



HAL
open science

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques

Steven Vertueux

► **To cite this version:**

Steven Vertueux. Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques. Chimie organique. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMR032 . tel-04199294

HAL Id: tel-04199294

<https://theses.hal.science/tel-04199294>

Submitted on 7 Sep 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques

Présentée et soutenue par
STEVEN VERTUEUX

Thèse soutenue le 10/06/2022
devant le jury composé de

| | | |
|-----------------------|---|--------------------|
| M. LOIC CHARBONNIERE | DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE STRASBOURG | Rapporteur du jury |
| M. GILLES ULRICH | DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE STRASBOURG 1 LOUIS PASTEUR | Rapporteur du jury |
| MME CHANTAL ANDRAUD | DIRECTEUR DE RECHERCHE, ECOLE NORMALE SUP LYON ENS DE LYON | Membre du jury |
| M. PHILIPPE DURAND | DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS | Membre du jury |
| MME CHRISTINE GOZE | MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE BOURGOGNE | Membre du jury |
| M. ALEXANDRE HAEFELE | MAITRE DE CONFERENCES, Université de Rouen Normandie | Membre du jury |
| M. JULIEN LEGROS | DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Rouen Normandie | Membre du jury |
| M. PIERRE YVES RENARD | PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie | Directeur de thèse |

Thèse dirigée par **PIERRE YVES RENARD (CHIMIE ORGANIQUE, BIOORGANIQUE, REACTIVITE, ANALYSE),**



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques.

Présentée et soutenue par

Steven VERTUEUX

Thèse soutenue publiquement le 10 juin 2022
devant le jury composé de

| | | |
|------------------------|---|--------------------|
| Dr. Loïc CHARBONNIÈRE | Directeur de recherche CNRS, IHPC, Université de Strasbourg | Rapporteur |
| Dr. Gilles ULRICH | Directeur de recherche CNRS, ICPEES, Université de Strasbourg | Rapporteur |
| Dr. Christine GOZE | Maitre de conférences, Université de Bourgogne | Examinatrice |
| Dr. Chantal ANDRAUD | Directrice de recherche, CNRS École normale supérieur de Lyon | Examinatrice |
| Dr. Philippe DURAND | Directeur de recherche, CNRS, Institut de Chimie des substances Naturelles | Examineur |
| Dr. Julien LEGROS | Directeur de recherche, CNRS Université de Rouen | Examineur |
| Pr. Pierre-Yves RENARD | Professeur, Université de Rouen | Directeur de thèse |
| Dr. Alexandre HAEFELÉ | Maitre de conférences, Université de Rouen | Co-encadrant |

Thèse dirigée par le Pr. Pierre-Yves RENARD, et co encadrée par le Dr. Alexandre HAEFELÉ
laboratoire COBRA UMR 6014



Je remercie sincèrement l'ensemble des membres du jury, les Dr. Loïc Charbonnière, Dr. Gilles Ulrich, Dr. Chantal Andraud, Dr. Christine Goze, Dr. Philippe Durand, et Dr. Julien Legros pour avoir accepté de juger et d'évaluer mes travaux de thèse.

Remerciements :

Tout d'abord, Je souhaite remercier mon directeur de thèse le Professeur Pierre-Yves Renard pour m'avoir laissé cette opportunité de réaliser cet objectif personnel. Je te remercie pour le temps accorder malgré tes multiples responsabilités.

Je remercie également le Docteur Philippe Durand, collaborateur sur ce projet scientifique, et qui m'aura permis de débloquent une partie de mon projet, au cours de mon séjour, rapide et efficace à l'ICSN.

Je souhaite remercier chaleureusement mon encadrant de thèse, le Docteur Alexandre Haefelé pour son encadrement scientifique dans une atmosphère agréable tout au long de cette thèse. Je n'aurai clairement pas pu avoir meilleur pédagogue. Ces 4 années auront été formateur, malgré les différents échecs j'aurai énormément appris. Merci pour ta patience et ta disponibilité. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie les différents étudiants, Cassandra Catrouillet, Cyrille Kiaku ainsi qu'Alexandre Hauwelle ayant contribué à leur échelle au projet.

Je remercie tous les permanents de l'équipe, Cyrille S., Xavier F, Stéphane L., Ludovic J. qui ont contribué d'une façon ou d'une autre au bon déroulement de ce projet. Merci à Thibault G. pour ses nombreux conseils en photophysique. J'ai une petite pensée pour Niko H. qui a amené sa bonne humeur au laboratoire et pas que... Enfin, je souhaite aussi remercier chaleureusement le Docteur Sébastien Balieu, GM au sein de la cellule 255 ... Merci Seb, pour ta bonne humeur, ton soutien ainsi que ton partage de connaissance, en chimie et aux échecs. Ça aura été un plaisir de travailler dans la même équipe.

La réalisation de tels travaux ne serait pas possible sans une structure qui nous supporte. Aussi, je remercie tout le personnel du laboratoire COBRA, les membres du services administratif, Camille le magasinier, Charles le verrier qui nous a sauvé un paquet de fois et bien sur le service analyse. Merci Tia², merci Emilie pour votre bonne humeur, votre disponibilité ainsi que votre patience avec nous autres les doctorants. Merci pour votre partage de connaissance, même si ce n'est pas toujours simple de vous suivre, vous avez réussi à me réconcilier avec l'analyse.

J'ai une pensée pour ceux que j'ai croisé au début de mon doctorat et qui ont rendu l'intégration ici à Rouen plus fun. Je remercie Rémi F, pour la bonne humeur qu'il a apportée au sein de la demi-cellule quand j'étais un peu seul. Son passage aura été court, mais qu'est-ce qu'on aura déconné. Merci à tous les doctorants et post-doctorats que j'ai pu côtoyés, les anciens et les nouveaux. Merci à Morgane et Dorra pour leur accueil lors de mon arrivé en 255. Merci à Maxou, l'homme qui n'a que de bons résultats et qui venait me remonter la morale en me disant « ça me saoul, ça marche encore ... » quand j'étais au fond du trou. Je remercie mes derniers compagnons de laboratoire, Aurélien, Antoine S a.k.a Stifler le plus fort, Blaise, Romain, Louis, Brice... Je n'oublie pas non plus les anciens, Alexis le boxeur fou... Margot, Romain le grand ourson, Mégane. Petite mention pour mes ex-compagnons de promotion, Pierre, Madeleine, Léo et Seydou. 1 an plus tard j'y serai finalement parvenue. On va bientôt pouvoir geeker Pierre ... bientôt...

Merci au gars du foot aussi, ça aura été important pour que je garde encore l'illusion d'être un « sportif ».

Bien sûr je n'oublie pas mon partenaire d'échec et de bar, Antoine D... 1750 ELO F*****, l'élève a battu le maître. À présent, il faut aller chercher le GM. Tu m'auras redonné goût au rugby et aux bières ? ah non ça c'était déjà le cas. Je te passe le témoin pour la suite bon courage.

Enfin, je remercie toutes les excellentes rencontres qui ont joué un rôle de près ou de loin dans cet aboutissement. Merci Yannou, Ben, John, Miguel, Soufiyann, Jérémy, Vinnie, Julien, Adrien, Dudley, Alan, Louis, Famo, c'est aussi grâce à vous. Je souhaite bien évidemment remercier mes parents, ainsi que mes frères Kévin et Fabrice. Une pensée pour mon gars, Sassoit qui m'a soutenu à sa façon pendant ma rédaction. Enfin, je remercie ma chérie Madeleine. Merci pour ton amour, ton soutien et ta patience, surtout dans les derniers jours de rédaction. *In fine* j'aurai galéré comme tout le monde... Je n'ai pas de doute sur le fait que le meilleur reste à venir pour nous.

Abréviations et acronymes

| | |
|------------------------|---|
| [¹⁸ F]-FDG | ¹⁸ F-fluorodesoxyglucose |
| ACN | Acétonitrile |
| ACT | Activators |
| ADN | Acide DéoxyriboNucléique |
| AIE | Aggregated Induced Emission |
| ATP | Adénosine Tri-Phosphate |
| AM | Amplitude Modulation |
| BET | Back Electron Transfer |
| Bn | Benzyle |
| BHQ | Black Hole Quencher |
| BRET | Bioluminescence Resonance Energy Transfer |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CIEEL | Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence. |
| CI | Conversion Interne |
| CIS | Croisement Intersystème |
| CRET. | Chemiluminescence Resonance Energy Transfer |
| CT | Computerized Tomography |
| CTAB | Bromure de cétyltriméthylammonium |
| CTID | Charge Transfer Induced Decomposition |
| DCI | Dicyanoisophorone |
| DCM | 1,3-dichloro9,9-dimethyl-9H-acridin-2(7)-one |
| DBP | Dichlorométhane |
| DCDMH | Dicyanométhylène benzopyrane |
| DDAO | Dichlorodiméthylhydantoïne |
| DDQ | 2,3 Dicyano-5,6-Dichloro-1,4-benzoquinone |
| DIPEA | N, N-diisopropyléthylamine |
| DMF | Diméthylformamide |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- tetraacetic acid |
| DO3A | 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid |
| EDTA : | Éthylène Diamine Tétracétique |
| <i>e.g.</i> | par exemple |
| ESI | Electron Spray Ionisation |
| ESIPT | Excited-State Intramolecular Proton-Transfer |
| EtOH | Ethanol |
| eV | Electron Volt |
| FBS | Fetal Serum Bovine |
| FRET | Förster Resonance Energy Transfer |
| FM | Frequency Modulation |
| GEA | Groupe ElectroAttracteur |

| | |
|-------------|--|
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| HOMO | Highest Occupied Molecular Orbital |
| HRMS | High Resolution Mass Spectroscopy |
| <i>i.e.</i> | c'est-à-dire |
| ICT | Internal Charge Transfer |
| ILCT | Intra Ligand Charge |
| IR | Infra-rouge |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| LDA | Diisopropylamidure de lithium |
| LMCT | Ligand-Metal Charge Transfer |
| LOD | Limit of Detection |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LUMO | Lowest Unoccupied Molecular Orbital |
| MeOH | Méthanol |
| MLCT | Metal-Ligand Charge Transfer |
| MRS | Magnetic Resonance Spectroscopy |
| NAD(P)H | Nicotinamide adenine dinucleotide |
| NIS | N-Iodiosuccinimide |
| NQO1 | NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 |
| nm | Nanomètre |
| NTR | Nitroréductase |
| PABA | Alcool para-aminobenzyle |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PeT | Photo-induced Electron Transfer |
| PET | Positron Emission Tomography |
| PS | Photosensibilisateur |
| QD's | Quantum Dots |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| RP-HPLC | Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography |
| RV | Relaxation Vibrationnelle |
| s | Seconde |
| SPECT | Single-Photon Emission Computed Tomography |
| TBAF | Fluorure de tétrabutylammonium |
| TBDMS | Tert-butyldiméthylsilyl |
| TBET | Through Bond Energy Transfer |
| TDM | Tomodensitométrie |
| TEAB | Triéthylammonium bicarbonate |
| TEMP | Tomographie par Emission Mono-Photonique |
| TEP | Tomographie par Emission de Positons |
| TFA | Acide trifluoroacétique |

| | |
|-----------------------|--|
| THF | Tétrahydrofurane |
| TICT | Twisted Internal Charge Transfer |
| TMS | Trimethylsilyl |
| UHPLC: | Ultra High Performance Liquid Chromatography |
| UHPLC-MS | Ultra High Performance Liquid Chromatography -Mass |
| UV : | Spectrum Ultraviolet |
| Φ_{CL} | Rendement quantique de chimiluminescence |
| Φ_{BL} | Rendement quantique de bioluminescence |
| Φ_{PL} | Rendement quantique de photoluminescence |
| Φ_F | Rendement quantique de fluorescence |
| Φ_S | Rendement quantique de chimiexcitation |
| ϵ | Coefficient d'extinction molaire |
| λ_{max}^{abs} | Longueur d'onde d'absorption maximale |
| λ_{max}^{BL} | Longueur d'onde de bioluminescence maximale |
| λ_{max}^{PL} | Longueur d'onde de fluorescence maximale |
| λ_{max}^{CL} | Longueur d'onde de photoluminescence maximale |
| λ_{exc} | Longueur d'onde d'excitation |
| ν | Fréquence |
| τ | Temps de vie de luminescence |
| $t_{1/2}'$ | Temps de demi vie du dioxétane |
| $t_{1/2}$ | Temps de demi vie de chimiluminescence |

| | |
|---|----------|
| INTRODUCTION : LUMINESCENCE ET IMAGERIE MOLECULAIRE..... | 4 |
| I. La Luminescence. | 4 |
| 1. Lumière et Luminescence..... | 4 |
| 1.1 La lumière..... | 4 |
| 1.2 La luminescence. | 5 |
| II. Photoluminescence : principe et généralités sur les processus connus.”..... | 7 |
| 1.1 Généralités et processus..... | 7 |
| 1.2 Interactions des états excités et effets environnementaux. | 10 |
| III. Introduction à la Chimiluminescence :..... | 18 |
| 1.1 Généralités : | 18 |
| 1.2 La bioluminescence. | 19 |
| 1.3 Les mécanismes de chimiluminescence du motif 1,2 dioxétane..... | 21 |
| 1.4 Les sondes bioluminescentes..... | 25 |
| 1.5 Les sondes chimiluminescentes : | 28 |
| IV. L'imagerie moléculaire dans le domaine médical. | 33 |
| 1. Généralités. | 33 |
| 2. Description des différentes techniques d'imagerie moléculaire. | 34 |
| 3. L'imagerie optique | 36 |
| V. Introduction au projet de thèse..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT DE SONDES CHIMILUMINESCENTES FONCTIONNALISEES PAR UN COMPLEXE DE LANTHANIDE POUR LA DETECTION DANS LE PROCHE IR DE LA NITROREDUCTASE. | 39 |
| I. État de l'art. | 39 |
| 1. Elaboration d'une sonde 1,2-dioxétane de type Schaap. | 39 |
| 1.1 Synthèse du motif 1,2-dioxétane. | 39 |
| 1.2 Sélection des groupements stabilisants. | 40 |
| 1.3 Travaux du Prof. M Matsumoto : synthèse et développement de nouveaux chimiluminophores de type 1,2-dioxetane. | 41 |
| 1.4 Travaux du Prof A.P. Schaap : Précurseur des sondes chimiluminescentes à visé biologique. .. | 47 |
| 2. Utilisation des Lanthanides en chémobiologie..... | 51 |
| 2.1 Généralités. | 51 |
| 2.2 Des propriétés spectroscopiques singulières. | 51 |
| 2.3 Exemple de sonde biologique basée sur des complexes de lanthanide. | 55 |
| 2.4 Utilisation de complexes de lanthanide pour la chimiluminescence..... | 56 |
| 3. Les sondes luminescentes pour la détection d'activité enzymatique. | 57 |
| 3.1 Brève introduction à la détection d'activité enzymatique. | 57 |
| 3.2 Des sondes fluorescentes pour la détection de l'activité enzymatique. | 58 |
| 4. Présentation des travaux antérieur au laboratoire. | 61 |
| 4.1 Synthèse et évaluation d'une sonde chimiluminescente pour la détection de la Caspase-3. | 62 |
| 4.2 Synthèse d'une sonde chimiluminescente à plateforme de type phénol fonctionnalisée par un complexe de lanthanide | 63 |
| II. Résultats et Discussion. | 65 |
| 1. Présentation de la voie de synthèse de la plateforme chimiluminescente..... | 65 |
| 2. Synthèse de l'intermédiaire clé. | 68 |
| 3. Introduction du complexe de lanthanide sur la plateforme chimiluminescente | 69 |
| 3.1 Insertion d'un groupement fonctionnel et du motif de reconnaissance sur la plateforme chimiluminescente..... | 70 |
| 3.2 Accroche du ligand DO3A. | 71 |
| 3.3 Formation du cycle 1,2-dioxetane..... | 75 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.4 | Synthèse des espèces émissives des chimiluminophore. | 76 |
| 4. | Etude du déclenchement de chimiluminescence..... | 77 |
| 4.1 | Déclenchement enzymatique et étude des propriétés spectroscopiques du chimiluminophore. 77 | |
| 5. | Conclusion et perspectives..... | 81 |

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES SONDAS CHIMILUMINESCENTES

FONCTIONNALISEES PAR UN FLUOROPHORE : 85

| | | |
|-----|---|-----|
| I. | Etat de l'art : | 85 |
| 1. | Stratégies pour la conception de sondes chimiluminescentes applicables à l'imagerie in vivo..... | 85 |
| 1.1 | Première stratégie : décalage de l'émission <i>via</i> un transfert d'énergie à travers l'espace. | 85 |
| 1.2 | Deuxième stratégie : Extension du système π -conjugué de la plateforme phénol 1,2-dioxétane. 86 | |
| 1.3 | Troisième stratégie : décalage de l'émission <i>via</i> un transfert d'énergie à travers les liaisons. ... | 90 |
| 1.4 | Dernière stratégie : Conception d'un « fluorophore chimiluminescent ». | 92 |
| 2. | Exemple d'application de sondes chimiluminescentes 1,2-dioxétane..... | 93 |
| 3. | Les fluorophores. | 98 |
| 3.1 | Généralités. | 98 |
| 3.2 | Les Bodipy. | 100 |
| 3.3 | Les systèmes push-pull dérivés du dicyanométhylène (DCM). | 101 |
| 4. | Présentation des travaux antérieurs au sein du laboratoire. | 103 |
| 4.1 | Synthèse d'une coumarine chimiluminescente par insertion du motif dioxétane. | 103 |
| 4.2 | Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR <i>via</i> une cassette chimiluminescente à transfert d'énergie « TBET » phénolique. | 104 |
| 4.3 | Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR <i>via</i> une cassette chimiluminescente à transfert d'énergie « TBET » naphtolique. | 105 |
| II. | Résultats et Discussion. | 108 |
| 1. | Présentation des molécules cibles et des objectifs. | 108 |
| 2. | Synthèse de cassettes TBET chimiluminescentes via l'insertion d'une triple liaison..... | 109 |
| 2.1 | Présentation des différentes stratégies de synthèse. | 109 |
| 2.2 | Première stratégie : introduction de l'acétylène sur la plateforme. | 110 |
| 2.3 | Deuxième stratégie : introduction de l'acétylène sur le fluorophore..... | 111 |
| 3. | Condensation d'un Bodipy en position ortho du phénol..... | 116 |
| 4. | Synthèse de chimiluminophores avec une extension du système π -conjugué. | 118 |
| 4.1 | Présentation de la stratégie de synthèse. | 118 |
| 5. | Caractérisations photophysiques. | 120 |
| 5.1 | Déclenchements chimiluminescents..... | 120 |
| 5.2 | Photoluminescence et Chimiluminescence, corrélation entre le chimiluminophore et son espèce émissives. | 126 |
| 5.3 | Déclenchement thermique de la chimiluminescence. « Thermochemiluminescence ». | 128 |
| 6. | Conclusion et perspectives..... | 129 |

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....132

| | | |
|----|--|-----|
| 1. | Projet n°1 : Fonctionnalisation de la sonde de Schaap par un complexe de lanthanide. | 132 |
| 2. | Projet n°2 : Synthèse de cassette chimiluminescente de type TBET..... | 134 |
| 3. | Projet n°3 : Synthèse de chimiluminophore <i>via</i> une extension du système π -conjugué du cœur phénolique. | 135 |
| 4. | Un nouvel axe de recherche ? | 136 |

EXPERIMENTAL PART.....139

| | | |
|----|---------------|-----|
| 1. | General. | 139 |
|----|---------------|-----|

| | | |
|-----|--|-----|
| 1.1 | General information..... | 139 |
| 1.2 | Instruments and Methods..... | 139 |
| 1.3 | Purification and Analytical HPLC System..... | 140 |
| 2. | Synthesis..... | 142 |

Introduction : Luminescence et imagerie moléculaire.

I. La Luminescence.

1. *Lumière et Luminescence.*

1.1 La lumière.

La lumière est un phénomène fondamental dans l'apparition de la vie telle que nous la connaissons sur Terre. Elle fournit l'énergie aux végétaux ou aux bactéries effectuant la photosynthèse. Ces végétaux sont à la base de la chaîne énergétique étant donné qu'ils permettent la redistribution de l'énergie, *via* la synthèse chimique des sucres, aux organismes dépourvus de capacités photosynthétiques. Cette particularité a toujours fasciné nos ancêtres, puisque le soleil, en tant que première source de lumière, a été divinisé dans de nombreuses cultures. Datée aux alentours de 1000 avant J.-C., la stèle égyptienne de la dame Tapéret est l'une des premières descriptions picturales de la lumière (Figure 1). Elle représente Tapéret recevant les rayons du soleil de la tête du dieu Osiris, représentés par des fleurs de toutes les couleurs véhiculant une image corpusculaire de la lumière. On peut également noter que les fleurs sont de couleurs différentes, évoquant la dissociation du spectre visible de la lumière.

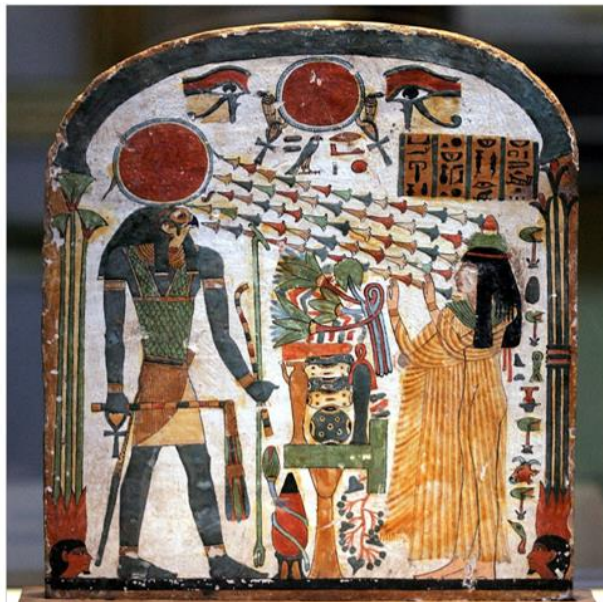


Figure 1: Stèle de la Dame Tapéret, exposée au musée du Louvre.

Dès l'origine de l'humanité, la lumière n'a cessé d'intriguer. Source de religion ou de curiosité, elle est à la base de nombreux mythes. En Europe, des philosophes grecs spéculaient sur la nature de la lumière, sa vitesse ou la manière dont elle se propage. Ibn al-Haytam, homme de science de l'empire arabo-musulman durant le 10^{ème} siècle, commencera à appréhender les premières propriétés de la lumière dans son *Traité d'Optique*. Au 17^{ème} siècle, les premières théories jetant les bases de notre compréhension contemporaine ont été élaborées. Pour Huyghens (1629–1695), la lumière serait une onde qui se propage de façon comparable aux ondes sonores. Parallèlement, Newton (1642-1727) soutient la thèse de la nature corpusculaire de la lumière sans argument solide. Il mettra à mal la théorie de Huyghens par son *aura*. La théorie ondulatoire sera donc ignorée par le consensus scientifique

dominant du 18^{ème} siècle. Les différents travaux de Young (1743-1829) et Fresnel (1788-1827) remettent en évidence le caractère ondulatoire de la lumière. Puis le mathématicien Maxwell déduit, de ses 20 années de travaux sur l'électricité, quatre équations différentielles prédisant l'existence d'une onde associée aux oscillations des champs électrique et magnétique. Une des solutions de ces équations postule que la vitesse de ces ondes, appelées alors ondes électromagnétiques, est de 300 000 km.s⁻¹. À l'époque, la vitesse de la lumière avait été estimée dans ces ordres de grandeur. Ses travaux seront confirmés expérimentalement par Hertz (1857-1894). Ainsi, une nouvelle étape est franchie dans la compréhension de la lumière « visible » qui n'est qu'une partie du vaste spectre des ondes électromagnétiques (Figure 2).

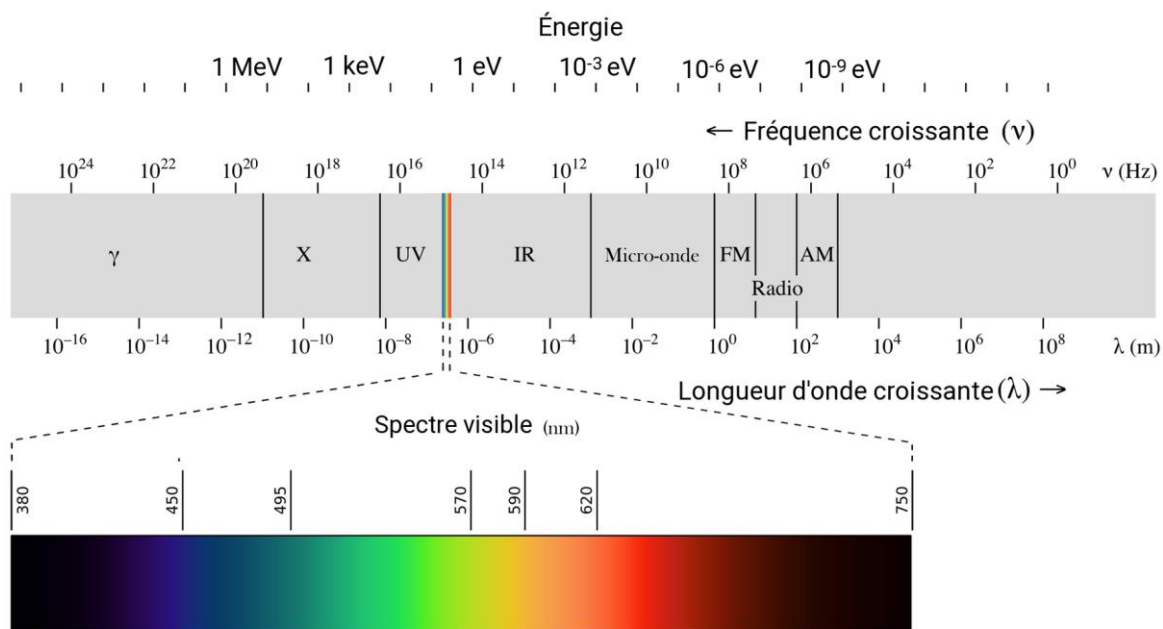


Figure 2: Spectre des ondes électromagnétiques (figure adaptée).¹

Aux débuts du 20^{ème} siècle, Max Planck jeta les fondations de la théorie du quanta venant bousculer plusieurs idées reçues en physique classique. Il démontra que l'énergie lumineuse ne s'échange pas de façon continue, mais par paquets d'énergie appelés *quanta* d'énergie $E = h\nu$ (ν : fréquence de rayonnement ; h constante de Planck, $h = 6.626.10^{-34}$ J. s⁻¹), appelés plus tard photons. En l'état, la lumière est définie comme une onde électromagnétique transportant des photons dont l'énergie est proportionnelle à la fréquence. Cette dualité onde-corpuscule reste toujours un mystère et un défi pour les physiciens contemporains spécialistes de la mécanique quantique.

1.2 La luminescence.

Le terme de luminescence a été introduit par Eilhart Wiedemann en 1888 pour définir l'émission dite de « lumière froide », à distinguer de l'émission de lumière issue d'une source chaude (feu de bois, soleil etc...). La luminescence s'oppose donc à l'incandescence, phénomène désignant l'émission de lumière par un corps chauffé à haute température (*e.g.* ampoule à filament de tungstène). Au milieu du 19^{ème} siècle, la luminescence a donc été définie comme étant le résultat d'un apport énergétique menant des atomes ou des molécules dans un état excité. Cet état énergétiquement supérieur est transitoire,

¹ Figure de Philip Ronan extraite sur <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=67848114>

puisque l'espèce excitée retourne à son état « énergétique d'équilibre », appelé rigoureusement état fondamental, ce retour à l'état fondamental s'accompagnant d'une émission lumineuse (Figure 3).

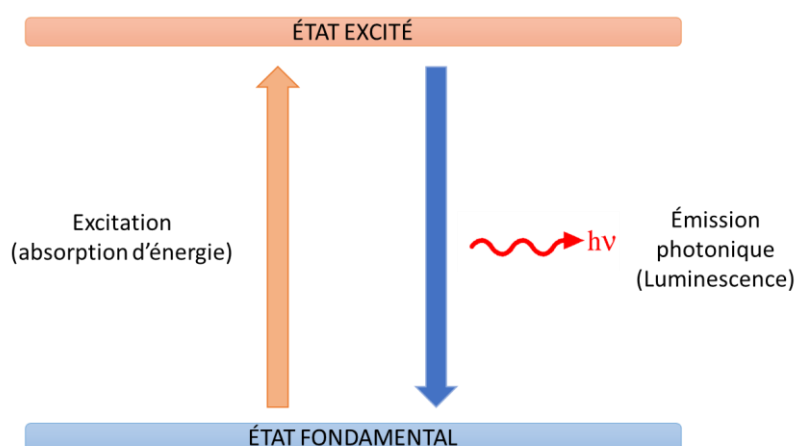


Figure 3 Représentation schématique du phénomène de luminescence.

L'intérêt pour la luminescence a permis de classer les différentes espèces luminescentes selon leur composition :

- *Les composés organiques* : composés aromatiques (naphtalène, anthracène, phénanthrène pyrène, pérylène, ...), fluorescéine, rhodamine, coumarine oxazines, etc.
- *Les composés inorganiques* : ion uranyle (UO_2^+), surfaces dopées avec divers éléments métalliques (Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, ...), nanocristaux (ou Quantum Dots (QD's) à base de ZnS, CdS, ZnSe, CdSe, GaS, ...), etc.
- *Les complexes de coordination* : complexes de métaux de transition (Ru, Os, Ir, Pt, ...) complexes de lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), etc.
- *Les protéines*

La source énergétique externe peut varier, ce qui permet de définir des types de luminescence selon le mode d'excitation impliqué (Tableau 1).

| Mode d'excitation | Types de luminescence |
|--|-----------------------|
| Photonique (domaine UV) | Photoluminescence |
| Photonique (Domaine RX rayons γ) et Rayonnement α β | Radioluminescence |
| Réaction chimique | Chimiluminescence |
| Réaction biochimique | Bioluminescence |
| Champ électrique | Electroluminescence |
| Ultrasons | Sonoluminescence |
| Frottement, rupture, déformation | Triboluminescence |

Tableau 1 Les différents types de luminescence.

Aujourd'hui le phénomène le plus couramment rencontré dans la vie de tous les jours est sans aucun doute l'électroluminescence. Ce dernier est à l'origine du développement de la majorité des écrans ou affichages électroniques qui nous entourent. Il s'en suit la photoluminescence utilisée dans le domaine

de l'éclairage (lampes fluocompactes), mais également dans le domaine de l'imagerie biomédicale dont nous introduirons les grands concepts dans la suite de ce manuscrit.

II. Photoluminescence : principe et généralités sur les processus connus.^{2,3,4}

1.1 Généralités et processus.

Comme son nom l'indique, la photoluminescence décrit un processus luminescent où l'apport énergétique initial est photonique *via* le processus d'absorption de photon par la matière. Cet excès d'énergie pourra être dissipé par relaxation radiative, c'est-à-dire par l'émission d'un photon. La fluorescence et la phosphorescence sont des cas particuliers de la photoluminescence, leur différence fondamentale résidant dans l'état de spin des états excités mis en jeu. Dans un premier temps nous décrivons le diagramme de Perrin-Jablonski, ainsi que les échelles de temps en photophysique. Puis nous dresserons une liste des principales caractéristiques mesurables des composés luminescents. Enfin nous discuterons en surface certains processus clés jouant un rôle non négligeable sur le devenir des états excités.

1.1.1. Diagramme de Perrin Jablonski.

Le diagramme de Perrin Jablonski est une représentation des différents niveaux d'énergie électroniques ainsi que leurs sous-niveaux vibrationnels (Figure 4). De plus, les différentes transitions radiatives et non radiatives possibles y sont également indiquées. En somme, ce diagramme permet de rationaliser le comportement de la plupart des composés organiques photoluminescents.

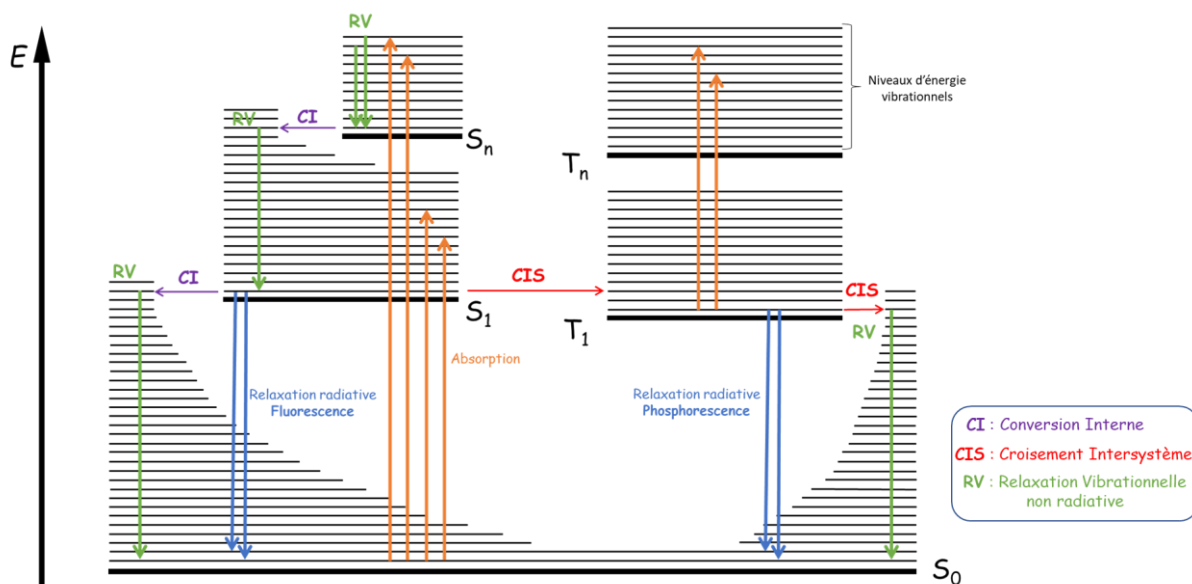


Figure 4 Diagramme de Perrin-Jablonski.

Lorsqu'un photon est absorbé par une molécule, il permet à cette dernière de réaliser une transition électronique. Cette transition permet à un électron de la couche externe de la molécule de passer de

2 Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Wiley-VCH, 2012

3 Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck & Larcier.; 2004

4 Delaire, J.; Piard, J.; Méallet-Renault, R.; Clavier, G. *Photophysique et photochimie*, edp scienc.

l'état fondamental singulet S_0 à un état plus haut en énergie S_n . On parle donc de la transition $S_0 \rightarrow S_n$. Il s'ensuit alors une conversion interne suivie d'une rapide relaxation vibrationnelle vers l'état S_1 pseudo-stable dans le temps (temps de vie de l'ordre de $\approx 10^{-8}$ s) au regard des ordres de grandeur cinétique de la conversion interne ($\approx 10^{-12}$ s) et de la relaxation vibrationnelle (processus plus rapide encore que la conversion interne). C'est donc en général à partir de cet état excité commun que l'espèce peut subir un ou différents processus menant à sa désexcitation :

Transitions non radiatives :

Conversion interne : permet la transition isoénergétique entre deux états électroniques de même spin. Il permet la transition $S_n \rightarrow S_1$ et la transition $S_1 \rightarrow S_0$. On parle également de couplage vibronique signifiant le recouvrement de deux niveaux vibrationnels entre deux états d'énergie distincte.

Relaxation vibrationnelle : Processus de dissipation d'énergie très rapide. Combiné au phénomène de conversion interne, découle la règle de Kasha stipulant que l'émission d'un fluorophore se produit toujours à l'état excité le plus bas en énergie (S_1 ou T_1) indépendamment des états d'énergie peuplés lors de l'absorption du photon.

Croisement intersystème : permet la transition isoénergétique entre deux états électroniques de spin différents. Les règles de sélection pour les transitions électroniques ne permettent pas les transitions entre les états électroniques de multiplicités de spin différents. Cet interdit peut être levé par un couplage spin-orbite entre les états électroniques. Ce couplage est favorisé par la présence d'atomes lourds (Br, I, Pb ...). Ainsi, les molécules contenant des atomes lourds auront une plus grande probabilité de subir un croisement intersystème. De plus, ce passage est favorisé par la proximité des niveaux S_1 et T_1 .

Les transitions non radiatives contribuent dans de nombreux cas à l'extinction de la luminescence, par anglicisme on parle également de « quenching » de luminescence.

Transitions radiatives :

La fluorescence : est une relaxation radiative $S_1 \rightarrow S_0$, ou transition radiative. À l'état S_1 , la fluorescence est en compétition avec la conversion interne et le croisement intersystème. Son temps de vie est généralement de l'ordre de la nanoseconde.

La fluorescence retardée : est également une transition radiative avec un temps de vie supérieur à celui de la fluorescence classique. L'existence de processus permettant la repopulation de l'état S_1 via l'état T_1 conduit à une émission ayant les caractéristiques spectrales de la fluorescence mais une durée de vie beaucoup plus longue. Ainsi, on peut distinguer la fluorescence retardée de type E, qui est issue d'un croisement intersystème en retour (transition $T_1 \rightarrow S_1$), et celle de type P issue de l'interaction intermoléculaire d'états excités triplet promouvant un état singulet excité.

La phosphorescence : correspond à l'émission d'un photon à partir de l'état T_1 (transition $T_1 \rightarrow S_0$). Elle est plus difficile à observer que la fluorescence du fait des difficultés de peupler l'état T. Par ailleurs, la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est interdite par la règle de spin ce qui rend le processus plus long et moins favorisé. Enfin, l'état T_1 est soumis à un plus grand nombre de voies de désexcitation comme l'annihilation triplet-triplet.

1.1.2. Echelle de temps en photophysique.

Pour mieux comprendre les processus à l'œuvre lors de phénomènes photophysique ou photochimique, il est nécessaire d'avoir en tête les ordres de grandeur des cinétiques des différents processus possibles. La Figure 5 résume les différentes échelles de temps en photophysique/photochimie. Par exemple, on peut constater que les transitions électroniques sont 1000 fois plus rapides que la solvation d'une molécule, ces différences permettant aux photophysiciens d'expliquer et de mieux caractériser certains processus particuliers.

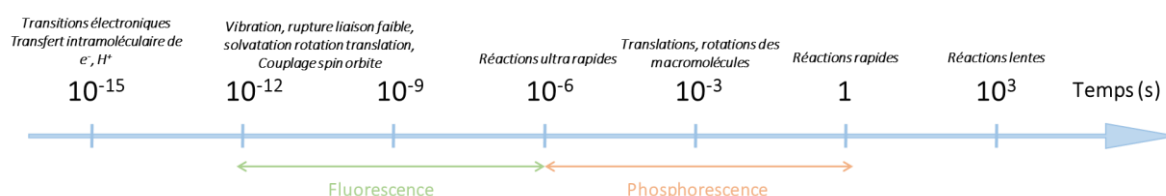


Figure 5 Échelle de temps en photophysique/photochimie.

1.1.3. Propriétés et caractéristiques photophysiques des composés luminescents.

Avant de pouvoir utiliser un luminophore dans un milieu complexe, que ce soit dans le domaine de l'imagerie médicale ou celui des matériaux, il convient de caractériser rigoureusement les molécules étudiées. Les données acquises (rendement quantique, maxima d'absorption et d'émission, coefficient d'absorption molaire, etc.) permettent de rationaliser l'utilisation du luminophore par la suite.

Le rendement quantique de fluorescence, noté Φ_F , correspond au rapport du nombre de photons émis sur le nombre de molécules dans l'état excité S_1 qui retournent à l'état fondamental S_0 . C'est un paramètre qui permet de quantifier rigoureusement l'efficacité d'émission d'un fluorophore. Dans le cas de la photoluminescence, il est évalué en comparant la quantité de photons émis, par rapport à la quantité de photons absorbés.

$$\Phi_{PL} = \frac{n_{\text{photons émis}}}{n_{\text{molécules excitées}}} = \frac{n_{\text{photons émis}}}{n_{\text{photons absorbés}}}$$

Équation 1.

Le coefficient d'absorption molaire (ϵ), également appelé coefficient d'extinction molaire, traduit l'efficacité avec laquelle l'espèce absorbe la lumière. Il est relié à l'absorbance A dans la loi de Beer-Lambert (Équation 2), l étant la longueur du trajet optique en cm, et C la concentration de l'échantillon en mol par litre. Le coefficient d'absorption molaire dépend de la température et de la longueur d'onde λ .

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Équation 2 Loi de Beer Lambert.

La brillance est définie comme le produit du rendement quantique de fluorescence et du coefficient d'absorption molaire (Équation 3). C'est un paramètre clé pour comparer les sondes luminescentes appliquées à la bioimagerie puisqu'il rend compte de l'efficacité d'un photoluminophore à absorber et restituer la lumière.

$$B = \varepsilon \cdot \Phi_{PL}$$

Équation 3 La brillance.

Le déplacement de Stokes correspond à la différence d'énergie entre les maximums d'absorption et d'émission, donc dans le cas de la photoluminescence, il s'agit de la différence entre l'énergie du photon incident et celle de celui qui est émis. Cette différence est fondamentalement expliquée par la perte d'énergie à l'état excité par conversion interne (transitions $S_n \rightarrow S_1$) et par relaxation vibrationnelle à l'état S_1 ou S_0 (après émission). Ce paramètre permet de rendre compte de la différence de géométrie entre l'état fondamental et les états excités ce qui permettra de donner des clés de compréhension pour certains phénomènes comme le transfert de charge photoinduit. Dans notre champ applicatif, la bioimagerie, le déplacement de Stokes est un paramètre à ne pas négliger. En effet, une valeur faible du déplacement de Stokes peut être responsable de phénomènes d'auto-extinction. Dans le cas d'une forte concentration de fluorophore, il est possible d'observer une réabsorption diminuant l'efficacité de la sonde photoluminescente. De plus, dans le cadre de l'imagerie par fluorescence, un faible déplacement de Stokes peut contraindre à effectuer certains compromis entre le canal de détection et la longueur d'onde d'excitation utilisée. Par exemple, un élargissement spectral du canal de détection pour enregistrer une gamme spectrale plus large obligera l'expérimentateur à utiliser une longueur d'onde d'excitation moins optimale, et vice et versa.

Le temps de vie de luminescence (τ), peut être intuitivement expliqué par le temps pendant lequel l'émission d'un composé est observable. Ce paramètre est lié au temps de vie moyen des états excités S_1 . Il est traduit algébriquement, dans le cas de la fluorescence, par l'inverse de la somme de la constante de vitesse de la désexcitation radiative (k_r) et la constante de vitesse pour tous les autres chemins de désexcitation non radiative (k_{nr}) (Équation 4).

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Équation 4 Le temps de vie de fluorescence.

Ainsi, dans le cadre de l'imagerie optique, le temps de vie est un paramètre assez important, d'une part puisqu'il permet de calibrer la détection du signal, d'autre part car il permet dans le cas d'un temps de vie « long » (au regard du temps de vie classique de la fluorescence $\approx 10^{-9}$ s) d'augmenter le rapport signal sur bruit en s'affranchissant d'un phénomène comme l'auto-fluorescence des tissus biologiques.

1.2 Interactions des états excités et effets environnementaux.

La luminescence est influencée par l'environnement de la substance luminescente. Cette caractéristique est l'un des points clefs de l'utilisation de l'imagerie par fluorescence. La conception d'une grande majorité des sondes est fondée sur la sensibilité du fluorophore à différents paramètres comme le pH, la polarité du solvant, la viscosité ... Lorsque la sensibilité d'un biomarqueur luminescent vis-à-vis d'un ou plusieurs paramètres est établie *in vitro*, il est alors possible de l'utiliser dans le cadre d'étude biologique. Dans cette sous-partie, nous allons décrire certains paramètres influençant la luminescence. La rationalisation de ces phénomènes permet aux chimistes travaillant à l'interface de la chimie et du vivant de les utiliser pour moduler les propriétés des futures sondes luminescentes.

1.2.1. Transfert de charge photoinduit.

Le phénomène de transfert de charge photoinduit (ou ICT pour « Internal Charge Transfer » en anglais) est généralement observé pour des systèmes dit « push-pull », c'est-à-dire des systèmes moléculaires conjugués comprenant un groupement électrodonneur (aniline, phénol...) ainsi qu'un groupement électroattracteur (carbonyle, nitrile...). Ces molécules possèdent donc un fort moment dipolaire, qui augmente lors du transfert de charge photoinduit. Dans un milieu suffisamment fluide, une réorganisation de la sphère de solvation a lieu pendant la durée de vie de l'état S_1 , stabilisant plus ou moins ce dernier. On parle alors d'état de transfert de charge. Cette stabilisation est proportionnelle à la polarité du solvant utilisé, provoquant un déplacement bathochrome du spectre de fluorescence (décalage des longueurs d'onde vers le rouge) et l'on parle alors de solvatochromisme (Figure 6).

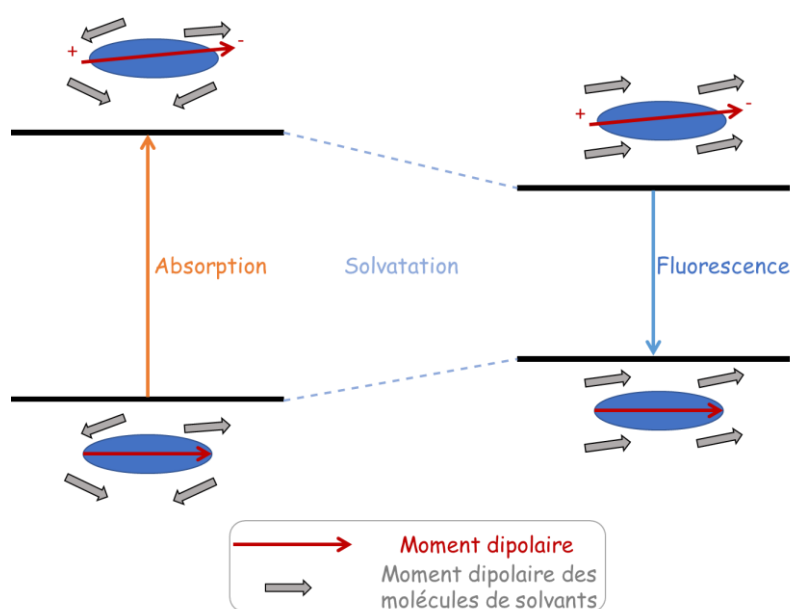


Figure 6 Influence de la polarité du solvant sur les états fondamental et excité lors de l'absorption et de la fluorescence.

