu, C.-Y. Li. Detecting and Imaging of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Activity in Serum, Live Cells, and Pathological Tissues with a High Signal-Stability Probe by Releasing a Precipitating Fluorochrome. *ACS Sens.* **2018**, *3*, 1354–1361. *Cité page 56*
- [285] M. Prost, J. Hasserodt. “Double gating” – a concept for enzyme-responsive imaging probes aiming at high tissue specificity. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14896–14899. *4 citations pages 56, 57, 104, et 109*
- [286] J. Hasserodt, *Fluorogenic glycosidase substrate and associated detection method*, *WO 2014/020285A1*, **2014**. *Cité page 56*
- [287] J. Hasserodt, C. Gondrand, M. Prost, G. Yvert, G. Triqueneaux, *Fluorogenic Glycosidase Substrate and Associated Detection Method*, *WO 2018/114933A1*, **2018**. *4 citations pages 56, 78, 85, et 109*
- [288] D. J. Spergel, U. Krüth, D. R. Shimshek, R. Sprengel, P. H. Seeburg. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. *Progress in Neurobiology* **2001**, *63*, 673–686. *Cité page 56*
- [289] D. Asanuma, M. Sakabe, M. Kamiya, K. Yamamoto, J. Hiratake, M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, T. Nagano, H. Kobayashi, Y. Urano. Sensitive  $\beta$ -

- galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nature Communications* **2015**, *6*, 6463. *Cité page 56*
- [290] X.-X. Zhang, H. Wu, P. Li, Z.-J. Qu, M.-Q. Tan, K.-L. Han. A versatile two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging *E. coli*  $\beta$ -galactosidase in live cells and *in vivo*. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8283–8286. *Cité page 56*
- [291] N. Hananya, D. Shabat. A Glowing Trajectory between Bio- and Chemiluminescence : From Luciferin-Based Probes to Triggerable Dioxetanes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16454–16463. *Cité page 56*
- [292] H. Ito, Y. Kawamata, M. Kamiya, K. Tsuda-Sakurai, S. Tanaka, T. Ueno, T. Komatsu, K. Hanaoka, S. Okabe, M. Miura, Y. Urano. Red-Shifted Fluorogenic Substrate for Detection of lacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 15702–15706. *Cité page 56*
- [293] S. K. Chatterjee, M. Bhattacharya, J. J. Barlow. Glycosyltransferase and Glycosidase Activities in Ovarian Cancer Patients. *Cancer Res* **1979**, *39*, 1943–1951. *3 citations pages 57, 73, et 94*
- [294] J. Burger, M. Kirchner, B. Bramanti, W. Haak, M. G. Thomas. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *PNAS* **2007**, *104*, 3736–3741. *Cité page 57*
- [295] E. A. Jordan, M. P. Thorne. The thermal decomposition of carbamates and carbonates of 2-arylpropan-2-ols and 1-aryl-1-phenylethanol : temperature and solvent effects on the reaction constant and kinetic isotope effects. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 647–653. *Cité page 64*
- [296] R. Peters, J. Peters, K. H. Tews, W. Bähr. A microfluorimetric study of translational diffusion in erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1974**, *367*, 282–294. *Cité page 67*
- [297] T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel, S. Papot. The First Generation of  $\beta$ -Galactosidase-Responsive Prodrugs Designed for the Selective Treatment of Solid Tumors in Prodrug Monotherapy. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 11606–11610. *2 citations pages 76 et 77*



- [298] H. Elnakat, M. Ratnam. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms : implications in targeted therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1067–1084. *Cité page 76*
- [299] P. S. Low, A. C. Antony. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1055–1058. *Cité page 76*
- [300] C. P. Leamon, J. A. Reddy. Folate-targeted chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1127–1141. *Cité page 76*
- [301] J. Reddy, V. Allagadda, C. Leamon. Targeting Therapeutic and Imaging Agents to Folate Receptor Positive Tumors. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2005**, *6*, 131–150. *Cité page 76*
- [302] J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L.-C. Xu, M. Vetzal, P. Kleindl, I. R. Vlahov, C. P. Leamon. Preclinical Evaluation of EC145, a Folate-Vinca Alkaloid Conjugate. *Cancer Res* **2007**, *67*, 4434–4442. *Cité page 76*
- [303] B. Elsadek, F. Kratz. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release* **2012**, *157*, 4–28. *Cité page 76*
- [304] R. A. Jefferson, S. M. Burgess, D. Hirsh.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *PNAS* **1986**, *83*, 8447–8451. *Cité page 82*
- [305] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, M. W. Bevan. GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **1987**, *6*, 3901–3907. *Cité page 82*
- [306] W. S. Sly, B. A. Quinton, W. H. McAlister, D. L. Rimoin.  $\beta$  glucuronidase deficiency : Report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *The Journal of Pediatrics* **1973**, *82*, 249–257. *Cité page 82*
- [307] W. H. Fishman,  $\beta$ -Glucuronidase in *Methods of Enzymatic Analysis (Second Edition)*, H. U. Bergmeyer (Ed.), Academic Press, **1974**, pp. 929–943. *Cité page 82*
- [308] L. Kürti, B. Czakó, *Strategic applications of named reactions in organic synthesis : background and detailed mechanisms ; 250 named reactions nachdr. ed.*, Elsevier, Acad. Press, Amsterdam, **2009**, OCLC : 634820219. *Cité page 83*
- [309] J.-H. Kim, H. Yang, J. Park, G.-J. Boons. A General Strategy for Stereoselective Glycosylations. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12090–12097. *Cité page 83*