La conception de certaines sondes fluorescentes capables de détecter des cations métalliques est basée sur la modulation de ce caractère. Dans cet exemple rapporté par le groupe de Tsien *et al*^{5,6}, la partie électrodonneuse de la molécule **1** (Figure 7) a la capacité d'interagir avec des cations, plus spécifiquement avec les cations calcium, en le chélatant à l'aide d'un ligand. Ce ligand polyaminocarboxylate est directement lié au fluorophore possédant un caractère de transfert de charge. Lorsque le calcium est chélaté, l'azote positionné sur le fluorophore voit son doublet non liant, impliqué dans le mécanisme d'ICT, prendre part à cette chélation, diminuant ainsi sa densité électronique et donc sa contribution au mécanisme d'ICT. Cela se traduit par un déplacement hypsochrome (décalage des longueurs d'onde vers le bleu) des longueurs d'onde d'émission. Le même procédé peut être utilisé en favorisant l'interaction d'analyte cible au groupement électroattracteur, provoquant ainsi un déplacement bathochrome du spectre d'émission.⁷

5 Tsien, R. Y. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci* **1988**, *11* (10), 419-424

6 Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **1985**, *260* (6), 3440-3450

7 Komatsu, H.; Miki, T.; Citterio, D.; Kubota, T.; Shindo, Y.; Kitamura, Y.; Oka, K.; Suzuki, K. Single molecular multianalyte (Ca^{2+} , Mg^{2+}) fluorescent probe and applications to bioimaging. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (31), 10798-10799

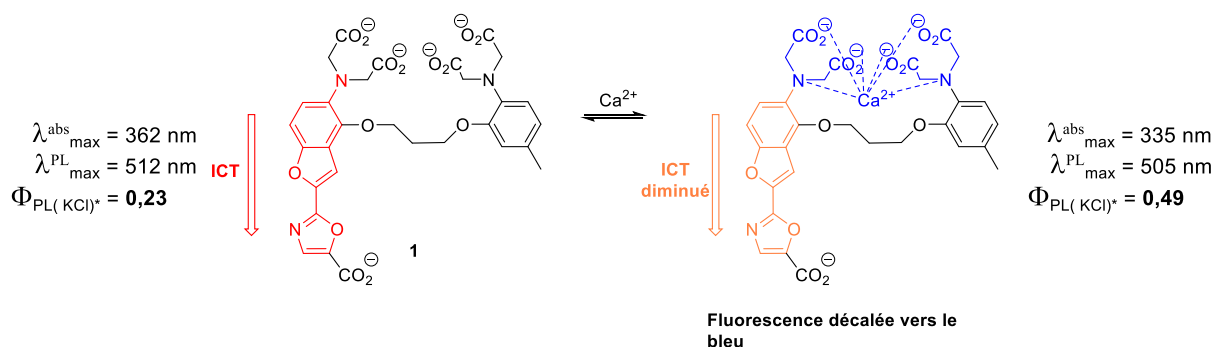


Figure 7 Sonde basée sur le phénomène d'ICT.^{5,6}

Outre la capacité de pouvoir détecter la présence d'ions calcium, ce type de design permet la mise au point de sondes ratiométriques,⁸ permettant de quantifier la présence de l'analyte dans un milieu complexe. Cela est particulièrement intéressant pour la détection de métaux lourds.⁹

1.2.2. Transfert d'énergie.

Lorsqu'une molécule atteint un état excité « pseudo stationnaire », elle a la possibilité de transférer cette énergie pour retourner à l'état fondamental. On distingue trois types de mécanisme de transfert d'énergie :

Le transfert d'énergie radiatif : correspondant simplement à une émission d'un photon par un donneur (D) absorbé par un accepteur (A). Ce mécanisme est très intuitif et se caractérise expérimentalement, lorsqu'un échantillon est trop concentré, par une diminution de l'intensité de fluorescence dans les régions où l'absorbance de l'accepteur recouvre la fluorescence du donneur. C'est un effet de filtre interne.

Le transfert d'énergie non radiatif de type Förster : ou FRET (pour « Förster Resonance Energy Transfer ») résulte d'un processus résonnant entre une molécule excitée donneuse et un accepteur. Ce transfert d'énergie ne peut avoir lieu que s'il y a un couplage entre les transitions vibroniques du donneur et les transitions vibroniques de l'accepteur (Figure 8). Le couplage de ces transitions se traduit expérimentalement par un recouvrement du spectre d'émission du donneur avec le spectre d'absorption de l'accepteur. Remarquons que ce transfert non radiatif, bien qu'iso-énergétique, est irréversible du fait de la rapide relaxation vibrationnelle qui suit.

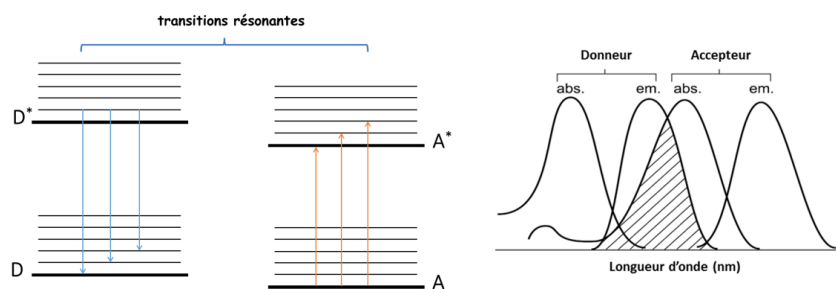


Figure 8 Représentation schématique du FRET.

⁸ Maruyama, S.; Kikuchi, K.; Hirano, T.; Urano, Y.; Nagano, T. A novel, cell-permeable, fluorescent probe for ratiometric imaging of zinc ion. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (36), 10650-10651

⁹ Chen, S. Y.; Li, Z.; Li, K.; Yu, X. Q. Small molecular fluorescent probes for the detection of lead, cadmium and mercury ions. *Coord Chem Rev* **2021**, *429*, 213691

L'efficacité du FRET dépend également de la distance du couple donneur-accepteur. Au-delà de 10 nanomètres, le mécanisme devient inopérant. De plus, l'orientation des moments dipolaires du couple donneur-accepteur affecte également l'efficacité du transfert d'énergie. Ces propriétés permettront de rationaliser plusieurs approches pour la conception de sonde FRET. La détection d'enzyme de la classe des hydrolases a pu être développée en utilisant un couple donneur-accepteur lié par une chaîne clivable substrat d'une enzyme cible (par exemple peptidique si l'enzyme est une protéase).¹⁰ Dans ce cas, le FRET est utilisé pour éteindre la fluorescence. Cela peut être réalisé par l'utilisation d'un quencher, ou en s'assurant que les deux fluorophores s'éteignent mutuellement (par effet de filtre interne si les fluorophores sont très proches spatialement). Lorsque l'enzyme rencontre la sonde, la chaîne clivable est alors rompue et l'éloignement des fluorophores provoque une exaltation de fluorescence. S. G. Withers *et al.*¹¹ ont décrit une sonde de type FRET pour une détection multi-cible enzymatique (Figure 8). Cette sonde **2** est composée d'une coumarine (D) et d'un bodipy (A) liés par une structure mimant celle des gangliosides GM3 impliqués dans la transduction de signal cellulaire. Le principe est le même que rapporté en amont : à t_0 lors d'une excitation à 313 nm, le FRET a lieu entre la coumarine et le bodipy et l'on observe donc la fluorescence de ce dernier (fluorescence verte). Lorsqu'une enzyme clive le motif ganglioside, les deux fluorophores diffusent, le FRET n'est plus effectif et l'émission de la coumarine est observée (fluorescence bleue).

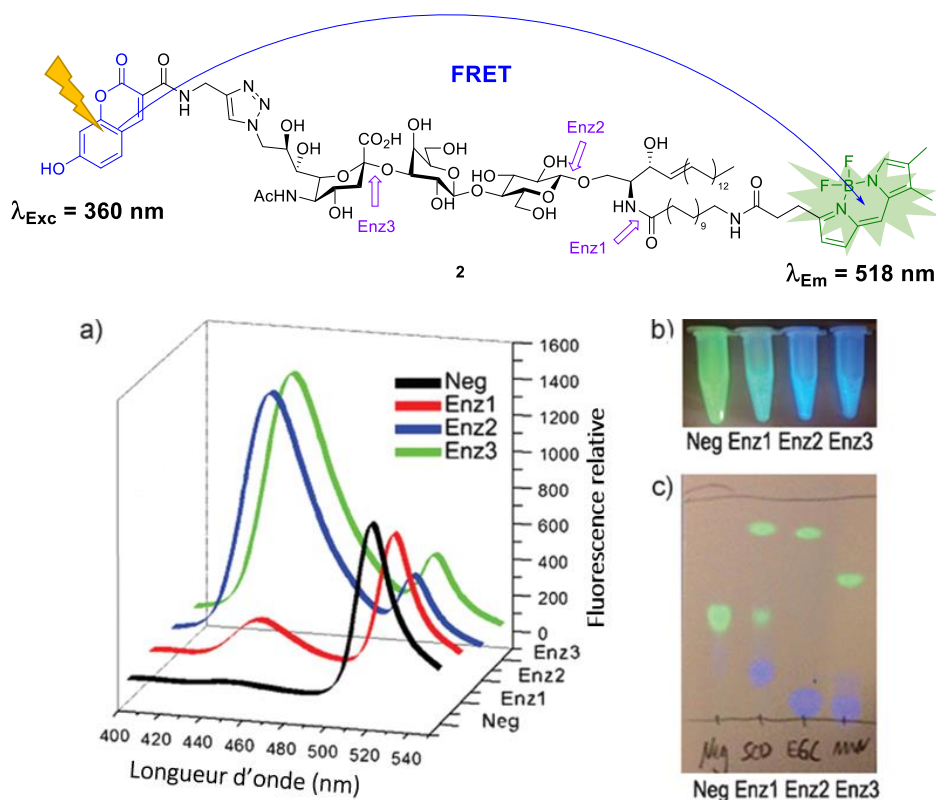


Figure 9 Sonde **2** a) Spectres d'émission enregistrés avant et après la détection de l'Enz1, 2 ou 3 b) Détection visuelle sous irradiation UV c) Mise en perspective des différentes coupures enzymatiques sur plaque CCM avec révélation UV (figure adaptée).¹¹

10 Chevalier, A.; Massif, C.; Renard, P. Y.; Romieu, A. Bioconjugatable azo-based dark-quencher dyes: Synthesis and application to protease-activatable far-red fluorescent probes. *Chem - A Eur J* **2013**, *19* (5), 1686-1699

11 Yang, G.-Y.; Li, C.; Fischer, M.; Cairo, C. W.; Feng, Y.; Withers, S. G. A FRET Probe for Cell-Based Imaging of Ganglioside-Processing Enzyme Activity and High-Throughput Screening. *Angew Chemie* **2015**, *127* (18), 5479-5483

D'autres approches ont pu être rationalisées, et on peut noter que dans le cadre de l'imagerie médicale, le FRET est un moyen simple d'obtenir un plus grand déplacement de Stokes apparent.

Le *transfert non radiatif de type Dexter* ou TBET (pour « Through Bond Energy Transfer ») est similaire au FRET du fait de son caractère non radiatif. Il fonctionne donc également avec un couple donneur-accepteur, en revanche il implique un recouvrement orbitalaire entre le donneur et l'accepteur (par liaison covalente ou collision) pour effectuer le transfert d'énergie, ce qui l'exempte du recouvrement spectral nécessaire dans le cas du FRET. C'est donc un transfert d'énergie à courte distance. D'un point de vue structural, ce type de transfert est donc souvent favorisé lorsqu'il existe une conjugaison entre deux chromophores distincts. Ces deux transferts peuvent être en compétition sur une même molécule, et sont caractérisables par leur cinétique. Un transfert d'énergie à travers l'espace sera plus lent, permettant de dissocier les deux phénomènes par des mesures d'absorption transitoire. Dans le cadre de l'imagerie biomédical, il faut souligner la faible hydrosolubilité intrinsèque de sondes basées sur le TBET due à leurs systèmes π -conjugués très étendus ce qui limite leur utilisation (Schéma 1).¹²

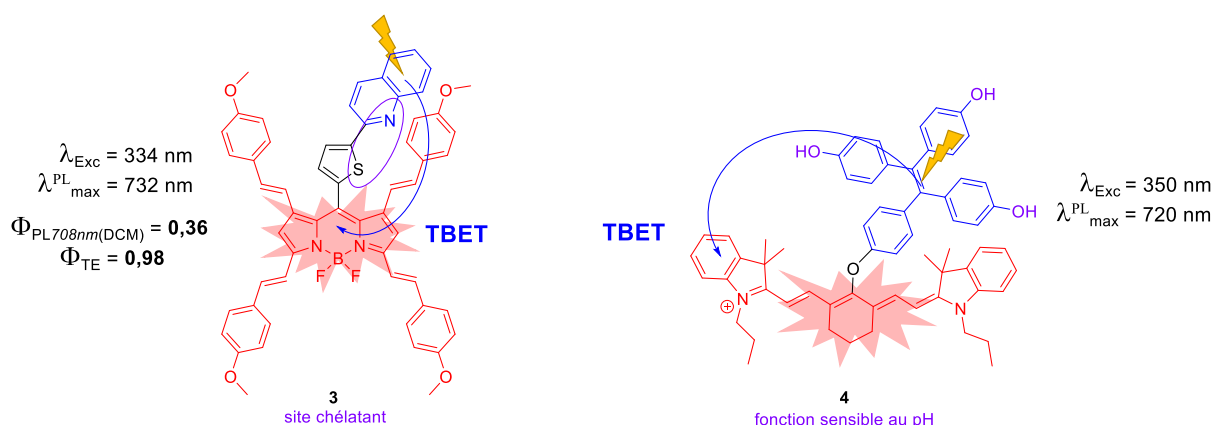


Schéma 1 Exemples de sondes faisant intervenir un TBET. **3** sonde à cation Fe^{3+} , **4** sonde à pH^{14} , Φ_{TE} : rendement quantique de transfert d'énergie.

1.2.3. Transfert d'électron photoinduit

Avec le FRET, le transfert d'électron photoinduit (ou PeT pour « Photoinduced Electron Transfer ») est un processus fondamental de la photosynthèse.^{15,16} Ce phénomène est en partie dû à l'exaltation des propriétés physico-chimiques à l'état excité. Ainsi, dans un certain nombre de cas, des réactions d'oxydoréduction peuvent éteindre la fluorescence. Cela se traduit au niveau orbitalaire par un transfert mono-électronique de la LUMO du fluorophore à l'état excité vers la LUMO d'un groupement électroattracteur dans le cas d'un transfert d'électron photoinduit oxydatif. Lorsque le transfert électronique est enclenché à partir de la HOMO d'un groupement électrodonneur vers la HOMO du fluorophore à l'état excité, on observe un transfert d'électron photo induit réductif.

12 Revue récente sur les sonde TBET : Cao, D.; Zhu, L.; Liu, Z.; Lin, W. Through bond energy transfer (TBET)-based fluorescent chemosensors. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* **2020**, *44*, 100371

13 Qu, X.; Liu, Q.; Ji, X.; Chen, H.; Zhou, Z.; Shen, Z. Enhancing the Stokes' shift of BODIPY dyes via through-bond energy transfer and its application for Fe^{3+} -detection in live cell imaging. *Chem Commun* **2012**, *48* (38), 4600-4602

14 Fang, M.; Xia, S.; Bi, J.; Wigstrom, T. P.; Valenzano, L.; Wang, J.; Mazi, W.; Tanasova, M.; Luo, F. T.; Liu, H. A cyanine-based fluorescent cassette with aggregation-induced emission for sensitive detection of pH changes in live cells. *Chem Commun* **2018**, *54* (9), 1133-1136

15 Remy, A.; Gerwert, K. Coupling of light-induced electron transfer to proton uptake in photosynthesis. *Nat Struct Biol* **2003**, *10* (8), 637-644

16 Scholes, G. D.; Fleming, G. R.; Olaya-Castro, A.; van Grondelle, R. Lessons from nature about solar light harvesting. *Nat Chem* **2011**, *3* (10), 763-774

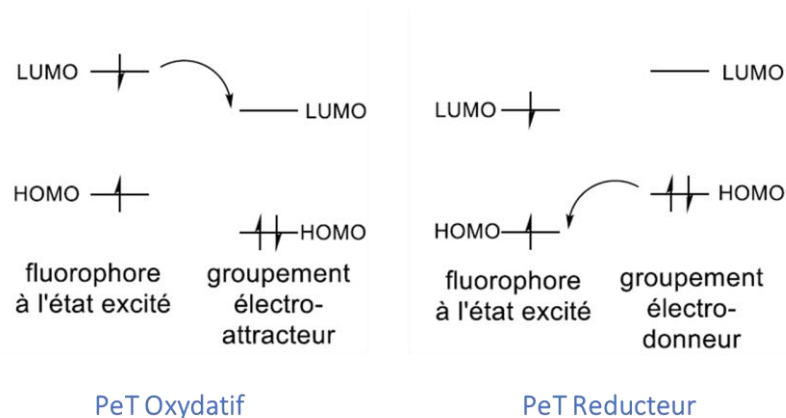


Figure 10 Illustration du principe du transfert d'électron photoinduit (PeT) (figure adaptée).¹⁷

La synthèse d'une sonde fondée sur le PeT réducteur implique un fluorophore fonctionnalisé par divers groupements riches en électrons comme peuvent l'être les anilines¹⁸ ou les phénolates.¹⁹ La réalisation de sonde à PeT oxydatif suit le même concept en utilisant des groupements appauvris en électrons tels que les nitroaryles²⁰ ou les maléimides.²¹ La modification chimique de ces groupements permet de moduler leurs propriétés redox vis-à-vis du fluorophore, donnant lieu à une extinction ou une exaltation de la fluorescence. On parle de système « On/Off ». Un exemple trivial de sonde PeT à pH rapporté par G.G. Luo *et al*²² décrit un bodipy fonctionnalisé par une aniline. La protonation de l'aniline en milieu très acide rend le doublet non liant de l'amine non disponible pour le PeT, impliquant une baisse de la densité électronique du groupement aniline. L'aniline n'est donc plus en état de réaliser du PeT réductif permettant de restaurer la fluorescence du bodipy. En somme, la réaction acido-basique impliquant l'aniline contrôle la fluorescence.

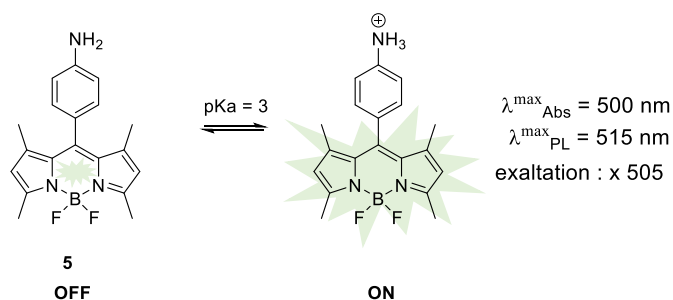


Figure 11 Sonde PeT sensible au pH.²²

17 Renault, K. Développement de ligations chimiosélectives « click » - applications à la synthèse de sondes fluorescentes, Université de Rouen Normandie, 2018

18 Gabe, Y.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Kojima, H.; Nagano, T. Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore - Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (10), 3357-3367

19 Bamesberger, A.; Schwartz, C.; Song, Q.; Han, W.; Wang, Z.; Cao, H. Rational design of a rapid fluorescent approach for detection of inorganic fluoride in MeCN:H₂O: A new fluorescence switch based on N-aryl-1,8-naphthalimide. *New J Chem* **2014**, *38* (3), 884-888

20 Li, Y.; Sun, Y.; Li, J.; Su, Q.; Yuan, W.; Dai, Y.; Han, C.; Wang, Q.; Feng, W.; Li, F. Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for in vivo nitroreductase imaging. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (19), 6407-6416

21 Guy, J.; Caron, K.; Dufresne, S.; Michnick, S. W.; Skene, W. G.; Keillor, J. W. Convergent preparation and photophysical characterization of dimaleimide dansyl fluorogens: Elucidation of the maleimide fluorescence quenching mechanism. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (39), 11969-11977

22 Zhong-Hua, P.; Geng-Geng, L.; Zhou, J.-W.; Xia, J.-X.; Fang, K.; Wu, R.-B. A simple BODIPY-aniline-based fluorescent chemosensor as multiple logic operations for the detection of pH and CO₂ gas. *Dalt Trans* **2014**, *43*, 8499-8507

1.2.4. Transfert de proton photoinduit.

L'exaltation des propriétés physico-chimiques à l'état excité concerne également les propriétés acido-basiques des molécules. Il a été observé une augmentation du caractère acide ou basique d'un groupement donneur ou accepteur de proton (*e.g.* phénol, aniline, atome d'azote hétérocyclique) à l'état excité. Le transfert de proton photoinduit intramoléculaire ou ESIPT (pour « Excited State Intramolecular Proton-Transfer ») est un cas particulier de ces propriétés physico-chimiques exacerbées. Cette réaction acido-basique intramoléculaire ($E^* \rightarrow K^*$) prend souvent la forme d'un équilibre céto-énolique. Une grande majorité des molécules effectuant de l'ESIPT existent sous forme d'énol à l'état fondamental. L'état excité K^* de la forme cétone est une forme bien plus stabilisée et la relaxation radiative ($K^* \rightarrow K$) est dans la plupart des cas bien moins énergétique que la transition radiative d'absorption ($E \rightarrow E^*$), conférant à ce type de composé un déplacement de Stokes bien plus grand. Notons que la transition radiative ($E^* \rightarrow E$) de la forme énol est en compétition avec le mécanisme d'ESIPT et n'est donc pas strictement interdite.

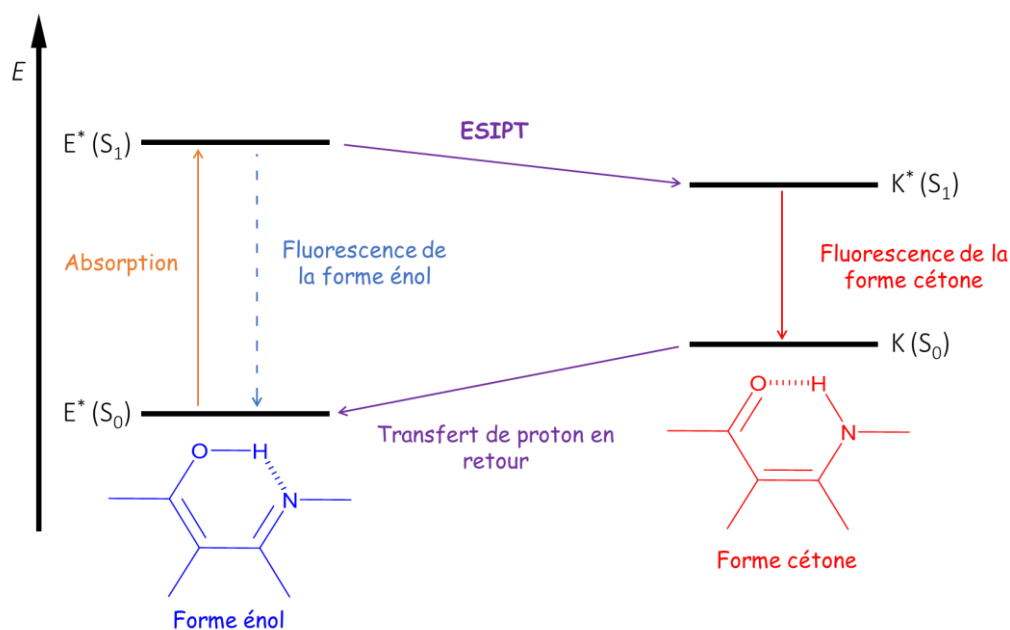


Figure 12 Principe du phénomène d'ESIPT (figure adaptée).²³

Une des conceptions possibles de sonde fluorogénique est fondée sur le blocage du phénomène ESIPT.²⁴ De façon analogue aux sondes de type PeT, un groupement fonctionnel est ajouté au fluorophore pour moduler l'efficacité du mécanisme d'ESIPT. A. S. Klymchenko *et al*²⁵ ont décrit une sonde ratiométrique pour la détection de l'apoptose, processus de mort cellulaire, fondée sur la modulation du caractère ESIPT. L'étude des propriétés ESIPT du motif 3-hydroxyflavone leur a permis de caractériser sa fluorescence duale correspondant à la compétition des deux états excités (E^* et K^* dans la figure 9). Différentes études leur ont permis de mettre en valeur la sensibilité de ce type de composé aux

23 Chen, K. Y.; Tsai, H. Y.; Lin, W. C.; Chu, H. H.; Weng, Y. C.; Chan, C. C. ESIPT fluorescent dyes with adjustable optical properties: Substituent and conjugation effects. *J Lumin* **2014**, *154*, 168-177

24 Revue récente sur le sonde ESIPT : Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H. H.; Bull, S. D.; He, X. P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B. Z.; Tian, H.; Yoon, J. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (23), 8842-8880

25 Shynkar, V. V.; Klymchenko, A. S.; Kunzelmann, C.; Duportail, G.; Muller, C. D.; Demchenko, A. P.; Freyssinet, J. M.; Mely, Y. Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (7), 2187-2193

variations électrostatiques environnantes.^{26,27} La sonde **6** a été conçue dans le but de s'insérer dans les membranes cellulaires. Cette molécule est non fluorescente dans l'eau, mais le devient au sein des membranes, ce qui permet d'éviter un bruit de fond considérable. Au sein de la membrane, les deux formes de l'équilibre céto-énolique sont fluorescentes et sont sensibles aux variations électrostatiques. Ainsi, l'apparition de phospholipides chargés négativement à la surface d'une cellule pendant l'apoptose permet à la sonde **6** de rendre compte de ce processus en sondant l'environnement électrostatique des membranes cellulaires *via* la variation de sa fluorescence duale.

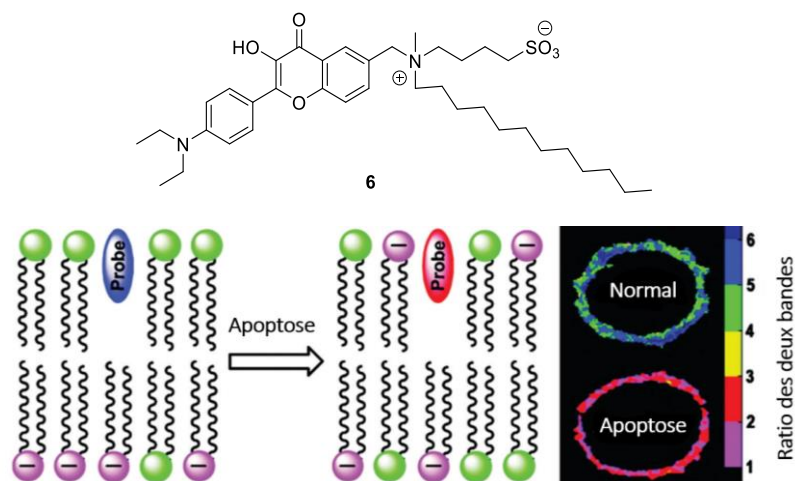


Figure 13 Sonde de type ESIPT ratiométrique pour la détection de l'apoptose développée par le groupe de A.S. Klymchenko (figure adaptée de la revue).²⁸

Les différents phénomènes listés ne représentent pas la totalité des interactions possibles des espèces promues à l'état excité. D'autres effets comme la formation d'exciplexe ou d'excimère, des réactions de fusion ou de fission d'états excités, n'ont pas été abordés. Tous ces processus généralement moins connus du chémobiologiste ne sont cependant pas à négliger dans le cadre de la conception de biomarqueurs luminescents dans l'interprétation des résultats obtenus.

1.2.5. Les effets environnementaux.

La dernière sonde présentée Figure 13 dans la section précédente illustre bien l'influence des paramètres environnementaux. Malgré l'utilisation du phénomène d'ESIPT, c'est un paramètre physique qui est sondé sans modification chimique direct sur la sonde. Cela nous permet de souligner, une fois de plus, l'importance des paramètres tels que la température, la viscosité, la pression etc (Figure 14). Ces derniers peuvent moduler le comportement de la molécule à l'état excité induisant des variations dans ses caractéristiques émissives. Cet avantage, qui fait le succès des sondes luminescentes, devient également un inconvénient lorsque la molécule utilisée est sujette à trop de facteurs externes, imprévus, chacun influant sur le signal de luminescence. Il devient alors compliqué d'interpréter le résultat obtenu.

26 Duportail, G.; Klymchenko, A.; Mély, Y.; Demchenko, A. P. On the Coupling Between Surface Charge and Hydration in Biomembranes: Experiments with 3-Hydroxyflavone Probes. *J Fluoresc* **2002**, *12* (2), 181-185

27 Duportail, G.; Klymchenko, A.; Mely, Y.; Demchenko, A. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS Lett* **2001**, *508* (2), 196-200

28 Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H. H.; Bull, S. D.; He, X. P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B. Z.; Tian, H.; Yoon, J. Excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) based fluorescence sensors and imaging agents. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (23), 8842-8880

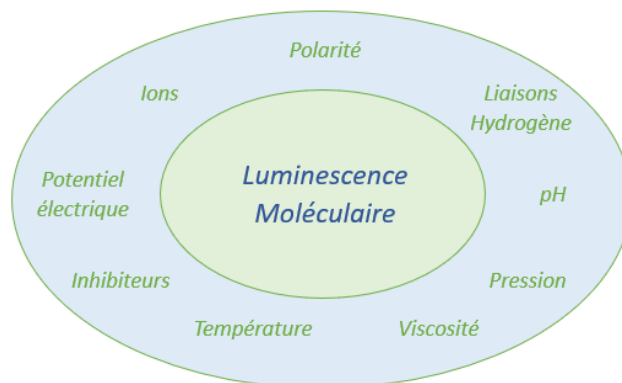


Figure 14 Paramètres influençant la luminescence moléculaire (figure adaptée).³

III. Introduction à la Chimiluminescence :

1.1 Généralités :

Selon l'union internationale de la chimie pure et appliquée (UICPA ou IUPAC en anglais), la chimiluminescence résulte d'une émission de photon déclenchée par une réaction chimique. L'espèce émissive peut être un produit d'une réaction ou une espèce excitée issue d'un transfert d'énergie à partir d'une espèce excitée à la suite d'une réaction. L'excitation peut être électronique, vibrationnelle, ou rotationnelle.²⁹ Cette définition permet alors d'établir les principes fondamentaux permettant une réaction chimiluminescente³⁰ :

- ✓ La réaction doit être suffisamment exothermique afin de pouvoir peupler les états électroniques excités, plus particulièrement l'état S_1 . L'enthalpie libre requise peut être calculée via l'Équation 5.

$$-\Delta G \geq \frac{hc}{\lambda_{ex}} = \frac{28600}{\lambda_{ex}}$$

Équation 5.

Elle permet donc d'approximer la quantité d'énergie requise pour qu'une réaction chimiluminescente émette dans le domaine du visible (400–750 nm) : elle doit être de l'ordre de 40-70 kcal.mol⁻¹.

- ✓ L'état excité de l'espèce émissive doit être accessible à partir des coordonnées réactionnelles de l'espèce initiale.
- ✓ L'émission de photon doit être le chemin de relaxation favorisé par l'espèce émissive pour obtenir la luminescence. En somme, une fois l'état S_1 ou T_1 peuplé, le comportement de l'espèce excitée est contrôlé par les mêmes phénomènes régissant une espèce photoexcitée.

²⁹ Laidler, K. J. "A glossary of terms used in chemical kinetics, including reaction dynamics (IUPAC Recommendations 1996)" *Pure and Applied Chemistry*, 68, 1, 1996, 149-192.

³⁰ *Chemiluminescence and Bioluminescence*; Roda, A., Éd.; Royal Society of Chemistry, 2011

Ce dernier principe sera très utile pour la suite de ce manuscrit. En effet, une fois que les deux premiers principes énoncés seront acquis, la compréhension et la conception de sondes chimiluminescentes s'appuiera fortement sur les paramètres énoncés dans la section détaillant la photoluminescence.

Le rendement quantique de chimiluminescence est défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de molécules ayant réagi. Il est représenté par l'Équation 6 où Φ_R correspond au rendement de la réaction, Φ_S équivaut au rendement de génération d'état excité singulet (on postule ici que la phosphorescence est un phénomène minoritaire, ce qui conditionne l'émission uniquement à partir de l'état S_1). Enfin, Φ_{PL} correspond au rendement quantique de photoluminescence de l'espèce émissive.

$$\Phi_{CL} = \Phi_R \times \Phi_S \times \Phi_{PL}$$

Équation 6 Expression mathématique du rendement quantique de chimiluminescence (Φ_{CL}).

Lors d'une réaction chimiluminescente impliquant un transfert d'énergie, il convient alors d'insérer le terme Φ_{TE} , rendant compte de l'efficacité du transfert. Le terme Φ_{PL} correspond alors au rendement quantique de photoluminescence de l'espèce réceptrice.

La définition de la chimiluminescence permet également d'englober des sous-types de chimiluminescence. Sur certains aspects, la flamme produite lors d'un feu de bois peut être considérée comme de la chimiluminescence puisque la lumière émise résulte de l'excitation d'une espèce produite à la suite d'une réaction chimique. Pour cet exemple, on préférera l'utilisation du terme de thermochimiluminescence, afin de notifier l'activation thermique de l'espèce émissive à l'état excité. La bioluminescence fait partie de l'un des « sous-types » de la chimiluminescence. Elle rend compte de la chimiluminescence dans le monde du vivant, et la sous-section suivante nous permettra de mettre en lumière l'importance de la bioluminescence dans l'histoire de la compréhension de la chimiluminescence. Ensuite, nous aborderons les mécanismes les plus connus à la base de la chimiluminescence. Enfin nous terminerons cette partie introductive à la chimiluminescence par un bref état de l'art des sondes bio- et chimiluminescentes.

1.2 La bioluminescence.

La bioluminescence a certainement été le premier phénomène chimiluminescent observé par l'Homme. Les premiers écrits connus rapportant des observations sur un organisme bioluminescent sont attribués au philosophe grecque Anaximenes de Mileto (585-528 av J-C). Le phénomène ne sera rigoureusement établi qu'en 1885 par le pharmacien français Raphaël Dubois, lors de son étude d'un coléoptère produisant de la lumière (Pyrophorus). Il parviendra à attribuer cette luminescence à deux composés distincts : l'un thermiquement stable extrait à l'eau chaude nommée luciférine (en référence à *Lucifer* signifiant porteur de lumière), l'autre thermosensible correspondant à une enzyme, la luciférase. L'oxydation de la luciférine par la luciférase permet alors l'émission de photon.

En 1962, O. Shimomura et son équipe isolent le système bioluminescent de la méduse *Aequorea Victoria*.³¹ La description de ce système amène de la complexité au modèle établi à cette époque, basé sur le couple luciférine/luciférase. Le mécanisme a été élucidé au fil de différentes études au cours de la moitié du 20^{ème} siècle. La bioluminescence de cette méduse résulte d'un transfert

31 Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *J Cell Comp Physiol* **1962**, 59 (165), 223-239

d'énergie entre un complexe protéique dépendant d'ions calcium, l'Aequorine, ainsi que la GFP (« Green Fluorescent Protein »). Il débute par l'inclusion de la **coelentérazine 7** dans la photoprotéine Aequorine constituée d'une apo-protéine possédant un site pouvant chélater la molécule **7** (Schéma 2). En présence de dioxygène, la **coelentérazine** est oxydée pour donner le dérivé peroxyde **8** encore plus affiné pour l'apoprotéine. La chélation d'ions calcium par la protéine induit un léger changement conformationnel de l'enzyme permettant l'oxydation de la coelentérazine **9** avec la formation du cycle **dioxétanone**.^{32,33} L'instabilité de ce cycle peroxyde à quatre atomes induit sa rupture et sa décomposition en libérant du dioxyde de carbone et de l'énergie permettant l'apparition du coelentéramide **10** à l'état excité singulet. La relaxation radiative de la molécule **10** est légèrement favorisée, et le reste des états excités subit un transfert d'énergie appelé BRET (« Bioluminescence Resonance Energy Transfer ») de la coelentéramide complexée dans l'aequorine vers la GFP.

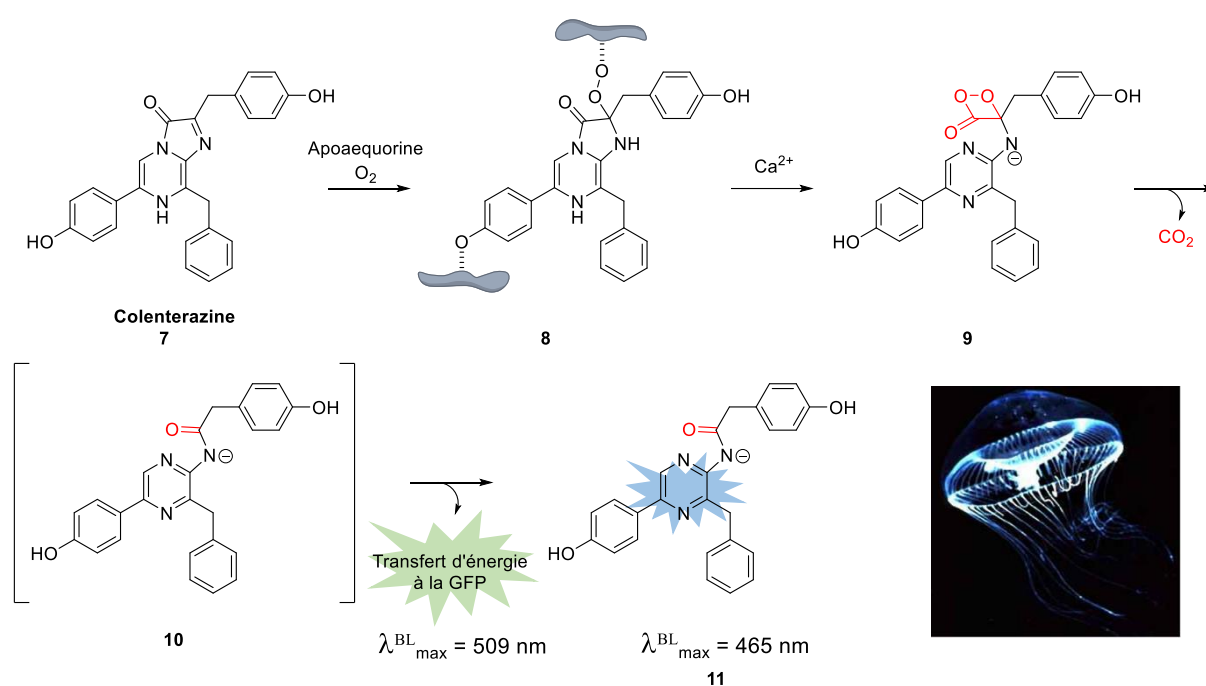


Schéma 2 Représentation schématique du mécanisme de bioluminescence appliqué aux méduses *Aequoria Victoria*

Depuis cette découverte, de nombreux couples luciférine-luciférase ont été référencés par différents groupes de recherche. La mise en avant de nombreuses molécules chimiluminescentes représentées dans la figure 15³⁴ permet de remarquer la formation récurrente d'un intermédiaire énergétique métastable basé sur une liaison peroxyde.

32 Ohmiya, Y.; Hirano, T. Shining the light: The mechanism of the bioluminescence reaction of calcium-binding photoproteins. *Chem Biol* **1996**, *3* (5), 337-347

33 Head, J. F.; Inouye, S.; Teranishi, K.; Shimomura, O. The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **2000**, *405* (6784), 372-376

34 Vacher, M.; Fdez Galván, I.; Ding, B. W.; Schramm, S.; Berraud-Pache, R.; Naumov, P.; Ferré, N.; Liu, Y. J.; Navizet, I.; Roca-Sanjuán, D.; Baader, W. J.; Lindh, R. Chemi- and Bioluminescence of Cyclic Peroxides. *Chem Rev* **2018**, *118* (15), 6927-6974

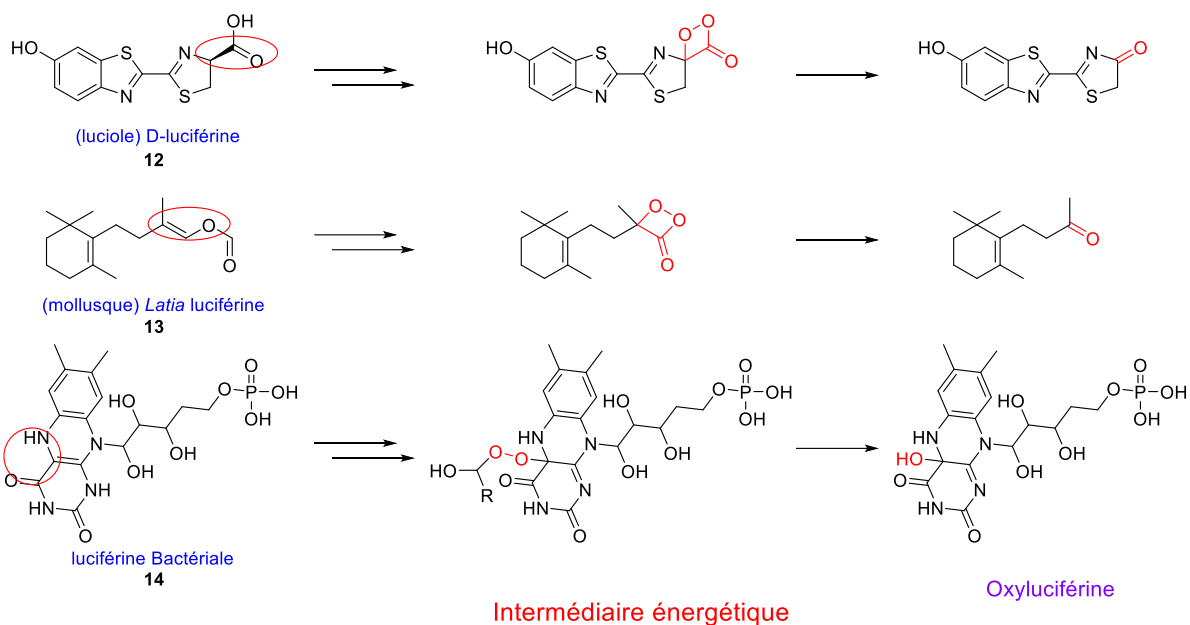


Schéma 3 Quelques exemples de luciférines.

La récurrence de la formation de cycle peroxyde à quatre atomes³⁴ de type dioxétanone **16** a aiguïté la curiosité de la communauté scientifique, puisque c'est à partir de ces dérivés peroxydes que l'état électronique S_1 peut être atteint. La découverte de O. Shimomura a lancé les chimistes organiciens dans la synthèse de cycle 1,2 dioxétane **15**, 1,2 dioxétanone **16**, 1,2 dioxétanedione **17** (Figure 15).³⁵ En 1969, Kopecky et Mumford³⁶ sont les premiers à rapporter la synthèse d'un cycle 1-2 dioxétane stable. L'obtention de tels composés et les avancées de la chimie théorique (grâce aux progrès de l'informatique) ont permis de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

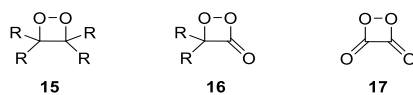


Figure 15 Structures des principaux cycle dioxétanes utilisés pour la chimiluminescence.

1.3 Les mécanismes de chimiluminescence du motif 1,2 dioxétane.

1.3.1. Généralités.

Comme rappelé dans la définition de la chimiluminescence, il existe plusieurs façons d'obtenir de la chimiluminescence, avec par exemple l'obtention de la chimiluminescence d'un lanthanide en présence d'oxygène singulet.³⁷ Néanmoins, la thématique de notre sujet de recherche sera bornée à l'étude des composés chimiluminescents liés à la décomposition du cycle 1-2 dioxétane (Schéma 4). D'un point de vue atomique, la décomposition de ce cycle est décrite comme résultant d'une torsion trop forte de la liaison peroxyde menant à une rupture de cette dernière.³⁸

35 Adam, W. The Chemistry of 1,2-Dioxetanes. *Adv Heterocycl Chem* **1977**, 21 (C), 437-481.

36 Kopecky, K. R.; Mumford, C. Luminescence in the thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane. *Can J Chem* **1969**, 47, 709-711.

37 Zhang, B. T.; Lin, J. M. Chemiluminescence and energy transfer mechanism of lanthanide ions in different media based on peroxomonosulfate system. *Luminescence* **2010**, 25 (4), 322-327.

38 Tanaka, C.; Tanaka, J. Ab Initio Molecular Orbital Studies on the Chemiluminescence of 1,2-Dioxetanes. *J Phys Chem A* **2000**, 104 (10), 2078-2090.

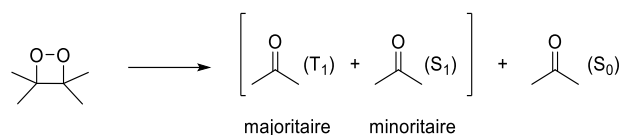


Schéma 4 Décomposition du tétraméthyl-1,2-dioxétane.

Des études expérimentales et théoriques ont été menées sur la décomposition du dioxétane tétra méthylé et ont démontré sa tendance à générer des états électroniques excités triplet.^{34,39} Une distinction est également faite entre une décomposition catalysée ou non du cycle dioxétane. Des calculs corrélés aux observations^{34,40} semblent démontrer que la décomposition catalysée du cycle diminuerait la génération d'états triplet, augmentant *de facto* le rendement d'états singulets générés, et donc rendant la chimiluminescence possible. Cette génération d'états singulet est un paramètre clé dans la conception de sondes chimiluminescentes pour l'imagerie optique.

1.3.2. Le mécanisme CIEEL.

En 1977, un premier mécanisme permettant de rationaliser la chimiluminescence a été élaboré par les Pr. Schuster^{41,42} et Adam⁴³. Appelé « Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence » (CIEEL), ce mécanisme met en jeu un cycle 1,2-dioxétanone et une espèce activatrice (ACT) (Schéma 5). La formation d'un complexe **18** entre l'espèce activatrice (espèce riche en électrons par rapport au cycle) et le cycle 1,2-dioxétanone provoque la formation des espèces radicalaires chargées **19** et **20**. Le radical anion peroxyde **19** se décompose ensuite spontanément en radical alkoxy **21**, processus favorisé par l'élimination de dioxyde de carbone. À ce stade, un transfert d'électron en retour (BET pour « Back Electron Transfer ») du radical alkoxy **21** vers le radical cation de l'activateur **20** a lieu, promulguant ce dernier dans un état excité. L'émission d'un photon dépend de la nature de l'espèce activatrice utilisée. L'étape de transfert d'électron en retour reste encore sujette à débat puisqu'elle nécessite une sphère de solvatation^{11,44} et les preuves de son existence sont encore discutées.^{34,45}

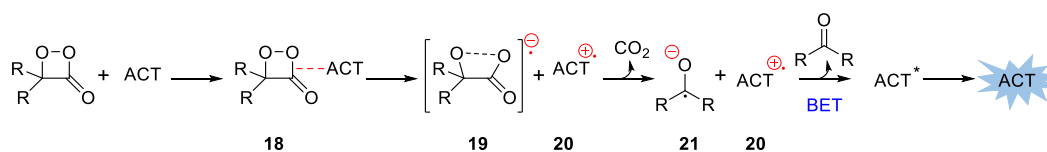


Schéma 5 Représentation schématique du mécanisme CIEEL.³⁴

Le processus CIEEL met en évidence une espèce haute en énergie, qui peut être libérée lors de la dissociation du cycle dioxétanone. Cette rupture peut être thermique, mais elle est favorisée, voire catalysée dans ce cas³⁴ par une espèce donneuse d'électron. En parallèle à ces études mécanistiques,

³⁹ Matsumoto, M. Advanced chemistry of dioxetane-based chemiluminescent substrates originating from bioluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2004, p 27-53

⁴⁰ Wilson, T. Comments on the Mechanisms of Chemi- and Bioluminescence. *Photochem Photobiol* **1995**, *62* (4), 601-606

⁴¹ Koo, J. young; Schuster, G. B. Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence. A New Chemiluminescent Reaction Path for Organic Peroxides. *J Am Chem Soc* **1977**, *99* (18), 6107-6109

⁴² Koo, J. young; Schuster, G. B. Chemiluminescence of Diphenoyl Peroxide. Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence. A New General Mechanism for Chemical Production of Electronically Excited States. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (14), 4496-4503

⁴³ Waldemar, A.; Omar, C. Fluorescer-Enhanced Chemiluminescence of α -Peroxylactones via Electron Exchange. *J Am Chem Soc* **1979**, *101* (22), 6511-6515

⁴⁴ Adam, W.; Bronstein, I.; Trofimov, A. V.; Vasil'ev, R. F. Solvent-cage effect (viscosity dependence) as a diagnostic probe for the mechanism of the intramolecular chemically initiated electron-exchange luminescence (CIEEL) triggered from a spiroadamantyl-substituted dioxetane. *J Am Chem Soc* **1999**, *121* (5), 958-961

d'autres groupes de recherche se sont attelés au référencement, ou au développement de molécules chimiluminescentes par rupture d'un cycle 1,2-dioxétane.

Le mécanisme présenté dans le Schéma 5 décrit un procédé intermoléculaire, mais une version intramoléculaire a également été décrite, comme c'est le cas pour les dérivés présentés dans la Figure 16. La molécule **22** se forme au sein d'une luciférase en présence de dioxygène⁴⁵ tandis que le dérivé **23** a été synthétisé par le groupe du Pr. Toshio Goto. Le point commun de ces chimiluminophores est la faible stabilité de leur cycle dioxétanone ou diotexane à température ambiante (décomposition spontanée à - 40°C pour la molécule **23**⁴⁶). En effet, la densité électronique apportée par les motifs électrodonneurs est suffisante pour favoriser le déclenchement du mécanisme CIEEL, ce qui provoque une réaction chimiluminescente spontanée à température ambiante. La faible stabilité du cycle 1,2-dioxétane ne permet pas d'utiliser ces molécules comme sondes « activables ». Pour obtenir une sonde utilisable en imagerie optique, il est nécessaire de pouvoir contrôler la formation du cycle 1,2-dioxétane et donc le processus de déclenchement de chimiluminescence dans les conditions physiologiques. En 1982, le groupe du Pr. Schaap présente le dérivé 1,2 dioxétane **24**, stable à température ambiante.⁴⁷ De plus, il est possible d'enclencher le mécanisme CIEEL à dessein, car si la forme phénol est stable, ce n'est pas le cas de la forme phénolate qui induit la décomposition du cycle dioxétane.

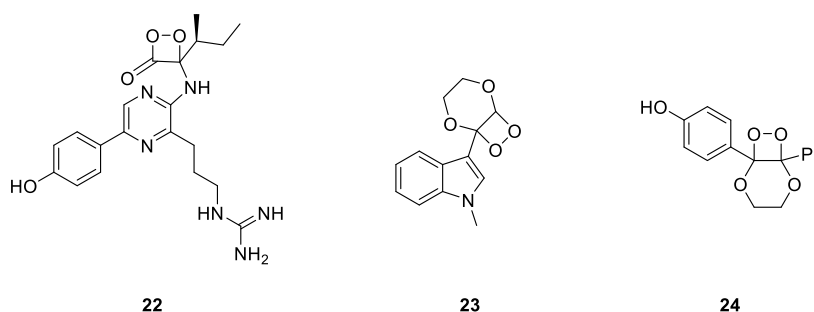


Figure 16 Chimiluminophores naturels et artificiels.

Ainsi, la stabilisation du cycle 1,2-dioxétane à température ambiante, couplée à la possibilité de déclencher le mécanisme CIEEL, a rendu possible l'utilisation de chimiluminophores pour la détection de (bio)analytes. Le mécanisme appliqué aux dioxétanes activables est représenté dans le Schéma 6. L'apparition du phénolate par rupture chimique ou enzymatique de la liaison O-R, déclenche le mécanisme CIEEL intramoléculaire de dégradation du cycle 1,2-dioxétane (a). Le phénolate, par transfert monoélectronique, déstabilise le pont peroxyde provoquant une première rupture homolytique (b). Cette étape est suivie d'une seconde rupture homolytique de la liaison carbone-carbone entre l'hémiacétal et l'adamantyl (c). Selon le mécanisme CIEEL, un transfert d'électron en retour du radical anion de l'adamantanone vers le radical phenoxy a lieu (d), à l'intérieur d'une sphère de solvatation, générant un phénolate dans un état excité capable d'émettre un photon (e).

45 Shimomura, O.; Johnson, F. Mechanisms in the quantum yield of cypridina bioluminescence. *Photochem Photobiol* **1970**, *12* (4), 291-295

46 Goto, T.; Nakamura, H. 2-(1-Methylindol-3-yl)-3-phenyldihydro-1,4-dioxin 2,3-epidioxide, a dioxetan resulting in efficient ultraviolet chemiluminescence. *J Chem Soc Chem Commun* **1978**, No 18, 781-782

47 Schaap, A. P.; Gagnon, S. D. Chemiluminescence from a Phenoxy-Substituted 1,2-Dioxetane: A Model for Firefly Bioluminescence. *J Am Chem Soc* **1982**, *104* (12), 3504-3506

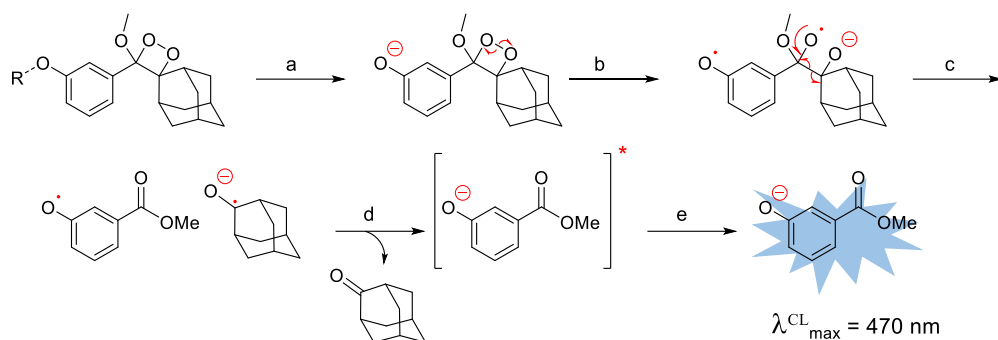


Schéma 6 Mécanisme CIEEL intramoléculaire a : coupure chimique ou enzymatique, b : transfert monoélectronique, c : rupture homolytique de la liaison C-C, d : BET de l'adamantanone vers le phénolate, e : émission d'un photon par désexcitation radiative.

1.3.3. Le mécanisme CTID.

L'étude des propriétés chimiluminescentes du 1,4-diméthoxy-9,10-diphénylanthracène et du peroxyde de diphenoyl,⁴⁸ deux systèmes chimiluminescents inefficaces comparés à ceux rapportés par Schuster *et al*⁴², ou Adam *et al*,⁴⁹ les a amenés à questionner le mécanisme CIEEL. La problématique majeure concerne le transfert d'électron en retour (BET), postulé en dernière étape (Schéma 6). En effet, Catalani et Wilson⁵² s'appuient sur la production non négligeable d'états triplet lors d'un transfert électronique entre une paire de radicaux. Le ratio est de 75/25 pour les états T₁ et S₁, respectivement, dans le cas le moins favorable à la production d'états singulets.⁵⁰ Dès lors, un écart de rendement quantique de chimiluminescence de plusieurs ordres de grandeur n'est pas envisageable et remet en question le mécanisme CIEEL. Dans cet article,⁴⁸ les auteurs proposent un mécanisme plus simple impliquant un transfert de charge vers le motif 1,2 dioxétane (Schéma 7). Il s'en suit une rupture de la liaison peroxyde suivie de la rupture homolytique de la liaison carbone-carbone produisant une espèce à l'état excité. Ce mécanisme a été mis en avant à maintes reprises par le groupe du Pr Matsumoto.^{51,52,53,54}

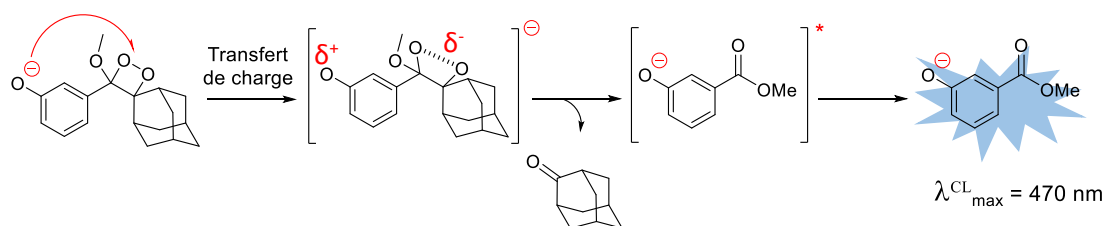


Schéma 7 Représentation du mécanisme intramoléculaire CTID.

48 Catalani, L. H.; Wilson, T. Electron Transfer and Chemiluminescence. Two Inefficient Systems: 1,4-Dimethoxy-9,10-diphenylanthracene Peroxide and Diphenoyl Peroxide. *J Am Chem Soc* **1989**, *111* (7), 2633-2639

49 Adam, W.; Cueto, O.; Yany, F. On the Mechanism of the Rubrene-Enhanced Chemiluminescence of α -Peroxylactones. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (8), 2587-2589

50 Weller, A. Mechanism and Spindynamics of Photoinduced Electron Transfer Reactions. *Zeitschrift für Phys Chemie* **1982**, *130* (2), 129-138

51 Matsumoto, M.; Azami, M. F--induced decomposition of 3-[(tert-Butyldimethylsiloxy)phenoxy]-3-phenyl-1,2-dioxetanes without C-C bond cleavage of the dioxetane ring. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38* (52), 8947-8950

52 Masakatsu Matsumoto, T. S. and N. W. Synthesis of bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxy-4-isoxazolylphenyl moiety new CIEEL-active dioxetanes emitting light with remarkable high-efficiency in aqueous medium. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 8955-8958

53 Matsumoto, M.; Watanabe, N.; Hoshiya, N.; Ijuin, H. K. Color modulation for intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence of 1,2-dioxetanes. *Chem Rec* **2008**, *8*, 213-228

54 Matsumoto, M.; Watanabe, N. Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Bull Chem Soc Jpn* **2005**, *78* (11), 1899-1920

Bien que le mécanisme CIEEL soit bien plus établi et donc bien plus cité, à notre connaissance, aucune preuve tangible ne permet de mettre clairement en avant un des deux mécanismes. Cependant, pour l'un comme pour l'autre des deux mécanismes, c'est la formation du phénolate qui amorce le processus de chimiluminescence lorsque celui-ci est intramoléculaire.

1.4 Les sondes bioluminescentes.

La bioluminescence est l'une des méthodes les plus sensibles en imagerie. Lorsque les conditions sont réunies, elle permet la détection un analyte à une concentration proche de l'attomolaire (10^{-18} M^{-1}) ou du zeptomolaire (10^{-21} M^{-1}).⁵⁵ Ceci est dû en partie au rapport signal sur bruit qui est élevé par rapport à la fluorescence, grâce à l'absence de source excitatrice et de réaction sans enzyme. Cependant, l'utilisation de la bioluminescence dans le domaine de l'imagerie, *in cellulo* ou *in vivo*, requiert des manipulations génétiques. En effet, rappelons que la bioluminescence résulte de l'interaction d'un couple luciférase-luciférine induisant quelques étapes d'ingénierie génétique pour exprimer l'enzyme souhaitée dans le milieu étudié. Plusieurs techniques transgéniques ont été développées pour mettre en place des outils de détection par bioluminescence dans un système vivant (Figure 17).⁵⁶

La technique du gène rapporteur est la plus répandue du fait de sa fiabilité. Elle repose sur l'introduction d'une séquence d'ADN qui code pour une luciférase. Il est ensuite possible de suivre l'expression du gène d'intérêt par bioluminescence dans la totalité de la cellule (Figure 17a) à condition que la luciférine pénètre dans la cellule et qu'elle (ou la luciférase) ne soit activée qu'en présence de l'analyte à détecter. Le système rapporteur en double, ou « dual-reporter system », est une amélioration de la technique du gène rapporteur (Figure 17b). Ici, la quantification de la luminescence enregistrée est rendue possible par l'incorporation d'un étalon interne par le biais d'une protéine rapportrice. Cette dernière doit posséder des propriétés de luminescence bien connues. Enfin, l'utilisation de protéines bifonctionnelles (Figure 17c) consiste à fusionner le gène codant une enzyme d'intérêt avec celui d'une enzyme bioluminescente, afin d'obtenir *in fine* l'enzyme d'intérêt capable d'effectuer de la bioluminescence. Cette liste non exhaustive permet de souligner les défis à relever pour pouvoir utiliser la bioluminescence *in cellulo* ou *in vivo*. En effet, même si la manipulation génétique est une technologie robuste, elle reste difficile à mettre en place pour un organisme vivant. De plus, l'enzyme d'intérêt est produite à un niveau qui ne correspond pas forcément à son niveau physiologique naturel.

55 Champiat, D.; Roux, A.; Lhomme, O.; Nosenzo, G. Biohemiluminescence and biomedical applications. *Cell Chem Biol Toxicol* **1994**, No 10, 345-351

56 Roda, A.; Pasini, P.; Mirasoli, M.; Michelini, E.; Guardigli, M. Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* **2004**, 22 (6), 295-303

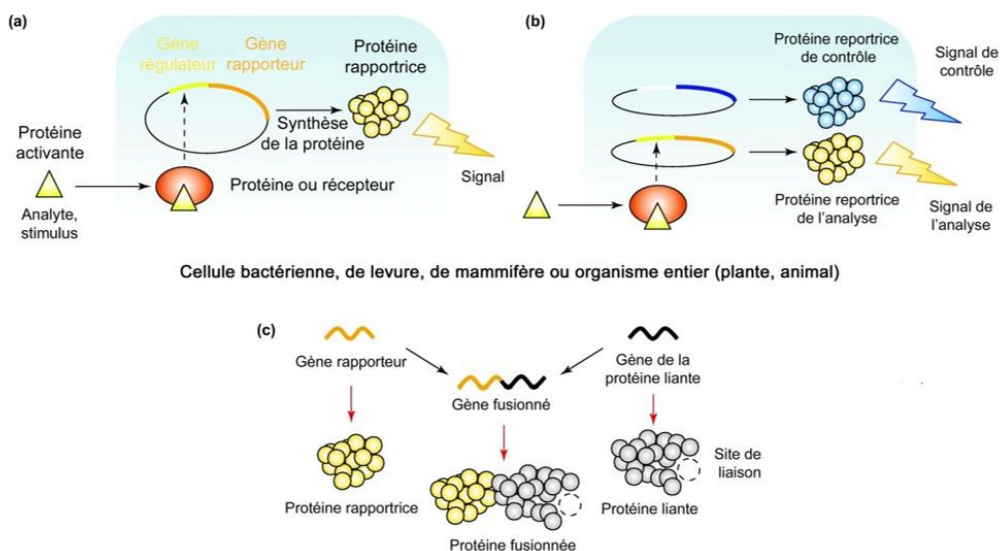


Figure 17 Différentes techniques utilisant la bioluminescence (figure adaptée).⁵⁶

La D-luciférine de la luciole *Lampyrus noctiluca* est l'une des plus utilisées du fait de sa petite taille et de son émission intrinsèque décalée vers le rouge (560 nm) (Schéma 8). De plus, elle possède l'un des meilleurs rendements quantiques de bioluminescence ($\Phi_{BL} \approx 40\%$ relatif au luminol)⁵⁷ combiné à une adaptabilité de sa luciférase vis-à-vis de D-luciférines chimiquement modifiées.⁵⁸ La luciférine **12** est notamment utilisée pour la détection d'ATP permettant de mettre en évidence l'activité microbienne ou bactérienne, l'ATP étant indispensable à l'activité de la luciférase.⁵⁹

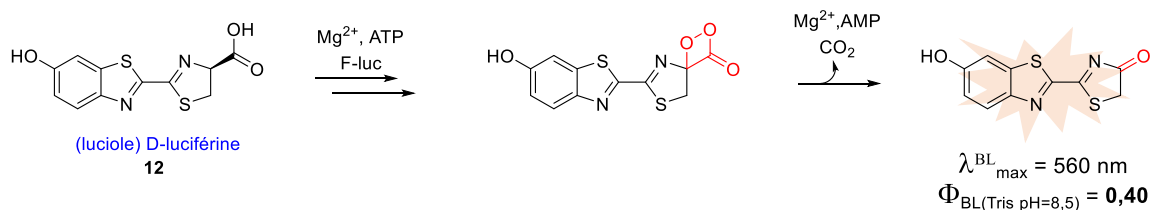


Schéma 8 Bioluminescence de la D-Luciférine.

Le développement de l'imagerie par bioluminescence a induit la conception de luciférines plus adaptées. Dans cette optique, la modification du squelette benzothiazole a donc été très étudiée pour décaler les propriétés de luminescence vers le rouge. Bien que le composé **25** détienne le rendement quantique de bioluminescence le plus élevé des analogues développés ($\Phi_{BL} \approx 70\%$ relatif à **12**),⁶⁰ il n'émet qu'à 523 nm (Figure 18). A l'inverse, le remplacement de la fonction phénol par une aniline dans l'analogue **26** permet un décalage de 34 nm par rapport à la D-luciférine, mais son rendement quantique

57 Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission. *Nat Photonics* **2008**, *2* (1), 44-47

58 Adams, S. T.; Miller, S. C. Beyond D-luciferin: Expanding the scope of bioluminescence imaging in vivo. *Curr Opin Chem Biol* **2014**, *21* (Figure 1), 112-120

59 Young, I. T.; Moerman, R.; Van Den Doel, L. R.; Iordanov, V.; Kroon, A.; Dietrich, H. R. C.; Van Dedem, G. W. K.; Bossche, A.; Gray, B. L.; Sarro, L.; Verbeek, P. W.; Van Vliet, L. J. Monitoring enzymatic reactions in nanolitre wells. *J Microsc* **2003**, *212* (3), 254-263

60 Woodroffe, C. C.; Meisenheimer, P. L.; Klaubert, D. H.; Kovic, Y.; Rosenberg, J. C.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Branchini, B. R. Novel heterocyclic analogues of firefly luciferin. *Biochemistry* **2012**, *51* (49), 9807-9813

de bioluminescence est moins élevé.^{61,62,63} En 2018, Mezzanotte *et al* rapportent un analogue de la luciférine qui émet plus vers le rouge sans utiliser de transfert d'énergie, utilisé dans le cadre de tests *in cellulo* et *in vivo*. Il faut noter que l'utilisation de la luciférine **27** nécessite la luciférase mutante CBR2opt.⁶⁴ D'autre part, l'obtention de sondes bioluminescentes dans le proche infrarouge peut également être réalisée *via* du BRET. Par exemple l'analogue **28** rapporté par l'équipe du Pr Urano⁶⁵ émet à 772 nm (via un processus de FRET). Cependant, son intensité lumineuse (à un temps fixé) est 40 fois moins élevée que la D-luciférine **12**. Dans le cadre de l'imagerie *in vivo* cette faible efficacité peut être compensée par le potentiel pénétrant plus élevée des radiations dans le domaine du rouge et du proche infrarouge.

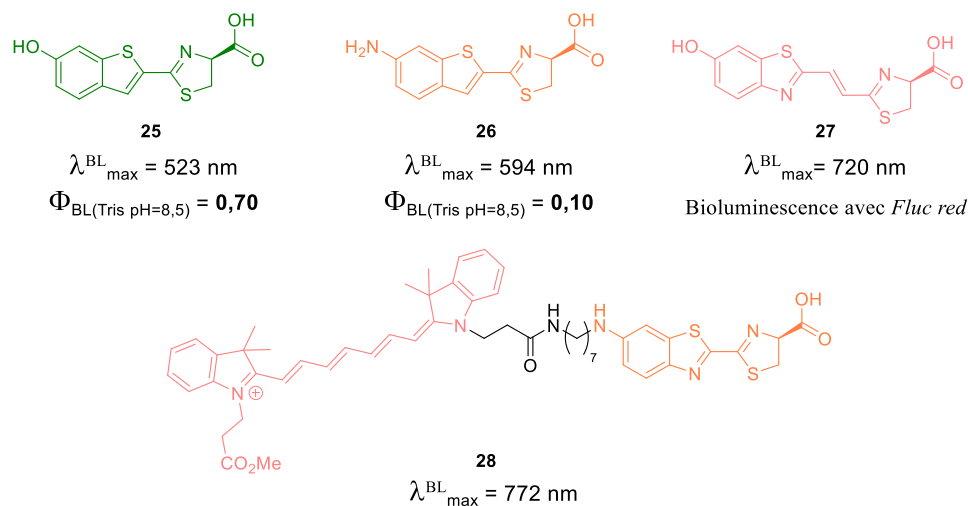


Figure 18 Structure d'analogues de la D-Luciférine

La conception des sondes présentées ci-dessus ont donc uniquement pour but d'améliorer les différentes propriétés lumineuses, or elles ne possèdent pas toutes une perméabilité suffisante vis-à-vis de la membrane plasmique, ce qui nécessite une lyse cellulaire pour obtenir un signal. Afin de remédier à ce problème, P.A Wender *et al* ont fonctionnalisé une D-luciférine par une chaîne poly-arginine, lui permettant de passer la membrane plasmique des cellules, reliée par un bras disulfure à la luciférine (Schéma 9A).⁶⁶ Lorsque la sonde est internalisée, le pont disulfure est réduit par le glutathion (GSH) cytoplasmique, libérant ensuite la luciférine. La sonde présentée dans le Schéma 9B possède un groupement amide, masquant la fonction acide carboxylique, ce qui empêche *de facto* la bioluminescence. Dans cet exemple,⁶⁷ la fonction amide est hydrolysée par l'hydrolase des amides d'acides gras, rendant ainsi possible le suivi de l'activité de cette enzyme.

61 Syed, A. J.; Anderson, J. C. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chem Soc Rev* **2021**, 50 (9), 5668-5705

62 Shinde, R.; Perkins, J.; Contag, C. H. Luciferin derivatives for enhanced *in vitro* and *in vivo* bioluminescence assays. *Biochemistry* **2006**, 45 (37), 11103-11112

63 White, E. H.; Worthier, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. Amino Analogs of Firefly Luciferin and Biological Activity Thereof. *J Am Chem Soc* **1966**, 88 (9), 2015-2019

64 Hall, M. P.; Woodrooffe, C. C.; Wood, M. G.; Que, I.; Van'T Root, M.; Ridwan, Y.; Shi, C.; Kirkland, T. A.; Encell, L. P.; Wood, K. V.; Löwik, C.; Mezzanotte, L. Click beetle luciferase mutant and near infrared naphthyl-luciferins for improved bioluminescence imaging. *Nat Commun* **2018**, 9 (1)

65 Kojima, R.; Takakura, H.; Ozawa, T.; Tada, Y.; Nagano, T.; Urano, Y. Rational design and development of near-infrared-emitting firefly luciferins available *in vivo*. *Angew Chemie - Int Ed* **2013**, 52 (4), 1175-1179

66 Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A. Releasable luciferin-transporter conjugates: Tools for the real-time analysis of cellular uptake and release. *J Am Chem Soc* **2006**, 128 (20), 6526-6527

67 Mofford, D. M.; Adams, S. T.; Reddy, G. S. K. K.; Reddy, G. R.; Miller, S. C. Luciferin Amides Enable *In Vivo* Bioluminescence Detection of Endogenous Fatty Acid Amide Hydrolase Activity. *J Am Chem Soc* **2015**, 137 (27), 8684-8687

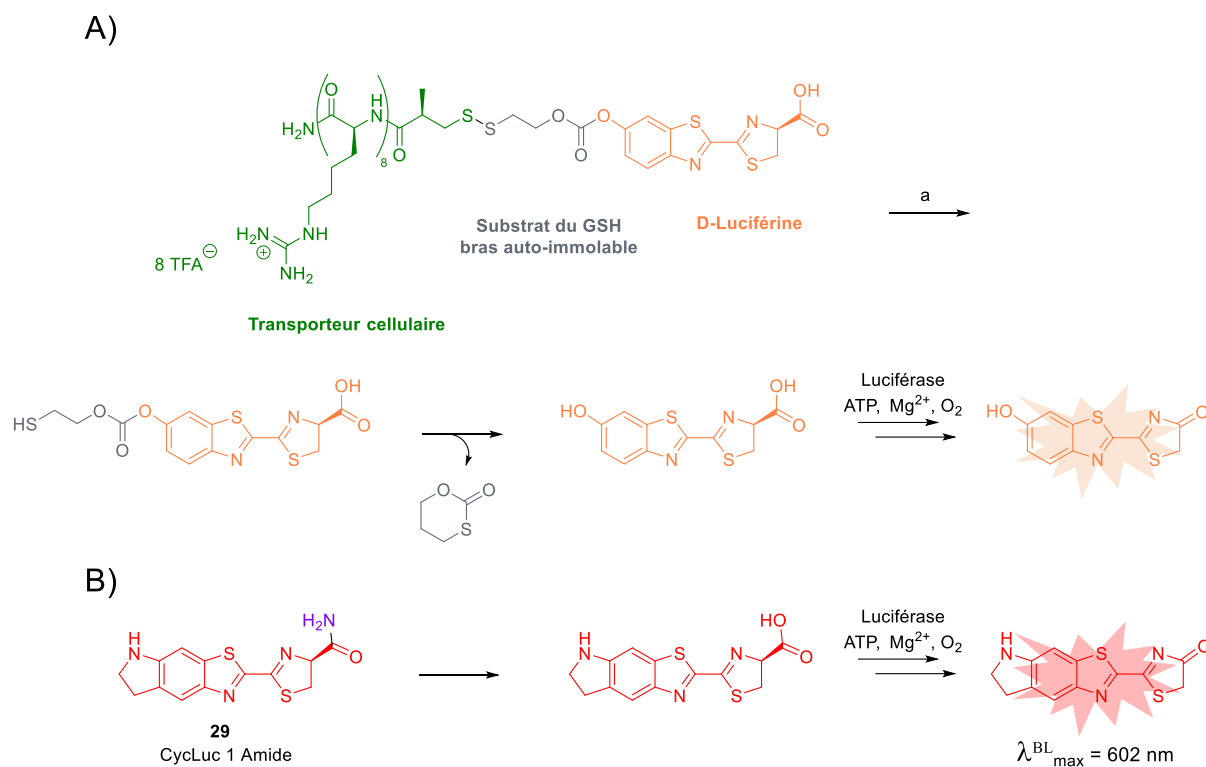


Schéma 9 Exemples de sondes bioluminescentes A) Luciférine modifiée pour une internalisation cellulaire (a : internalisation cellulaire puis réduction par le GSH) B) D-luciférine cagée au niveau de la fonction acide carboxylique.

Dans le domaine de l'imagerie optique, la bioluminescence est donc un outil très performant car elle est efficace pour mesurer de très faibles concentrations d'analytes. De plus, son rapport signal sur bruit est un avantage en comparaison de la fluorescence. Néanmoins, elle nécessite une ingénierie génétique ce qui limite drastiquement son développement dans les applications *in vivo*. Enfin, il est également important de noter qu'il est impossible de travailler en milieu hypoxique, c'est à dire à faible teneur en oxygène. Le développement de sondes chimiluminescentes sans intervention d'enzyme se positionne donc en alternative aux sondes bioluminescentes.

1.5 Les sondes chimiluminescentes :

1.5.1. Basées sur le motif luminol.

Le 3-aminophthalhydrazide plus connu sous le nom de luminol a été synthétisé pour la première fois au début du 20^{ème} siècle.³⁴ Ses propriétés chimiluminescentes ont été rapportées par Albrecht en 1929.⁶⁸ Le luminol est capable d'émettre de la lumière lorsque qu'il est placé en milieu oxydant en présence d'une base et d'un catalyseur (Figure 19). Dans un milieu biologique la réaction peut avoir lieu en présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) et de peroxydase, (*i.e.* enzyme ayant des propriétés oxydantes).

68 Albrecht, H. O. Über die Chemilumineszenz des Aminophthalsäurehydrazids. *Zeitschrift für Phys Chemie* **1928**, 136U (1), 321-330

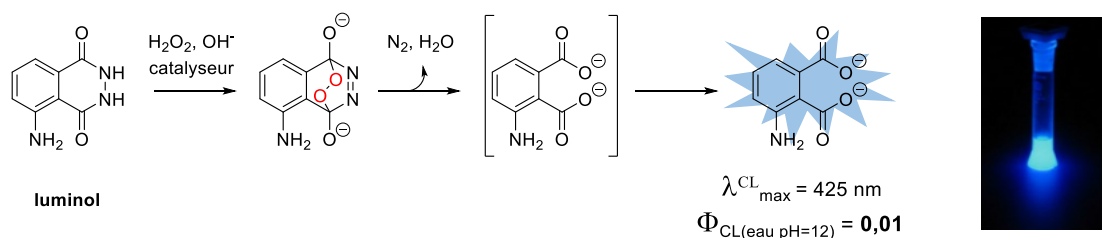


Figure 19 Réaction de chimiluminescence du luminol.

Le faible rendement quantique de chimiluminescence du luminol ($\Phi_{\text{CL}} \approx 1\%$)⁶⁹ juxtaposé à son émission dans la région du bleu limite son utilisation pour des tests *in cellulo* ou *in vivo*. De plus le pH optimum d'émission du luminol est relativement élevé (pH optimum $\approx 11-13$) par rapport au pH physiologique se situant aux alentours de 7,4. À l'image des sondes bioluminescentes, l'utilisation du transfert d'énergie à des composés plus adaptés à la luminescence est donc une stratégie très utilisée.⁷⁰ Ces systèmes chimiluminescents fondés sur du transfert d'énergie de type CRET (pour Chemiluminescence Resonance Energy Transfer) peuvent utiliser des chromophores organiques,⁷¹ des polymères cationiques⁷² ou encore des quantum dots (QDs).⁷³ A ce propos, J.H Park *et al*⁷⁴ propose une sonde au luminol de type CRET fonctionnalisé par un QD composé de CdSeTe, lui-même fonctionnalisé par des chaînes PEG (Schéma 10). Le transfert d'énergie entre le motif chimiluminescent et le quantum dot leur permet d'imager le stress oxydatif *in vivo* avec une émission décalée vers le rouge (émission aux abords de 800 nm).

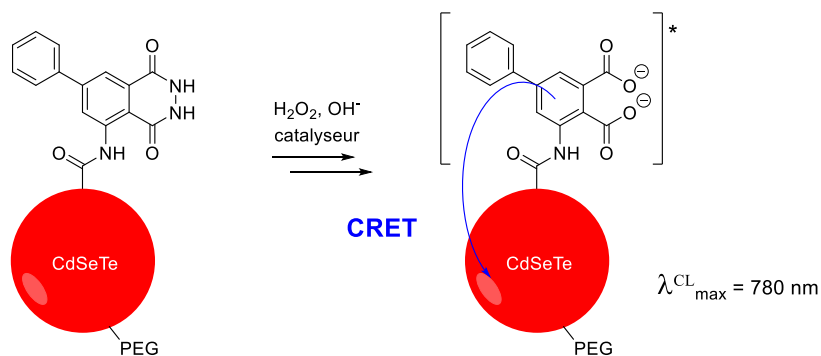


Schéma 10 Sonde CRET basée sur un système luminol - quantum dot.

69 LEE, J.; SELIGER, H. H. Quantum Yields of the Luminol Chemiluminescence Reaction in Aqueous and Aprotic Solvents. *Photochem Photobiol* **1972**, *15* (2), 227-237

70 Yang, Y.; Zhang, F. Activatable Chemiluminescent Molecular Probes for Bioimaging and Biosensing. *Anal Sens* **2021**, 1-16

71 Yuan, H.; Chong, H.; Wang, B.; Zhu, C.; Liu, L.; Yang, Q.; Lv, F.; Wang, S. Chemical molecule-induced light-activated system for anticancer and antifungal activities. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (32), 13184-13187

72 Zhang, Y.; Pang, L.; Ma, C.; Tu, Q.; Zhang, R.; Saeed, E.; Mahmoud, A. E.; Wang, J. Small molecule-initiated light-activated semiconducting polymer dots: An integrated nanoplatfom for targeted photodynamic therapy and imaging of cancer cells. *Anal Chem* **2014**, *86* (6), 3092-3099

73 Lee, E. S.; Deepagan, V. G.; You, D. G.; Jeon, J.; Yi, G. R.; Lee, J. Y.; Lee, D. S.; Suh, Y. D.; Park, J. H. Nanoparticles based on quantum dots and a luminol derivative: Implications for *in vivo* imaging of hydrogen peroxide by chemiluminescence resonance energy transfer. *Chem Commun* **2016**, *52* (22), 4132-4135

1.5.2. Basé sur les peroxyoxalates.

Les sondes chimiluminescentes basées sur l'utilisation d'un peroxyoxalate ne peuvent être que des sondes de type CRET, ou du moins basées sur un transfert d'énergie.⁷⁰ En premier lieu, le motif peroxyoxalate peut générer la dioxétanedione intermédiaire haut en énergie instable en milieu oxydant. Puis, la décomposition de cette espèce instable a pour effet de générer une espèce « chimiexcitée » capable de transférer son énergie à un accepteur luminescent (Schéma 11). Ce dernier est principalement issu de fluorophores organiques,⁷⁴ ainsi que de polymères semi-conducteurs.^{75,76} Le domaine d'émission de chimiluminescence dépend donc uniquement des propriétés photophysiques de l'accepteur. Néanmoins, le choix du composé émissif est contraint par le niveau énergétique de la dioxétanedione. Il ne semble malheureusement pas possible de sensibiliser directement un luminophore émettant directement dans le proche infrarouge.⁷⁰

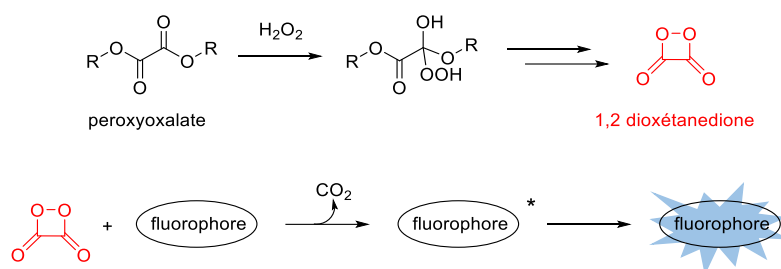


Schéma 11 Chimiluminescence basée sur le motif peroxyoxalate.

Cette approche de sonde chimiluminescente nécessite la conception de nanoparticules, d'architectures micellaires, intégrant le peroxyoxalate, ainsi que des composés luminescents. Ainsi, B.Liu *et al*⁷⁷ ont rapporté une application *in vivo* dans laquelle un système chimiluminescent peroxyoxalate est amalgamé à un fluorophore **TPE-BT-DC** connu pour ses propriétés d'émission augmentées par agrégation (AIE pour « Aggregation-Induced Emission »). Leur cohésion est maintenue par encapsulation en présence d'huile de palme dans une nanoparticule amphiphile conçue à l'aide du polymère pluronique F-127. Une première preuve de concept d'une utilisation duale en tant que biomarqueur de cellule cancéreuse, ainsi qu'outil thérapeutique par génération d'oxygène singulet y est décrite (Figure 20).

74 Mao, D.; Wu, W.; Ji, S.; Chen, C.; Hu, F.; Kong, D.; Ding, D.; Liu, B. Chemiluminescence-Guided Cancer Therapy Using a Chemiexcited Photosensitizer. *Chem* **2017**, *3* (6), 991-1007

75 Zhang, Y.; Pang, L.; Ma, C.; Tu, Q.; Zhang, R.; Saeed, E.; Mahmoud, A. E.; Wang, J. Small molecule-initiated light-activated semiconducting polymer dots: An integrated nanoplatfrom for targeted photodynamic therapy and imaging of cancer cells. *Anal Chem* **2014**, *86* (6), 3092-3099

76 Singh, A.; Seo, Y. H.; Lim, C. K.; Koh, J.; Jang, W. D.; Kwon, I. C.; Kim, S. Biolighted Nanotorch Capable of Systemic Self-Delivery and Diagnostic Imaging. *ACS Nano* **2015**, *9* (10), 9906-9911

77 Mao, D.; Wu, W.; Ji, S.; Chen, C.; Hu, F.; Kong, D.; Ding, D.; Liu, B. Chemiluminescence-Guided Cancer Therapy Using a Chemiexcited Photosensitizer. *Chem* **2017**, *3* (6), 991-1007

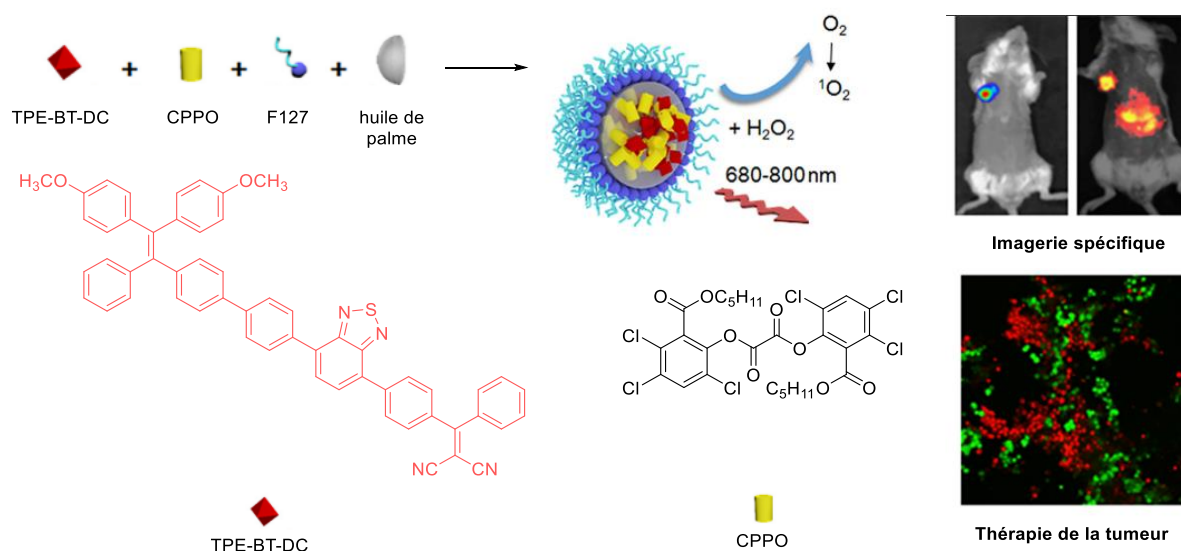


Figure 20 Sonde théranostique chimiluminescente basée sur l'utilisation d'un peroxyoxalate (figure adaptée).⁷⁷

1.5.3. Basées sur le motif imidazopyrazinone.

L'emploi de sondes chimiluminescentes fondées sur un motif imidazopyrazinone est inspiré de la coelentérazine présentée dans la section I.III.1.2. Ce motif a pour avantage de pouvoir effectuer de la chimiluminescence en milieu neutre selon un mécanisme similaire aux coelentérazines (*cf* Schéma 2). Cependant, tout comme le luminol, son émission de chimiluminescence se situe dans la région du bleu, hors de la fenêtre d'imagerie *in vivo*. L'obtention d'un spectre d'émission vers les plus grandes longueurs d'onde a donc été réalisée à l'aide du transfert d'énergie CRET ou TBET. C'est le cas de la sonde à anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) **31** qui permet de décaler l'émission de la plateforme chimiluminescente dans le vert (545 nm) *via* l'utilisation d'un bodipy (Schéma 12).⁷⁸ En outre, la sonde **30** utilise un motif tétraphényléthylène (TPE) combiné à deux motifs chimiluminescents imidazopyrazinone pour augmenter son efficacité de chimiluminescence.⁷⁹ Enfin, B.Tang *et al*⁸⁰ ont également réalisés une sonde à $\text{O}_2^{\bullet-}$ par nanoprécipitation basée sur le motif imidazopyrazinone greffé sur le polymère PFBT jouant le rôle d'accepteur. La limite de détection de cette sonde **32** est estimée à 19,3 pM ce qui permet de quantifier correctement la concentration très faible d'anion superoxyde (Schéma 12).

78 Sekiya, M.; Umezawa, K.; Sato, A.; Citterio, D.; Suzuki, K. A novel luciferin-based bright chemiluminescent probe for the detection of reactive oxygen species. *Chem Commun* **2009**, No 21, 3047-3049

79 Niu, J.; Fan, J.; Wang, X.; Xiao, Y.; Xie, X.; Jiao, X.; Sun, C.; Tang, B. Simultaneous Fluorescence and Chemiluminescence Turned on by Aggregation-Induced Emission for Real-Time Monitoring of Endogenous Superoxide Anion in Live Cells. *Anal Chem* **2017**, *89* (13), 7210-7215

80 Li, P.; Liu, L.; Xiao, H.; Zhang, W.; Wang, L.; Tang, B. A New Polymer Nanoprobe Based on Chemiluminescence Resonance Energy Transfer for Ultrasensitive Imaging of Intrinsic Superoxide Anion in Mice. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (9), 2893-2896

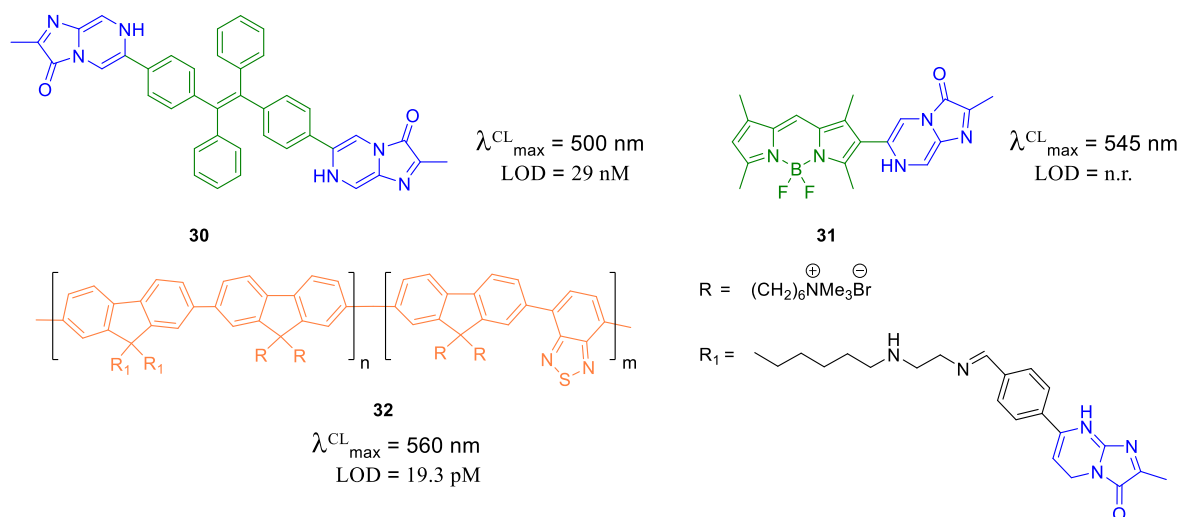


Schéma 12 Sonde à anions $\text{O}_2^{\bullet -}$ chimiluminescente imidazopyrazinone, (n.r. ; non renseigné).