- [310] A. Comfort, *The biology of senescence*, of *The biology of senescence*, Rinehart, Oxford, England, **1956**. *Cité page 92*
- [311] G. C. Williams. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* **1957**, *11*, 398–411. *Cité page 92*
- [312] J. Campisi, F. d’Adda di Fagagna. Cellular senescence : when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 729–740. *Cité page 92*
- [313] L. D. Noodén, J. J. Guiamét, I. John. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* **1997**, *101*, 746–753. *Cité page 92*
- [314] B. G. Childs, D. J. Baker, J. L. Kirkland, J. Campisi, J. M. van Deursen. Senescence and apoptosis : dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* **2014**, *15*, 1139–1153. *Cité page 92*
- [315] M. A. Hayat (Ed.), *Tumor Dormancy, Quiescence, and Senescence, Volume 2 : Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies*, of *Tumor Dormancy and Cellular Quiescence and Senescence*, Springer Netherlands, **2014**. *Cité page 92*
- [316] C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **1990**, *345*, 458. *Cité page 92*
- [317] E. H. Blackburn. Structure and function of telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569. *Cité page 92*
- [318] T. von Zglinicki. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* **2002**, *27*, 339–344. *Cité page 93*
- [319] M. Collado, M. A. Blasco, M. Serrano. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **2007**, *130*, 223–233. *Cité page 93*
- [320] J. Campisi. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology* **2013**, *75*, 685–705. *Cité page 93*
- [321] B. G. Childs, M. Durik, D. J. Baker, J. M. van Deursen. Cellular senescence in aging and age-related disease : from mechanisms to therapy. *Nature Medicine* **2015**, *21*, 1424–1435. *Cité page 93*
- [322] F. Rodier, J. Campisi. Four faces of cellular senescence. *The Journal of Cell Biology* **2011**, *192*, 547–556. *Cité page 94*

- [323] G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1995**, *92*, 9363–9367. *Cité page 94*
- [324] B. Y. Lee, J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, E. S. Hwang. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell* **2006**, *5*, 187–195. *Cité page 94*
- [325] J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orłowski. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2010**, *11*, 50–61. *Cité page 94*
- [326] B. Lozano-Torres, A. Estepa-Fernández, M. Rovira, M. Orzáez, M. Serrano, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón. The chemistry of senescence. *Nature Reviews Chemistry* **2019**, *3*, 426. *Cité page 94*
- [327] J. Huang, N. Li, Q. Wang, Y. Gu, P. Wang. A lysosome-targetable and two-photon fluorescent probe for imaging endogenous  $\beta$ -galactosidase in living ovarian cancer cells. *Sensors and Actuators B : Chemical* **2017**, *246*, 833–839. *Cité page 94*
- [328] X. Chen, X. Zhang, X. Ma, Y. Zhang, G. Gao, J. Liu, S. Hou. Novel fluorescent probe for rapid and ratiometric detection of  $\beta$ -galactosidase and live cell imaging. *Talanta* **2019**, *192*, 308–313. *Cité page 94*
- [329] J. Zhang, C. Li, C. Dutta, M. Fang, S. Zhang, A. Tiwari, T. Werner, F.-T. Luo, H. Liu. A novel near-infrared fluorescent probe for sensitive detection of  $\beta$ -galactosidase in living cells. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *968*, 97–104. *Cité page 95*
- [330] B. Lozano-Torres, I. Galiana, M. Rovira, E. Garrido, S. Chaib, A. Bernardos, D. Muñoz-Espín, M. Serrano, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón. An OFF–ON Two-Photon Fluorescent Probe for Tracking Cell Senescence in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8808–8811. *Cité page 95*
- [331] H. W. Lee, C. H. Heo, D. Sen, H.-O. Byun, I. H. Kwak, G. Yoon, H. M. Kim. Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probe for Quantitative Detection of  $\beta$ -Galactosidase Activity in Senescent Cells. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10001–10005. *Cité page 95*