1.5.4. Basées sur le motif phénol 1,2 dioxétane.

Toutes les sondes chimiluminescentes présentées précédemment ont pour inconvénient d'être activées par des espèces réactives de l'oxygène. Ces sondes permettent de s'affranchir de l'ingénierie génétique nécessaire à la mise en place de systèmes bioluminescents. Cependant, le traçage d'autres analytes biologiques d'intérêt (e.g. les enzymes) est plus complexe. Le Pr. Schaap et son équipe a permis de remédier à ce problème grâce à la rationalisation d'une nouvelle classe de sondes chimiluminescentes basées sur un motif phénol – 1,2 dioxétane.^{81,82,83} L'exemple le plus cité dans la littérature est la sonde pour la détection de l'anion fluorure. Une étude structurale de cette molécule permet de définir trois motifs fonctionnels nécessaires à la réalisation d'une telle sonde chimiluminescente (Schéma 13). **Une fonction phénol masquée** positionnée en *méta* du cycle 1,2-dioxétane est capable, lorsqu'elle est déprotégée et déprotonée, d'enclencher le mécanisme CIEEL, faisant office d'un motif déclencheur de chimiluminescence. Dans cet exemple c'est un groupement **terbutyldiméthylsilyloxy** qui permet masquer le phénol et d'obtenir de la chimiluminescence en présence de fluorures qui conduit à la coupure de la liaison O-Si. Le **cycle 1,2-dioxétane est la source d'énergie** de la molécule permettant *in fine* la génération d'une espèce excitée, et **il doit être stabilisé** afin de ne pas se décomposer spontanément à température ambiante. En utilisant un **groupement adamantyl**, bien connu dans la littérature pour cette utilisation,⁸⁴ le groupe réalisa les premières sondes **33**,⁸² **34**,⁸¹ et **35**⁸³ permettant respectivement de détecter l'anion fluorure, des estérases ou la phosphatase alcaline.

81 Schaap, A. P.; Sandison, M. D.; Handley, R. S. Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. 3: alkaline phosphatase-catalyzed chemiluminescence from an aryl phosphate-substituted dioxetane. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28* (11), 1159-1162

82 Schaap, A. P.; Chen, T.; Handley, R. S. Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes 2. : Fluoride-Induced chemiluminescence from tert-butyl dimethylsilyloxy-substituted dioxetanes. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28* (11), 1155-1158

83 Schaap, A. P.; Handley, R. S.; Giri, B. P. Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. 1: Aryl esterase-catalyzed chemiluminescence from a naphthyl acetate-substituted dioxetane. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28* (9), 935-938

84 Schuster, G. B.; Turro, N. J.; Steinmetzer, H. C.; Schaap, A. P.; Faler, G.; Liu, J. C.; Adam, W. Adamantylideneadamantane-1,2-dioxetane. An Investigation of the Chemiluminescence and Decomposition kinetics of an Unusually Stable 1,2-Dioxetane. *J Am Chem Soc* **1975**, *97* (24), 7110-7118

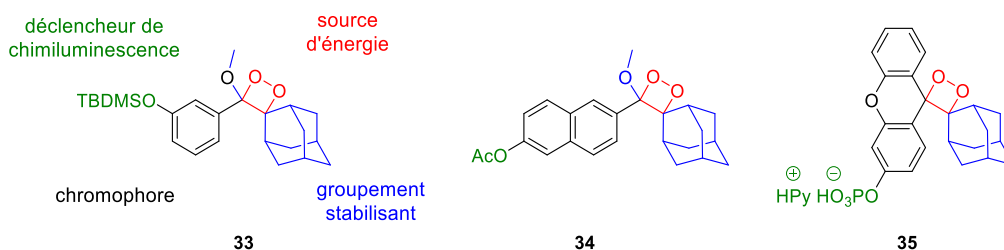


Schéma 13 Premières sondes à motif 1,2 dioxétane de Schaap et al, pour la détection d'anions fluorures, d'estérases et de phosphatases alcalines.

Un état de l'art plus exhaustif des sondes à motif 1,2 dioxétane sera développé au cours des chapitres suivants. Auparavant, il convient de faire une brève mise en perspective de l'imagerie optique dans le domaine médical.

IV. L'imagerie moléculaire dans le domaine médical.

1. Généralités.

L'origine de toutes les techniques d'imagerie actuelles a pour source la découverte des rayons X en 1895 par le premier prix Nobel de Physique, Wilhem Röntgen. Durant le XX^{ème} siècle, différentes techniques ont été développées et ont permis l'avancée de nos connaissances et techniques médicales, et plus généralement, nos connaissances dans le domaine de la biologie. La recherche constante du progrès a permis l'émergence de techniques d'imagerie moléculaire permettant d'accroître la compréhension fonctionnelle des gènes, protéines, et autres objets prenant part aux nombreux processus biologiques.

Aujourd'hui, la description précise de ces nombreux processus biochimiques amène une différenciation de l'état d'avancement d'une même maladie pour différents patients et donc une thérapie personnalisée. C'est l'avènement de la « médecine personnalisée » ou « médecine de précision ». Par exemple, en oncologie, l'utilisation de l'imagerie moléculaire à l'aide de biomarqueurs peut permettre l'évaluation de caractéristiques moléculaires de la tumeur permettant une thérapie plus ciblée.^{85,86} Un des aspects en faveur du développement de l'imagerie moléculaire est son faible coût, intrinsèque à certaines techniques, également due à la diminution de l'utilisation de cobayes animaux pour les études *in vivo*. En effet, la multiplicité des données recueillies lors d'une étude, ainsi que l'utilisation de méthodes non-invasives permettant un suivi dans le temps, augmentent l'efficacité de compréhension d'une pathologie sans augmenter le nombre d'animaux nécessaires.⁸⁷

Comme mentionné plus tôt, l'essor de l'imagerie moléculaire est aussi dû au développement des biomarqueurs. Ces unités à l'échelle moléculaire ont pour objectif d'observer certains paramètres spécifiques d'un environnement biologique à l'échelle cellulaire permettant dans les cas idéaux : d'identifier de nouvelles anomalies moléculaires ou physiologiques, de mettre au point et/ou ajuster un traitement (en temps réel dans le cas d'un cancer par exemple), et enfin de développer de nouveaux médicaments.

85 Mahmood, U.; Weissleder, R. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol Cancer Ther* **2003**, 2 (5), 489-496

86 Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **2008**, 452 (7187), 580-589

87 Weissleder, R. Molecular imaging in cancer. *Science (80-)* **2006**, 312 (5777), 1168-1171

Dans un premier temps, nous décrirons brièvement les différentes méthodes d'imagerie connues à ce jour afin de mettre en perspective l'utilisation de l'imagerie optique. Ensuite, nous présenterons plus en détails la technique d'imagerie optique.

2. Description des différentes techniques d'imagerie moléculaire.

Il est possible de dissocier les techniques d'imagerie en deux grandes catégories : l'imagerie médicale, permettant une étude (ou un diagnostic) à une échelle macroscopique ou anatomique, et l'imagerie biologique, ciblant les composants du vivant à l'échelle microscopique voire moléculaire. A l'échelle macroscopique, on peut classer les modalités basées sur l'utilisation des rayons X avec la tomodensitométrie (CT pour « X-Ray Computed Tomography »), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), ou encore l'utilisation des ondes sonores pour l'échographie. Ces trois techniques sont aujourd'hui très utilisées dans les études cliniques, car elles sont relativement non invasives (dépendamment de l'utilisation d'agents de contraste). L'imagerie dite biologique correspond au terme d'imagerie moléculaire introduit en amont. Ce champ de l'imagerie inclut des modalités telles que la Tomographie par Emission Mono-Photonique, (TEMP, ou SPECT en anglais pour « Single-Photon Emission Computed Tomography »), la Tomographie par Emission de Positons (TEP, ou PET en anglais pour « Positron Emission Tomography ») *via* la détection de rayonnement γ , ainsi que l'imagerie optique regroupant toutes les classes de luminescence. Le Tableau 2 met en lumière la porosité entre les techniques d'imagerie médicale, et celles usuellement destinées à la l'imagerie moléculaire. Par exemple, l'imagerie optique peut également être utilisée dans le cadre d'une étude physiologique, et à l'inverse, l'échographie est également employable dans le domaine de l'imagerie moléculaire.

| Modalités | Phénomène Physique | Profondeur | Echelle | Résolution Spatiale | Cout |
|-------------|----------------------|-------------------------------|--|---|------|
| IRM | Champ Magnétique | Pas de limite | Anatomique, physiologique, moléculaire | 25 μ M -100 μ M (pré-clinique) 1 mm (clinique) | €€€ |
| CT | Rayonnement X | Pas de limite | Anatomique, physiologique | 50 μ M | €€ |
| Echographie | Ondes sonores | Quelques dizaines de cm au cm | Anatomique, physiologique, moléculaire | Quelques mm au dixième de mm | € |
| TEMP | Rayonnement γ | Pas de limite | Physiologique, moléculaire | 1-2 mm | €€ |
| TEP | Rayonnement γ | Pas de limite | Physiologique Moléculaire | 1-2 mm | €€€ |
| Optiques | Luminescences | < 2 cm | Physiologique, moléculaire | 2-3 mm 1-10 μ m (NIRF) | € |

Tableau 2 Résumé des différentes méthodes d'imagerie dans le domaine bio médicale.^{86,88}

La tomodensitométrie (TDM) est une méthode reposant sur les rayonnements ionisants X. Ces radiations peuvent être obtenues en provoquant une transition électronique de couches électroniques internes proche du noyau atomique. Ces ondes électromagnétiques sont très énergétiques et pénètrent bien la matière organique (la peau, la graisse, et les muscles sont peu opaques aux rayons X). En revanche, les rayons X sont absorbés par les os créant *de facto* un contraste. La TDM est apparue avec le développement de l'informatique dans les années 70. En effet, la TDM, aussi appelée tomographie axiale calculée par ordinateur (traduction du terme CT) permet l'obtention d'images en 3D, et non plus

88 Geraldès, C. F. G. C. Introduction to infrared and raman-based biomedical molecular imaging and comparison with other modalities. *Molecules* **2020**, *25* (23)

d'un simple cliché. La TDM est limitée par l'utilisation de ses agents de contraste (l'iode, BaSO₄ ou CO₂), à haute concentration (de l'ordre du millimolaire), rendant cette modalité un peu plus invasive.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une modalité basée sur l'utilisation du champ magnétique. Cette technique est une extension de la méthode de caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), très utile aux chimistes organiciens. L'utilisation d'un puissant champ magnétique permet d'induire l'alignement des spins nucléaires. Par la suite, l'application de champs magnétiques oscillants, appelés « radiofréquence », conduit à un phénomène de précession des spins lors de leur retour à leur position d'équilibre. Ce phénomène est transcrit en signal électrique, puis traité informatiquement en une image en trois dimensions d'ordre structurelle. Ces images, utilisant les atomes d'hydrogène de l'eau pour le signal RMN, permettent d'obtenir des informations anatomique ou physiologique, amenant à la détection d'anomalies. Le développement d'agents de contraste spécifiques (à base de lanthanide dont le gadolinium, ou de nanoparticules) a permis de développer l'utilisation de l'IRM à l'échelle cellulaire, par observation uniquement des molécules d'eau liées au Gd ou des atomes de la nanoparticule.⁸⁹ En résumé, l'IRM est une méthode très polyvalente, combinant résolution et absence de limite quant à la profondeur de l'analyse.

Basée sur le développement des premiers sonars pendant la première guerre mondiale, l'échographie est également une méthode très utilisée dans le domaine clinique. A l'aide d'ondes sonores à haute fréquence (de l'ordre du MHz), il est possible d'obtenir des images détaillées résultant de l'écho obtenu et traité de façon informatique. Cette modalité, sans danger, permet une utilisation *in vivo* pour visualiser le flux sanguin ou le mouvement des organes en temps réel. Néanmoins, sa capacité pénétrante peut être limitée par rapport à l'IRM, rendant son utilisation plus difficile pour des individus en surpoids ou des zones trop profondes à imager. La résolution spatiale augmente en fonction de la fréquence utilisée, permettant d'atteindre des images avec une définition de l'ordre du dixième de millimètre. En revanche, la pénétration des ondes sonores diminue à mesure que la fréquence augmente. Ainsi, l'échographie à haute fréquence peut également être utilisée pour de l'imagerie dite moléculaire.

Enfin la *Tomographie par Emission Monophotonique* (TEMP) et la *Tomographie par Emission de Positron* (TEP) sont toutes deux basées sur la détection de rayonnement gamma en provenance de radio isotopes ou radiotraceurs. La TEMP permet de trianguler un signal radioactif à l'aide d'un détecteur en constante rotation. En raison de l'utilisation d'un collimateur pour minimiser l'effet de dispersion des photons, cette technique est peu sensible. En effet, on estime à 1 % la quantité des radiations atteignant le capteur.⁹⁰ Les biomarqueurs utilisés ont été développés avec les éléments ^{99m}Tc, ¹¹¹In, possédant des périodes de décroissance lentes (de l'ordre de quelques heures à quelques jours) pour optimiser leurs utilisations dans le domaine clinique.⁹¹ La TEP se distingue de la TEMP car la décomposition de l'atome radioactif conduit à la production d'un positron, qui, après un parcours dans l'organisme dont la longueur dépend de l'atome émetteur, est annihilé en présence d'un électron. Cette réaction conduit à l'émission simultanée de deux photons avec un angle de 180 degrés. L'image est plus précise par

89 Que, E. L.; Chang, C. J. Responsive magnetic resonance imaging contrast agents as chemical sensors for metals in biology and medicine. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (1), 51-60

90 Gomes, C. M.; Abrunhosa, A. J.; Ramos, P.; Pauwels, E. K. J. Molecular imaging with SPECT as a tool for drug development. *Adv Drug Deliv Rev* **2011**, *63* (7), 547-554

91 Parrott, M. C.; Rahima Benhabbour, S.; Saab, C.; Lemon, J. A.; Parker, S.; Valliant, J. F.; Adronov, A. Synthesis, radiolabeling, and bio-imaging of high-generation polyester dendrimers. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (8), 2906-2916

détection simultanée des 2 photons. Les radio isotopes utilisés tels que le fluor 18 (période radioactive de 110 minutes)⁹² et le carbone 11 (période de 21 minute)⁹³ permettent l'émission d'un positon, qui lors de sa collision avec un électron produit cette émission biphotonique dans le domaine du rayonnement gamma. Grâce à cette bi-émission, l'utilisation d'un collimateur n'est plus nécessaire, augmentant *de facto* la sensibilité de cette modalité. C'est l'une des modalités les plus populaires ces dernières années, le principal radio marqueur utilisé actuellement étant le ¹⁸F-fluorodesoxyglucose ([¹⁸F]-FDG), permettant de visualiser des cancers grâce à la surconsommation du glucose par les cellules malignes.⁹⁴

Le descriptif non exhaustif des différentes modalités a mis en lumière les principaux avantages et inconvénients. La modalité idéale n'existe pas, et même si certaines d'entre elles peuvent bénéficier d'une plus grande polyvalence, la suite logique du développement de l'imagerie médicale est le développement d'appareils multi modaux.⁹⁵ Ainsi, des imageurs TEP-CT ou bien TEP-IRM sont apparus, induisant le développement de biomarqueurs bimodaux. Un des problèmes majeurs de cette nouvelle approche est la différence de sensibilité qu'il peut y avoir entre les différentes techniques.

3. L'imagerie optique

En introduction, il convient de rappeler que l'enjeu principal de toutes les techniques d'imagerie est l'obtention d'un contraste entre l'objet à observer et le milieu environnant. Toutes les stratégies élaborées pour obtenir une meilleure résolution visent à améliorer le contraste. L'imagerie optique utilise les photons se trouvant dans la partie visible et proche infrarouge du spectre des ondes électromagnétiques. Dans un premier temps, le phénomène d'absorption *via* les premiers microscopes optiques a été utilisé. Ensuite, les différents phénomènes de luminescence ont permis d'augmenter la sensibilité de cette modalité. Ces dernières années, l'imagerie par fluorescence est une méthode qui a retenu beaucoup d'attention. En effet, son caractère non invasif, sa simplicité de mise en œuvre couplée à sa bonne résolution spatiale et temporelle, ainsi que son faible coût sont autant d'arguments permettant son développement. De plus, il est à souligner le développement de nombreuses sondes moléculaires capables de fournir des informations (parfois multiples en travaillant à plusieurs longueurs d'onde) au niveau cellulaire.^{96,97}

L'une des problématiques majeures de l'imagerie optique est la pénétration tissulaire des photons, dans le domaine du visible. De nombreux phénomènes peuvent perturber la trajectoire des photons émis. La dispersion des photons, l'anisotropie des milieux biologiques ainsi que l'absorption de la lumière par les tissus environnants sont autant de difficultés à surmonter afin d'obtenir une meilleure visualisation des objets étudiés. Une des solutions réside dans l'utilisation de sondes émettant dans le domaine du proche Infra Rouge (IR) ou de l'infrarouge. En effet, l'absorption des différents composés présents dans l'organisme (principalement l'hémoglobine) se situe plutôt dans le domaine de l'UV proche et la région

92 Krishnan, H. S.; Ma, L.; Vasdev, N.; Liang, S. H. ¹⁸F-Labeling of Sensitive Biomolecules for Positron Emission Tomography. *Chem - A Eur J* **2017**, *23* (62), 15553-15577

93 Pimlott, S. L.; Sutherland, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (1), 149-162

94 National, G.; Pillars, H. Fluorinated tracers for imaging cancer with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2004**, *31*, 1182-1206

95 Lee, D. E.; Koo, H.; Sun, I. C.; Ryu, J. H.; Kim, K.; Kwon, I. C. Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chem Soc Rev* **2012**, *41* (7), 2656-2672

96 Yao, J.; Yang, M.; Duan, Y. Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. *Chem Rev* **2014**, *114* (12), 6130-6178

97 Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 2620-2640

bleue du spectre de la lumière visible. De plus, au-delà de 900 nm, l'absorption de l'eau commence à devenir problématique. Utiliser des sondes fluorogéniques émettant dans le proche-IR permet dans beaucoup de cas d'utiliser une longueur d'onde d'excitation proche de ces mêmes régions. Cela a pour avantage de diminuer le phénomène d'auto-fluorescence des tissus des groupements fluorogéniques présents dans les milieux biologiques, améliorant drastiquement le rapport signal sur bruit lors d'une imagerie par fluorescence.

En résumé, le cahier des charges d'une « bonne » sonde luminescente nécessite que ces molécules soient stables, hydrosolubles, non cytotoxiques, brillantes dans l'eau à pH physiologique. De plus, dans le cadre d'une utilisation *in vivo*, ces sondes luminescentes doivent absorber et émettre dans la fenêtre de transparence biologique qui correspond au proche infrarouge. Cette fenêtre est définie par deux critères principaux 1) l'auto-fluorescence des tissus biologique dans le domaine bleu et vert du visible créant des signaux fluorescents parasites et 2) l'absorption des tissus biologiques et de l'eau qui réduisent considérablement l'intensité du signal d'intérêt. Cette fenêtre de transparence biologique s'étend de 600 nm à 900 nm.⁹⁷ Sur ce point, la chimiluminescence et la bioluminescence se distinguent de la photoluminescence grâce à l'obtention d'une espèce excitée, capable d'émettre un photon, sans apport externe d'un autre photon. L'absence de source excitatrice permet de s'affranchir complètement du phénomène d'auto-fluorescence des tissus biologiques. L'utilisation de la chimiluminescence ou de la bioluminescence permet d'augmenter *de facto* le rapport signal sur bruit par rapport à la photoluminescence.

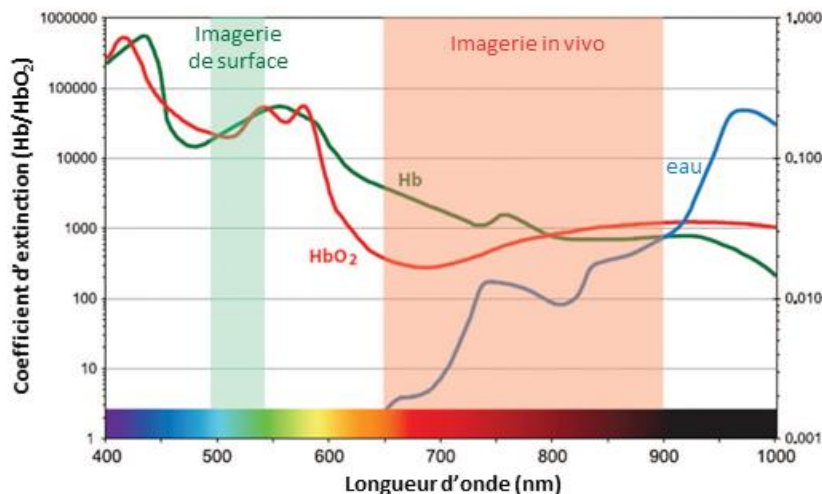


Figure 21 Spectres d'absorption UV-visible IR de l'hémoglobine, de l'oxyhémoglobine, et de l'eau. Représentation des fenêtres de transparence biologique (figure adaptée).⁹⁷

Aujourd'hui, la faible pénétration des rayons lumineux dans l'organisme limite l'utilisation de sondes fluorescentes dans le domaine clinique à l'assistance à la chirurgie (sondes permettant de marquer spécifiquement des zones tumorales à enlever). L'imagerie optique reste principalement utilisée en recherche pré-clinique.

V.Introduction au projet de thèse.

Dans cette introduction, nous avons pu constater que l'essor de l'imagerie optique accroît la demande de biomarqueurs luminescents, en particulier pour des applications *in vivo*. Les points clés requis pour la conception de telles sondes sont :

- 1) Une pénétration du signal en profondeur, ce qui implique une luminescence dans la région du proche-infrarouge / infrarouge.
- 2) Une bonne hydrosolubilité.
- 3) Un rapport signal sur bruit le plus élevé possible ce qui induit la mise en place de stratégies pour diminuer l'autofluorescence des tissus.

Pour ce faire, l'imagerie de bioluminescence a en partie répondu à ces critères grâce à l'absence de source excitatrice. Cependant, l'usage de la bioluminescence nécessite l'emploi de la manipulation génétique, ce qui complique la mise en œuvre de l'imagerie. En ce sens, les sondes chimiluminescentes apparaissent avantageuses puisqu'elles permettent de s'affranchir de cette ingénierie génétique. Par ailleurs, la conception des sondes chimiluminescentes dites activables (le Pr. Schaap étant un des pionniers en la matière), a ouvert la voie à la détection de nouveaux analytes.

Ainsi, les objectifs de ce projet de thèse sont la synthèse et l'étude de sondes chimiluminescentes basées sur le motif phénol 1,2-dioxétane de Schaap, capables de détecter une ou plusieurs activités enzymatiques *in vivo*. La première stratégie repose sur la fonctionnalisation de la plateforme chimiluminescente par un complexe de lanthanide afin d'obtenir une émission dans la région du proche infrarouge. Dans un premier temps, la nitroréductase est l'enzyme ciblée pour la réalisation d'une première preuve de concept. L'utilisation d'un fluorophore pour améliorer les propriétés chimiluminescentes (émissions décalées, rendement quantique augmenté) est une stratégie ayant déjà fait ses preuves par le biais du FRET. La conception de sonde fluorescente TBET a démontré la possibilité d'obtenir des rendements de transfert d'énergie bien plus élevé que dans le cas du FRET. Pour ces raisons, la deuxième stratégie s'appuie sur le transfert d'énergie à travers les liaisons (TBET). Les deux stratégies énoncées précédemment s'appuient en partie sur les expériences passées du laboratoire. Enfin, la troisième stratégie se fonde sur les derniers travaux du Pr Shabat et son équipe sur l'extension du système π conjugué de la plateforme chimiluminescente.

Dans le chapitre 2, l'état de l'art traitera plus en détails des fondamentaux de la conception d'une sonde à motif 1,2-dioxétane grâce aux travaux du Pr Schaap et du Pr Matsumoto. Ensuite, nous présenterons nos travaux concernant la fonctionnalisation de la plateforme chimiluminescente par un complexe de lanthanide. Cette stratégie a été développée en collaboration avec le Dr. Philippe Durand de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles UPR CNRS 2301 à Gif sur-Yvette.

Enfin, un état de l'art exhaustif des innovations récentes des sondes de Schaap sera présenté dans le dernier chapitre principalement par le biais des travaux du Pr. Doron Shabat et son équipe. Cette mise en contexte permettra de présenter nos travaux réalisés pour la conception de cassettes chimiluminescente TBET.

Chapitre 1 : Développement de sondes chimiluminescentes fonctionnalisées par un complexe de lanthanide pour la détection dans le proche IR de la nitroréductase.

I. État de l'art.

1. Elaboration d'une sonde 1,2-dioxétane de type Schaap.

L'utilisation d'une sonde de type 1,2-dioxétane nécessite que deux conditions clés soient réunies. D'une part, le motif 1,2-dioxétane faisant office de source d'énergie doit être suffisamment stable dans le temps pour qu'il n'y ait pas une émission spontanée de chimiluminescence ou dégradation de la sonde. D'autre part, la décomposition de ce même motif doit être contrôlée et déclenchée *via* la modification d'un groupement chimique électrodonneur présent sur la sonde. Ainsi, la Figure 22 résume les différents constituants nécessaires dans la conception d'une sonde 1,2-dioxétane.

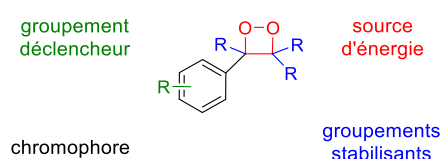


Figure 22 Représentation schématique des différents constituants d'une sonde 1,2-dioxétane.

Dans cette section nous évoquerons les travaux fondateurs sur les sondes chimiluminescentes à motif 1,2-dioxétane. Nous commencerons par une brève introduction sur les différentes voies d'accès au motif 1,2-dioxétane ainsi que les différents groupements stabilisants de ce cycle peroxyde contraint. Puis, l'étude des travaux du Pr. Matsumoto et son équipe nous permettront d'illustrer les possibilités de modulation du groupement déclencheur, ainsi que la relation entre la position de ce groupement et celle de la source d'énergie. Nous décrirons ensuite les travaux du Pr. Schaap, pionnier dans le développement de sondes de type 1,2-dioxétane pour la détection d'une activité enzymatique.

1.1 Synthèse du motif 1,2-dioxétane.

La synthèse du tétraméthyl-1,2-dioxétane **TMD** rapportée par Kopecky et Mumford est la première voie d'accès au motif 1,2-dioxétane, lequel a été obtenu *via* une cyclisation intramoléculaire.^{36,98} Dans ce cas, la formation du cycle intervient à la suite d'une hydroperoxydation et bromation d'un alcène suivi par une substitution nucléophile intramoléculaire. Peu de temps après, Bartlett et Schaap⁹⁹ ainsi que Mazur et Foote¹⁰⁰ proposèrent simultanément comme voie d'accès alternative la cycloaddition [2+2] du dioxygène singulet sur un alcène. Cette seconde voie permet l'accès au motif dioxétane dans des conditions plus douces. En effet, la génération d'oxygène singulet peut s'effectuer *via* la présence d'un photosensibilisateur (i.e. un chromophore générant des états triplets), ce qui évite l'étape d'hydroperoxydation/bromation. L'oxygène singulet qui s'additionne sur la double liaison est alors obtenu par annihilation triplet-triplet entre le photosensibilisateur (PS) et l'oxygène triplet (état fondamental du dioxygène moléculaire). Les PS peuvent être assimilés à des fluorophores inefficaces

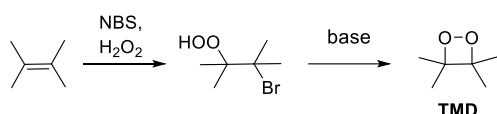
98 Adam, W. The Chemistry of 1,2-Dioxetanes. *Adv Heterocycl Chem* **1977**, 21 (C), 437-481

99 Schaap, A. P.; Bartlett, P. D. Stereospecific formation of 1,2-dioxetanes from cis- and trans-diethoxyethylenes by singlet oxygen. *J Am Chem Soc* **1970**, 92 (10), 3223-3225

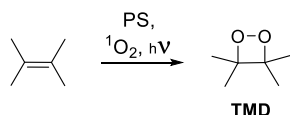
100 Foote, C. S.; Mazur, S. Chemistry of singlet oxygen. IX. Stable dioxetane from photooxygenation of tetramethoxyethylene. *J Am Chem Soc* **1970**, 92 (10), 3225-3226

puisque'ils doivent favoriser la génération d'états triplets. C'est le cas du bleu de méthylène, du rose de bengale ou encore de la tétraphénylporphyrine qui sont des PS couramment utilisés.

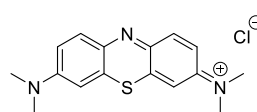
Cyclisation éliminatrice



Photocycloaddition [2+2]



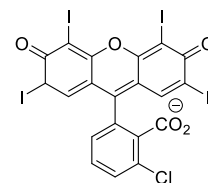
PS :



Bleu de méthylène

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 660 \text{ nm}$$

$$\Phi_{\Delta(\text{MeOH})}^* = 0,5$$



Rose de Bengale

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} = 559 \text{ nm}$$

$$\Phi_{\Delta(\text{MeOH})}^* = 0,76$$

Schéma 14 voies d'accès au motif 1,2-dioxétane, et PS couramment utilisés (Φ_{Δ} rendement quantique de génération d' $^1\text{O}_2$)¹⁰¹

Il est intéressant de noter que l'utilisation de trioxaphosphétane généré *in situ* à partir d'un phosphite et d'ozone peut également générer du dioxygène singulet lors de sa décomposition.¹⁰² Cela peut être une alternative utile à la photo-cycloaddition dans le cas de composés photosensibles.

1.2 Sélection des groupements stabilisants.

La faible stabilité du cycle dioxétane peut être expliquée par sa forte tension de cycle ainsi que la présence de la liaison peroxyde, plus fragile qu'une liaison C-C. Plusieurs mécanismes pour la décomposition thermique du motif dioxétane ont été postulés. Ils impliquent tous une torsion du cycle lors d'un état de transition amenant à une rupture de la liaison peroxyde. La synthèse du dioxétane adamantylideneadamantane **36** a permis de mettre en avant les propriétés stabilisantes du groupement adamantyle vis-à-vis du cycle dioxétane.¹⁰³ Ici, la stabilisation du cycle provient de l'encombrement stérique généré par le groupement stabilisant permettant de limiter les degrés de liberté de torsion du cycle dioxétane. D'autre part, la multiplication d'exemples a mis en lumière l'efficacité de la stabilisation du cycle par des groupements à effet inductif donneur. Ainsi, le motif adamantyle tel que celui présent sur le composé **33** est le groupement le plus populaire dans la conception de sondes chimiluminescentes. Son temps de demi-vie à 25°C est estimé à environ 3,8 années (Figure 23).⁸² Initialement, la mesure de la stabilité des différents dioxétanes a été caractérisé par la mesure de l'énergie d'activation nécessaire à l'ouverture du cycle en s'appuyant sur la loi d'Arrhenius.¹⁰⁴ Par la suite, toujours issu de la loi d'Arrhenius, le temps de demi-vie à 25°C fut introduit pour permettre la comparaison entre les différents groupements stabilisants.

Une brève analyse de la littérature permet de rendre compte de l'efficacité stabilisante d'une seconde classe de motif de type dihydrofurane utilisés dans les composés **38**, **39** et **40** (Figure 23) développés par le Pr Matsumoto *et al.*¹⁰⁵ Cette classe de motif augmente de façon significative la stabilité thermique

101 DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* **2002**, 233-234, 351-371

102 Zielinski, M. B.; Stephenson, L. M. Transfer of oxygen (O_2) from triphenyl phosphite ozonide to alkyl-substituted olefins. *J Am Chem Soc* **1982**, 104 (21), 5819-5820

103 Schuster, G. B.; Turro, N. J.; Steinmetzer, H. C.; Schaap, A. P.; Faler, G.; Liu, J. C.; Adam, W. Adamantylideneadamantane-1,2-dioxetane. An Investigation of the Chemiluminescence and Decomposition kinetics of an Unusually Stable 1,2-Dioxetane. *J Am Chem Soc* **1975**, 97 (24), 7110-7118

104 Adam, W.; Bogan, D. J.; Faulkner, L. R.; Glass, R. S.; Horn, K. A.; Kopecky, K. R.; Quina, F. H.; Schuster, G. B. *Chemical and Biological Generation of Excited States*; 1982

105 Matsumoto, M.; Watanabe, N.; Kasuga, N. C.; Hamada, F.; Tadokoro, K. Synthesis of 5-Alkyl-1-aryl-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptanes as a chemiluminescent substrate with remarkable thermal stability. *Tetrahedron Lett* **1997**, 38 (16), 2863-2866

du cycle. Cependant, le rendement quantique de chimiluminescence peut être affecté par ces différents groupements.

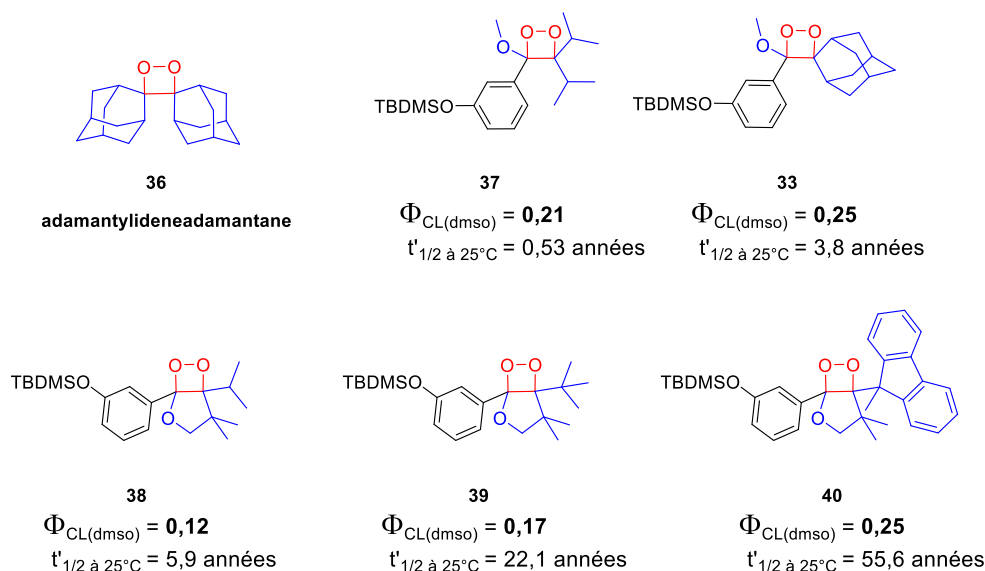


Figure 23 Groupements stabilisants (en bleu) utilisés pour le motif 1,2-dioxétane.

Au sein du laboratoire, une expertise a été acquise sur ces deux grandes classes de motifs. Nous reviendrons par la suite sur le choix que nous avons fait d'utiliser le groupement adamantyle, moins stable mais plus facilement accessible d'un point de vue synthétique.

1.3 Travaux du Prof. M Matsumoto : synthèse et développement de nouveaux chimiluminophores de type 1,2-dioxétane.

Dans la sous-section précédente nous avons introduit le paramètre de stabilité thermique associé aux principaux groupements stabilisants utilisés dans les chimiluminophores à structure 1,2-dioxétane. Bien que ces derniers exercent une influence non négligeable sur l'efficacité de chimiluminescence, la modification du groupement faisant office de déclencheur et/ou le chromophore, permettent également de moduler l'intensité de la chimiluminescence. Cette efficacité est principalement caractérisée par le rendement quantique de chimiluminescence. Cependant, l'utilisation de processus tel que le CRET met également en avant le rendement quantique de génération d'états excités S_1 (appelé aussi rendement de chimiexcitation Φ_s). Le dernier paramètre clé utilisé pour caractériser un chimiluminophore est son temps de demi-vie de chimiluminescence ($t_{1/2}$).

Entre les années 90 et la première décennie du 21^{ème} siècle le Pr Matsumoto et son équipe ont fourni un travail considérable dans la compréhension fondamentale des chimiluminophores de type 1,2-dioxétane. Les notions de base pour la conception d'un chimiluminophore seront abordées au travers d'un bref état de l'art de ses travaux.

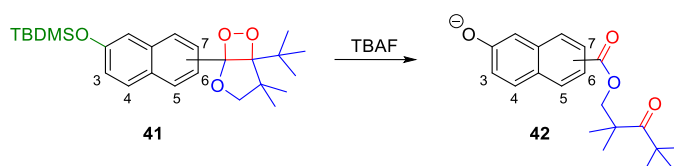
1.3.1. La relation Odd – Even.

Initialement mis en lumière par le Dr. Bronstein *et al*¹⁰⁶ sur un motif dioxétane naphthol, la relation « Odd-Even » (pair-impair) évoquant le nombre de carbone entre le groupement électrodonneur et le motif

106 Bronstein, I.; Voyta, J. C.; Sparks, A.; Edwards, B. Unusual Luminescent Properties of Odd- and Even-substituted Naphthyl derivatized Dioxetanes. *J Biolumin Chemilumin* 1990, 5, 1-4

1,2-dioxétane a été étudié en profondeur par le Pr Matsumoto et son équipe. Cet effet met en avant la relation entre l'architecture et les caractéristiques fondamentales du chimiluminophore. Comme le montre l'étude du naphthol 1,2-dioxétane stabilisé par un groupement dihydrofurane,¹⁰⁷ les composés ayant un nombre d'atomes impair (*i.e.* « effet odd ») séparant la fonction phénol du motif dioxétane, possèdent de meilleures propriétés photophysiques. Ce type d'étude met en avant l'importance de la position relative du groupement déclencheur et du motif dioxétane. On peut noter que le chimiluminophore avec le motif dioxétane en position **5** (3 atomes entre le phénol et le carbone portant le dioxétane) détient un meilleur rendement de chimiexcitation qu'en position **4** (

Tableau 3). Néanmoins, le plus faible rendement quantique de fluorescence de l'espèce émissive (*i.e.* le naphtolate issu du produit d'ouverture) lui confère de moins bonnes propriétés chimiluminescentes que le luminophore au motif dioxétane en position **4**. Dans le but de concevoir une sonde à transfert d'énergie le motif dioxétane en position **5** ou **7** seraient donc les choix appropriés pour des propriétés photophysiques optimales. En effet, c'est le rendement de chimiexcitation de la plateforme qui prime, afin de maximiser la génération d'état S_1 généré. Par ailleurs, dans cette étude de cas, la relation odd-even entre les substituants ne semble pas avoir d'effet significatif sur le temps de demi-vie de chimiluminescence.



| | Position | $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm) | Φ_{CL} | Φ_{S} | $\Phi_{\text{PL}}^{\text{a}}$ | $t_{1/2}$ (s) |
|-------------|----------|---|----------------------|----------------------|-------------------------------|---------------|
| Odd | 7 | 559 | 0,11 | 0,49 | 0,23 | 120 |
| | 5 | 582 | 0,017 | 0,22 | 0,078 | 19 |
| | 4 | 516 | 0,068 | 0,088 | 0,77 | 220 |
| Even | 6 | 470 | $1,7 \times 10^{-5}$ | $2,3 \times 10^{-5}$ | 0,74 | 0,04 |
| | 3 | 551 | $6,6 \times 10^{-4}$ | $3,2 \times 10^{-3}$ | 0,21 | 170 |

Tableau 3 Propriétés photophysiques de la décomposition du motif 1,2-dioxétane en fonction de la position du déclencheur [10^{-2} M] mesure effectuée dans une solution de TBAF diluée dans du DMSO à 25°C.
a) rendement quantique de l'espèce émissive correspondante.

La relation odd-even a également été démontrée sur des naphthols ou phénols qui possèdent des groupements stabilisants de type *gem*-diisopropyle.¹⁰⁸ Dans le cadre de notre sujet de recherche, concernant l'utilisation d'un phénol, il a clairement été établi qu'un nombre d'atomes impair promeut les meilleures caractéristiques photophysiques.³⁹ Le rendement de chimiexcitation d'un phénol en position *para* vis-à-vis du dioxétane (2 atomes séparant les 2 motifs) est 100 fois inférieur à celui en

107 Hoshiya, N.; Fukuda, N.; Maeda, H.; Watanabe, N.; Matsumoto, M. Synthesis and fluoride-induced chemiluminescent decomposition of bicyclic dioxetanes substituted with a 2-hydroxynaphthyl group. *Tetrahedron* **2006**, *62* (24), 5808-5820

108 Watanabe, N.; Kobayashi, H.; Azami, M.; Matsumoto, M. Synthesis of 3,3-diisopropyl-4-methoxy-4-(siloxy-2-naphthyl)-1,2-dioxetanes and their F⁻-induced chemiluminescent decomposition. *Tetrahedron* **1999**, *55* (22), 6831-6840

position *meta*.^{106,109} Ainsi, le motif phénol en *meta* du motif dioxétane est celui qui est systématiquement utilisé dans la littérature.

En revanche, une étude de chimie théorique, modélisant la chimiluminescence du phénol 1,2-dioxétane adamantyle, remet en question la relation odd-even entre le déclencheur et le motif dioxétane.¹¹⁰ Cet effet serait uniquement dû à la présence d'un groupement électroattracteur inductif sur le motif dioxétane. L'étude s'appuie sur les résultats expérimentaux obtenus par l'équipe du Pr. W. Adam.¹¹¹ En effet, le chimiluminophore composé d'un motif acridine **44** qui ne semble pas être affecté par l'effet odd-even y a été rapporté. En prenant en compte ce point de vue, la conception d'un motif stabilisant promouvant un rendement de chimiexcitation efficient sans effet odd-even ouvrirait de nouvelles voies dans la conception de chimiluminophores.

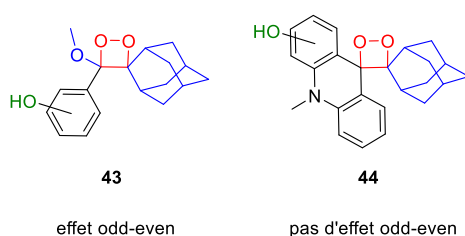


Figure 24 Représentation schématique d'un motif 1,2-dioxétane adamantyle et acridine.

1.3.2. Modulation des propriétés spectrales, et nouveaux groupements déclencheurs.

Comme toutes les sondes luminescentes, l'utilisation de chimiluminophores à motif 1,2-dioxétane dans le domaine de l'imagerie médicale requiert une émission dans la partie rouge ou proche infrarouge du spectre visible. La modulation des propriétés spectroscopiques a donc été rapidement un thème de recherches investi. Dans un premier temps, cela a été possible en modifiant le chromophore (*i.e.* utilisation d'un naphhtol à la place du phénol) ainsi que les positions relatives du déclencheur et du dioxétane (

Tableau 3).^{106,108} Dans un second temps, la modification du groupement déclencheur peut donner une modulation de ces propriétés spectroscopiques. La synthèse du chimiluminophore **45** à partir d'un cœur aniline permet de décaler la chimiluminescence vers le rouge à 642 nm.¹¹² Cependant, d'une part le rendement quantique obtenu dans le DMSO est extrêmement faible. D'autre part, le déclenchement du mécanisme de chimiluminescence a lieu uniquement quand l'aniline est déprotonée ($pK_{a(DMSO)} = 30.6$ $pK_{a(eau)} = 18$). En conséquence, les conditions de pH requises pour le déclenchement de chimiluminescence sont incompatibles avec une utilisation en condition physiologique (*i.e.* pH 7.4). De même, des chimiluminophores déclenchables *via la génération d'espèce carboanionique* ont été développés. Les composés **47** possèdent donc des groupements électroattracteurs en position tolylique

109 Adam, W.; Bronstein, I.; Trofimov, A. V. Solvatochromic effects on the electron exchange chemiluminescence (CIEEL) of spiroadamantyl-substituted dioxetanes and the fluorescence of relevant oxyanions. *J Phys Chem A* **1998**, *102* (28), 5406-5414

110 Yue, L.; Liu, Y. J. Mechanism of AMPPD chemiluminescence in a different voice. *J Chem Theory Comput* **2013**, *9* (5), 2300-2312

111 Adam, W.; Reinhardt, D. Chemical triggering of dioxetanes derived from 9-adamantylideneacridanes: Fluoride- and base-induced chemiluminescence (CIEEL) of siloxy- and acetoxy-substituted dioxetanes. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1997**, No 8, 1453-1463

112 Watanabe, N.; Ichikawa, M.; Ono, A.; Murakami, H.; Matsumoto, M. New triggering system for dioxetane-based chemiluminescence: Base-induced decomposition of bicyclic dioxetanes bearing a 3-aminophenyl or 2-phenylindol-6-yl moiety. *Chem Lett* **2005**, *34* (5), 718-719

en méta du motif 1,2-dioxétane afin de rendre le proton benzylique plus acide.¹¹³ Plus l'anion formé comporte des groupements électroattracteurs (GEA), plus l'émission de chimiluminescence sera décalée dans le domaine des longueurs d'onde élevées (*i.e.* IR proche IR). Des sondes basées sur le groupement thiophénol a également été rapportée dans la littérature (Figure 25).^{114,115}

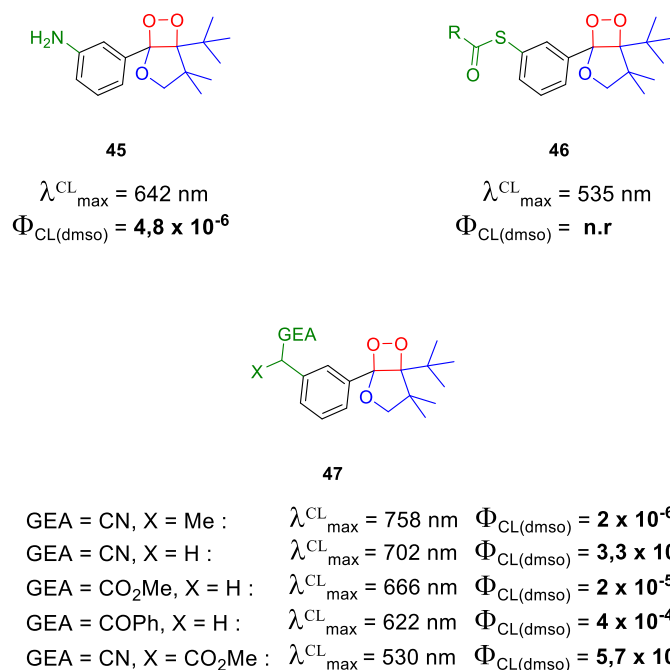


Figure 25 Chimiluminophores possédant un motif déclencheur autre que phénol.