- [332] M. S. Filho, P. Dao, M. Gesson, A. R. Martin, R. Benhida. Development of highly sensitive fluorescent probes for the detection of  $\beta$ -galactosidase activity – application to the real-time monitoring of senescence in live cells. *Analyst* **2018**, *143*, 2680–2688. *Cité page 95*
- [333] Y. Wang, J. Liu, X. Ma, C. Cui, P. R. Deenik, P. K. P. Henderson, A. L. Sigler, L. Cui. Real-time imaging of senescence in tumors with DNA damage. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 2102. *Cité page 95*
- [334] I. Juranić. Simple Method for the Estimation of pKa of Amines. *Croatica Chemica Acta* **2014**, *87*, 343–347. *Cité page 96*
- [335] S. T. A. Tong, D. Barker. A concise synthesis of ( $\pm$ ) and a total synthesis of (+)-epiquinamide. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 5017–5020. *Cité page 97*
- [336] M. N. Matrosovich, T. Y. Matrosovich, T. Gray, N. A. Roberts, H.-D. Klenk. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology* **2004**, *78*, 12665–12667. *Cité page 105*
- [337] C.-P. Lu, C.-T. Ren, Y.-N. Lai, S.-H. Wu, W.-M. Wang, J.-Y. Chen, L.-C. Lo. Design of a Mechanism-Based Probe for Neuraminidase To Capture Influenza Viruses. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 6888–6892. *Cité page 105*
- [338] A. Fleming. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *Br J Exp Pathol* **1929**, *10*, 226–236. *2 citations pages 110 et 113*
- [339] H. T. Clarke, J. R. Johnson, R. Robinson, *Chemistry of Penicillin*, Princeton University Press, Place of publication not identified, **1949**. *Cité page 110*
- [340] E. P. Abraham, E. Chain. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146*, 837. *2 citations pages 110 et 113*
- [341] H. Barreteau, A. Kovač, A. Boniface, M. Sova, S. Gobec, D. Blanot. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **2008**, *32*, 168–207. *Cité page 111*
- [342] A. Bouhss, A. E. Trunkfield, T. D. H. Bugg, D. Mengin-Lecreulx. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **2008**, *32*, 208–233. *Cité page 111*

- [343] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J. A. Ayala, P. Charlier. The penicillin-binding proteins : structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **2008**, *32*, 234–258. *Cité page 111*
- [344] A. Matagne, M. F. Ghuysen, J. M. Frère. Interactions between active-site-serine  $\beta$ -lactamases and mechanism-based inactivators : a kinetic study and an overview. *Biochemical Journal* **1993**, *295*, 705–711. *Cité page 112*
- [345] J. Davies, D. Davies. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433. *Cité page 112*
- [346] V. M. D'Costa, C. E. King, L. Kalan, M. Morar, W. W. L. Sung, C. Schwarz, D. Froese, G. Zazula, F. Calmels, R. Debruyne, G. B. Golding, H. N. Poinar, G. D. Wright. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **2011**, *477*, 457–461. *Cité page 112*
- [347] J. M. Frère, B. Joris, B. Granier, A. Matagne, F. Jacob, C. Bourguignon-Bellefroid. Diversity of the mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Research in Microbiology* **1991**, *142*, 705–710. *Cité page 113*
- [348] S. B. Levy, B. Marshall. Antibacterial resistance worldwide : causes, challenges and responses. *Nature Medicine* **2004**, *10*, S122–S129. *Cité page 113*
- [349] S. B. Levy. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**, *36*, 695–703. *Cité page 113*
- [350] A. Zapun, C. Contreras-Martel, T. Vernet. Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* **2008**, *32*, 361–385. *Cité page 113*
- [351] J.-D. Docquier, S. Mangani. An update on  $\beta$ -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resistance Updates* **2018**, *36*, 13–29. *Cité page 113*
- [352] C. Reading, M. Cole. Clavulanic Acid : a  $\beta$ -Lactamase-Inhibiting  $\beta$ -Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1977**, *11*, 852–857. *Cité page 114*
- [353] G. M. Rossolini, F. Arena, P. Pecile, S. Pollini. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology* **2014**, *18*, 56–60. *Cité page 114*
- [354] The antibiotic alarm. *Nature News* **2013**, *495*, 141. *Cité page 114*

- [355] F. J. Pérez-Pérez, N. D. Hanson. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **2002**, *40*, 2153–2162. *Cité page 115*
- [356] D. M. Livermore, D. F. J. Brown. Detection of  $\beta$ -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* **2001**, *48*, 59–64. *Cité page 116*
- [357] C. H. O’Callaghan, A. Morris, S. M. Kirby, A. H. Shingler. Novel Method for Detection of  $\beta$ -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrob Agents Chemother* **1972**, *1*, 283–288. *Cité page 116*
- [358] M. I. Page, P. Proctor. Mechanism of  $\beta$ -lactam ring opening in cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3820–3825. *Cité page 116*
- [359] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien. Quantitation of Transcription and Clonal Selection of Single Living Cells with  $\beta$ -Lactamase as Reporter. *Science* **1998**, *279*, 84–88. *3 citations pages 116, 117, et 135*
- [360] B. Xing, A. Khanamiryan, J. Rao. Cell-Permeable Near-Infrared Fluorogenic Substrates for Imaging  $\beta$ -Lactamase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4158–4159. *Cité page 116*
- [361] H. Xie, J. Mire, Y. Kong, M. Chang, H. A. Hassounah, C. N. Thornton, J. C. Sacchettini, J. D. Cirillo, J. Rao. Rapid point-of-care detection of the tuberculosis pathogen using a BlaC-specific fluorogenic probe. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 802–809. *Cité page 116*
- [362] L. Li, Z. Li, W. Shi, X. Li, H. Ma. Sensitive and Selective Near-Infrared Fluorescent Off-On Probe and Its Application to Imaging Different Levels of  $\beta$ -Lactamase in *Staphylococcus aureus*. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6115–6120. *Cité page 116*
- [363] J. T. Moore, S. T. Davis, I. K. Dev. The Development of  $\beta$ -Lactamase as a Highly Versatile Genetic Reporter for Eukaryotic Cells. *Analytical Biochemistry* **1997**, *247*, 203–209. *Cité page 117*
- [364] A. Matagne, J. Lamotte-Brasseur, J. M. Frère. Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases : efficiency and diversity. *Biochem J* **1998**, *330*, 581–598. *Cité page 117*