L'ajout d'un espaceur oléfinique entre le motif dioxétane et le cycle aromatique a permis d'observer des propriétés intéressantes. La présence d'une double ou d'une triple liaison en position *meta* par rapport au phénol déclencheur permet d'obtenir une émission de chimiluminescence dans le proche IR (Figure 26).¹¹⁶ Le second effet notable est la nette différence du temps de demi-vie de chimiluminescence entre **48** et **49**. En effet, l'un possède une émission de type glow (*i.e.* une cinétique d'émission longue) et l'autre de type flash. Nous verrons par la suite l'importance de la cinétique de chimiluminescence dans le cadre de la détection de (bio)analytes. Le groupement phénolate-alcyne semble agir comme un très bon groupement donneur vis-à-vis du motif dioxétane induisant une décomposition d'un ordre de grandeur plus rapide que la référence **39**. En opposition à cela, le même groupement phénol combiné à une double liaison possède un temps de demi-vie de l'ordre de l'heure.

113 Watanabe, N.; Mizuno, T.; Matsumoto, M. Intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition of 1,2-dioxetanes bearing a phenylmethanide anion. *Tetrahedron* **2005**, *61* (40), 9569-9585

114 Matsumoto, M.; Watanabe, N.; Hoshiya, N.; Ijuin, H. K. Color modulation for intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence of 1,2-dioxetanes. *Chem Rec* **2008**, *8*, 213-228

115 Sabelle, S.; Renard, P. Y.; Pecorella, K.; De Suzzoni-Dézard, S.; Créminon, C.; Grassi, J.; Mioskowski, C. Design and synthesis of chemiluminescent probes for the detection of cholinesterase activity. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (17), 4874-4880

116 Matsumoto, M.; Ishihara, T.; Watanabe, N.; Hiroshima, T. Synthesis of thermally stable 1,2-dioxetanes bearing a phenylethenyl or a phenylethynyl moiety and their base-induced decomposition. *Tetrahedron Lett* **1999**, *40* (24), 4571-4574

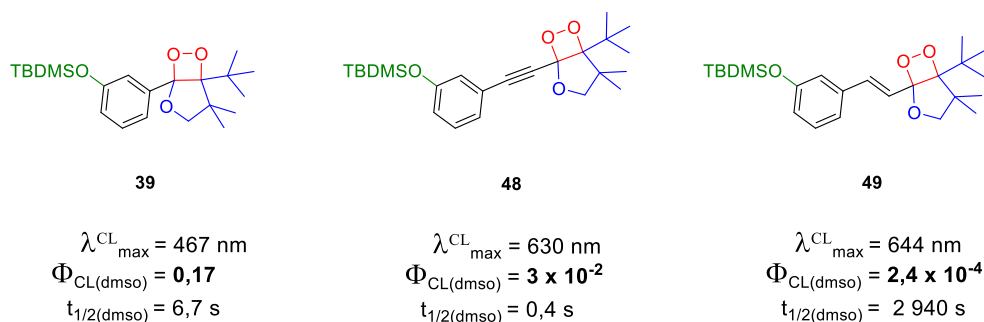


Figure 26 Chimiluminophores possédant un motif 1,2-dioxétaneconjugué proposés par Matsumoto *et al.* Mesures effectuées dans une solution de TBAF diluée dans du DMSO à 25°C.¹¹⁶

1.3.3. Élaboration de chimiluminophores performants en milieux aqueux.

L'équipe du Pr. Matsumoto s'est également penchée sur la conception de chimiluminophores performants en milieu aqueux sans pour autant viser d'application directe à l'imagerie médicale. L'accès à des dioxétanes émettant efficacement en milieu aqueux reste encore aujourd'hui un grand défi. En effet, la performance de beaucoup de chimiluminophores reste limitée en milieux aqueux, et la classe des luminophores de type 1,2-dioxétane n'y échappe malheureusement pas. Une stratégie employée pour augmenter l'efficacité de chimiluminescence est l'utilisation du transfert d'énergie de type CRET. La Figure 27 présente deux chimiluminophores synthétisés par Matsumoto *et al.*¹¹⁷. Ils sont composés d'un motif dioxétane stabilisé par le groupement dihydrofurane classiquement utilisé dans leurs travaux. L'accroche d'un fluorophore par le biais d'un espaceur placé sur leur motif stabilisant permet la réalisation du CRET, car, contrairement aux chimiluminophores fondés sur le motif adamantyle, la présence du cycle furanique permet de conserver alors le lien covalent entre l'espèce émissive et le fluorophore s'il est greffé sur cette partie de la sonde. Il est intéressant de noter l'augmentation du rendement quantique de chimiluminescence par rapport à la référence **50** ; 550 et 30 fois supérieur dans l'eau pour les chimiluminophores **51** et **52**, respectivement. Dans cet article, les auteurs postulent que les rendements de chimiexcitation des composés **51** et **52** sont similaires à celui du composé référence **50** ($\Phi_s = 0,46$ dans l'acétonitrile). À partir de ce constat ils postulent l'obtention d'un rendement de transfert d'énergie de l'ordre de 80 à 90 %.

117 Watanabe, N.; Kino, H.; Watanabe, S.; Ijuin, H. K.; Yamada, M.; Matsumoto, M. Synthesis of bicyclic dioxetanes tethering a fluororescer through an ω -carbamoyl-substituted linker and their high-performance chemiluminescence in an aqueous system. *Tetrahedron* **2012**, *68* (30), 6079-6087

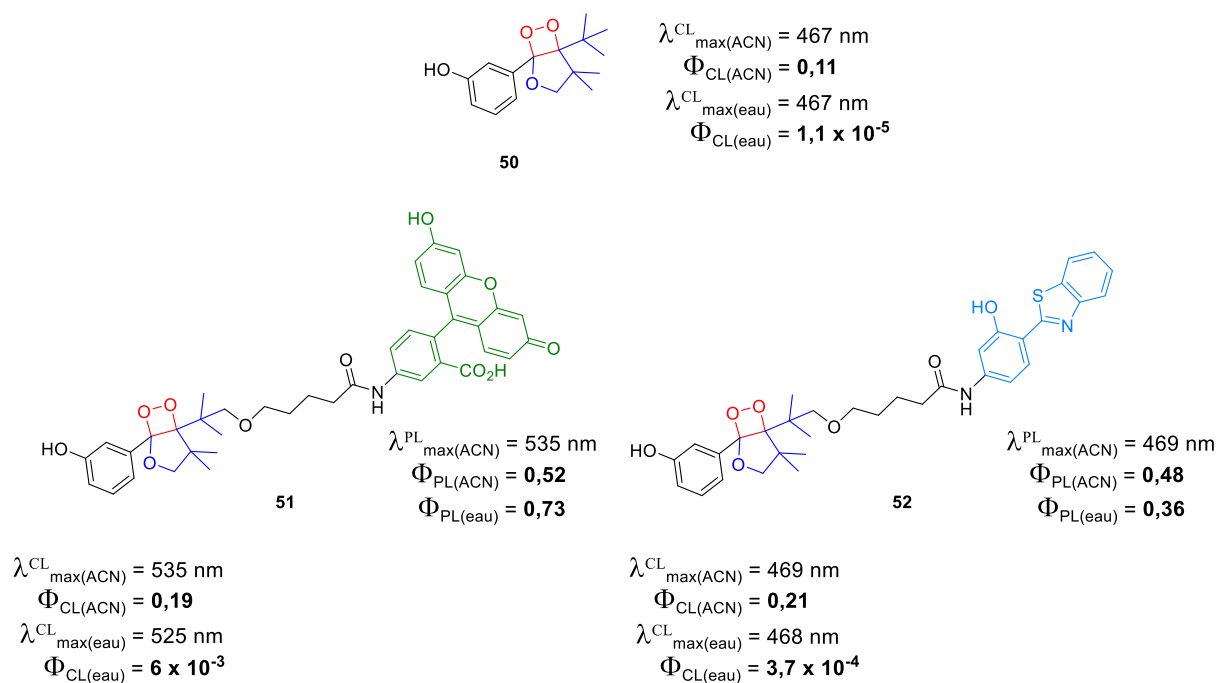
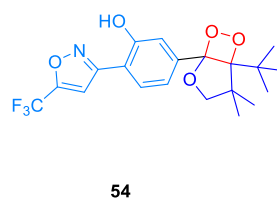
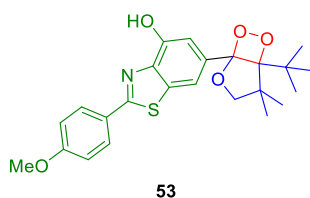


Figure 27 Chimiluminophores en milieu aqueux synthétisés par le groupe du Pr Matsumoto.

Bien qu'encourageant, ces résultats restent faibles en comparaison des rendements quantiques qui peuvent être obtenus par des sondes bioluminescentes ($\Phi_{\text{BL}} \approx 0,5$ pour les meilleurs sondes).⁶¹ Dans l'article présenté précédemment, cela est imputé à une baisse du rendement quantique de fluorescence et du transfert d'énergie dans l'eau. Or, le rendement de chimiexcitation a été postulé comme étant constant. Matsumoto et son équipe ont pourtant publié des travaux démontrant une nette baisse du rendement de chimiexcitation lors d'un passage d'un solvant organique vers un milieu aqueux.¹¹⁸ Comme l'illustre le chimiluminophore **53** (Figure 28), il a été rapporté une diminution d'un ordre de grandeur de du rendement de chimiexcitation Φ_{s} . Au contraire, le chimiluminophore **54** comportant un motif isoxazole, conserve un bon rendement quantique de chimiluminescence dans l'eau ($\Phi_{\text{CL}} = 0,24$ dans l'eau).¹¹⁹ Étonnement ce chimiluminophore n'a jamais fait l'objet d'études pour la détection de bio analytes. Malgré son émission de chimiluminescence dans la région du bleu, ses bonnes caractéristiques en milieux aqueux en font pourtant un bon candidat pour une sonde de type CRET.

118 Matsumoto, M.; Mizoguchi, Y.; Motoyama, T.; Watanabe, N. Base-induced chemiluminescence of 5-tert-butyl-1-(4-hydroxybenz[d]oxazol-6-yl)-4,4-dimethyl-2,6,7-trioxabicyclo[3.2.0]heptanes: Chemiluminescence-chemiexcitation profile in aqueous medium. *Tetrahedron Lett* **2001**, 42 (50), 8869-8872

119 Masakatsu Matsumoto, T. S. and N. W. Synthesis of bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxy-4-isoxazolylphenyl moiety new CIEEL-active dioxetanes emitting light with remarkable high-efficiency in aqueous medium. *Tetrahedron Lett* **2002**, 43, 8955-8958



$$\lambda_{\text{max(ACN)}}^{\text{CL}} = 512 \text{ nm} \quad \lambda_{\text{max(eau)}}^{\text{CL}} = 505 \text{ nm}$$

$$\Phi_{\text{CL(ACN)}} = \mathbf{0,15} \quad \Phi_{\text{CL(eau)}} = \mathbf{4,3 \times 10^{-3}}$$

$$\Phi_{\text{S(ACN)}} = \mathbf{0,5} \quad \Phi_{\text{S(eau)}} = \mathbf{0,036}$$

$$\lambda_{\text{max(ACN)}}^{\text{CL}} = 481 \text{ nm} \quad \lambda_{\text{max(eau)}}^{\text{CL}} = 473 \text{ nm}$$

$$\Phi_{\text{CL(ACN)}} = \mathbf{0,44} \quad \Phi_{\text{CL(eau)}} = \mathbf{0,24}$$

$$t_{1/2(\text{ACN})} = 11 \text{ 000 s} \quad t_{1/2(\text{eau})} = 13 \text{ 000 s}$$

Figure 28 Chimiluminophore illustrant la dépendance de Φ_{S} au solvant, et chimiluminophore le plus performant en milieux aqueux de l'équipe du Pr Matsumoto.

1.4 Travaux du Prof A.P. Schaap : Précurseur des sondes chimiluminescentes à visé biologique.

Comme il a été présenté succinctement lors de l'introduction, les travaux du Professeur Schaap et son équipe sont précurseurs dans le développement de sondes chimiluminescentes à cœur phénolique combiné au motif 1,2-dioxétane. Les travaux du Pr Matsumoto décrits précédemment, nous ont permis de poser les bases de la conception d'un chimiluminophore, ceux du groupe du Pr Schaap, nous permettront de poser les bases d'une sonde chimiluminescente 1,2-dioxétane activable.

En 1987 le groupe a rationalisé la conception de sondes chimiluminescentes pour la détection d'une activité enzymatique avec trois preuves de concepts. Contrairement aux sondes bioluminescentes classiques, la modification du groupement déclencheur permet de moduler de façon simple l'analyte ciblé, étendant *de facto* le champ d'action de la détection par chimiluminescence. La Figure 29 présente les trois premières sondes chimiluminescentes synthétisées par le groupe du Pr Schaap **33**,⁸² **34**,⁸¹ et **35**⁸³ permettant respectivement de détecter les anions fluorures, des estérases, ou la phosphatase alcaline. La sonde à cœur phénolique **33** (appelée par la suite sonde de Schaap) montre les meilleures propriétés avec un rendement de chimiluminescence de 25 % dans le DMSO.

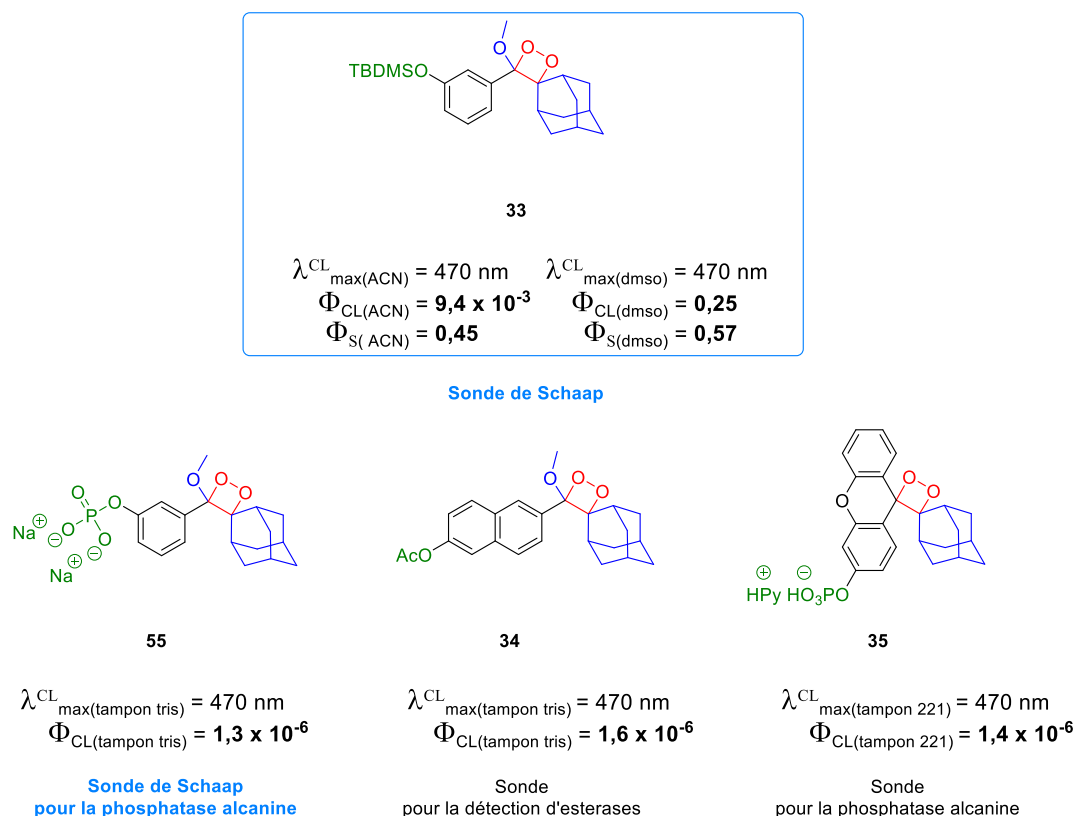


Figure 29 Première série de sondes du Pr. Schaap pour la détection d'anions fluorures, d'estérase, et de la phosphatase alcaline (tampon 221 : 2-amino-2-méthyl-1-propanol, 0,8 mM MgOAc, pH 9,6).

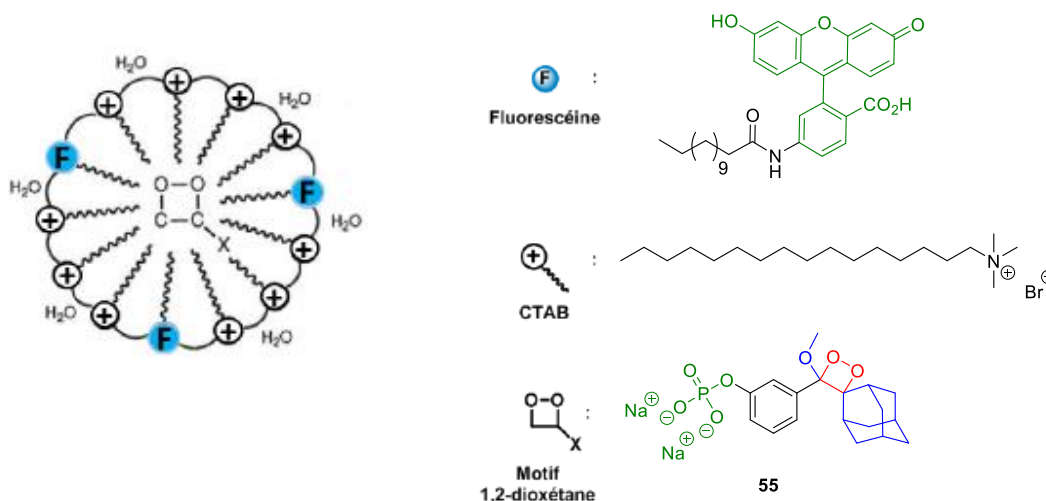
Cependant, les caractéristiques spectroscopiques de la sonde à plateforme phénolique **55** restent modestes. Il a rapidement été nécessaire d'augmenter le rendement quantique de chimiluminescence inférieur à 1 % dans l'eau. De plus le maximum d'émission à 470 nm ne se situe pas dans la fenêtre de transparence biologique, et n'est pas optimal pour les expériences d'immunodosages ou d'imagerie cellulaire. À cela s'ajoute l'hydrophobicité du motif adamantyle qui rend difficile toute application *in vitro*, *in cellulo* ou *in vivo*. Dans la série de publications de ces premières sondes, le groupe du Pr Schaap présente des résultats de détection de la phosphatase alcaline et d'une estérase en milieu physiologique. Le manque de solubilité de leur sonde n'est pas explicité, néanmoins deux années plus tard, des travaux font apparaître une structure micellaire permettant de solubiliser la sonde.^{120,121} Aujourd'hui, des kits de chimiluminescence commerciaux sont basés sur ces travaux.¹²² Le chimiluminophore peu soluble en milieu aqueux est « solubilisé » à l'aide de la cage hydrophobe d'une micelle composée de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB). La fluoresceine est incorporée à cette structure micellaire afin de jouer le rôle d'accepteur de CRET. Les résultats présentés dans le tableau de la

Figure 30 montrent une exaltation de deux ordres de grandeur du rendement quantique de chimiluminescence avec ce système micellaire.

120 Thorpe, G. H.; Bronstein, I.; Kricka, L. J.; Edwards, B.; Voyta, J. C. Chemiluminescent enzyme immunoassay of alpha-fetoprotein based on an adamantyl dioxetane phenyl phosphate substrate. *Clin Chem* **1989**, *35* (12), 2319-2321

121 Bronstein, I.; Edwards, B.; Voyta, J. C. 1,2-dioxetanes: novel chemiluminescent enzyme substrates. Applications to immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* **1989**, *4* (1), 99-111

122 <http://www.lumigen.com/> <http://www.lumigen.com/>



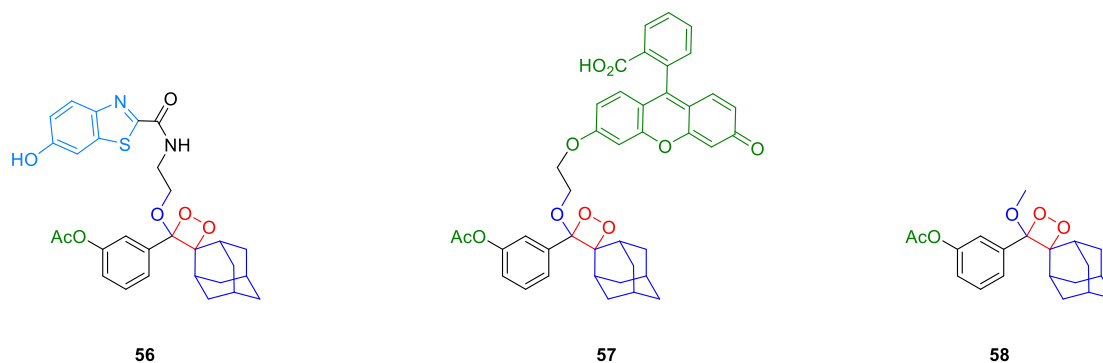
| Conditions | $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}}$ (nm) | Φ_{CL} | $t_{1/2}$ (min) |
|--------------------------------------|---|----------------------|-----------------|
| Architecture micellaire fluorescente | 535 | $4,8 \times 10^{-3}$ | 36,9 |
| Fluoresceine + Sonde de Schaap | 535 | $2,6 \times 10^{-4}$ | 3,27 |
| Sonde de Schaap | 470 | $1,5 \times 10^{-5}$ | 3,08 |

Figure 30 Exaltation de signal de chimiluminescence via l'incorporation de la sonde dans une architecture micellaire.

Cependant, la faible durée de vie de l'espèce chimiexcitée générée, et l'utilisation d'un tel kit nécessitent une optimisation de la quantité de fluorophore greffé sur la micelle. Une trop petite quantité diminue la probabilité d'un transfert d'énergie de l'espèce excitée au fluorophore. En revanche, une trop grande concentration de fluorophore peut engendrer des phénomènes « d'auto quenching » tels que la formation d'exciplexes ou d'excimères. Ces différents problèmes ont conduit le Pr Schaap et son équipe à envisager une alternative consistant à lier un chimiluminophore directement à un fluorophore afin de s'affranchir de l'architecture micellaire. Cette stratégie a donné lieu à un brevet pour les sondes **56** et **57**.¹²³ La comparaison des résultats présentés dans la

Figure 31 permet d'observer une efficacité des sondes de type CRET **56** et **57** respectivement de 45 fois et 25 fois plus élevée que la référence **58** dans un système aqueux en présence de NaOH. En revanche, le déclenchement de ces sondes en présence du surfactant CTAB est plus efficace d'un ordre de grandeur, ce qui pourrait être expliqué par un meilleur rendement Φ_{S} au sein d'une cage hydrophobe.

123 Lechtken, P. United States Patent 5,438,146, 1995



| Rendements quantiques de chimiluminescence | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|
| Conditions de déclenchement | 56 | 57 | 58 |
| Esterase pH 9,2 | $2,9 \times 10^{-4}$ | $3,9 \times 10^{-4}$ | $1,2 \times 10^{-5}$ |
| CTAB + NaOH | $2,2 \times 10^{-3}$ | $1,4 \times 10^{-3}$ | $1,7 \times 10^{-4}$ |
| NaOH | 2×10^{-4} | $3,8 \times 10^{-4}$ | $8,4 \times 10^{-6}$ |

Figure 31 Sondes de Schaap de type CRET brevetées.

Le succès relatif de cette stratégie a conduit à l'utilisation de la cage hydrophobe fluorescente appelée aujourd'hui « enhancer ». Des études *in vivo* ont été conduites par R.P. Mason *et al*¹²⁴ démontrant la possibilité de détecter la β -Galactosidase par utilisation du kit Galacton-Light Plus™. Par la suite, le groupe s'est attelé à l'utilisation de fluorophores émettant dans la région du rouge et du proche IR afin d'optimiser la détection *in vivo*.¹²⁵

En résumé, la sonde de Schaap est la référence dans le développement de sondes chimiluminescentes 1,2-dioxétane pour la détection d'activités enzymatiques. Entre la dernière décennie du 20^{ème} siècle et la première du 21^{ème}, la sonde de Schaap a permis d'étoffer les exemples d'utilisation de la chimiluminescence dans le domaine de l'imagerie médicale. L'approche concernant l'incorporation de la sonde dioxétane au sein d'une nanoparticule a été la méthode la plus prometteuse pour une application *in vivo*. Cependant, le principal inconvénient de ce dispositif réside dans la limite de stabilité d'une architecture micellaire.¹²⁶ De plus l'obtention d'autoassemblages de structures micellaires requiert parfois des concentrations trop élevées pouvant nuire au milieu étudié.¹²⁷ Loin d'être insurmontable, cette stratégie nécessite donc cependant un certain savoir-faire dans la conception de nanoparticules non cytotoxiques.¹²⁸

124 Liu, L.; Mason, R. P. Imaging β -galactosidase activity in human tumor xenografts and transgenic mice using a chemiluminescent substrate. *PLoS One* **2010**, *5* (8)

125 Park, J. Y.; Gunpat, J.; Liu, L.; Edwards, B.; Christie, A.; Xie, X. J.; Kricka, L. J.; Mason, R. P. Red-shifted emission from 1,2-dioxetane-based chemiluminescent reactions. *Luminescence* **2014**, *29* (6), 553-558

126 Domínguez, A.; Fernández, A.; Gonzalez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *J Chem Educ* **1997**, *74* (10), 1227-1231

127 Partearroyo, M. A.; Ostolaza, H.; Goñi, F. M.; Barberá-Guillem, E. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol* **1990**, *40* (6), 1323-1328

128 Jamgotchian, L. Micelles fluorées et polydiacétyléniques pour la thérapie et le diagnostic, 2021

2. Utilisation des Lanthanides en chémiobiologie.

2.1 Généralités.

Les lanthanides désignent les anions des éléments appartenant à la famille des lanthanoïdes qui regroupent quinze éléments chimiques dont le numéro atomique est compris entre 57 (Lanthane : La) et 71 (Lutécium : Lu). Cette famille comprend tous les éléments qui possèdent la sous-couche électronique f partiellement ou totalement remplie. Le remplissage des orbitales 4f est plus favorable énergétiquement à partir de la troisième série des métaux de transition donnant des configurations électroniques de type $[\text{Xe}]4f^n6s^2$ et $[\text{Xe}]4f^{n-1}5d^16s^2$ pour le lanthane, cérium et le gadolinium. Du fait de la contraction des orbitales f les propriétés chimiques des lanthanides sont relativement homogènes. Ce sont des métaux très réducteurs avec une électropositivité du même ordre de grandeur que celle de la famille des métaux alcalins. En solution, les lanthanides présentent en majorité un degré d'oxydation +III de configuration $[\text{Xe}]4f^n$. La forte charge d'un cation lanthanide lui confère un caractère oxophile ainsi qu'une affinité pour tous les groupements polarisables (*i.e.* carboxylate, alkoxydes, phosphates ...). En phase aqueuse, le nombre de coordination varie entre 8 et 9 selon la taille du lanthanide ainsi que la gêne stérique générée par les ligands. Enfin, à l'exception du lanthane et du lutécium, les lanthanides possèdent un fort effet paramagnétique.¹²⁹ Cette propriété rends ces éléments utiles pour la conception de puissants aimants.¹³⁰ Dans le domaine médical, le gadolinium est le lanthanide le plus utilisé pour effectuer de l'imagerie par résonance magnétique. Outre son caractère paramagnétique, loin d'être le plus performant, le gadolinium possède un temps de relaxation suffisamment long (10^6 fois plus lent que celui des autres élément f) lui permettant d'interagir avec le spin nucléaire des atomes d'hydrogène de l'eau.¹³¹

2.2 Des propriétés spectroscopiques singulières.

2.2.1. Diagramme énergétique et transitions électroniques.

A l'image du gadolinium qui possède 3 432 niveaux énergétiques, le diagramme énergétique des lanthanides est caractérisé par un grand nombre de niveaux électroniques. Ceci s'explique par la grande capacité d'accueil de l'orbitale f (*i.e.* de 0 à 14 électrons) conduisant à une multiplication des niveaux électroniques possibles (en comparaison aux métaux de transition) lors des levées de dégénérescence du couplage spin orbite (ou couplage Russel-Saunders) et du champ provenant du ligand (sous niveaux de Starck).¹³²

129 Harvey, P.; Kuprov, I.; Parker, D. Lanthanide complexes as paramagnetic probes for 19F magnetic resonance. *Eur J Inorg Chem* **2012**, No 12, 2015-2022

130 Benelli, C.; Gatteschi, D. Magnetism of lanthanides in molecular materials with transition-metal ions and organic radicals. *Chem Rev* **2002**, 102 (6), 2369-2387

131 Viswanathan, S.; Kovacs, Z.; Green, K. N.; Ratnakar, S. J.; Sherry, A. D. Alternatives to gadolinium-based metal chelates for magnetic resonance imaging. *Chem Rev* **2010**, 110 (5), 2960-3018

132 Bünzli, J. C. G.; Piguet, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem Soc Rev* **2005**, 34 (12), 1048-1077

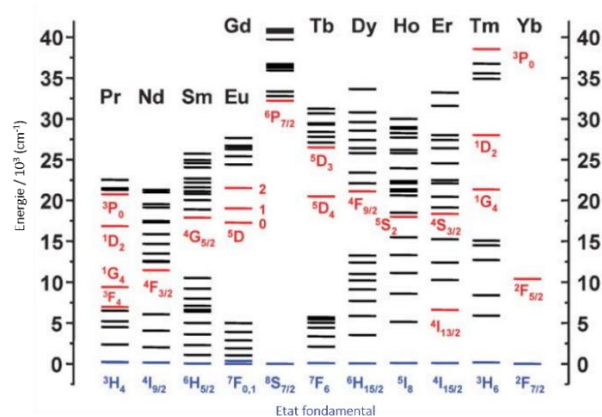


Figure 32 Diagramme d'énergie partiel des lanthanides avec les niveaux « récepteurs » d'énergie des différents lanthanides en rouge, adapté de la publication.¹³²

A l'image des complexes des éléments du bloc d, les lanthanides ont trois types de transitions.¹³³ D'une part, il est possible d'observer des transitions impliquant une délocalisation sur tout le complexe de type transfert de charge du métal vers le ligand (MLCT Metal to Ligand Charge Transfer concernant Ce^{3+} et Tb^{3+}). De même, La transition inverse partant du ligand vers le métal est plausible (LMCT Ligand to Metal Charge Transfer concernant plutôt le Sm^{3+} , Eu^{3+} , Yb^{3+}). Il est également possible d'observer des transitions intra-configurationnelles centrées sur le métal comme la $4f \rightarrow 5d$. Ces deux premiers types de transition ont un coefficient d'extinction molaire compris entre 200 et 1000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ et sont les plus probables.¹³⁴ Enfin, tout comme la $4f \rightarrow 5d$ les transitions f-f intra-configurationnelle sont celles qui sont exploitées pour obtenir des complexes luminescents.

2.2.2. Caractéristiques des transitions f-f.

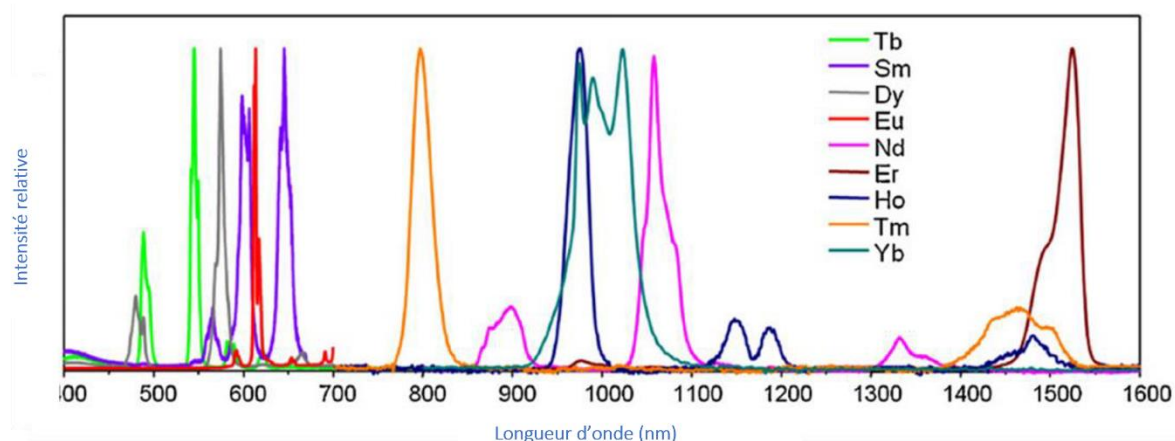


Figure 33 Spectres d'émission normalisés de différents complexes de lanthanide Ln(III) luminescents en solution, adapté de¹³⁵

Les lanthanides possèdent des propriétés de luminescence singulières liées à leur sous-couche f, La Figure 34 ci-dessus montre les spectres d'émissions de différents lanthanides. Contrairement aux

133 Ala-Kleme, T.; Bünzli, J. C. G.; Bazin, H.; Eliseeva, S. V.; Faulkner, S.; Hänninen, P.; Härma, H.; Hemmilä, I.; Hyppänen, I.; Kankare, J.; Kulmala, S.; Kuusisto, A.; Laitala, V.; Mathis, G.; Nann, T.; Schäferling, M.; Soukka, T.; Spangker, C.; Stenman, U.; Suomi, J.; Sykes, D.; Tanke, H.; Tanner, P.; Wang, H.; Werts, M. H. V. *Lanthanide luminescence*, Springer S.; Wolfbeis, O. S., Éd.; Springer US, 2011; Vol. 7

134 Eliseeva, S. V.; Bünzli, J. C. G. *Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences*. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (1), 189-227

135 Uha, H.; Petoud, S. Novel antennae for the sensitization of near infrared luminescent lanthanide cations. *Comptes Rendus Chim* **2010**, *13* (6-7), 668-680

fluorophores organiques, ils possèdent des bandes d'émission de luminescence très fines. Ce caractère atypique est expliqué par les propriétés faiblement covalentes des orbitales 4f dû à la localisation interne sur le lanthanide. L'enfouissement des orbitales f assure une minimisation des perturbations de l'architecture moléculaire lors d'une absorption d'énergie. Il en résulte alors une diminution des niveaux vibroniques et donc très peu de transitions radiatives possibles. Cela engendre d'une part, des bandes d'émission très fines, et d'autre part, un très faible déplacement de Stokes car l'énergie absorbée par le métal ne peut quasiment pas se dissiper (Figure 34).

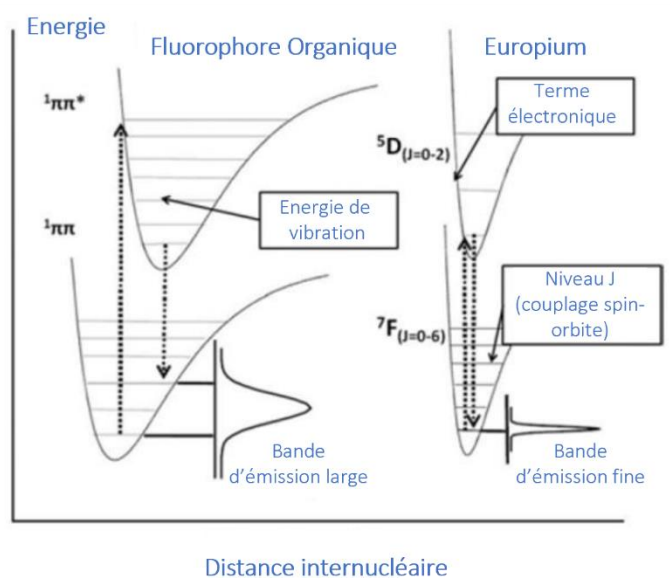


Figure 34 Représentation schématique des diagrammes d'énergie potentielle de l'émission radiative d'un fluorophore comparé à l'euprimum (figure adaptée).¹³⁴

Aussi, il faut préciser la faible probabilité d'une transition électronique appartenant à cette même sous couche f. Les coefficients d'absorption molaire sont donc de l'ordre de l'unité, ce qui est bien faible au regard du coefficient d'absorption d'un bon fluorophore ($> 10\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La longue durée de vie de luminescence des lanthanides (jusqu'à 10 ms selon la bande observée) est également liée à la faible probabilité de transition $f \rightarrow f$.¹³⁴ Comme rappelé dans l'introduction, ce caractère propre aux lanthanides est particulièrement apprécié pour augmenter le rapport signal sur bruit dans le domaine de l'imagerie *via* des expériences de mesure de luminescence en temps résolu.

2.2.3. Sensibilisation d'un lanthanide par « effet d'antenne ».

L'effet d'antenne a été découvert par Weissman en 1942.¹³⁶ Ce phénomène décrit la sensibilisation d'un lanthanide *via* un chromophore organique. On obtient donc un cation lanthanide énergisé par le biais d'un chromophore avec un coefficient d'absorption bien plus élevé, ce qui permet une exaltation de la brillance du complexe de lanthanide. Le mécanisme de sensibilisation du cation métallique par une antenne reste partiellement incompris. Le transfert d'énergie permettant le peuplement des états électroniques émissifs des lanthanides implique les mécanismes non radiatifs de Dexter ou de Förster.¹³⁴ Le mécanisme d'échange de Dexter est clairement remis en cause car il nécessite un recouvrement

¹³⁶ D'Aléo, A.; Pointillart, F.; Ouahab, L.; Andraud, C.; Maury, O. Charge transfer excited states sensitization of lanthanide emitting from the visible to the near-infra-red. *Coord Chem Rev* **2012**, 256 (15-16), 1604-1620

orbitale. Or, la localisation des orbitales électroniques f du lanthanide ne favorisent pas un recouvrement avec celles du ligand.

La Figure 35 représente les différentes voies de sensibilisation connues à ce jour. Le premier mécanisme mis en valeur (à droite de la figure), nécessite un croisement intersystème pour peupler les états triplets. Cela n'est pas favorisé dans le cas des chromophores organiques classiques, mais la présence de l'ion lanthanide peut favoriser cela par effet d'atome lourd, notamment si le chromophore chélate directement le lanthanide. L'efficacité de ce transfert réside donc dans la facilité à peupler cet état triplet. L'optimisation du rendement de sensibilisation dépend de plusieurs facteurs : 1) l'écart entre le niveau S_1 et T_1 du ligand doit être au moins supérieur à 5000 cm^{-1} , 2) et l'état T_1 doit être plus énergétique d'au moins $2\ 500$ à $3\ 000\text{ cm}^{-1}$ par rapport aux niveaux de sensibilisation des lanthanides luminescents.¹³⁷ Cependant ces dernières années d'autres voies d'excitation ont été décrites (partie gauche de la figure). Ainsi, la sensibilisation d'un cation lanthanide via le processus ILCT (Intra Ligand Charge Transfer) connaît un essor. De même des cas de sensibilisation via des états transitoires $^1\text{LMCT}$ ou $^1\text{MLCT}$ ont été rapportés dans la littérature.

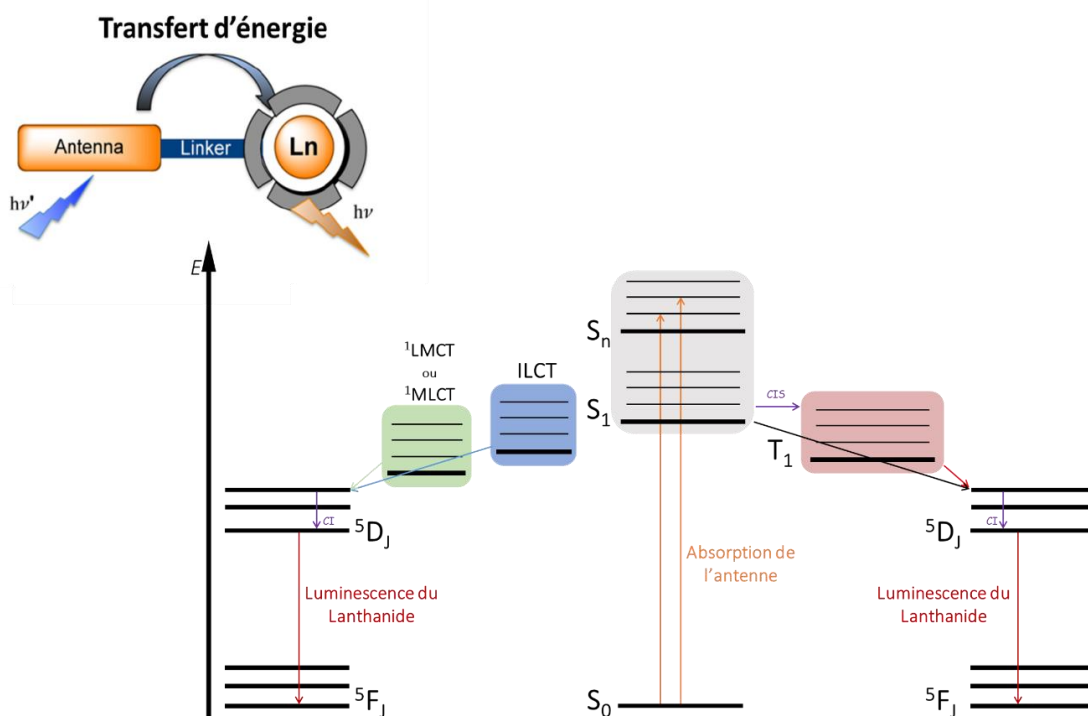


Figure 35 Représentation schématique des différentes voies de sensibilisation d'un lanthanide sur un diagramme de Perrin Jablonski.

Le complexe d'Europium **59** chélaté par trois β -dicétones et un motif bipyrazole triazine illustre les difficultés rencontrées lors de la détermination de la voie de sensibilisation du lanthanide. Initialement rapporté comme un système antenne-cation métallique sans passage par l'état triplet,¹³⁸ plusieurs études se sont penchées sur ce système atypique. Le niveau S_1 étant trop élevé pour une sensibilisation

137 Steemers, F. J.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N.; van der Tol, E. B.; Verhoeven, J. W. New Sensitizer-Modified Calix[4]arenes Enabling Near-UV Excitation of Complexed Luminescent Lanthanide Ions. *J Am Chem Soc* **1995**, *117* (37), 9408-9414

138 Yang, C.; Fu, L. M.; Wang, Y.; Zhang, J. P.; Wong, W. T.; Ai, X. C.; Qiao, Y. F.; Zou, B. S.; Gui, L. L. A highly luminescent europium complex showing visible-light-sensitized red emission: Direct observation of the singlet pathway. *Angew Chemie - Int Ed* **2004**, *43* (38), 5010-5013

de l'euporium, un état transitoire ILCT a été postulé. Par la suite, cette conclusion a été remise en cause par L.D. Carlos *et al* arguant la possibilité d'un passage par un état triplet.¹³⁹ Enfin la possibilité d'avoir une sensibilisation du lanthanide *via* un état transitoire ¹LMCT a été évoquée par le groupe de J.P Zhang¹⁴⁰ auteur initiale de la première étude. La présence de plusieurs voies de sensibilisation pour un système antenne-lanthanide n'est pas interdite.

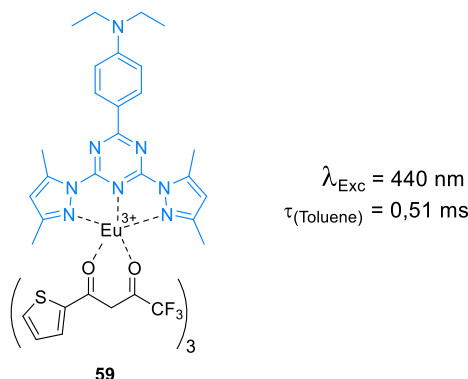


Figure 36 Complexe d'Euporium $\text{Eu}(\text{tta})_3\text{dpbt}$ rapporté par J.P Zhang *et al*.¹³⁸

2.3 Exemple de sonde biologique basée sur des complexes de lanthanide.

Nous avons vu précédemment l'importance de l'effet d'antenne pour obtenir une luminescence efficace. La conception de sondes luminescentes basées sur des complexes de lanthanide se fonde donc sur l'utilisation de ce processus. Cependant, il est important d'aborder les voies de désactivation vibrationnelles non radiatives dans le cas des lanthanides. Comme pour un fluorophore organique, l'excès d'énergie engrangée à l'état excité peut se dissiper rapidement par le mouvement de ses propres liaisons chimiques que l'on peut comparer à des oscillateurs vibrationnels. Dans le cas des lanthanides, cette désactivation ne peut se faire que par des interactions dipolaires de type Förster avec des liaisons du ligand ou d'autres liaisons situées proches de l'environnement du cation métallique (*e.g. les molécules de solvant*).^{134,141,142} Ainsi la liaison O-H est l'oscillateur vibrationnel le plus apte à désactiver la luminescence d'un lanthanide faisant de l'eau un très bon vecteur d'extinction de luminescence des complexes de lanthanide.¹⁴³

Le choix de la molécule chélatant le complexe n'est donc pas anodin pour une application biologique.¹⁴³ Pour une intensité de luminescence maximale il est nécessaire de remplir la sphère de coordination du métal par les fonctions chélatantes. D'ailleurs, les différents ligands des complexes de lanthanides luminescents développés sont classés selon ces fonctions chélatantes. Ainsi, il est courant d'utiliser des polyaminocarboxylates linéaire ou cyclique, des phosphonates ou encore des β -dicétones. Lors de la conception du complexe, deux stratégies peuvent être envisagées concernant l'antenne. Elle peut être directement incorporée au motif chélatant et participer à la chélation, ou être accrochée sur ce dernier.

139 Carlos, L. D.; Faustinob, W. M.; Malta, O. L. Comment on trivalent europium lifetimes in the presence of intramolecular energy transfer processes. *J Braz Chem Soc* **2008**, *19* (2), 299-301

140 Fu, L. M.; Ai, X. C.; Li, M. Y.; Wen, X. F.; Hao, R.; Wu, Y. S.; Wang, Y.; Zhang, J. P. Role of ligand-to-metal charge transfer state in Nontriplet photosensitization of luminescent europium complex. *J Phys Chem A* **2010**, *114* (13), 4494-4500

141 Artizzu, F.; Mercuri, M. L.; Serpe, A.; Deplano, P. NIR-emissive erbium-quinolinolate complexes. *Coord Chem Rev* **2011**, *255* (21-22), 2514-2529

142 Doffek, C.; Alzakhem, N.; Molon, M.; Seitz, M. Rigid, perdeuterated lanthanoid cryptates: Extraordinarily bright near-IR luminophores. *Inorg Chem* **2012**, *51* (8), 4539-4545

143 Heffern, M. C.; Matosziuk, L. M.; Meade, T. J. Lanthanide probes for bioresponsive imaging. *Chem Rev* **2014**, *114* (8), 4496-4539

A titre d'exemple, le complexe de lanthanide-Cyanine-Cy 5.0 **60** a été développé au sein du laboratoire pour la détection de l'activité de la caspase 3 (Figure 37A). Elle présente un ligand de type polyaminocarboxylates de type terpyridine jouant également le rôle d'antenne. Dans cet exemple, le complexe de lanthanide est combiné à une cyanine *via* un motif peptidique clivable par l'analyte visé (la caspase-3). Ainsi, le phénomène de FRET, présent initialement, est supprimé suite au clivage du lien covalent et à l'éloignement des deux partenaires et joue donc le rôle de révélateur. La sonde **61** (Figure 37B) est fondée sur l'utilisation d'un dérivé du ligand DOTA (macrocycle azoté tétra substitué par des fonctions carboxylates) fonctionnalisé par un motif coumarine faisant office d'antenne. Le caractère OFF-ON de cette sonde est assuré par la génération de la coumarine par une cascade réactionnelle (principe de fluorophore auto-assemblé),^{144,145} qui ne peut avoir lieu qu'après clivage d'un groupement reconnu spécifiquement par l'enzyme ciblée (Figure 36B). Ce ligand macrocyclique a attiré notre attention du fait de sa forte stabilité dans le temps ainsi que sa fonctionnalisation facile pour la version tri substitué (DO3A).

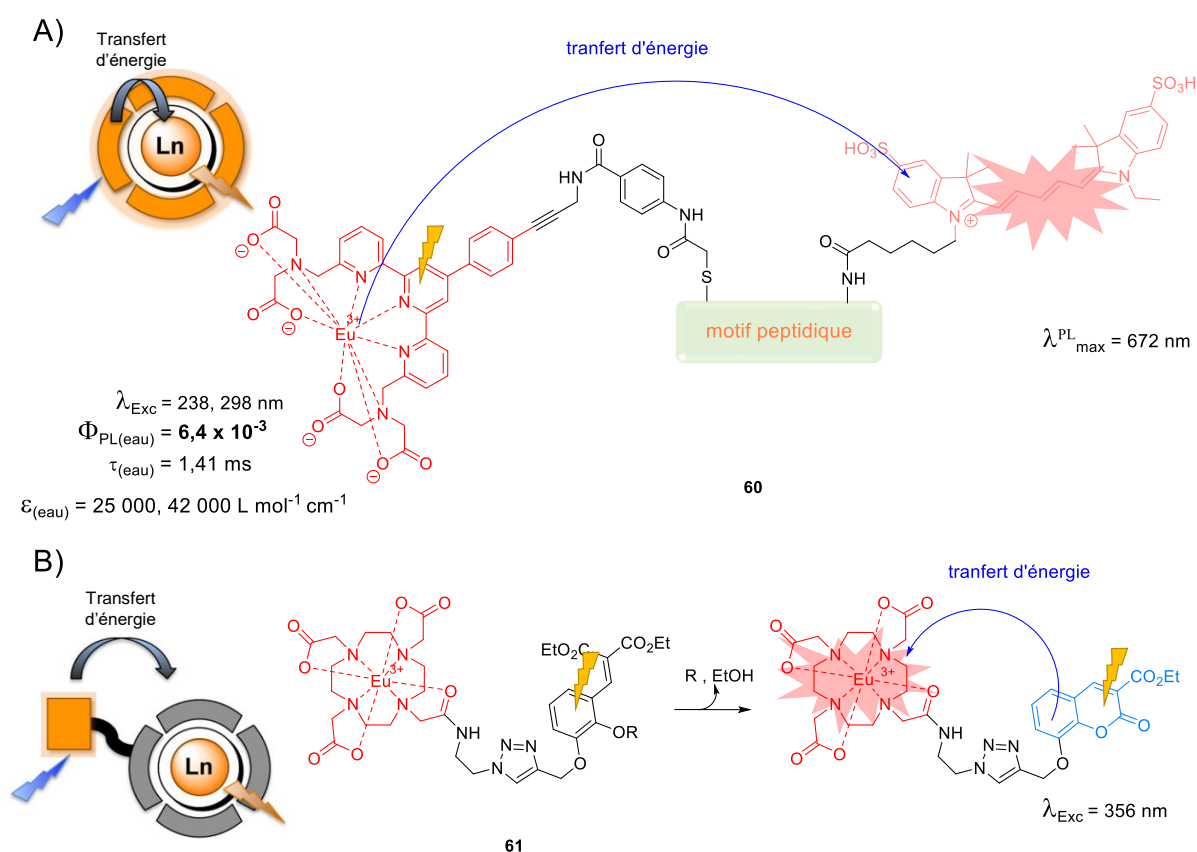


Figure 37 Représentation schématique des deux stratégies du positionnement de l'antenne a) Sonde FRET lanthanide Cy 5.0 développée par le laboratoire et composée d'une antenne chélatante. b) Sonde au motif chélatant DOTA fonctionnalisé par un motif coumarine faisant office d'antenne.

2.4 Utilisation de complexes de lanthanide pour la chimiluminescence.

Dans le cadre de notre projet de recherche, qui s'oriente vers l'association d'un complexe de lanthanide avec un chimiluminophore de type 1,2-dioxetane, nous pouvons citer les différents exemples de chimiluminescence impliquant des complexes de lanthanide rapportés par le groupe de Kazakov et

144 Romieu, A. « AND » luminescent « reactive » molecular logic gates: A gateway to multi-analyte bioimaging and biosensing. *Org Biomol Chem* **2015**, 13 (5), 1294-1306

145 Debieu, S.; Romieu, A. In situ formation of pyronin dyes for fluorescence protease sensing. *Org Biomol Chem* **2017**, 15 (12), 2575-2584

Voloshin. La thermolyse du dioxétane bisadamantyle a permis de sensibiliser des complexes de perchlorate de différents lanthanides ($\text{Ln}(\text{ClO}_4)_3$) présents en solution, sans qu'il n'y ait de liaison covalente entre les deux partenaires.¹⁴⁶ Les rendements quantiques de chimiluminescence des complexes d'euprium et de terbium ont été mesurés respectivement à 0,042 et 0,1 à 55°C dans l'acétonitrile. Suivant le même procédé, le même groupe a également rapporté la sensibilisation de différents lanthanides au sein d'un complexe composé par des ligands β -dicétone (Schéma 15A).¹⁴⁷ Ces études fondamentales sur les mécanismes ne permettent pas de statuer sur une sensibilisation par le biais d'un état singulet ou triplet. Enfin, un autre exemple propose la sensibilisation d'un complexe de lanthanide à l'aide d'oxygène singulet généré par la thermolyse d'un cycle endopéroxyde 1,4-diméthyl-naphtalène, à nouveau sans qu'il n'y ait de liaison covalente entre les deux partenaires.¹⁴⁸ Le mécanisme proposé par le Pr V.Kazakov passe par l'oxydation d'un des ligands du complexe l'amenant à un état excité. Cette énergie est ensuite transférée au cation métallique qui peut ensuite émettre un photon (Schéma 15B).

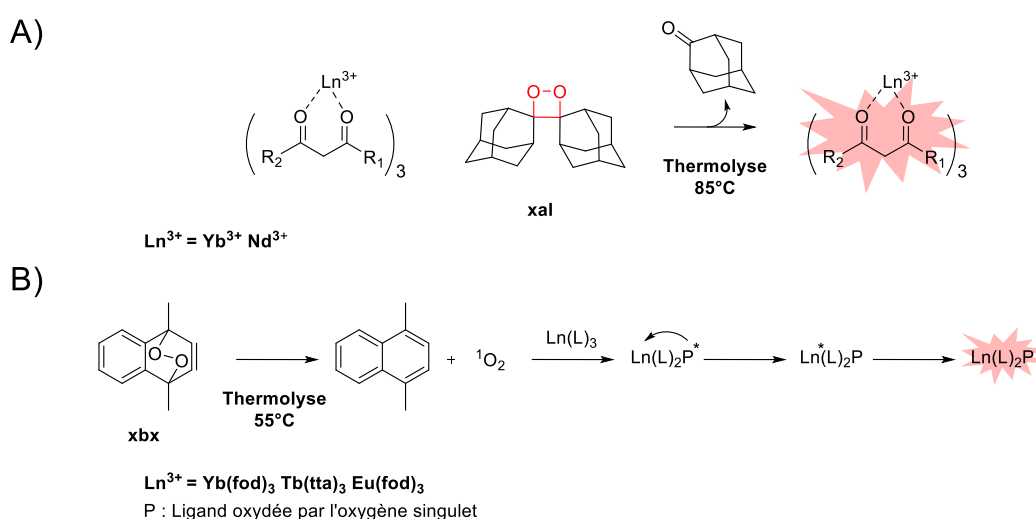


Schéma 15 A) Complexe de lanthanide tris β -dicétone sensibilisé par le bisadamantyle-dioxétane B) Complexe de lanthanide sensibilisé via la génération d'oxygène singulet.

3. Les sondes luminescentes pour la détection d'activité enzymatique.

3.1 Brève introduction à la détection d'activité enzymatique.

Les enzymes sont des protéines dotées de propriétés catalytiques, elles sont au cœur de mécanismes biochimiques nécessaires au bon fonctionnement d'une cellule. De ce fait, découle l'intérêt de la compréhension de leur rôle précis et de leur mécanisme d'action et éventail de substrats transformés. Cependant, différents facteurs sont susceptibles d'influencer ou de moduler l'activité d'une enzyme comme, l'interaction protéine-protéine,¹⁴⁹ l'inhibition endogène¹⁵⁰, ou encore le clivage d'un

146 Kazakov, K. P.; Voloshin, A. I.; Ostakhov, S. S.; Khusainov, L. A.; Zharinova, E. V. *Chemiluminescence and catalysis of decomposition of dispiro(diadamantane-1,2-dioxetane) in solutions of lanthanide perchlorates 2. * Chemiluminescence of Eu^{III}, Tb^{III}, and Pr^{III}*; 1997; Vol. 46

147 Voloshin, A. I.; Shavaleev, N. M.; Kazakov, V. P. Singlet-singlet energy transfer from ketone to lanthanide ion β -diketonates as studied by chemiluminescence quenching. First observation of infrared chemiluminescence of neodymium (III) and ytterbium (III) in solution. *J Photochem Photobiol A Chem* **2000**, *131* (1-3), 61-65

148 Kazakov, D. V.; Safarov, F. E. A novel chemiluminescence from the reaction of singlet oxygen with β -diketonates of europium(III), neodymium(III) and ytterbium(III). *Photochem Photobiol Sci* **2014**, *13*, 1646

149 Arkin, M. M. R.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (4), 301-317

150 Turk, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (9), 785-799

groupement fonctionnel (e.g. phosphate ou partie polypeptidique de l'enzyme) La multiplication de ces facteurs compliquent grandement l'attribution du ou des rôles d'une enzyme dans un système dynamique. En conséquence, la demande concernant des molécules capable de marquer mais surtout de détecter l'activité des enzymes est toujours plus grande, et doit être de plus en plus spécifique.

Les applications biologiques peuvent être divisées en trois parties : (1) la compréhension fine des fonctions physiologiques d'une enzyme et des facteurs l'influençant, (2) le criblage à haut débit afin de pouvoir tester de nouveaux inhibiteurs potentiels (90 % des médicaments développés ciblent des protéines dont une part non négligeable sont des enzymes),¹⁵¹ enfin (3) l'imagerie *in vivo* avec pour objectif l'établissement d'un diagnostic est également un champ d'application non négligeable. Certaines classes d'enzymes voient leur activité augmentée lors de dysfonctionnements physiologiques.¹⁵² Par exemple, les nitroréductases,¹⁵³ DT diaphorases¹⁵⁴ ou azoréductases¹⁵² sont surexprimées lors d'une concentration anormalement basse en dioxygène dissout dans le sang (*i.e.* hypoxie). La détection de ces surexpressions correspond en particulier à des marqueurs de pathogénicité pour de nombreux cancers. De même, on peut citer le cas de la surexpression de certaines phosphatases dans des maladies impliquant des dommages au foie ou encore des problèmes cardiaques.¹⁵⁵

La détection de ces surexpressions par imagerie médicale permet de mettre en évidence les anomalies, ou les organes où elles se situent, ou de suivre l'efficacité d'un traitement, ce qui peut être réalisée à l'aide de sondes pro-fluorescentes, FRET ou encore chimiluminescentes.

3.2 Des sondes fluorescentes pour la détection de l'activité enzymatique.

Le terme de pro-fluorescence a été introduit par L.D Lavis et R.T. Raines,¹⁵⁶ aussi appelé « smart probe » pour sonde intelligente, il désigne les sondes fluorogéniques capables d'augmenter leur signal lumineux lors de la présence de l'analyte ciblé. On peut également parler de sonde « OFF-ON ». Cette approche a pour avantage d'augmenter le rapport signal sur bruit, puisque les sondes sont activées uniquement après l'interaction avec l'analyte visé. La sensibilité de la sonde est alors directement liée à la différence de signal obtenu (soit en intensité, soit en termes de longueur d'onde d'excitation ou d'émission). Cette modulation de la fluorescence peut avoir lieu grâce aux différents phénomènes tel que le PeT, la modulation du caractère ICT d'un fluorophore, ou encore la formation *in situ* du cœur fluorescent. Ainsi la sonde **63** rapporté par C.Y Li *et al*¹⁵⁷ utilise une hémicyanine avec la fonction phénol masquée par un groupement phosphate (Schéma 16). Lors du clivage du phosphate en conditions physiologiques, le phénolate est libéré, exaltant les propriétés de fluorescence de l'hémicyanine *via* la formation d'un ICT efficient.¹⁵⁸ Quant à la sonde **64**, son originalité réside dans la formation du fluorophore *in situ*. En effet,

151 Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (9), 727-730

152 Singh, H.; Tiwari, K.; Tiwari, R.; Pramanik, S. K.; Das, A. Small Molecule as Fluorescent Probes for Monitoring Intracellular Enzymatic Transformations. *Chem Rev* **2019**, *119* (22), 11718-11760

153 Li, Y.; Sun, Y.; Li, J.; Su, Q.; Yuan, W.; Dai, Y.; Han, C.; Wang, Q.; Feng, W.; Li, F. Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for *in vivo* nitroreductase imaging. *J Am Chem Soc* **2015**, *137* (19), 6407-6416

154 Danson, S.; Ward, T. H.; Butler, J.; Ranson, M. DT-diaphorase: A target for new anticancer drugs. *Cancer Treat Rev* **2004**, *30* (5), 437-449

155 Metallo, C. M.; Vander Heiden, M. G. Understanding Metabolic Regulation and Its Influence on Cell Physiology. *Mol Cell* **2013**, *49* (3), 388-398

156 Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem Biol* **2008**, *3* (3), 142-155

157 Li, S. J.; Li, C. Y.; Li, Y. F.; Fei, J.; Wu, P.; Yang, B.; Ou-Yang, J.; Nie, S. X. Facile and Sensitive Near-Infrared Fluorescence Probe for the Detection of Endogenous Alkaline Phosphatase Activity *In Vivo*. *Anal Chem* **2017**, *89* (12), 6854-6860

158 Goddard, J. P.; Reymond, J. L. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotechnol* **2004**, *15* (4), 314-322

lors de la libération de la fonction phénol, une cascade réactionnelle a lieu pour former le motif imino-coumarine luminescent.¹⁵⁹ L'objectif d'une sonde pro-fluorescente efficace réside dans sa capacité à obtenir une exaltation de fluorescence élevée, mais surtout, pour l'imagerie médicale, un signal le plus faible possible en absence de l'analyte.

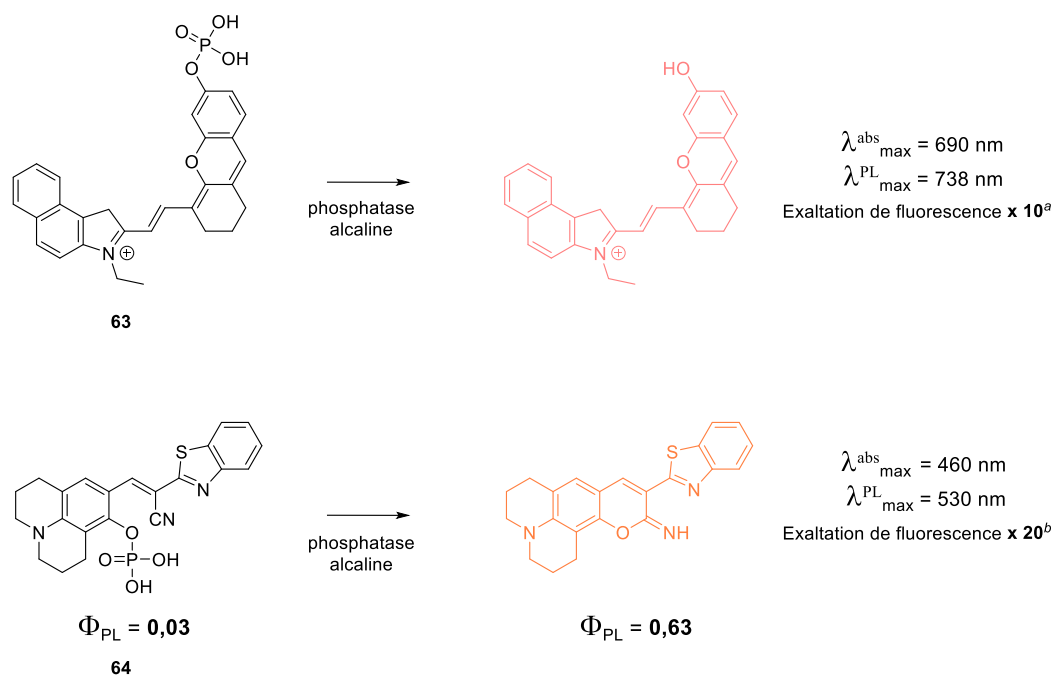


Schéma 16 Exemples de sondes pro-fluorescentes pour la détection de la phosphatase alcaline. a) exaltation de fluorescence annoncée par les auteurs¹⁵⁷ b) exaltation de fluorescence calculée par rapport au rendement quantique¹⁵⁹

De facto, les sondes de type FRET peuvent être considérées comme des sondes pro-fluorescentes, mais la conception de sondes pro-fluorescentes utilisant une modulation de la structure même de l'espèce émissive s'oppose à ces sondes utilisant deux chromophores/luminophores. L'inconvénient majeur des sondes pro-fluorescentes *stricto sensu* dans le domaine de l'imagerie médicale par rapport aux sondes FRET provient de la difficulté qu'il peut y avoir à obtenir une bonne exaltation de fluorescence dans la gamme d'émission essentielle à l'imagerie *in vivo*. Comme l'illustre l'exemple présenté dans la Figure 38, l'utilisation d'un couple FRET utilisant un inhibiteur (ou quencher en anglais) de fluorescence absorbant dans le proche-infra-rouge peut permettre l'obtention d'une exaltation de fluorescence d'un fluorophore proche-infra-rouge, ce qui permet l'utilisation d'un panel de fluorophores beaucoup plus large. La sonde **65** synthétisée au sein du laboratoire développé durant les travaux de thèse du Dr. A. Chevalier,^{160,161} est par exemple composée d'une Cy 5.0 combinée au quencher de fluorescence BHQ-3. Lors du clivage du motif peptidique, le FRET entre la Cy 5.0 et le BHQ-3 restaure la fluorescence

159 Xu, K.; Wang, F.; Pan, X.; Liu, R.; Ma, J.; Kong, F.; Tang, B. High selectivity imaging of nitroreductase using a near-infrared fluorescence probe in hypoxic tumor. *Chem Commun* **2013**, 49 (25), 2554-2556

160 Chevalier, A. Développement de nouveaux outils chimiques pour la synthèse de sondes optiques fluorogéniques pour la détection d'activités enzymatiques en milieu biologique, Université de Rouen, 2014

161 Chevalier, A.; Massif, C.; Renard, P. Y.; Romieu, A. Bioconjugatable azo-based dark-quencher dyes: Synthesis and application to protease-activatable far-red fluorescent probes. *Chem - A Eur J* **2013**, 19 (5), 1686-1699

éteinte auparavant par le chromophore grâce à son motif diazoïque (Figure 38), avec une très bonne amplification du signal.

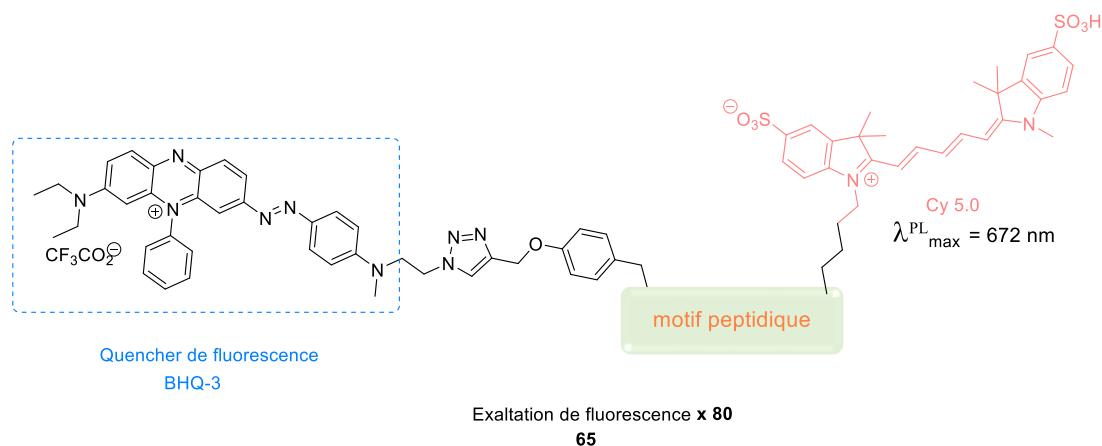


Figure 38 Sonde fluorescente de type FRET via l'utilisation d'un inhibiteur de fluorescence, exaltation de fluorescence obtenue par comparaison des intensités avant et après clivage du motif peptidique.

Néanmoins, si l'utilisation d'un quencher de fluorescence permet d'éviter de l'ingénierie moléculaire trop complexe sur le fluorophore, l'augmentation de la taille de la sonde est une contrepartie pouvant être non négligeable selon l'application.

Enfin, l'utilisation des bras auto-immolables (ou self immolative linker) est un outil supplémentaire utilisable dans la conception des sondes pro-fluorescentes. Initialement utilisés pour la conception de « promédicaments » (prodrug en anglais), ces motifs peuvent atténuer plusieurs problématiques rencontrées.¹⁶² En effet, certaines sondes pro-fluorescentes souffrent d'un manque de spécificité à cause de la possible fragilité de la liaison existante entre la fonction sensible à l'analyte et le reste du fluorophore.¹⁶³ L'introduction d'un bras auto-immolable peut remédier à ce problème. De plus, l'éloignement du site de coupure enzymatique du fluorophore permet dans certains cas d'améliorer la cinétique de clivage. En effet, l'éloignement du site de reconnaissance de l'enzyme du squelette encombrant polyaromatique du pro-fluorophore, améliore l'affinité de la sonde pour l'enzyme. De même, l'utilisation d'un bras auto-immolable permet de diversifier la fonction d'accroche sur le fluorophore (*i.e.* aniline, phénol, thiol...), ce qui permet de détecter des activités enzymatiques libérant une plus grande diversité de fonctions chimiques. Cela accroît *de facto* la polyvalence d'un même pro-fluorophore pour diverses enzymes ciblées. Ainsi un même fluorophore possédant d'excellentes caractéristiques photophysiques pourra être utilisé pour divers cibles en modulant le bras auto-immolable.

La sonde **66** rapportée par le groupe de S. M. Hecht *et al*¹⁶⁴ a permis d'imager l'activité de la nitroréductase (NTR) *in cellulo*. Elle est constituée d'une cyanine Cy 7.0 composée d'un motif quinone masqué par la présence d'un bras auto-immolable *para*-nitrobenzyle. La réduction du groupement nitro par la NTR en présence de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, cofacteur indispensable à

162 Alouane, A.; Labruère, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Self-immolative spacers: Kinetic aspects, structure-property relationships, and applications. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2015, p 7492-7509

163 Goddard, J. P.; Reymond, J. L. Enzyme assays for high-throughput screening. *Curr Opin Biotechnol* **2004**, *15* (4), 314-322

164 Chevalier, A.; Zhang, Y.; Khdour, O. M.; Kaye, J. B.; Hecht, S. M. Mitochondrial Nitroreductase Activity Enables Selective Imaging and Therapeutic Targeting. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (37), 12009-12012

l'activité de la NTR) provoque un mécanisme d'élimination 1,6.^{165,166} Ainsi, la libération du fluorophore **67** conduit à une exaltation de fluorescence à 703 nm. En outre, cet exemple nous permet d'illustrer un des paramètres clés d'un marqueur biologique : la sélectivité. Ici, les auteurs l'ont éprouvée en testant la réponse de la sonde face à la DT-diaphorase, autre enzyme appartenant à la famille des réductases. La réponse en termes de fluorescence à la DT-diaphorase se révèle nettement plus faible qu'en présence de NTR.

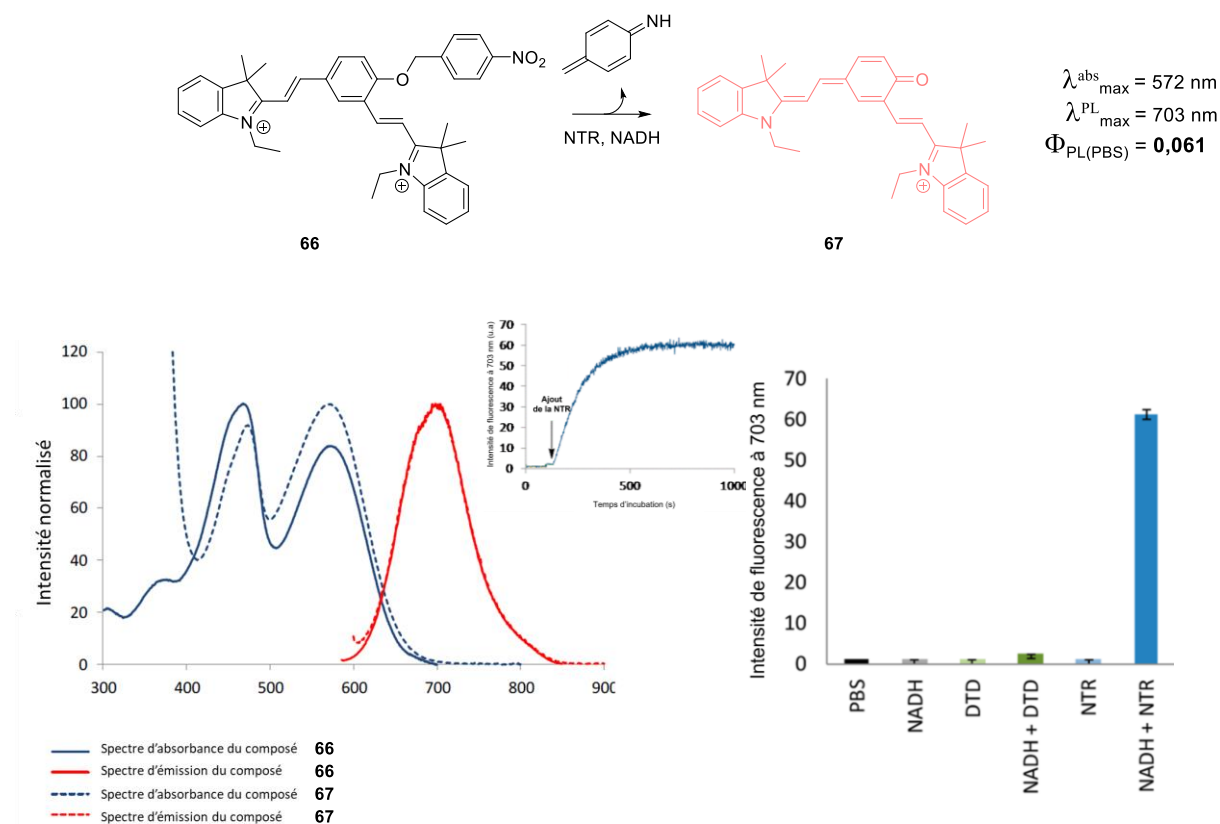


Schéma 17 Sonde pour la détection de l'activité de la nitroréductase (NTR), et comparaison de l'intensité de fluorescence obtenue en présence de DT-diaphorase (DTD).¹⁶⁴

La conception de sondes chimiluminescentes de type 1,2-dioxétane peut être une alternative aux sondes pro-fluorescentes. Nous aurons l'occasion de présenter un état de l'art plus récent de ces sondes dans le chapitre 3.

4. Présentation des travaux antérieur au laboratoire.

Au sein du laboratoire COBRA, l'équipe de chimie bio-organique du Pr. Pierre-Yves Renard travaille sur la conception de sondes chimiluminescentes depuis un peu plus d'une décennie. Son expertise sur le sujet est antérieure à son arrivée au laboratoire¹¹⁵ et a été poursuivie par la suite.

165 Carl, P. L.; Chakravarty, P. K.; Katzenellenbogen, J. A.A Novel Connector Linkage Applicable in Prodrug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1981, p 479-480

166 Alouane, A.; Labruère, R.; Silvestre, K. J.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L. Disassembly kinetics of quinone-methide-based self-immolative spacers that contain aromatic nitrogen heterocycles. *Chem - An Asian J* **2014**, 9 (5), 1334-1340

4.1 Synthèse et évaluation d'une sonde chimiluminescente pour la détection de la Caspase-3.

Au sein de l'équipe, la première sonde chimiluminescente a été synthétisée durant les travaux de thèse du Dr. Jean-Alexandre Richard sous la direction du Pr. Pierre-Yves Renard en collaboration avec la start-up QUIDD.¹⁶⁷ Cette sonde a été conçue pour détecter l'activité de la caspase-3 *in vitro*. Elle est donc composée de la plateforme de Schaap, munie d'un bras auto-immolable PABA (*para*-aminobenzalcohol) permettant un clivage enzymatique d'une liaison amide, relarguant une fonction amine (Schéma 18). Comme pour l'exemple vu précédemment, un mécanisme d'élimination 1,6 suit le relargage de cette fonction amine, et permet d'obtenir le phénolate chimiluminescent. Le bras auto-immolable permet donc de convertir une libération d'amine aliphatique en une libération de phénol, indispensable pour la chimiluminescence.

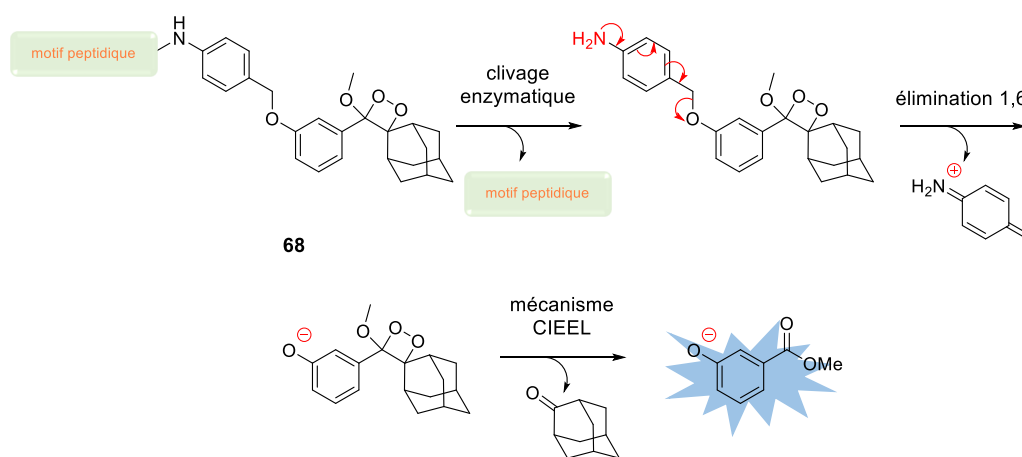


Schéma 18 Représentation schématique d'une sonde chimiluminescente pour détecter la caspase-3 et son mécanisme de déclenchement.

Les conditions de mesure du clivage enzymatique ont été adaptées par rapport aux procédures développées par le Pr. Schaap. Dans ce cas présent, la caspase-3 est une enzyme fonctionnant à pH physiologique (*i.e* pH 7,4).¹⁶⁸ Or, il est nécessaire de rappeler que le déclenchement du mécanisme CIEEL (ou CTID) de la plateforme de Schaap a lieu grâce à la charge de la fonction phénolate. Lors de la preuve de concept par le Pr. Schaap pour la détection de la phosphatase alcaline, le choix de l'analyte cible a permis de travailler en tampon basique. L'impossibilité de pouvoir travailler à pH physiologique est l'un des désavantages de la sonde de Schaap.

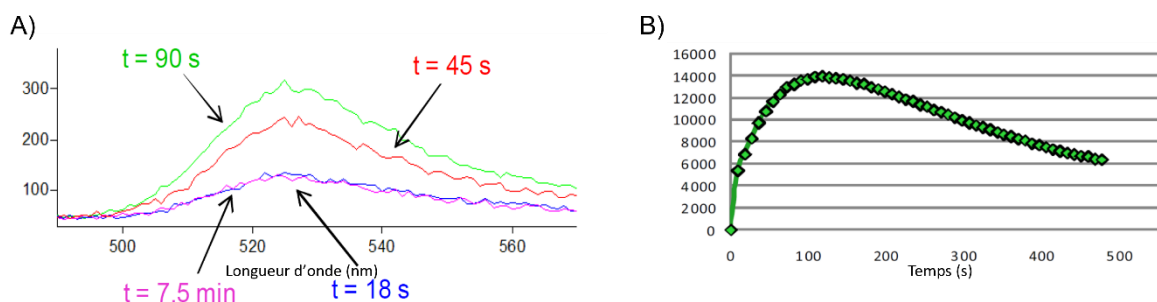
Le protocole utilisé a donc été réalisé en deux temps :

- 1) Une première phase de clivage enzymatique avec la sonde et l'enzyme cible dissoute dans un tampon spécifique compatible au bon fonctionnement de l'enzyme.
- 2) Puis un prélèvement du milieu réactionnel est ajouté à un tampon basique, contenant un enhancer afin de déclencher le mécanisme de décomposition du dioxétane pour enregistrer sa chimiluminescence.

167 Richard, J.-A. Synthèse de sondes luminescentes utilisant un bras réactif auto-immolable : Applications à la détection de peptidases, Université de Rouen, 2008

168 Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* **1997**, *272* (41), 25719-25723

Ce protocole a permis d'enregistrer une augmentation de l'intensité de chimiluminescence au cours du temps d'incubation de la sonde avec l'enzyme (Figure 39A). Cette émission à 530 nm est due à la présence de la fluoescéine au sein de l'enhancer utilisé. Le temps de chimiluminescence enregistré à chaque prélèvement est de plusieurs minutes (Figure 39B), elle est alors qualifiée de glow.



Cet exemple est la première application de la chimiluminescence pour la détection d'une activité protéasique. Cependant, la détection a été réalisée *in vitro*, et son utilisation pour une application *in vivo* est limitée par le pKa du phénol trop élevé et l'absence d'une émission dans la fenêtre d'imagerie *in vivo*. Enfin même si l'utilisation d'une architecture micellaire peut être compatible avec une application *in vivo*, une sonde chimiluminescente évitant son utilisation gagnerait dans sa prise en main.

4.2 Synthèse d'une sonde chimiluminescente à plateforme de type phénol fonctionnalisée par un complexe de lanthanide

Mon projet de thèse s'inscrit clairement à la suite des travaux de thèse du Dr. Kathleen Solmont réalisé entre 2015 et 2018.¹⁶⁹ L'un des axes de son sujet de thèse a été la synthèse d'une sonde chimiluminescente fonctionnalisée par un complexe de lanthanide. C'est pourquoi la présentation de ses travaux sur ce sujet fera également office d'introduction aux résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse pour ce chapitre.

La conception d'une sonde chimiluminescente pour la détection de l'activité enzymatique *in vivo* est l'objectif affiché par ce projet. Pour ce faire, comme n'importe quel marqueur fluorescent, la sonde doit émettre dans la fenêtre d'imagerie *in vivo* (i.e. proche IR et IR), doit être non cytotoxique, et hydrosoluble aux concentrations expérimentales utilisées. Les propriétés intrinsèques de la chimiluminescence offrent la possibilité d'obtenir une sonde OFF-ON si tant est que le chimiluminophore possède de bonnes propriétés photophysiques.

La sonde **xca** (Schéma 19) visée lors des travaux de thèse du Dr. K. Solmont est composée d'un motif phénolique possédant le groupement stabilisant dihydrofurane développé par le groupe du Pr Matsumoto en position *méta*. Le choix de ce motif est inhérent à l'expertise acquise au sein de l'équipe au cours de thèses précédentes. Par un souci de pertinence, ces travaux seront présentés lors du chapitre 3. En somme, ce motif présente des capacités stabilisantes plus élevées que le groupement adamantyle classiquement utilisé pour des propriétés d'émission similaire.

169 Solmont, K. Développement de sondes chimiluminescentes pour la détection d'activités enzymatiques, Université de Rouen, 2018

Le cœur de ce projet réside dans l'utilisation du chimiluminophore comme antenne, transférant son énergie, à un complexe de lanthanide afin d'obtenir des longueurs d'ondes d'émission dans le proche IR. Pour une application *in vivo*, l'euprimum a été choisi du fait de sa fine bande d'émission à 614 nm. Le choix du ligand s'est porté sur le DO3A pour ses nombreuses qualités, telles que sa stabilité, son potentiel d'hydrosolubilisation en contrepartie au caractère hydrophobe des sondes chimiluminescentes, ainsi que son utilisation déjà éprouvée *in vivo*. De plus, en partant du synthon de départ DO3AR (R correspondant aux fonctions protectrices des acides carboxyliques), les résultats décrits dans la littérature montrent que la fonctionnalisation de ce ligand reste accessible plus ou moins facilement. Il a été positionné en position *ortho* du phénol afin de viser une complexation de la fonction phénolate au lanthanide. La chélation du phénolate au lanthanide pourra alors jouer plusieurs rôles clés. D'une part cette chélation permettra d'augmenter le nombre d'atomes coordonnant le lanthanide (passage de 7 à 8 fonctions chélatantes sur 9 sites possibles) afin de minimiser la présence de molécules d'eau dans la première sphère de coordination du lanthanide. En effet, ces molécules d'eau peuvent avoir un effet délétère sur l'intensité de luminescence. D'autre part, nous espérons augmenter l'efficacité de sensibilisation du lanthanide en rapprochant la plateforme chimiluminescente qui fera office d'antenne. De plus, cette chélation pourrait également avoir pour effet d'abaisser le pKa du phénol rendant la sonde activable en conditions physiologiques. Enfin, il est envisageable de miser sur la capacité de conversion des états triplets en relaxation radiative d'un complexe de lanthanide. En effet durant l'introduction à la chimiluminescence, nous avons vu que certains mécanismes décrivant la décomposition du dioxétane amènerait une quantité non négligeable d'espèces à l'état excité T₁. Dans notre cas, la génération de ces états pourrait sensibiliser le lanthanide.

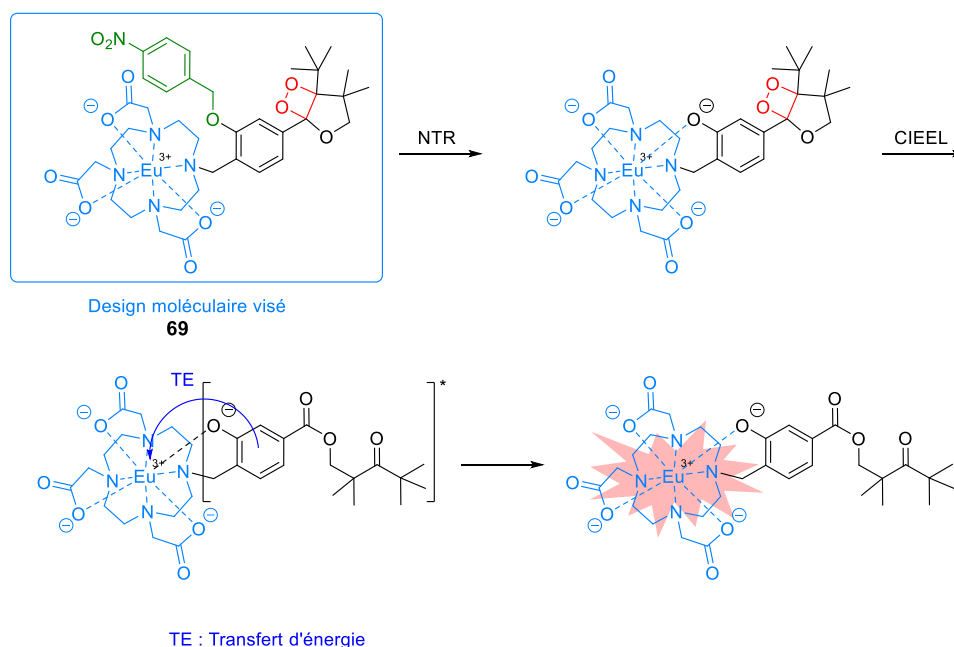


Schéma 19 Structure de la sonde chimiluminescente visée durant les travaux de thèse du Dr. Solmont ainsi que son mécanisme d'action.

Comme nous l'avons vu auparavant, une fois la preuve de concept réalisée, l'architecture de la sonde pourra être dérivatisée en plusieurs sondes chimiluminescentes *via* la modulation du groupement masquant le phénol. Dans un premier temps, il a été choisi de cibler la NTR, car le ciblage de cette enzyme est facilement accessible grâce à l'utilisation du groupement *para*-nitrobenzyle. Le point clé des

travaux de thèse du Dr. Solmont concernant la synthèse de la sonde **69** a été la recherche d'une voie pour fonctionnaliser la plateforme chimiluminescente de Matsumoto en position *ortho* du phénol. Deux stratégies ont été alors envisagées : l'une par orthométallation, l'autre par orthoformylation. C'est la seconde stratégie qui a été retenue. La voie de synthèse comporte donc 19 étapes au total, dont 3 étapes convergent vers la voie de synthèse principale. Elle débute à partir du substrat commercial 3-hydroxybenzoate de méthyle **70**. Elle consiste à obtenir dans un premier temps l'intermédiaire clé **75** de la synthèse des sondes de Matsumoto (10 étapes). Par la suite, cet intermédiaire est modifié par orthoformylation permettant l'introduction du ligand DO3A et le déclencheur est introduit sur le phénol par l'accroche du groupement *para*-nitrobenzyle pour mener au composé **77**. Enfin la synthèse se termine par la complexation de l'euprium et la formation du dioxétane. Malheureusement, le nombre d'étapes de synthèse requises pour accéder au groupement stabilisant de Matsumoto, le temps passé sur l'optimisation de la bonne stratégie synthétique combinés aux différentes difficultés de synthèse rencontrées, en particulier au niveau du groupe protecteur du phénol ; n'ont pas permis d'obtenir la sonde finale **69** durant ces travaux de thèse, l'intermédiaire le plus avancé obtenu étant l'intermédiaire **77**, à trois étapes de la sonde finale : déprotection des esters du DO3A, complexation de l'euprium et formation du dioxétane.

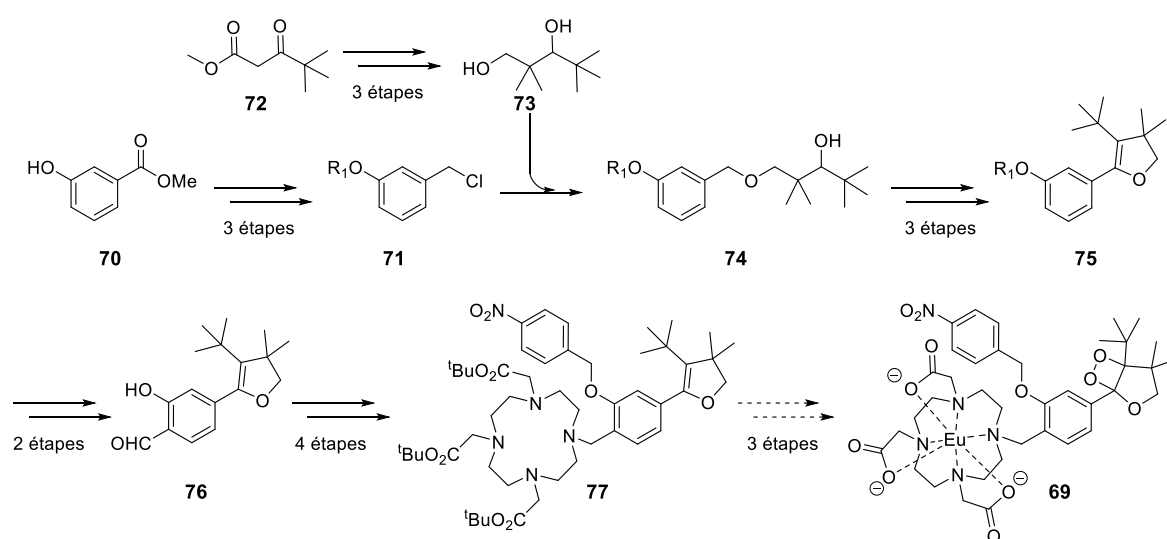


Schéma 20 Schéma de synthèse réalisé par le Dr. Solmont.

II. Résultats et Discussion.

1. Présentation de la voie de synthèse de la plateforme chimiluminescente.

L'objectif premier de ce sujet de thèse a été la synthèse, ainsi que la caractérisation de la sonde chimiluminescente **78**. Son design est similaire à la sonde ciblée durant les travaux de thèse du Dr. Solmont. Dans notre cas, l'ajout d'un atome de chlore en ortho du phénol assurera, comme démontré sur plusieurs exemples de la littérature (vide supra et l'introduction du chapitre 3), la diminution du pKa du phénol aux alentours de 7. Afin de limiter le nombre d'étapes de synthèse, il a été choisi de revenir au motif stabilisant adamantyle. Ceci induit lors du mécanisme d'action la libération de l'adamantanone dans le milieu. Durant le mécanisme CIEEL, l'adamantanone peut alors être excitée à la place du cœur phénolique diminuant l'efficacité potentielle de luminescence de la sonde.