- [365] M. L. M. Salverda, J. A. G. M. D. Visser, M. Barlow. Natural evolution of TEM-1  $\beta$ -lactamase : experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiology Reviews* **2010**, *34*, 1015–1036. *Cité page 117*
- [366] S. A. Qureshi.  $\beta$ -Lactamase : an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. *BioTechniques* **2007**, *42*, 91–96. *Cité page 118*
- [367] S. Mizukami, S. Watanabe, Y. Hori, K. Kikuchi. Covalent Protein Labeling Based on Noncatalytic  $\beta$ -Lactamase and a Designed FRET Substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5016–5017. *Cité page 118*
- [368] S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Hori, K. Kikuchi. Multicolor Protein Labeling in Living Cells Using Mutant  $\beta$ -Lactamase-Tag Technology. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2320–2326. *Cité page 118*
- [369] S. L. Aronoff, K. Berkowitz, B. Shreiner, L. Want. Glucose Metabolism and Regulation : Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* **2004**, *17*, 183–190. *Cité page 119*
- [370] S. Huang, M. P. Czech. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism* **2007**, *5*, 237–252. *Cité page 119*
- [371] A. Sheena, S. S. Mohan, N. P. A. Haridas, G. Anilkumar. Elucidation of the Glucose Transport Pathway in Glucose Transporter 4 via Steered Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e25747. *Cité page 119*
- [372] W. T. Garvey, L. Maianu, J. H. Zhu, G. Brechtel-Hook, P. Wallace, A. D. Baron. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest* **1998**, *101*, 2377–2386. *Cité page 119*
- [373] J. W. Ryder, J. Yang, D. Galuska, J. Rincón, M. Björnholm, A. Krook, S. Lund, O. Pedersen, H. Wallberg-Henriksson, J. R. Zierath, G. D. Holman. Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* **2000**, *49*, 647–654. *Cité page 119*
- [374] Y. Haga, K. Ishii, T. Suzuki. N-Glycosylation Is Critical for the Stability and Intracellular Trafficking of Glucose Transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31320–31327. *Cité page 119*

- [375] N. Zaarour, M. Berenguer, Y. L. Marchand-Brustel, R. Govers. Deciphering the role of GLUT4 N-glycosylation in adipocyte and muscle cell models. *Biochemical Journal* **2012**, *445*, 265–273. *Cité page 119*
- [376] M. Kukuruzinska, K. Lennon. Protein N-Glycosylation : Molecular Genetics and Functional Significance. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1998**, *9*, 415–448. *Cité page 119*
- [377] A. Helenius, M. Aebi. Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry* **2004**, *73*, 1019–1049. *Cité page 119*
- [378] B. L. Ing, H. Chen, K. A. Robinson, M. G. Buse, M. J. Quon. Characterization of a Mutant GLUT4 Lacking the N-Glycosylation Site : Studies in Transfected Rat Adipose Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *218*, 76–82. *Cité page 119*
- [379] S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki, K. Kikuchi. Fluorogenic probes reveal a role of GLUT4 N-glycosylation in intracellular trafficking. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 853–859. *2 citations pages 119 et 120*
- [380] A. D. Deshpande, K. G. Baheti, N. R. Chatterjee. Degradation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Current Science* **2004**, *87*, 1684–1695. *Cité page 125*
- [381] B. Dalby, S. Cates, A. Harris, E. C. Ohki, M. L. Tilkins, P. J. Price, V. C. Ciccarone. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent : primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* **2004**, *33*, 95–103. *Cité page 126*
- [382] S. Bacchetti, F. L. Graham. Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *PNAS* **1977**, *74*, 1590–1594. *Cité page 126*
- [383] Y. Yarden. The EGFR family and its ligands in human cancer : signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* **2001**, *37*, 3–8. *Cité page 132*
- [384] J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson. EGFR Mutations in Lung Cancer : Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497–1500. *Cité page 132*



- [385] G. N. Rolinson.  $\beta$ -Lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1986**, *17*, 5–36. *Cité page 134*
- [386] P. Ruiz-Carretero, A. Nacher, M. Merino-Sanjuan, V. G. Casabo. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of oral cefuroxime axetil in the rat. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *202*, 89–96. *Cité page 134*
- [387] K. Stoeckel, W. Hofheinz, J. P. Laneury, P. Duchene, S. Shedlofsky, R. A. Blouin. Stability of Cephalosporin Prodrug Esters in Human Intestinal Juice : Implications for Oral Bioavailability. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, *42*, 2602–2606. *Cité page 135*
- [388] Y. S. Park, S. K. Woo, M. H. Jung, K.-i. Kwon. Pharmacokinetics and bioavailability of oral cephalosporins, KR-984055 and its prodrugs, KR-999001 and KR-999002, in the rat. *Arch Pharm Res* **2003**, *26*, 83–88. *Cité page 135*
- [389] S. Watanabe, S. Mizukami, Y. Akimoto, Y. Hori, K. Kikuchi. Intracellular Protein Labeling with Prodrug-Like Probes Using a Mutant  $\beta$ -Lactamase Tag. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 8342–8349. *Cité page 135*
- [390] D. Wang, L. Zou, Q. Jin, J. Hou, G. Ge, L. Yang. Human carboxylesterases : a comprehensive review. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, *8*, 699–712. *Cité page 135*
- [391] J. C. Fung-Tomc. Fourth-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology Newsletter* **1997**, *19*, 129–136. *Cité page 135*
- [392] R. E. Hancock, F. Bellido. Factors involved in the enhanced efficacy against gram-negative bacteria of fourth generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* **1992**, *29 Suppl A*, 1–6. *Cité page 135*
- [393] A. Braïki, *Synthèse de nouveaux espaceurs auto-effondrables pour la détection d'activités enzymatiques*, Tech. Rep., Lyon, École normale supérieure, Lyon, France, **2014**. *Cité page 136*
- [394] G. Hong, A. L. Antaris, H. Dai. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nature Biomedical Engineering* **2017**, *1*.  
*4 citations pages 148, 149, 150, et 151*
- [395] A. M. Smith, M. C. Mancini, S. Nie. Bioimaging : Second window for *in vivo* imaging. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4*, 710–711. *Cité page 148*



- [396] E. Hemmer, N. Venkatachalam, H. Hyodo, A. Hattori, Y. Ebina, H. Kishimoto, K. Soga. Upconverting and NIR emitting rare earth based nanostructures for NIR-bioimaging. *Nanoscale* **2013**, *5*, 11339–11361. *Cité page 149*
- [397] J. V. Frangioni. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, *7*, 626–634. *Cité page 150*
- [398] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, X. Chen. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6597–6626. *Cité page 150*
- [399] Y. Jiang, K. Pu. Molecular Fluorescence and Photoacoustic Imaging in the Second Near-Infrared Optical Window Using Organic Contrast Agents. *Advanced Biosystems* **2018**, *2*, 1700262. *Cité page 151*
- [400] A. Haque, M. S. H. Faizi, J. A. Rather, M. S. Khan. Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery : A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25*, 2017–2034. *Cité page 151*
- [401] J.-B. Li, H.-W. Liu, T. Fu, R. Wang, X.-B. Zhang, W. Tan. Recent Progress in Small-Molecule Near-IR Probes for Bioimaging. *Trends in Chemistry* **2019**, *1*, 224–234. *Cité page 151*
- [402] S. A. Hilderbrand, R. Weissleder. Near-infrared fluorescence : application to *in vivo* molecular imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 71–79. *Cité page 151*
- [403] K. Kiyose, H. Kojima, T. Nagano. Functional Near-Infrared Fluorescent Probes. *Chemistry – An Asian Journal* **2008**, *3*, 506–515. *Cité page 151*
- [404] E. A. Owens, M. Henary, G. El Fakhri, H. S. Choi. Tissue-Specific Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1731–1740. *Cité page 151*
- [405] H. Wang, X. Mu, J. Yang, Y. Liang, X.-D. Zhang, D. Ming. Brain imaging with near-infrared fluorophores. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *380*, 550–571. *Cité page 151*
- [406] S. Gioux, H. S. Choi, J. V. Frangioni. Image-Guided Surgery Using Invisible Near-Infrared Light : Fundamentals of Clinical Translation. *Mol Imaging* **2010**, *9*, 7290.2010.00034. *Cité page 151*