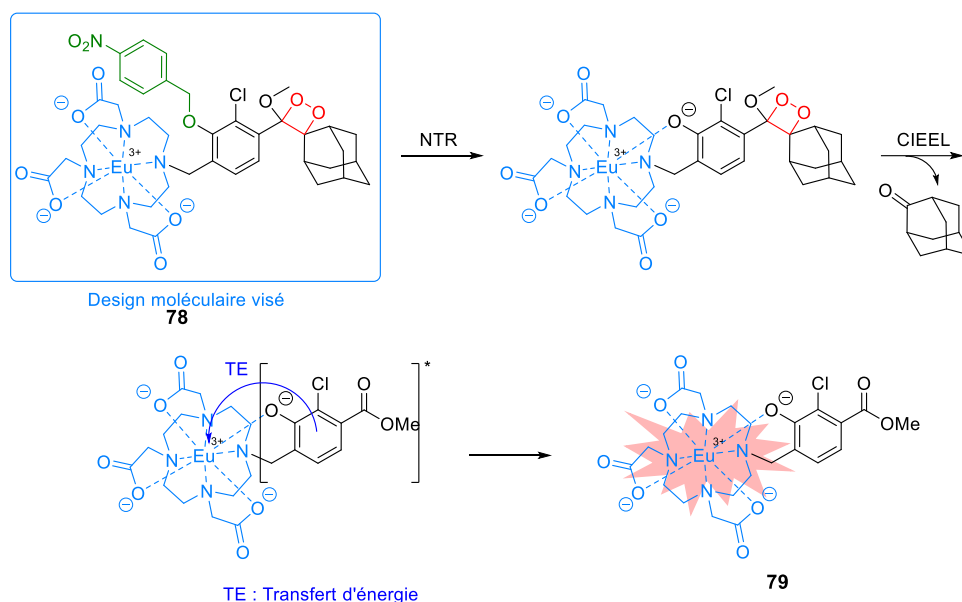


Schéma 21 Représentation schématique du chimiluminophore visé ainsi que son mécanisme d'action postulé.

Si le choix du motif adamantyle n'est pas justifié par une réelle amélioration des propriétés intrinsèque de la sonde, la simplicité d'accès à cette sonde a été préférée afin d'établir, dans un premier temps, une preuve de concept sur l'utilisation d'une architecture combinant complexe de lanthanide et antenne chimiluminescente.

L'architecture générale des molécules visées, est basée sur le motif du précurseur de la sonde de Schaap **81** (Schéma 22). Pour y parvenir, trois voies de synthèse optimisées ont été décrites. La voie a (Schéma 17) utilisée par le groupe du Pr. Schaap¹⁷⁰, est basé sur la réaction de McMurry¹⁷¹ permettant le couplage entre l'adamantanone et l'ester de méthyle **80**. Cette voie de synthèse permet l'obtention du dérivé **33** en une seule étape. Néanmoins, le rendement de la réaction est limité par l'apparition de sous-produit d' homo-couplage entre les réactifs, notamment avec la formation de bis(adamantyldène). De plus, la réaction de McMurry est très sensible à l'oxygène et à la présence d'eau, il serait nécessaire de travailler en boîte à gant sous atmosphère inerte, pour obtenir de bons résultats.¹⁷² La voie de synthèse b, développé par P. Sammes et C. Roeschlaub¹⁷³, met à profit la réaction d'Horner-Wadsworth-Emmons^{174,175} (HWE) pour synthétiser l'éther d'énol **33**. Pour ce faire, l'obtention d'une fonction phosphonate est requise afin de pouvoir être mis en réaction avec l'adamantanone. Il faut donc partir non plus d'un ester de méthyle mais de l'aldéhyde **81** et procéder à 2 étapes d'aménagement fonctionnel pour obtenir le dérivé phosphonate **82**. Enfin, durant la rédaction de ce manuscrit, une

170 Schaap, A. P.; Chen, T.; Handley, R. S. Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes 2. : Fluoride-Induced chemiluminescence from tert-butylidimethylsilyloxy-substituted dioxetanes. *Tetrahedron Lett* **1987**, *28* (11), 1155-1158

171 McMurry, J. E. Carbonyl-Coupling Reactions Using Low-Valent Titanium. *Chem Rev* **1989**, *89* (7), 1513-1524

172 Sabelle, S.; Hydrio, J.; Leclerc, E.; Mioskowski, C.; Renard, P. Y. McMurry intermolecular cross-coupling between an ester and a ketone: Scope and limitations. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43* (20), 3645-3648

173 Roeschlaub, C. A.; Sammes, P. G. Use of the Wadsworth-Emmons reaction for preparing hindered vinyl ethers and related 1,2-dioxetanes. *J Chem Soc Perkin Trans 1* **2000**, No 14, 2243-2248

174 Horner, L.; Hoffmann, H.; Wippel, H. G.; Klahre, G. Phosphororganische Verbindungen, XX. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien. *Chem Ber* **1959**, *92* (10), 2499-2505

175 Boutagy, J.; Thomas, R. Olefin Synthesis with Organic Phosphonate Carbanions. *Chem Rev* **1973**, *74* (1), 87-98

troisième stratégie appelée « fonctionnalisation tardive du chromophore » a été proposée par le Pr. Shabat et son équipe (voie c).¹⁷⁶ Si cette méthode ne fait pas gagner en étape de synthèse, elle propose une nouvelle approche de synthèse plus convergente, facilitant la conception de chimilumino-phores. Cette approche sera présentée durant l'état de l'art du chapitre 3.

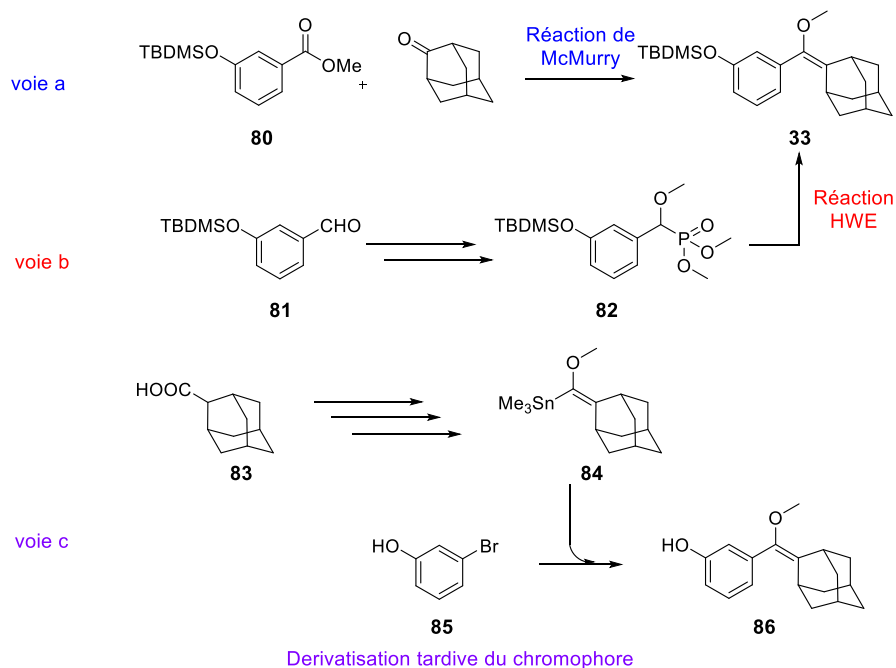


Schéma 22 Voies de synthèse connues pour accéder au précurseur du dioxétane de Schaap.

A l'image des travaux de thèse du Dr. Solmont, nous avons envisagé la synthèse du motif phénol-éther d'énol adamantyl dans un premier temps pour ensuite le fonctionnaliser, afin d'y ajouter le ligand DO3A. Pour ce faire nous avons choisi d'utiliser la voie de Sammes et Roeschlaub malgré son plus grand nombre d'étapes car elle nous a semblé plus reproductible et plus robuste. À partir du 2-chloro-3-hydroxybenzaldéhyde **87**, le dérivé chloré éther d'énol **88** est obtenu en 5 étapes (Schéma 18). Puis, à l'aide d'une formylation régiosélective, il est possible d'envisager, *via* des aménagements fonctionnels, l'accroche du ligand DO3A avec ses acides carboxyliques protégés. Il faut également insérer le motif de reconnaissance de la nitroréductase par substitution nucléophile sur le phénol, complexer l'euporium, et réaliser le cycle 1,2-dioxétane par cyclo addition [2+2] d'oxygène singulet.

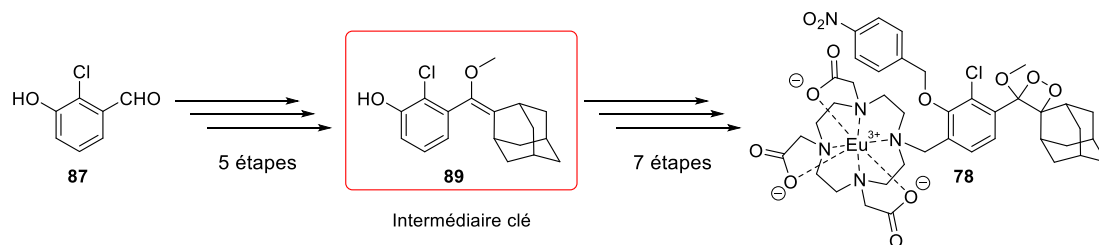


Schéma 23 Stratégie de synthèse vers le composé cible.

176 Gnaim, S.; Gholap, S. P.; Ge, L.; Das, S.; Gutkin, S.; Green, O.; Shelef, O.; Hananya, N.; Baran, P. S.; Shabat, D. Modular Access to Diverse Chemiluminescent Dioxetane-Luminophores Through Convergent Synthesis. *Angew Chemie Int Ed* **2022**, No e202202187 10.1002/anie.202202187

2. Synthèse de l'intermédiaire clé.

Si l'obtention du composé final **78** ne met pas en exergue la nécessité d'un intermédiaire clé de synthèse, la seconde partie de notre projet *via* la fonctionnalisation de cet intermédiaire pour l'accroche de différents fluorophores la justifie. Une des stratégies de synthèse durant ces travaux a donc consisté à obtenir plusieurs dizaines de grammes du composé **88**. Dans un premier temps la synthèse a démarré à partir de l'aldéhyde commercial **87**. Cependant, son accès est limité par de longs délais de livraison, ainsi qu'une limitation concernant la taille de lots. L'une de nos premières problématiques fut donc de produire une quantité non négligeable (quelques dizaines de grammes) du dérivés chloré **87** par *ortho* chloration du *meta* hydroxybenzaldehyde **xdc** (Schéma 24), très bon marché et livrable en grande quantité.

Ainsi, la molécule **87** a été obtenue par la réaction du 3-hydroxybenzaldehyde **89** avec la dichlorodiméthylhydantoïne (DCDMH), faisant office de source de chlore, en présence d'une quantité catalytique du sel de diisopropylammonium préparé à l'aide de diisopropylamine et d'acide chlorhydrique. Cette réaction décrite dans la littérature pour de petites quantités¹⁷⁷ nous a posé quelques difficultés à plus grosse échelle. Premièrement, le manque de solubilité du produit de départ dans le toluène, nous a conduits à réaliser cette réaction en conditions hétérogènes. Puis, la séparation du sous-produit de l'hydantoïne, présente en quantité stœchiométrique, a demandé un certain temps d'optimisation. Des lavages à l'eau successifs du solide brut, obtenu après évaporation sans traitement, a été la seule solution permettant d'isoler le produit final **87** dans des quantités satisfaisantes. Ce traitement abaisse de façon significative le rendement (45 %), alors que la RMN du brut de la réaction permet d'observer une conversion supérieure à 90 %.

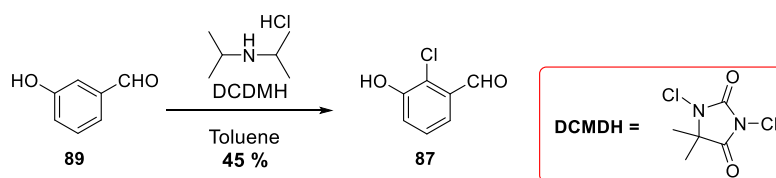


Schéma 24 Synthèse du dérivé chloré **87** de départ.

L'optimisation de la voie de synthèse fut facilitée par les résultats optimisés publiés par le groupe du Pr. Shabat travaillant avec le même produit de départ.¹⁷⁸ La fonction aldéhyde est tout d'abord protégée en engageant le produit de départ **87** en présence d'orthoformiate de triméthyle dans du méthanol anhydre et d'une quantité catalytique de tribromure de tétrabutylammonium. Une fois la fonction acétal obtenue, la fonction phénol du composé **90** a été protégée à l'aide du groupement protecteur *tert*-butyl dimethylsilyl. Le phénol protégé **91** a été obtenu avec un bon rendement de 95 %. La fonction phosphonate a ensuite été générée *via* l'addition du triméthylphosphite combiné à l'ajout de tétrachlorure de titane,^{173,179} permettant d'obtenir le composé **92** avec un très bon rendement de 92 %. Puis, le précurseur à la réaction HWE a été engagée en présence de diisopropylamidure de lithium (LDA), à -78°C, et de 2-adamantanone afin d'obtenir l'éther d'énol **93** avec un bon rendement de 80%.

177 Xiong, X.; Yeung, Y. Y. Ammonium Salt-Catalyzed Highly Practical Ortho-Selective Monohalogenation and Phenylselenation of Phenols: Scope and Applications. *ACS Catal* **2018**, *8* (5), 4033-4043

178 Remarkable Enhancement of Chemiluminescent Signal by Dioxetane-Fluorophore Conjugates: Turn-ON Chemiluminescence Probes with Color Modulation for Sensing and Imaging. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (40), 13438-13446

179 Burkhouse, D.; Zimmer, H. New Synthesis of 1-Alkoxy-1-arylmethaneosulphonic Acid Esters. *Synthesis (Stuttg)* **1984**, *4*, 330

Enfin, une réaction de déprotection du groupement protecteur TBDMS, en présence d'anions fluorure, a permis d'obtenir notre intermédiaire clé le phénol **88** avec un rendement global de 56 % sur 5 étapes.

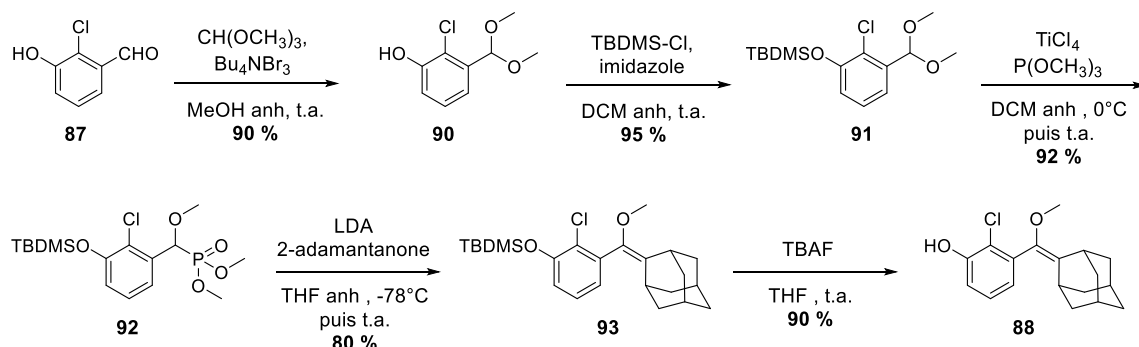


Schéma 25 Synthèse du dérivé éther d'énol **88**.

Dans un premier temps, la synthèse a été réalisée à l'échelle du gramme. Par comparaison avec les résultats décrits par l'équipe du Pr. Shabat sur la même échelle de synthèse, nous avons obtenu des rendements équivalents pour les 5 étapes de synthèse. Puis, il a été nécessaire d'optimiser la synthèse à plus large échelle. En effet, afin d'éviter les étapes de purification sur gel de silice sur de grosses quantités, des ajustements ont été effectués sur les modes opératoires utilisés. L'optimisation des traitements, a permis d'engager des bruts réactionnels directement dans l'étape suivante. Ainsi la séquence réactionnelle décrite dans le Schéma 25 a pu être réalisée sans purification intermédiaire, à l'exception de l'éther d'énol **93** qui a été recristallisé dans l'acétonitrile, de la formation de l'acétal jusqu'à la réaction de déprotection, avec des rendements de conversion RMN similaire aux réactions faites avec purification des intermédiaires. L'intermédiaire **93** a pu être obtenu à hauteur de 36 g.

3. Introduction du complexe de lanthanide sur la plateforme chimiluminescente

L'obtention du composé **78** à partir de l'intermédiaire clé nécessite la fonctionnalisation du phényle afin de permettre l'accroche du ligand DO3A. Cette stratégie de synthèse éprouvée durant les travaux de thèse du Dr. Solmont a été mis à profit dans notre cas. À partir du substrat **88** trois étapes de synthèse ont été nécessaires pour obtenir le composé **94** via une orthoformylation et une réduction. L'introduction du groupement *para* nitrobenzyle, motif de reconnaissance pour la nitroréductase, a été intercalé entre les deux étapes d'aménagement fonctionnel. Puis, la transformation de l'alcool benzylique du composé **94** en un bon groupe partant, a rendu possible la substitution nucléophile par le macrocycle aminé. Enfin, afin d'effectuer la complexation du lanthanide désiré (dans ce cas, l'euprium), il a fallu réaliser la déprotection des acides du ligand. Enfin la stratégie de synthèse a été achevée par la formation du cycle 1,2-dioxétane par cycloaddition [2+2].

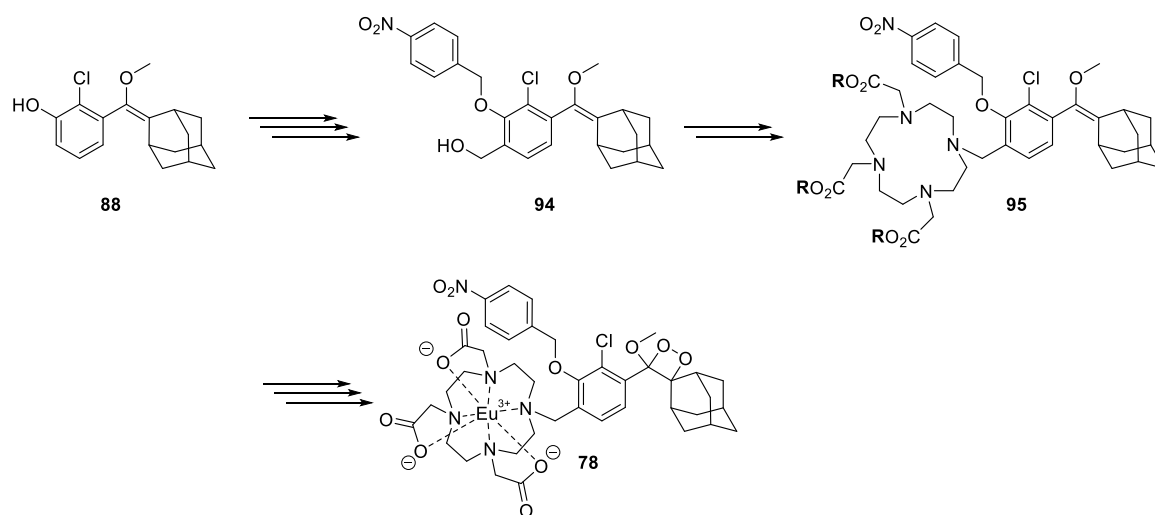


Schéma 26 Stratégie de synthèse de 78 à partir de l'intermédiaire clé 88.

3.1 Insertion d'un groupement fonctionnel et du motif de reconnaissance sur la plateforme chimiluminescente.

Dans un premier temps, nous avons rencontré quelques difficultés dans la mise en œuvre de la formylation en position *ortho* du phénol. En effet il a été établi que la présence d'eau pouvait réduire de façon drastique le rendement (inférieur à 5% si toutes les précautions ne sont pas prises pour éliminer toute trace d'eau).¹⁸⁰ Pour ce faire, chaque réactif a dû être traité en conséquence, le paraformaldéhyde et le chlorure de magnésium ont été mis au dessiccateur 24 h avant chaque réaction. L'utilisation de MgCl₂ anhydre avec une pureté de 99,99 % contre 98 % pour les premiers essais, a confirmé l'hypothèse de départ, car une augmentation de rendement significative (de 5-10 % à 65 %) a été obtenue avec cette pureté du réactif. De plus, la conversion du produit de départ **88** n'étant pas complète, la purification du composé formylé **96** a été compliquée par une co-élution liée à des polarités proches entre les deux composés.

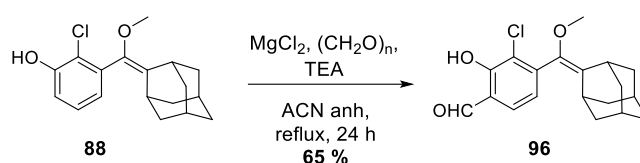


Schéma 27 Orthoformylation du composé **88**.

L'aldéhyde **96** a ensuite été engagé dans une réaction d'alkylation avec le bromure de *p*-nitrobenzyle, en présence de carbonate de potassium pour obtenir le composé **97** fonctionnalisé par le motif de reconnaissance avec un bon rendement de 86 %. Enfin, la réduction de la fonction aldéhyde en alcool benzylique a pu être mise en œuvre à l'aide du borohydrure de sodium dans le dichlorométhane avec un rendement de réaction quantitatif (Schéma 28).

180 Hansen, T. V.; Skattebot, L. Ortho-Formylation of Phenols; Preparation of 3-Bromosalicylaldehyde. *Org Synth* **2005**, *82*, 64-68

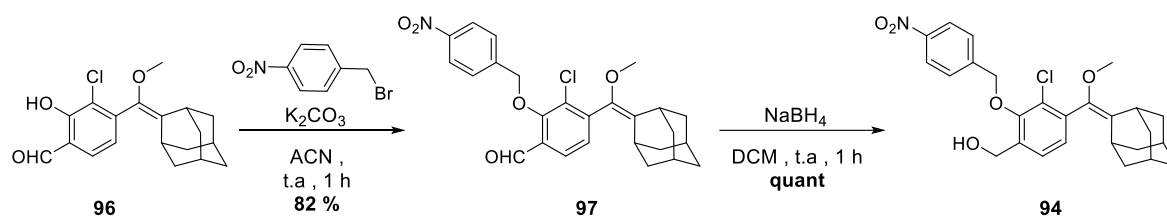


Schéma 28 Synthèse du composé **94**, précurseur à la réaction d'accroche du ligand DO3A.

3.2 Accroche du ligand DO3A.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'optimiser la voie de synthèse en la diminuant d'une étape. En effet, il serait théoriquement possible d'effectuer une amination réductrice entre l'aldéhyde **xdm** et le ligand DO3A. Cette amination réductrice avait été testée sans succès par le Dr. Solmont. Cependant les essais effectués l'ont été en présence du phénol protégé par le groupement *p*-nitrobenzyle. La potentielle gêne stérique générée par le ligand DO3A nous a encouragé à retenter la réaction avec le composé **96**. Dans un premier temps, le composé **96** a été mis en réaction avec le DO3A^tbu et du triacétoxyborohydrure de sodium (NaBH(OAc)₃) en présence d'acide acétique. Après 24 h, aucune réaction n'a été observée. Afin de vérifier que l'absence de réaction n'est pas du fait d'une gêne stérique provoquée par le macrocycle azoté trop volumineux, un second essai a été essayé dans les mêmes conditions en présence de pipéridine sans différence de résultat. L'hypothèse d'un agent réducteur trop peu efficace a été faite et en conséquence, un troisième essai a été effectué en présence de cyanoborohydrure de sodium (NaBH₃CN). Ce troisième essai infructueux nous a permis d'observer par masse le composé de réduction de la fonction aldéhyde en alcool et nous a conduit à abandonner définitivement cette voie de synthèse (Schéma 29).

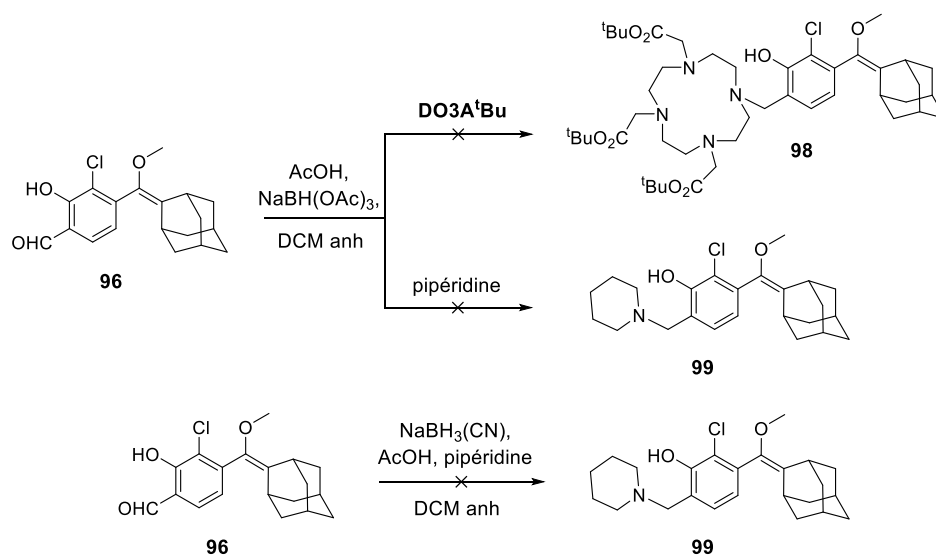


Schéma 29 Tentative d'insertion du DO3A via une amination réductrice.

La stratégie initiale d'accroche du ligand DO3A protégé a été basée sur l'utilisation d'une réaction de substitution nucléophile. Il a donc été nécessaire de transformer l'alcool benzylique en un bon groupe partant. Dans la voie de synthèse développée par le Dr. K. Solmont, il a été choisi d'halogéner cette position *via* la réaction d'Appel¹⁸¹ à l'aide du tétrabromure de carbone et de triphénylphosphine.

181 Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angew Chem int Ed Engl* **1975**, *14* (2), 801-811

Malheureusement, le produit **100** n'a pas été obtenu. Le signal RMN des protons du OMe, n'étant plus présent, nous soupçonnons l'hydrolyse de l'éther d'énol en cétone durant la bromation du composé **94**. Cette hydrolyse serait probablement liée à la sensibilité de cette fonction vis-à-vis des acides. En effet, il est possible que CBr_4 , contienne des traces d'acide bromhydrique (HBr). Nous avons alors opté pour l'insertion d'un groupement tosyle qui nous a conduit au même problème d'hydrolyse, avec un faible taux de conversion de l'alcool benzylique. Le choix s'est alors porté sur l'insertion du groupement mésyle. Après optimisation nous avons réussi à obtenir la molécule **102** avec une conversion RMN de 100 % en présence de trois équivalents de chlorure de mésyle et un équivalent de triéthylamine. Du fait de la faible stabilité du groupement mésylate, en particulier lors des chromatographies sur gel de silice, nous avons choisi d'engager le composé issu du brut réactionnel sans purification intermédiaire (Schéma 30).

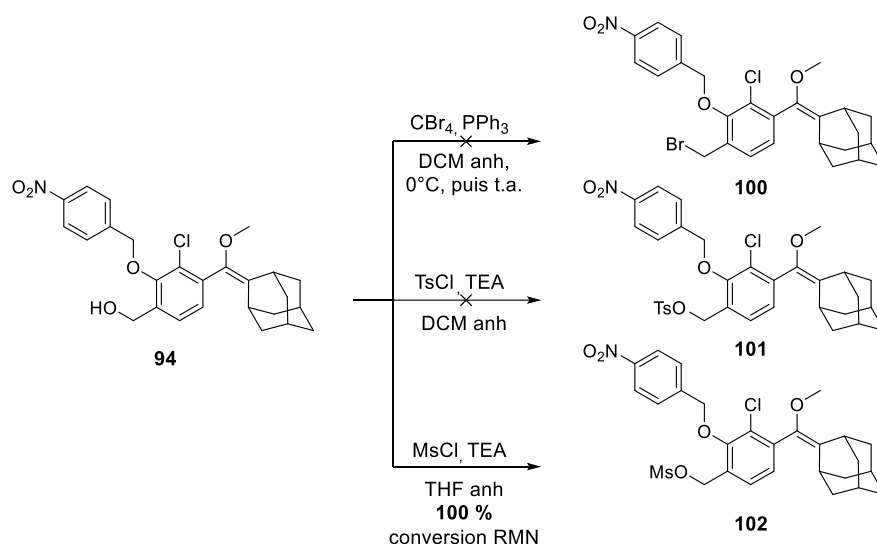


Schéma 30 Insertion d'un nucléofuge en vue de l'accroche du ligand par substitution nucléophile.

3.2.1. Choix des groupements protecteurs des acides carboxyliques.

L'optimisation du choix du synthon précurseur du ligand DO3A a également dû être entreprise. Le choix s'est initialement porté vers le **DO3A^{tu}** qui est le synthon le plus utilisé dans la littérature,^{182,183,184} et avait également été utilisé lors des travaux du Dr. K. Solmont. Néanmoins, les conditions acides de déprotection de ces esters (acide trifluoroacétique dans le DCM) se sont révélées non compatibles avec la fonction éther d'énol. En effet, lorsque nous avons testé la stabilité de l'intermédiaire clé **88** en présence d'un équivalent de TFA dans le dichlorométhane, la fonction éther d'énol a été hydrolysée, conduisant à la cétone correspondante. À ce stade, il fallut donc changer de stratégie et synthétiser d'autres précurseurs du ligand DO3A avec des esters plus facilement clivables en milieu basique. En partant du cyclen, il nous a été possible de synthétiser le **DO3A-Me**, ainsi que le **DO3A-Bn**. Durant un essai de purification du **DO3A-Me** par chromatographie sur gel de silice en phase normale, il a été constaté un clivage total ou partiel des esters (la proportion n'a pas été déterminée). Ce même

182 Mishra, A.; Pfeuffer, J.; Mishra, R.; Engelmann, J.; Mishra, A. K.; Ugurbil, K.; Logothetis, N. K.A new class of gel-based DO3A-ethylamine-derived targeted contrast agents for MR and optical imaging. *Bioconjug Chem* **2006**, *17* (3), 773-780

183 Krchová, T.; Kotek, J.; Jiráček, D.; Havlíčková, J.; Čisářová, I.; Hermann, P.Lanthanide(III) complexes of aminoethyl-DO3A as PARACEST contrast agents based on decoordination of the weakly bound amino group. *Dalt Trans* **2013**, *42* (44), 15735-15747

184 Nithyakumar, A.; Alexander, V.Synthesis, relaxivity, and in vitro fluorescence imaging studies of a novel d-f heterometallic trinuclear complex as a potential bimodal imaging probe for MRI and optical imaging. *Dalton Transactions*. 2015, p 17800-17809

phénomène, a également été observé durant les chromatographies sur colonne réalisées pour les composés **103** ou **104** (Schéma 32) possédant des esters méthyliques, ou benzyliques (Schéma 32), compliquant la possibilité d'isoler ces molécules.

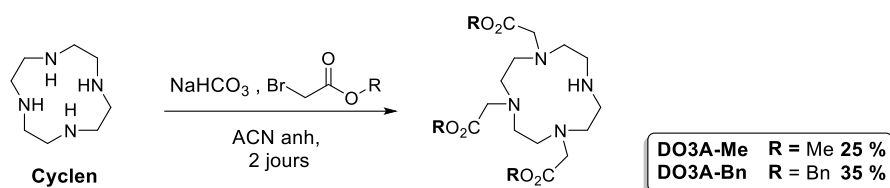


Schéma 31 Synthèse des ligands DO3AMe, et DO3ABn.

3.2.2. Mise au point de la réaction d'accroche du ligand.

La réaction de substitution nucléophile par le macrocycle est le fruit de plusieurs optimisations (Schéma 32). Initialement, le dérivé mésylé **102** était synthétisé en amont et traité pour éliminer les sels, puis engagé directement. Il peut également être purifié sur chromatographies sur gel de silice, cependant compte tenu de sa sensibilité à l'hydrolyse du mésylate, nous avons constaté une diminution du rendement conséquente. De plus, lors de la réaction en présence du ligand DO3A protégé et de triéthylamine à reflux, un produit de dimérisation de **94** a été isolé. Durant la réaction, une partie du mésylate est hydrolysée, et l'alcool benzylique du dérivé **94** serait assez nucléophile pour substituer la fonction mésylate d'une seconde molécule de **94**, formant ainsi une fonction éther. La solution a donc été d'utiliser de l'iodure de sodium pour effectuer l'échange iode-mésylate, permettant d'avoir un électrophile beaucoup plus stable dans le temps. Par ailleurs, afin d'éviter la moindre dégradation du mésylate **102**, il a été choisi de réaliser cette série de réaction en *one pot*. Dans un premier temps, en présence de triéthylamine, le dérivé **94** est mis en réaction avec le chlorure de mésyle. Une fois la conversion complète, l'iodure de sodium est ajouté pour la conversion du groupement mésylate en halogène, enfin le ligand **DO3A-R** est ajouté au milieu réactionnel. Le produit résultant de cette réaction n'ayant jamais été isolé, aucun rendement n'est disponible pour ce protocole. Mais le suivi par CCM, et les RMN des bruts réactionnels, montre l'efficacité de ce mode opératoire. En effet, le dérivé mésylé a rapidement été converti en un seul composé, supposé être le dérivé iodé. Et dans un second temps, ce dernier a été totalement consommé et le suivi par CCM a également montré l'absence de formation du produit de dimérisation.

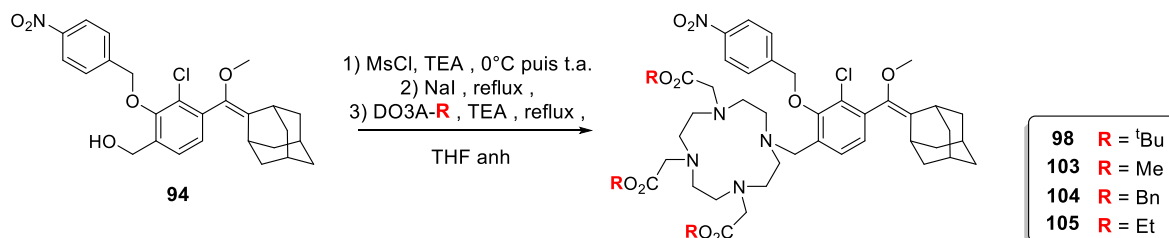


Schéma 32 Conditions optimales pour la substitution nucléophile par le DO3AR.

3.2.3. Vers une stratégie de synthèse sans purification.

A la vue des problèmes de purification rencontrés, nous nous sommes posé la question de l'utilité d'isoler les composés d'addition du DO3A protégés **103**, **104** et **105**. Pour des raisons de montée en échelle de cette étape, la purification en phase inverse a été exclue. De plus la présence de quatre fonctions amine ne facilite pas le choix du tampon afin d'éviter la présence de plusieurs espèces liée aux

équilibres acido-basiques. À l'aide du **DO3ABn** nous avons donc essayé d'effectuer la synthèse sans purification du composé **104** et d'engager le brut réactionnel dans la réaction de saponification. En présence de 10 équivalents de carbonate de potassium aucune évolution n'a été observée en suivi UHPLC-MS. Nous avons donc décidé d'utiliser des conditions plus dures en utilisant de la potasse à 15 M en chauffant à reflux. Malheureusement, au regard du chromatogramme de l'UHPLC-MS qui montre la présence de nombreux produits secondaires, ces conditions de saponification ont été trop dures (Schéma 33).

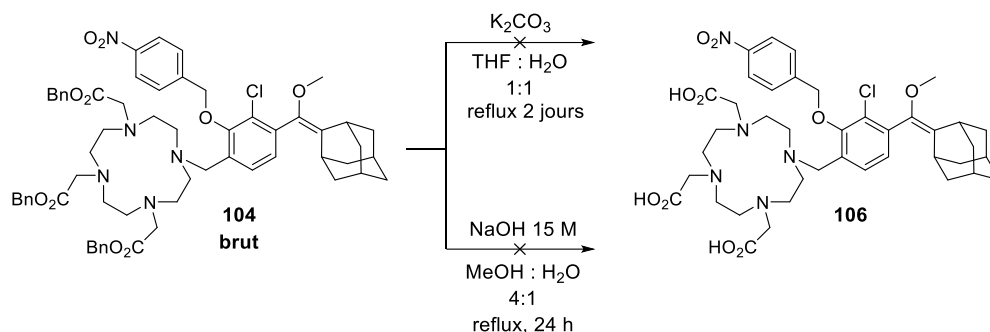


Schéma 33 Essais de saponification des ester de benzyle du DO3ABn.

Après tous ces essais infructueux, nous avons eu la chance de pouvoir profiter de l'expertise du Dr. Philippe Durand, directeur de recherche au sein de l'ICSN, partenaire sur ce projet. Nous avons choisi de reprendre une voie de synthèse déjà mise au point par le Dr. P. Durand que j'ai pu mettre en œuvre à l'ICSN au cours d'un séjour sur place.¹⁸⁵ Celle-ci a sollicité le DO3AEt substrat comportant des esters d'éthyles qui présentent un bon compromis entre stabilité et facilité de clivage. Dans une optique de prudence le dérivé métylé a été purifié avec un rendement modéré de 40 % (Schéma 34). Puis, en présence d'iodure de potassium et de carbonate de potassium dans l'acétonitrile, le composé purifié **102** a été engagé avec le **DO3AEt** à 50°C. Puis le produit d'addition du DO3AEt **105** obtenu a été mis en réaction, sans purification intermédiaire, avec 10 équivalents de lithine dans le méthanol. Après environ une nuit de réaction, la saponification des trois esters est complétée. Puis, la complexation du lanthanide est alors effectuée dans la foulée en milieu aqueux en présence du chlorure d'euprimum en veillant à rester dans une plage de pH comprise entre 6 et 8. D'une part, un pH trop élevé peut provoquer la formation du complexe Eu(OH)₃, trop stable pour être utilisé comme réactif de complexation. D'autre part, un pH trop acide pourrait hydrolysée la fonction éther d'énol. La purification du complexe de lanthanide est facilitée par sa précipitation lors de la complexation. Le composé **107** a été obtenu avec un rendement de 50 % sur les trois dernières étapes.

185 Othman, M.; Desmaële, D.; Couvreur, P.; Vander Elst, L.; Laurent, S.; Muller, R. N.; Bourgaux, C.; Morvan, E.; Pouget, T.; Lepêtre-Mouelhi, S.; Durand, P.; Gref, R. Synthesis and physicochemical characterization of new squalenoyl amphiphilic gadolinium complexes as nanoparticle contrast agents. *Org Biomol Chem* **2011**, *9* (11), 4367-4386

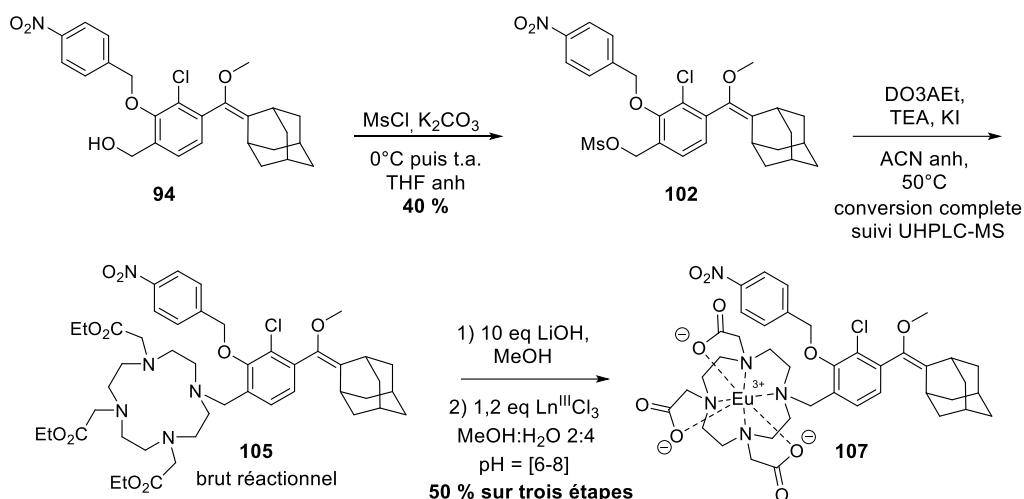


Schéma 34 Synthèse du complexe de lanthanide **107**.

En conclusion, le précurseur éther d'énol **107** de notre sonde cible a bien été obtenu après maintes tentatives. Il est apparu après tous ces essais infructueux qu'il n'était pas nécessaire d'isoler le composé contenant la plateforme combinée au DO3AEt **105**. La présence des fonctions amines rend de plus sa purification périlleuse. De plus, la caractérisation de ce dernier, s'il a été purifié, est également un défi, ce qui est probablement dû au nombre de conformères non négligeable que peut adopter cette molécule. On peut également se poser la question de la transposabilité des conditions de saponification des esters d'éthyle sur les esters de benzyle. Finalement le produit de complexation est purifié par précipitation dans le milieu réactionnel.

3.3 Formation du cycle 1,2-dioxétane.

3.3.1. Synthèse des composés cibles

Fort de ces résultats, nous nous sommes alors engagés dans la dernière étape de synthèse, la cycloaddition permettant de former le dioxétane. Nous avons choisi d'utiliser le bleu de méthylène comme photosensibilisateur. L'absorption dans le domaine du rouge de ce dernier nous a permis l'utilisation d'une ampoule LED classique combinée à un filtre passe-haut à 495 nm pour éviter toute absorption de la plateforme chimiluminescente. En effet, il a été observé qu'une irradiation prolongée du dioxétane pouvait provoquer sa décomposition. L'énergie apportée par une absorption photonique serait suffisante pour déstabiliser le cycle dioxétane. De plus, le temps de réaction de l'ordre de la journée soumet ces dioxétanes formés à des radiations pendant plusieurs heures. Il a donc été nécessaire de minimiser ce risque. En appliquant ce protocole la molécule cible **78** a été obtenue avec un bon rendement de 70 %.

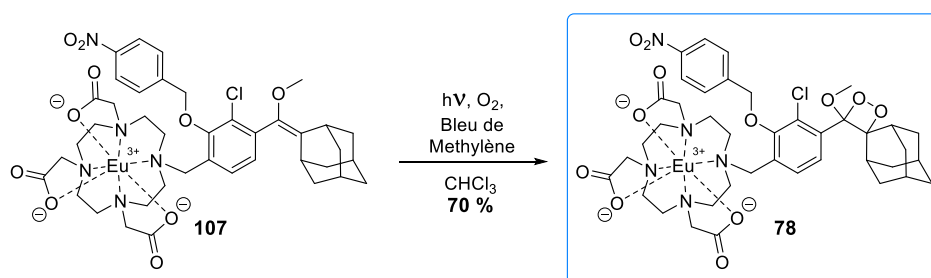


Schéma 35 Synthèse du dioxétane **78** par cycloaddition de dioxygène singulet.

La conversion du substrat de départ par suivi UHPLC est totale sans formation majeur de sous-produit. En revanche la purification de ces types de dioxétane a été plus délicate. Des problèmes de stabilité ont été rencontrés lors de la purification sur un appareil de purification automatisé en phase inverse. Il a été observé une dégradation totale ou partielle (selon la concentration du brut engagé) à la fin de la purification. Les analyses UHPLC-MS nous permettent de soupçonner une dégradation du composé **78** en son produit de décomposition **108** lors de la détection UV automatisée. Cela a rendu la purification du composé **78** très fastidieuse puisqu'elle a été effectuée en phase inverse automatisée sans détection UV en exploitant la grande différence de polarité entre le bleu de méthylène présent en quantité catalytique et la molécule finale. Du fait du caractère paramagnétique de l'euprium, le composé final a été caractérisé par une analyse UHPLC-MS (Figure 40), confirmée par une autre analyse HRMS.

Au final, la sonde **78** a été obtenue à partir de la plateforme **88** en 8 étapes de synthèse avec un rendement global estimé à 11 %.

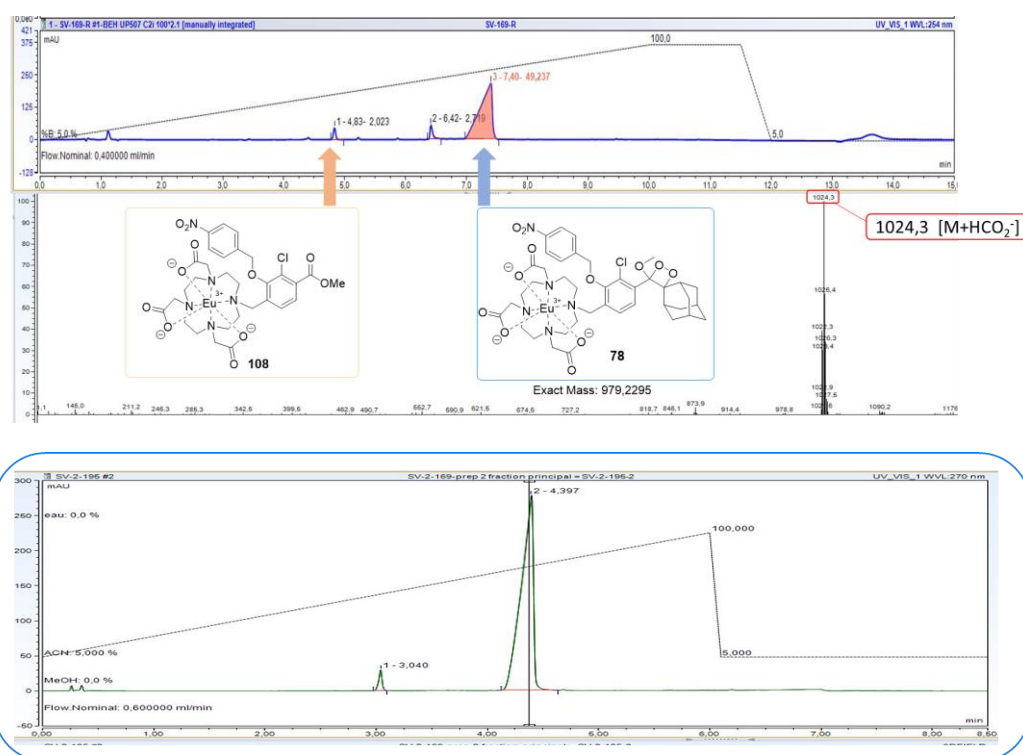


Figure 40 En haut, chromatogramme UHPLC-MS du brut réactionnel du composé final **78** (Waters BEH C18 column, 0,1 % acide formique – ACN **Système A**) en bas chromatogramme du composé finale après purification (Thermo Fisher Hypersyl GOLD® column 0,1 % acide formique – ACN **Système C**) pureté UV à 270 nm 90 %).