- [407] A. L. Antaris, H. Chen, K. Cheng, Y. Sun, G. Hong, C. Qu, S. Diao, Z. Deng, X. Hu, B. Zhang, X. Zhang, O. K. Yaghi, Z. R. Alamparambil, X. Hong, Z. Cheng, H. Dai. A small-molecule dye for NIR-II imaging. *Nature Materials* **2016**, *15*, 235–242. *Cité page 151*
- [408] A. L. Antaris, H. Chen, S. Diao, Z. Ma, Z. Zhang, S. Zhu, J. Wang, A. X. Lozano, Q. Fan, L. Chew, M. Zhu, K. Cheng, X. Hong, H. Dai, Z. Cheng. A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging. *Nature Communications* **2017**, *8*, 15269. *Cité page 151*
- [409] E. D. Cosco, J. R. Caram, O. T. Bruns, D. Franke, R. A. Day, E. P. Farr, M. G. Bawendi, E. M. Sletten. Flavylium Polymethine Fluorophores for Near- and Shortwave Infrared Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 13126–13129. *Cité page 151*
- [410] Q. Yang, Z. Ma, H. Wang, B. Zhou, S. Zhu, Y. Zhong, J. Wang, H. Wan, A. Antaris, R. Ma, X. Zhang, J. Yang, X. Zhang, H. Sun, W. Liu, Y. Liang, H. Dai. Rational Design of Molecular Fluorophores for Biological Imaging in the NIR-II Window. *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1605497. *Cité page 151*
- [411] Q. Yang, Z. Hu, S. Zhu, R. Ma, H. Ma, Z. Ma, H. Wan, T. Zhu, Z. Jiang, W. Liu, L. Jiao, H. Sun, Y. Liang, H. Dai. Donor Engineering for NIR-II Molecular Fluorophores with Enhanced Fluorescent Performance. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1715–1724. *Cité page 151*
- [412] F. Ding, Y. Zhan, X. Lu, Y. Sun. Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 4370–4380. *Cité page 151*
- [413] S. Wang, Y. Fan, D. Li, C. Sun, Z. Lei, L. Lu, T. Wang, F. Zhang. Anti-quenching NIR-II molecular fluorophores for *in vivo* high-contrast imaging and pH sensing. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1–11. *Cité page 151*
- [414] S. Zhu, B. C. Yung, S. Chandra, G. Niu, A. L. Antaris, X. Chen. Near-Infrared-II (NIR-II) Bioimaging via Off-Peak NIR-I Fluorescence Emission. *Theranostics* **2018**, *8*, 4141–4151. *Cité page 151*
- [415] G. Hong, J. C. Lee, J. T. Robinson, U. Raaz, L. Xie, N. F. Huang, J. P. Cooke, H. Dai. Multifunctional *in vivo* vascular imaging using near-infrared II fluorescence. *Nature Medicine* **2012**, *18*, 1841–1846. *Cité page 151*

- [416] B. Li, L. Lu, M. Zhao, Z. Lei, F. Zhang. An Efficient 1064 nm NIR-II Excitation Fluorescent Molecular Dye for Deep-Tissue High-Resolution Dynamic Bioimaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 7483–7487.  
*Cité page 151*
- [417] S. Zhu, S. Herraiz, J. Yue, M. Zhang, H. Wan, Q. Yang, Z. Ma, Y. Wang, J. He, A. L. Antaris, Y. Zhong, S. Diao, Y. Feng, Y. Zhou, K. Yu, G. Hong, Y. Liang, A. J. Hsueh, H. Dai. 3D NIR-II Molecular Imaging Distinguishes Targeted Organs with High-Performance NIR-II Bioconjugates. *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1705799.  
*Cité page 151*
- [418] W. Wang, Z. Ma, S. Zhu, H. Wan, J. Yue, H. Ma, R. Ma, Q. Yang, Z. Wang, Q. Li, Y. Qian, C. Yue, Y. Wang, L. Fan, Y. Zhong, Y. Zhou, H. Gao, J. Ruan, Z. Hu, Y. Liang, H. Dai. Molecular Cancer Imaging in the Second Near-Infrared Window Using a Renal-Excreted NIR-II Fluorophore-Peptide Probe. *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1800106.  
*Cité page 151*
- [419] M. Oheim, D. J. Michael, M. Geisbauer, D. Madsen, R. H. Chow. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 788–808. *Cité page 155*
- [420] P.-T. Chou, Y.-C. Chen, W.-S. Yu, Y.-H. Chou, C.-Y. Wei, Y.-M. Cheng. Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 10-Hydroxybenzo[h]quinoline. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 1731–1740.  
*Cité page 156*
- [421] G. O. W. Lins, L. F. Campo, F. S. Rodembusch, V. Stefani. Novel ESIPT fluorescent benzazolyl-4-quinolones : Synthesis, spectroscopic characterization and photophysical properties. *Dyes and Pigments* **2010**, *84*, 114–120.  
*2 citations pages 156 et 159*
- [422] M. G. Holler, L. F. Campo, A. Brandelli, V. Stefani. Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **2002**, *149*, 217–225.  
*Cité page 159*
- [423] F. S. Rodembusch, F. P. Leusin, L. F. d. C. Medina, A. Brandelli, V. Stefani. Synthesis and spectroscopic characterisation of new ESIPT fluorescent protein probes. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, *4*, 254–259.  
*Cité page 159*

- [424] L. Cui, W. Zhu, Y. Xu, X. Qian. A novel ratiometric sensor for the fast detection of palladium species with large red-shift and high resolution both in aqueous solution and solid state. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *786*, 139–145.  
*2 citations pages 159 et 225*
- [425] M. A. Shaban, O. M. Al Badry, A. M. Kamala, M. A. el Wahap Abd El-Gawad. Synthesis and screening of quinolone antibiotic isosteres. *Journal of Chemical Research* **2008**, *2008*, 715–718.  
*3 citations pages 159, 225, et 226*
- [426] A. D'Aléo, D. Gachet, V. Heresanu, M. Giorgi, F. Fages. Efficient NIR-Light Emission from Solid-State Complexes of Boron Difluoride with 2'-Hydroxychalcone Derivatives. *Chemistry – A European Journal* **2012**, *18*, 12764–12772.  
*Cité page 160*
- [427] X. Cheng, K. Wang, S. Huang, H. Zhang, H. Zhang, Y. Wang. Organic Crystals with Near-Infrared Amplified Spontaneous Emissions Based on 2'-Hydroxychalcone Derivatives : Subtle Structure Modification but Great Property Change. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 8369–8373.  
*Cité page 160*
- [428] X. Cheng, Y. Zhang, S. Han, F. Li, H. Zhang, Y. Wang. Multicolor Amplified Spontaneous Emissions Based on Organic Polymorphs That Undergo Excited-State Intramolecular Proton Transfer. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22*, 4899–4903.  
*Cité page 160*
- [429] Y. Lv, Y. J. Li, J. Li, Y. Yan, J. Yao, Y. S. Zhao. All-Color Subwavelength Output of Organic Flexible Microlasers. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11329–11332.  
*Cité page 160*
- [430] M. Dommett, M. Rivera, R. Crespo-Otero. How Inter- and Intramolecular Processes Dictate Aggregation-Induced Emission in Crystals Undergoing Excited-State Proton Transfer. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 6148–6153. *Cité page 160*
- [431] M. Dommett, R. Crespo-Otero. Excited state proton transfer in 2'-hydroxychalcone derivatives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 2409–2416.  
*Cité page 160*
- [432] Z. Luo, B. Liu, K. Zhu, Y. Huang, C. Pan, B. Wang, L. Wang. An environment-sensitive fluorescent probe for quantification of human serum albumin : Design,

- sensing mechanism, and its application in clinical diagnosis of hypoalbuminemia. *Dyes and Pigments* **2018**, *152*, 60–66. *Cité page 161*
- [433] X. Jin, L. Dong, X. Di, H. Huang, J. Liu, X. Sun, X. Zhang, H. Zhu. NIR luminescence for the detection of latent fingerprints based on ESIPT and AIE processes. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 87306–87310. *2 citations pages 161 et 166*
- [434] R. Li, L. Yan, Z. Wang, Z. Qi. An aggregation-induced emissive NIR luminescent based on ESIPT and TICT mechanisms and its application to the detection of Cys. *Journal of Molecular Structure* **2017**, *1136*, 1–6. *3 citations pages 161, 165, et 231*
- [435] J. Li, X. Ni, J. Zhang, Y. Liang, Z. Gao, X. Zhang, D. Zheng, D. Ding. A fluorescence and photoactivity dual-activatable prodrug with self-synergistic magnification of the anticancer effect. *Mater. Chem. Front.* **2019**, *3*, 1349–1356. *Cité page 161*
- [436] X. Wang, Q. Liao, H. Li, S. Bai, Y. Wu, X. Lu, H. Hu, Q. Shi, H. Fu. Near-Infrared Lasing from Small-Molecule Organic Hemispheres. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9289–9295. *Cité page 161*
- [437] X. Wang, Z.-Z. Li, S.-F. Li, H. Li, J. Chen, Y. Wu, H. Fu. Near-Infrared Organic Single-Crystal Lasers with Polymorphism-Dependent Excited State Intramolecular Proton Transfer. *Advanced Optical Materials* **2017**, *5*, n/a–n/a. *Cité page 161*
- [438] X. Wang, Z.-Z. Li, M.-P. Zhuo, Y. Wu, S. Chen, J. Yao, H. Fu. Tunable Near-Infrared Organic Nanowire Nanolasers. *Advanced Functional Materials* **2017**, *27*, 1703470. *Cité page 161*
- [439] K.-i. Sakai, H. Kawamura, N. Kobayashi, T. Ishikawa, C. Ikeda, T. Kikuchi, T. Akutagawa. Highly efficient solid-state red fluorophores using ESIPT : crystal packing and fluorescence properties of alkoxy-substituted dibenzothiazolylphenols. *CrystEngComm* **2014**, *16*, 3180–3185. *2 citations pages 167 et 237*
- [440] A. K. Gupta, A. Kumar, R. Singh, M. Devi, A. Dhir, C. P. Pradeep. Facile Synthesis of an Organic Solid State Near-Infrared-Emitter with Large Stokes Shift via Excited-State Intramolecular Proton Transfer. *ACS Omega* **2018**. *2 citations pages 170 et 239*

- [441] H.-W. Tseng, T.-C. Lin, C.-L. Chen, T.-C. Lin, Y.-A. Chen, J.-Q. Liu, C.-H. Hung, C.-M. Chao, K.-M. Liu, P.-T. Chou. A new class of N–H proton transfer molecules : wide tautomer emission tuning from 590 nm to 770 nm via a facile, single site amino derivatization in 10-aminobenzo[h]quinoline. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16099–16102. *Cité page 171*
- [442] K.-C. Tang, M.-J. Chang, T.-Y. Lin, H.-A. Pan, T.-C. Fang, K.-Y. Chen, W.-Y. Hung, Y.-H. Hsu, P.-T. Chou. Fine Tuning the Energetics of Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) : White Light Generation in A Single ESIPT System. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17738–17745. *Cité page 171*
- [443] J. Piechowska, G. Angulo. Frustrated excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) in 10-hydroxy-11H-benzo[b]fluoren-11-one : Synthesis and photophysics. *Dyes and Pigments* **2019**, *165*, 346–353. *Cité page 171*
- [444] H. Roohi, P. Alizadeh. Fine tuning the emission wavelengths of the 7-hydroxy-1-indanone based nano-structure dyes : Near-infrared (NIR) dual emission generation with large stokes shifts. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2018**, *196*, 83–102. *2 citations pages 171 et 172*
- [445] S.-i. Nagaoka, J. Kusunoki, T. Fujibuchi, S. Hatakenaka, K. Mukai, U. Nagashima. Nodal-plane model of the excited-state intramolecular proton transfer of 2-(o-hydroxyaryl)benzazoles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry* **1999**, *122*, 151–159. *Cité page 172*
- [446] D.-E. Wang, Y. Zhang, T. Li, Q. Tu, J. Wang. Self-immolative trigger-initiated polydiacetylene probe for  $\beta$ -glucuronidase activity. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16820–16823. *2 citations pages 202 et 203*
- [447] R. Sugiyama, S. Nishimura, T. Ozaki, S. Asamizu, H. Onaka, H. Kakeya. Discovery and Total Synthesis of Streptoaminals : Antimicrobial [5,5]-Spirohemiaminals from the Combined-Culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 10278–10282. *2 citations pages 212 et 213*
- [448] S. Desgranges, C. C. Ruddle, L. P. Burke, T. M. McFadden, J. E. O'Brien, D. Fitzgerald-Hughes, H. Humphreys, T. P. Smyth, M. Devocelle.  $\beta$ -Lactam-host defence peptide conjugates as antibiotic prodrug candidates targeting resistant bacteria. *RSC Advances* **2012**, *2*, 2480. *3 citations pages 216, 217, et 218*

- [449] T.-S. Jiang, B. Gan, X. Wang, X. Zhang. One-pot synthesis of ortho-acylphenols by palladium-catalyzed phenol C–H addition to nitriles. *Tetrahedron Letters* **2017**, *58*, 4197–4199. *Cité page 227*
- [450] M. Mečiarová, Toma, P. Magdolen. Ultrasound effect on the aromatic nucleophilic substitution reactions on some haloarenes. *Ultrasonics Sonochemistry* **2003**, *10*, 265–270. *2 citations pages 227 et 228*
- [451] R. Murashige, Y. Hayashi, S. Ohmori, A. Torii, Y. Aizu, Y. Muto, Y. Murai, Y. Oda, M. Hashimoto. Comparisons of O-acylation and Friedel–Crafts acylation of phenols and acyl chlorides and Fries rearrangement of phenyl esters in trifluoromethanesulfonic acid : effective synthesis of optically active homotyrosines. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 641–649. *Cité page 228*
- [452] T. C. Swinney, D. F. Kelley. Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones : Solvent polarization effects. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 211–221. *Cité page 229*
- [453] C. Chiruta, D. Schubert, R. Dargusch, P. Maher. Chemical Modification of the Multitarget Neuroprotective Compound Fisetin. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 378–389. *Cité page 231*
- [454] M. Y. Fosso, H. LeVine 3rd, K. D. Green, O. V. Tsodikov, S. Garneau-Tsodikova. Effects of structural modifications on the metal binding, anti-amyloid activity, and cholinesterase inhibitory activity of chalcones. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9418–9426. *2 citations pages 234 et 235*
- [455] L. F. Lindoy, G. V. Meehan, N. Svenstrup. Mono- and Diformylation of 4-Substituted Phenols : A New Application of the Duff Reaction. *Synthesis* **1998**, *1998*, 1029–1032. *Cité page 236*
- [456] P. A. Peixoto, A. Boulangé, M. Ball, B. Naudin, T. Alle, P. Cosette, P. Karuso, X. Franck. Design and Synthesis of Epicocconone Analogues with Improved Fluorescence Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15248–15256. *Cité page 239*
- [457] H. Takikawa, A. Nishii, K. Suzuki. Synthesis of  $\beta$ -Hydroxynaphthoate Derivatives from Ketodioxinones via Benzyne Acyl-Alkylation and Aldol Condensation Cascade. *Synthesis* **2016**, *48*, 3331–3338. *Cité page 240*

- [458] L. Porrès, A. Holland, L.-O. Pålsson, A. P. Monkman, C. Kemp, A. Beeby. Absolute Measurements of Photoluminescence Quantum Yields of Solutions Using an Integrating Sphere. *J Fluoresc* **2006**, *16*, 267–273. *Cité page 241*
- [459] J. C. d. Mello, H. F. Wittmann, R. H. Friend. An improved experimental determination of external photoluminescence quantum efficiency. *Advanced Materials* **1997**, *9*, 230–232. *Cité page 241*
- [460] M. Rémond, *Développement de nouveaux chromophores dipolaires pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie photoacoustique*, thesis, Lyon, **2018**. *Cité page 241*