3.4 Synthèse des espèces émissives des chimiluminophore.

Afin d'étudier les propriétés spectroscopiques de l'espèce émissive **79** du chimiluminophore synthétisé, il a été nécessaire d'obtenir cette molécule. Le déclenchement enzymatique se faisant à des échelles trop petites pour pouvoir espérer récupérer le composé en question, nous avons décidé de le synthétiser. À partir du dioxétane **78**, nous avons déclenché le mécanisme d'élimination de type 1,6 en réduisant la fonction nitro en amine en présence d'un excès d'indium métallique en milieu légèrement acide ce qui nous a permis d'obtenir le composé **79** avec un modeste rendement de 35% (Schéma 36).

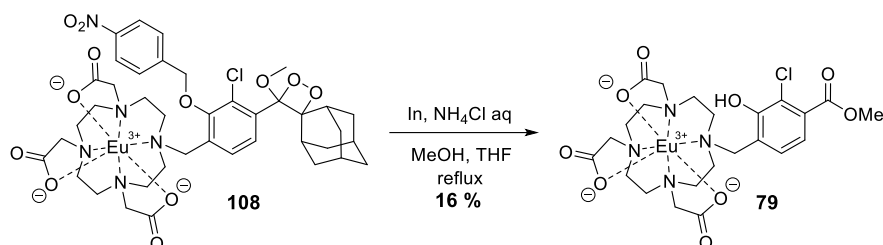


Schéma 36 Synthèse de l'espèce émissive **79** supposée de la sonde chimiluminescente **78**.

4. Etude du déclenchement de chimiluminescence.

4.1 Déclenchement enzymatique et étude des propriétés spectroscopiques du chimiluminophore.

L'objectif final de ce projet étant le développement de sondes chimiluminescentes pour une application biologique, la réalisation de tests *in vitro* avec la cible choisie est la première étape requise pour la validation d'une preuve de concept. Pour rappel nous avons choisi de cibler la nitroréductase du fait de son intérêt biologique combiné à la simplicité d'insérer un groupement ciblant cette enzyme.

4.1.1. Déclenchement enzymatique.

Afin de se faire la main sur un déclenchement *in vitro* avec la NTR, nous avons décidé d'effectuer des tests avec la sonde pour la NTR **SR101-O-(o)NB**, développée par le Dr. Arnaud Chevalier durant ses travaux de thèse. Cela nous a permis de tester différents paramètres tels que le tampon, la quantité de DMSO maximale utilisable pour solubiliser la sonde ou encore l'utilisation d'une légère agitation durant la réaction enzymatique. Toutes les données acquises nous ont permis d'établir une plage de fonctionnement de l'enzyme.

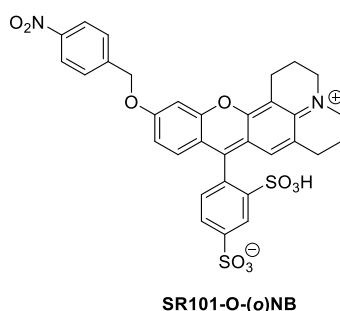


Figure 41 Représentation schématique de la sonde enzymatique pour la détection de la NTR **SR101-O-(o)NB**

○ Déclenchement enzymatique de la sonde au complexe d'euporium :

Les déclenchements de chimiluminescence ont été effectués dans un tampon PBS à pH 7,4 en présence de 7% de DMSO, 50 μ M du cofacteur NADH et une NTR commerciale (extraite d'*Escherichia coli*). La concentration de sonde **78** était de 5 μ M et l'enzyme (0,5 U) été ajoutée en dernier. Aucune émission de chimiluminescence n'a pu être enregistrée à 614 nm (bande principale d'émission attendue pour l'euporium). Cependant, l'enregistrement d'un spectre de chimiluminescence durant un déclenchement a donné une émission très faible centrée sur 470 nm que l'on pourrait vraisemblablement attribuer à l'émission du phénolate de la plateforme (Figure 42).

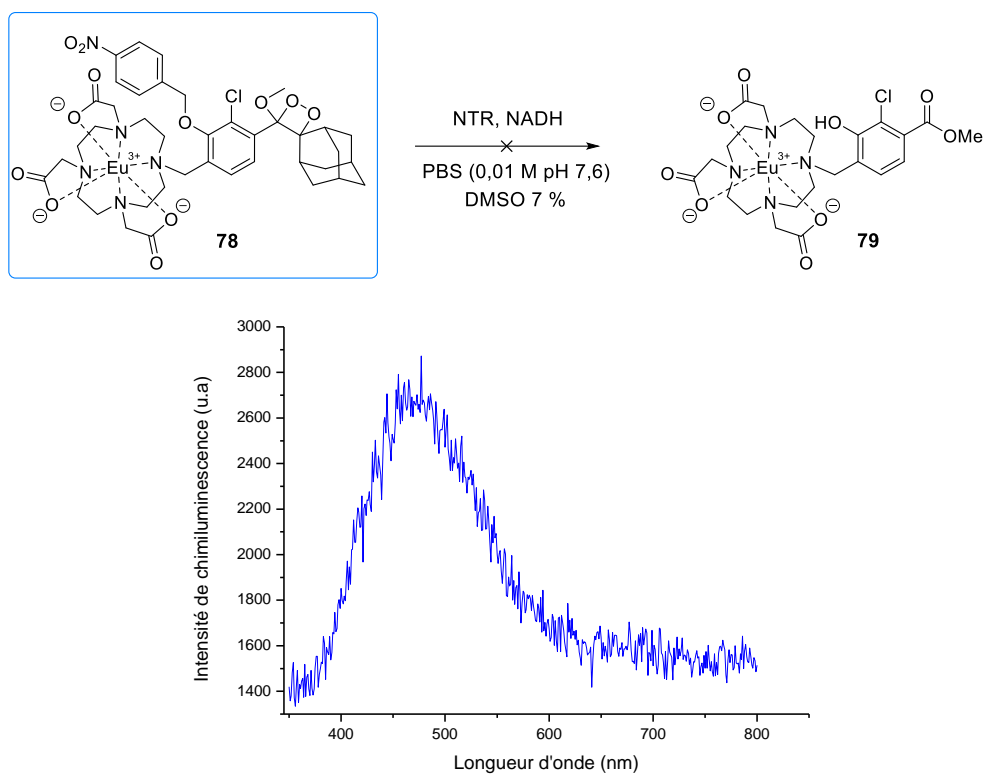


Figure 42 Représentation schématique du clivage enzymatique attendu en haut, et spectre d'émission de chimiluminescence obtenu en bas.

Les analyses UHPLC-MS du brut de l'expérience de déclenchement enzymatique n'ont pas permis d'identifier le composé **79** attendu à l'issue de ce déclenchement. Cela remet en question l'identification de la structure de l'espèce émissive. Cependant ces analyses sont à relativiser. En effet, les concentrations utilisées très faibles et la présence d'enzymes ne permettent pas la détection des produits en UV directement dans le milieu réactionnel après déclenchement. Avant d'envoyer les échantillons en analyse, il a fallu filtrer les enzymes, et concentrer le milieu réactionnel en effectuant une lyophilisation. Il n'est pas exclu que ces traitements aient conduit à une évolution du brut réactionnel.

4.1.2. Etude des propriétés spectroscopiques.

o Etudes spectroscopiques de l'espèce émissive de la sonde au complexe d'euporium

La caractérisation d'un chimiluminophore passe par l'identification de son espèce émissive. Dans le cas de la sonde comportant le complexe d'euporium, l'espèce émissive supposée de notre chimiluminophore est le composé **79**. Avec la présence du complexe d'euporium, nous attendions l'obtention des différentes bandes d'émission caractéristiques de l'euporium décrites dans la Figure 43. La bande la plus caractéristique de l'euporium correspond à la transition $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ centrée à 614 nm. Dans le cas de l'euporium, l'intensité de certaines transitions est dépendante de l'environnement. Par conséquent, il est possible de tirer des informations conformationnelles du ligand par rapport à la modulation de ces intensités.

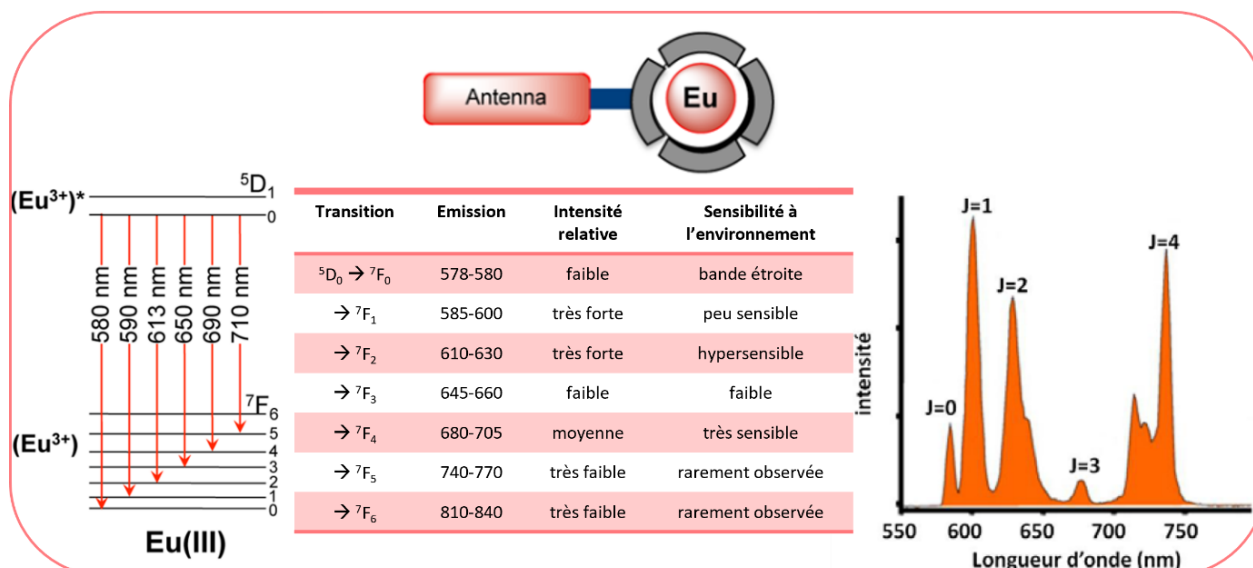


Figure 43 Bandes d'émission et leurs caractéristiques attendues pour l'euporium.

Par manque de temps et à cause des multiples purifications en phase inverse à haute pression, le composé **79** n'a pas été isolé en très grande quantité. L'étude photophysique a été réalisée dans le méthanol et à température ambiante, de façon qualitative, sans connaître la concentration exacte en composé (Figure 44). Sans ajout de base dans le milieu pour former le phénolate, cette molécule présente un spectre d'absorption dans l'UV avec un profil présentant une absorption décroissante de 200 nm à 400 nm, sans bande définie (Figure 44A). Les différents spectres de photoluminescence ont été enregistrés avec des paramètres de fentes différents. Les intensités des spectres ne peuvent donc pas être comparées entre elles. Quant à l'émission, elle se situe majoritairement dans l'UV entre 300 et 400 nm avec deux maxima à 313 et 358 nm (Figure 44B). Mais nous avons tout de même pu observer dans les spectres représentés dans la Figure 44C des bandes minoritaires, pouvant s'apparenter à des transitions caractéristiques de l'euporium (autour de 614, 690 et 800 nm).

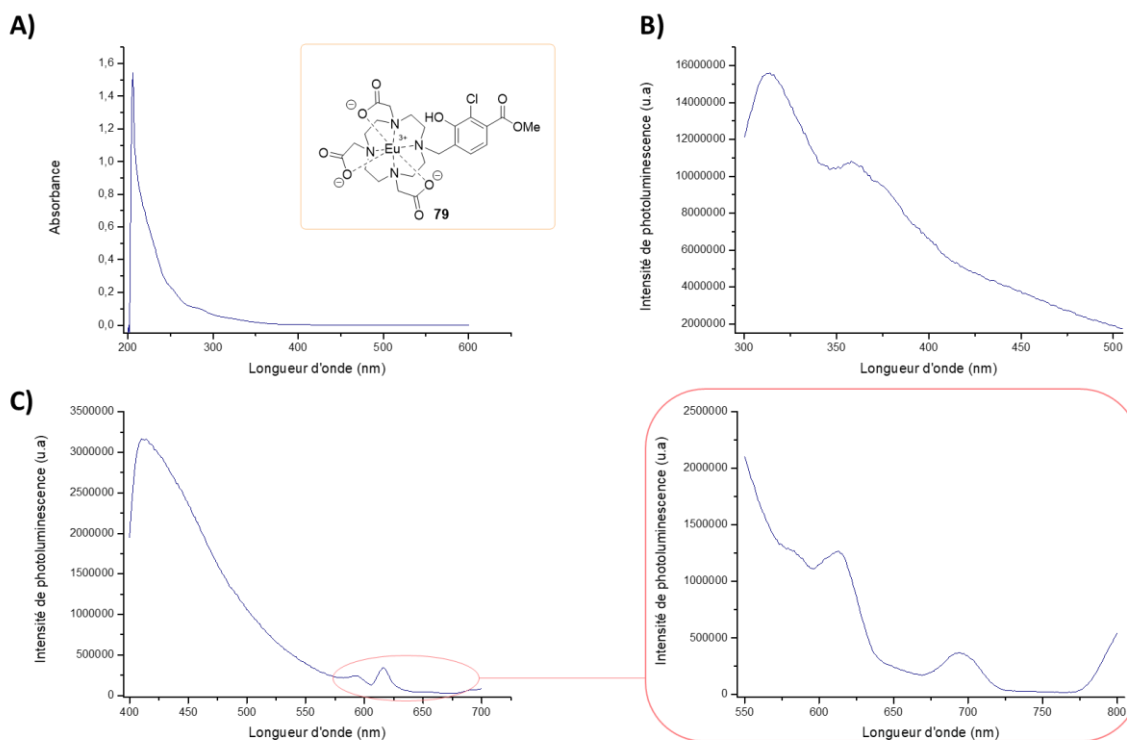


Figure 44 Étude photophysique du composé **79** A) Spectre d'absorption (MeOH, TA) B) Spectre d'émission (MeOH, ta, exc : 260 nm) C) Spectre d'émission en présence d'un filtre passe-haut à 400 nm (MeOH, ta, exc : 320 nm).

Les temps de vie de photoluminescence à 415 et 615 nm ont été mesurés et le profil à 615 nm est représenté dans la Figure 45. La mesure à 415 nm nous a montré l'absence d'un temps de vie de fluorescence long (et correspond donc, a priori, à l'émission du phénol sans transfert sur l'euprium). En revanche, Le temps de vie de la bande centrée à 615 nm est bien plus long ($> 200 \mu\text{s}$) que la celui de la bande majoritaire et tend à confirmer que cette emission est bien issue de l'euprium.

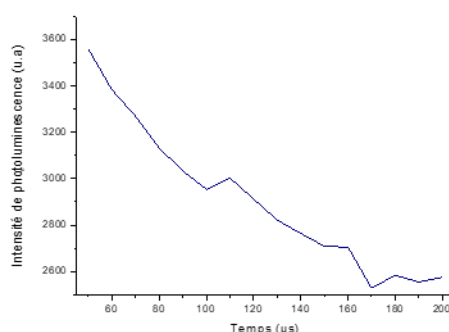


Figure 45 Temps de vie de photoluminescence de l'espèce **79** à 615 nm (MeOH, TA, exc : 320 nm).

En résumé, la bande d'émission centrée aux alentours de 400 nm est décalée vers le bleu par rapport à la chimiluminescence qui a été observée (470 nm). Ceci pourrait être expliqué par l'enregistrement d'un spectre de photoluminescence de la forme phénol et non phénolate, forme obtenue à la fin du processus de chimiexcitation. La présence de bandes d'émission caractéristiques de l'euprium nous permet d'affirmer que le cœur phénolique est capable de sensibiliser le complexe. Mais cette sensibilisation semble très peu efficace.

4.1.3. Synthèse d'un dioxétane déclenchable en milieu organique.

En vue d'une investigation de la chimiluminescence du lanthanide en solvant organique il a été essayé d'obtenir le dioxétane sans le motif *para* nitrobenzyle. À partir du composé éther d'énol Nous avons utilisé la même méthode de réduction de la fonction nitro, décrite précédemment (Schéma 36). Par la suite, la protection du phénol **109** par un groupement TBDMS a été tentée, cependant, aucune réaction n'a été observée (Schéma 37). L'échec de cette réaction triviale, menée auparavant dans la synthèse, est probablement dû à la diminution du caractère nucléophile du phénol causée par la probable chélation au lanthanide.

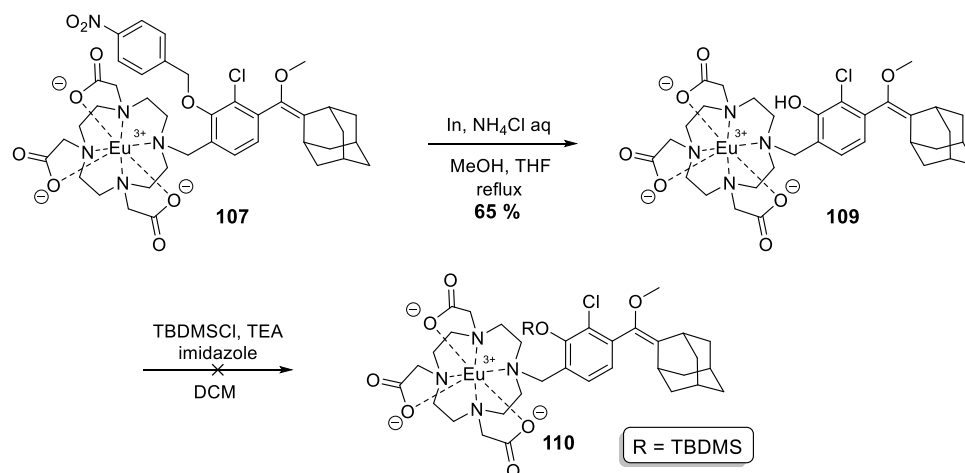


Schéma 37 Tentative de protection du phénol en présence du complexe de lanthanide.

À la suite de cet échec et par manque de temps, nous avons tenté de former le dioxétane sur l'éther d'énol **109**, toujours dans l'optique d'effectuer un déclenchement en milieu organique. Les conditions de réaction ont été similaires à celles qui nous ont permis d'obtenir la molécule finale **78**. La réaction a partiellement fonctionné, même si le produit final **111** a été identifié dans le milieu réactionnel par UHPLC-MS, la présence de sous-produits ayant des temps de rétention proches, combiné à la petite quantité de matière engagée, n'ont pas permis la purification du dioxétane **111**. Par ailleurs le nombre de sous-produits obtenus, dans ce cas présent, nous a conduits à soupçonner une faible stabilité du dioxétane **111**.

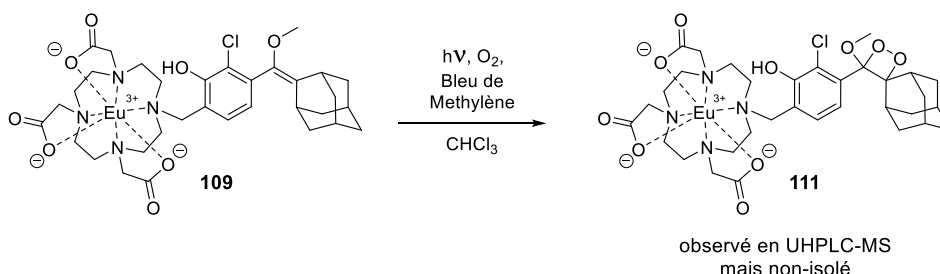


Schéma 38 Tentative de synthèse du dioxétane **111**

5. Conclusion et perspectives.

Dans ce chapitre nous avons pu présenter une approche originale développée au sein du laboratoire : d'une part, en se fondant sur une plateforme éther d'énol **88**, présentant un phénol en position *meta*, dont nous avons pu reproduire la synthèse au laboratoire avec des rendements similaires à ceux décrits

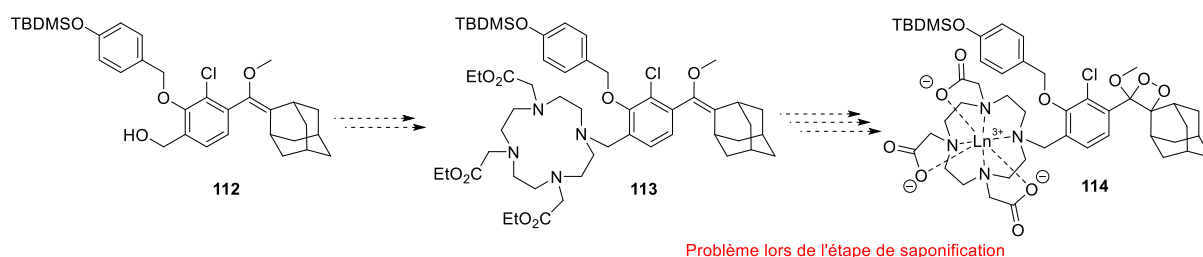
par l'équipe du Pr. D. Shabat, et procéder à une montée en échelle pour obtenir ce composé à hauteur d'environ 40 g. D'autre part, forts de l'expertise acquise au cours de la thèse précédente (Dr. Kathleen Solmont), nous avons pu développer une voie de synthèse pour l'obtention d'une sonde chimiluminescente **78** fondée sur la plateforme de Schaap fonctionnalisée par un complexe de lanthanide-DO3A. Cette sonde **78** a été obtenue à partir de la plateforme **88** en 8 étapes de synthèse avec un rendement global estimé à 11 %.

Pour obtenir cette sonde, nous avons dû résoudre des difficultés synthétiques, notamment pour l'accroche du ligand DO3A. L'enregistrement d'un spectre de chimiluminescence lors du déclenchement enzymatique a laissé transparaître une émission très faible, et uniquement dans le domaine d'émission de la sonde de Schaap (centrée sur 470 nm). Aucune émission de chimiluminescence caractéristique des bandes d'émission de l'euprium n'a été détectée. De plus, aucune information n'a été recueillie lors des analyses UHPLC-MS allant dans le sens d'un déclenchement se déroulant en bonne et due forme. Au contraire la tentative de synthèse du dioxétane **111** possédant le complexe et la fonction phénol, tend à montrer une certaine instabilité de cette espèce. Les premières études des propriétés spectroscopiques de l'espèce émissive théorique ne correspondent pas aux résultats observés en chimiluminescence (mais ceci peut être lié à l'enregistrement des spectres d'émission de la forme phénol, et non phénolate. En somme, les résultats *in vitro* n'ont pas été concluants et beaucoup de questions restent en suspens :

- 1) L'espèce émissive théorique est-elle la bonne ?
- 2) Quel est l'efficacité réelle du luminophore **79**, et du chimiluminophore **78** ?

Dans un premier temps, un déclenchement en milieu organique devrait permettre d'obtenir des premiers éléments de réponse. En effet, il sera techniquement plus simple de suivre la décomposition du cycle dioxétane dans ces conditions. Elle peut être envisagée *via* l'insertion d'un bras auto immolable portant un phénol masqué par un groupement éther silylé (OTBDMS ou OTIPS) à la place du nitro afin d'effectuer un déclenchement en milieu organique par action d'anions fluorures. D'un point de vue synthétique la fragilité du groupement silylé pourrait poser des problèmes. Une insertion du bras en amont de l'accroche provoquerait certainement le clivage du groupe silylé lors de l'étape de saponification des esters (voie a, Schéma 39). Cependant, une insertion de ce bras après la complexation serait sans doute soumise au même problème rencontré lors de la tentative de protection du phénol. En somme, la voie semblant la plus raisonnable serait d'introduire ce bras juste avant la complexation (voie b Schéma 39). Cela impliquerait la manipulation du ligand polyaminocarboxylates avec toutes ses fonctions libres, mais aussi de pouvoir s'affranchir de l'encombrement stérique lié à ce ligand.

voie a



voie b

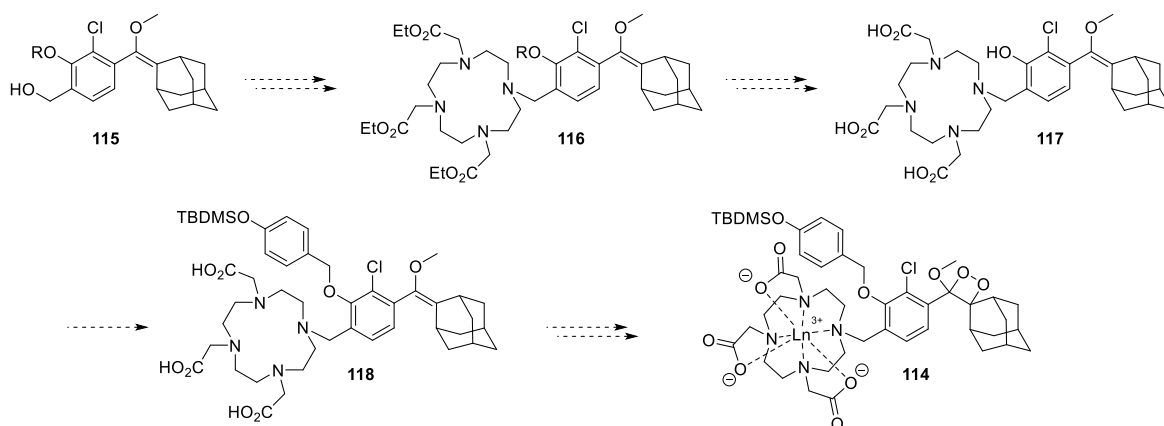


Schéma 39 Proposition de voie de synthèse pour le chimiluminophore 114

Dans un second temps, une fois le chimiluminophore obtenu une caractérisation plus poussée du chimiluminophore et de l'espèce émissive théorique est nécessaire. L'hypothèse évidente d'un spectre de photoluminescence ne correspondant pas à celui de chimiluminescence dû à la protonation ou pas du phénol doit être levée. Le temps de vie de chimiluminescence doit être également mesuré. En effet, l'une de nos hypothèses pouvant expliquer une faible chimiluminescence résiderait dans la stabilité de la forme phénolate-dioxétane, la complexation du phénolate sur l'euprotium modifiant l'efficacité des transferts d'électrons nécessaires pour la déstabilisation du dioxétane. Il a été rappelé maintes fois la nécessité de la charge sur le phénolate afin de déclencher la décomposition du dioxétane. Or, si cette dernière est trop impliquée dans la chélation avec le lanthanide, à quel point la probabilité de la déstabilisation du cycle dioxétane est-elle diminuée ? Lorsque la réaction de déprotection du phénol est rapide, le temps de vie de chimiluminescence reflète la stabilité du composé dioxétane – phénolate. Une validation de cette hypothèse devrait nous pousser à revoir le design de la sonde afin d'éviter une chélation du phénolate, par exemple en ajoutant un espaceur entre les deux parties de la sonde.

Enfin, dans un troisième temps, afin d'obtenir plus d'information sur le transfert, un screening des différents lanthanides pouvant être utilisés pour l'imagerie pourrait être effectué.

Chapitre 2 : Développement de nouvelles sondes chimiluminescentes fonctionnalisées par un fluorophore :

L'ensemble des concepts fondamentaux nécessaires à la conception d'un chimiluminophore de type 1,2-dioxétane a été abordé dans le chapitre précédent. De même, la genèse des sondes chimiluminescentes 1,2-dioxétane a été introduite au travers des travaux du Pr. Schaap. L'état de l'art qui suit a pour vocation de présenter les innovations dans le domaine afin de mettre en perspective les autres axes de ce projet de recherche. Ceux-ci reposent sur deux approches plus conventionnelles pour améliorer les propriétés de chimiluminescence : d'une part, *via* un transfert d'énergie à travers les liaisons vers un fluorophore ; d'autre part, grâce à une extension du système π -conjugué du cœur phénolique.

I. Etat de l'art :

Aujourd'hui, il n'est pas possible d'aborder la thématique des sondes 1,2-dioxétane en éludant les travaux de l'équipe du Pr. D. Shabat. Dans la section suivante, nous développerons les différentes stratégies de conception d'un chimiluminophore applicable à l'imagerie biomédicale, au travers des travaux novateurs de l'équipe du Pr. D. Shabat. Puis, nous ferons un état de l'art non exhaustif des utilisations de cette nouvelle génération de chimiluminophores 1,2-dioxétane. Enfin, cette partie bibliographique sera close par une brève présentation de la famille des fluorophores utilisés au cours de nos travaux, suivi de la mise en perspective des résultats *via* une introduction des travaux antérieurs au sein du laboratoire.

1. Stratégies pour la conception de sondes chimiluminescentes applicables à l'imagerie *in vivo*.

1.1 Première stratégie : décalage de l'émission *via* un transfert d'énergie à travers l'espace.

Depuis les années 2010, les nouvelles stratégies de développement de la sonde de Schaap ont été guidées par l'obtention d'un objet compatible avec les conditions requises pour l'imagerie médicale. Le premier défi est donc d'obtenir une chimiluminescence dans la fenêtre d'imagerie *in vivo* avec le meilleur rendement quantique de chimiluminescence possible. Il convient de rappeler que l'utilisation d'une architecture micellaire a été mise de côté par les développeurs de sondes chimiluminescentes pour l'imagerie médicale, car difficilement applicable pour des applications *in vivo*. Comme il a été mentionné plus tôt, l'idée générale réside dans la conception d'un objet efficace et simple à prendre en main. La Figure 46 présente la première sonde chimiluminescente développée par l'équipe du Pr. D. Shabat. Elle s'appuie sur la stratégie de transfert d'énergie à travers l'espace déjà éprouvé par le passé.¹⁷⁸ Les sondes chimiluminescentes de type CRET du Pr. Schaap mentionnées dans le chapitre précédent, n'ont pas montré une efficacité significative face à l'utilisation de la sonde originelle de Schaap au sein d'une architecture micellaire. Dans le cas présent (Figure 46), la sonde de Schaap a été fonctionnalisée pour un transfert d'énergie à travers l'espace, par une cyanine quinone émettant dans le proche infrarouge. De plus, l'atome de chlore en position ortho sur le cœur phénolique a permis

l'utilisation de cette sonde à pH physiologique.¹⁸⁶ Ainsi, la molécule **119** est la première sonde chimiluminescente 1,2-dioxétane utilisée pour de l'imagerie par chimiluminescence *in vivo* sans avoir recours à une architecture micellaire. L'émission du cœur phénolique chimiluminescent est transférée à la cyanine quinone, l'efficacité globale de chimiluminescence est faible (0,09%), mais permet malgré tout une imagerie superficielle *in vivo* (sonde et enzyme injectées en sous cutané).

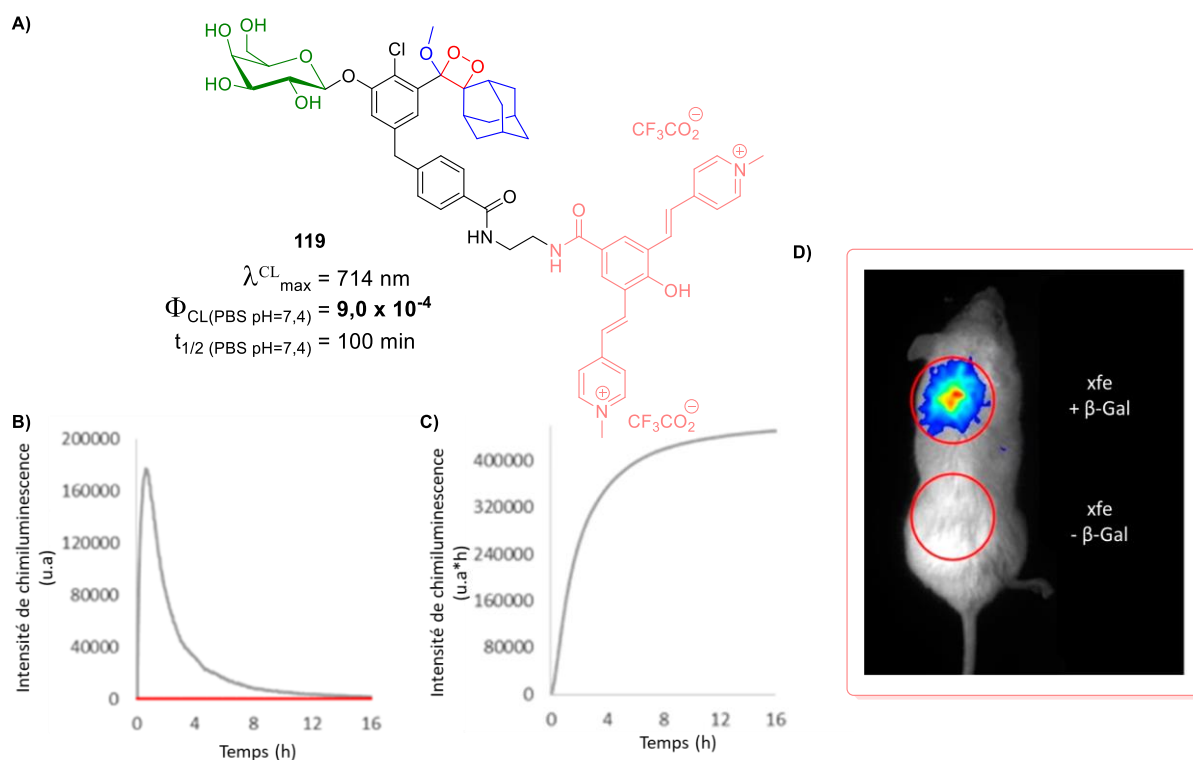


Figure 46 A) Structure d'une sonde chimiluminescente de type CRET B) Profil cinétique de la sonde en présence de β -Galactosidase C) Quantité du flux lumineux émis en fonction du temps dans le PBS 0.1 M, pH 7,4 en présence de 1,5 U de β -Galactosidase D) Imagerie de souris effectué 30 minutes après injection sous-cutanée de la sonde **xfa** en présence de β -Galactosidase ou non (figure adaptée).¹⁷⁸

1.2 Deuxième stratégie : Extension du système π -conjugué de la plateforme phénol 1,2-dioxétane.

1.2.1. Travaux du Pr. D. Shabat : Précurseur du décalage de l'émission vers le rouge par extension du système π -conjugué.

Malgré cette première preuve de concept réalisée avec la sonde **119** grâce à une émission de chimiluminescence décalée dans le proche IR (Figure 46), le faible rendement quantique de chimiluminescence dans l'eau de cette plateforme reste un désavantage majeur. Un changement d'approche permit d'effectuer une nouvelle percée dans la conception des sondes 1,2-dioxétane. L'inefficacité du CRET a été palliée par l'amélioration direct des propriétés lumineuses de l'espèce émissive du chimiluminophore.¹⁸⁷ En effet, l'extension du système π -conjugué de la plateforme chimiluminescente a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Le groupement électrodonneur du cœur

¹⁸⁶ Eilon-Shaffer, T.; Roth-Konforti, M.; Eldar-Boock, A.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. Ortho-Chlorination of phenoxy 1,2-dioxetane yields superior chemiluminescent probes for in vitro and in vivo imaging. *Org Biomol Chem* **2018**, *16* (10), 1708-1712

¹⁸⁷ Hananya, N.; Shabat, D. A Glowing Trajectory between Bio- and Chemiluminescence : From Luciferin-Based Probes to Triggerable Dioxetanes. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, *56*, 16454-16463

phénolique a été utilisé afin d'obtenir un système donneur-accepteur (aussi appelé push-pull en anglais) à l'aide de l'incorporation d'un groupement électroattracteur conjugué au phénol. L'extension de ce système d'électrons délocalisés a donné lieu à une amélioration significative du rendement quantique de fluorescence d'une part, et d'autre part, à une augmentation du rendement de chimiexcitation de la plateforme. Ainsi dans une publication de 2017,¹⁸⁸ le groupe a rapporté les chimiluminophores **121** et **122** possédant des rendements quantiques de quelques pourcents (respectivement $\Phi_{Cl} = 0,025$ et $\Phi_{Cl} = 0,098$ dans l'eau), plus d'un ordre de grandeur supérieur à ceux décrits jusqu'à présent (Schéma 40). De plus, l'extension du système π -conjugué a provoqué le décalage de leur bande d'émission de chimioluminescence initialement centrée à 470 nm, à 540 nm pour **121** et 525 nm pour **122**.

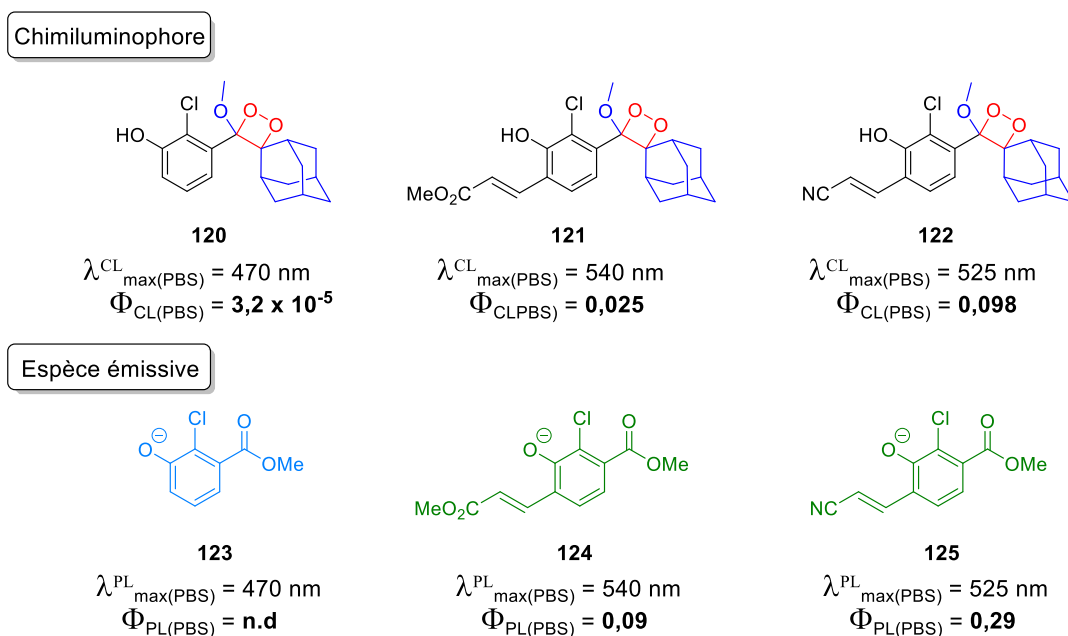


Schéma 40 Chimiluminophores développés par l'équipe du Pr. D. Shabat fondés sur l'extension du système π -conjugué de la plateforme de Schaap avec leurs espèces émissives respectives.¹⁸⁸

En démontrant l'efficacité de ces chimiluminophores, ces travaux ont fait office de preuve de concept pour le développement d'une nouvelle génération de sondes. En effet, le chimiluminophore **122** a été comparé à la sonde de Schaap chlorée en présence de son enhanceur (*i.e.* architecture micellaire incorporant un fluorophore pour du CRET) pour la détection de la β -Galactosidase (Figure 47). Les résultats de ces déclenchements enzymatiques *in vitro* ont révélé une multiplication par 8 de l'intensité lumineuse émise par la sonde **127** par rapport au kit de chimioluminescence classiquement utilisé, et sans utilisation de micelles. Par la suite, les chimiluminophores **121** et **122** furent utilisés dans de nombreuses publications impliquant de l'imagerie par chimioluminescence.^{70 189}

¹⁸⁸ Green, O.; Eilon, T.; Hananya, N.; Gutkin, S.; Bauer, C. R.; Shabat, D. Opening a Gateway for Chemiluminescence Cell Imaging: Distinctive Methodology for Design of Bright Chemiluminescent Dioxetane Probes. *ACS Cent Sci* **2017**, 3 (4), 349-358

¹⁸⁹ Gnam, S.; Green, O.; Shabat, D. The emergence of aqueous chemiluminescence: New promising class of phenoxy 1,2-dioxetane luminophores. *Chem Commun* **2018**, 54 (17), 2073-2085

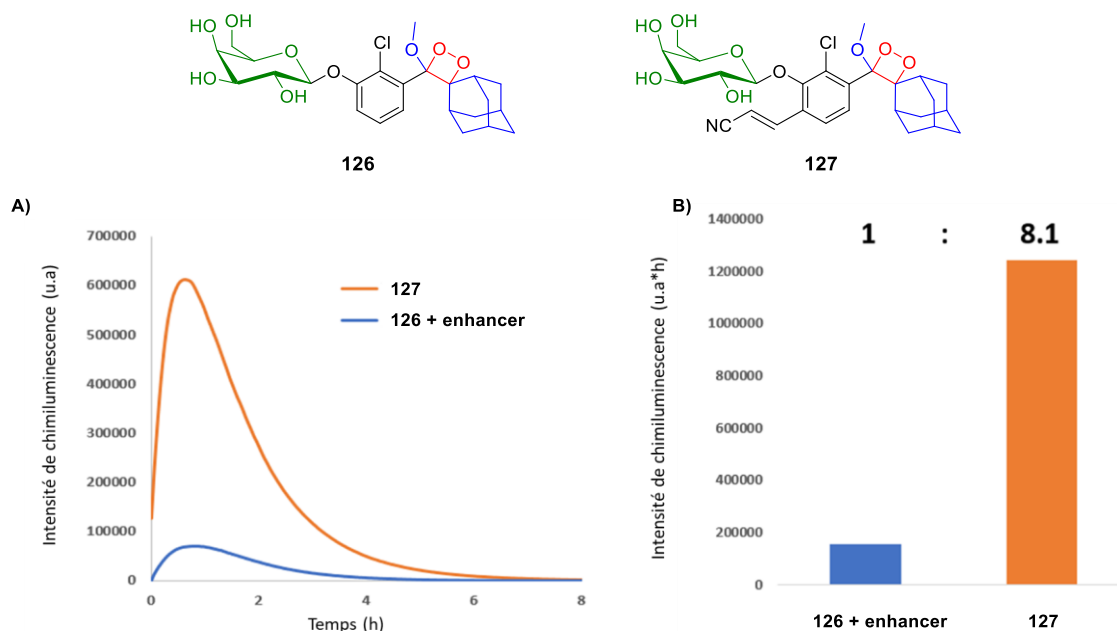


Figure 47 Présentation de la preuve de concept effectuée par l'équipe du Pr. D. Shabat A) Profils cinétiques de chimiluminescence de la sonde **126** [1 μ M] plus un enhancer commercial (Emerald II enhancer) et de la sonde **127** [1 μ M] dans un tampon PBS 0,1 M à pH 7,4, 10 % de DMSO, en présence de 1,5 unité.mL⁻¹ de β -Galactosidase B) Nombre total de photons enregistré au cours de l'expérience (figure adaptée).¹⁸⁸

Si l'obtention d'un bon rendement quantique de chimiluminescence est une caractéristique intuitivement recherchée lors de la conception d'un nouveau chimiluminophore, il s'avère que le profil cinétique de chimiluminescence est également un paramètre important. L'avantage majeur de la chimiluminescence réside dans son rapport signal sur bruit intrinsèquement beaucoup plus élevé que celui de la photoluminescence. Pour un rendement quantique constant, ce rapport est augmenté si la période d'émission est raccourcie. En somme, une cinétique d'émission dite flash (*i.e* cinétique rapide) augmente la sensibilité de la sonde chimiluminescente.¹⁹⁰ Cependant, les phénomènes photophysiques impliqués dans la modulation de la cinétique de chimiluminescence restent encore partiellement incompris. Même si le mécanisme précis de chimiexcitation reste sujet à débat, il y a un consensus sur la première étape de déstabilisation de la liaison peroxyde *via* un transfert de charge ou électronique. De ce constat découle le fait qu'une augmentation de la densité électronique du phénolate devrait augmenter la vitesse de décomposition du cycle dioxétane. En opposition, la présence d'un groupement électroattracteur retarderait ce processus de décomposition.

Cet axiome a été investi par Shabat et *al.*¹⁹¹ Le passage de l'ester **121** à l'acide **128** a permis une réduction du temps de demi-vie de chimiluminescence (passage de $t_{1/2} = 460$ s à $t_{1/2} = 85$ s) (Figure 48A). En effet, les auteurs ont postulé que le caractère moins électroattracteur du groupement carboxylate comparé à celui de l'ester est à l'origine de la diminution significative du temps de vie. L'étude souligne également l'importance du régime cinétique concernant les performances de détection de la sonde. Trois chimiluminophores ont été conçus pour la détection de la NADH grâce à un motif auto immolable

190 Lampinen, J.; Raitio, M.; Perälä, A.; Kytöniemi, V.; Harinen, R. Comparison of Flash and Glow ATP Assays with Thermo Scientific Varioskan Flash Luminometry. *Appl Note AP-MIB-VARIO12-0108 - Thermo Sci* **2008**

191 Hananya, N.; Reid, J. P.; Green, O.; Sigman, M. S.; Shabat, D. Rapid chemiexcitation of phenoxy-dioxetane luminophores yields ultrasensitive chemiluminescence assays. *Chem Sci* **2019**, *10* (5), 1380-1385

portant une quinone. La détermination des différentes limites de détection (LOD pour « limit of detection ») des sondes **130**, **131**, et **132** démontre l'importance du profil cinétique des chimiluminesces utilisés. En effet, la sonde au dérivé cyanoacrylate **130** qui détient le rendement quantique de chimiluminescence le plus élevé mais un profil cinétique de type glow détient la LOD la moins performante (Figure 48B). En opposition, c'est bien le chimiluminescent au rendement quantique le plus bas mais au profil cinétique de chimiexcitation le plus rapide, qui détient la LOD la plus compétitive.

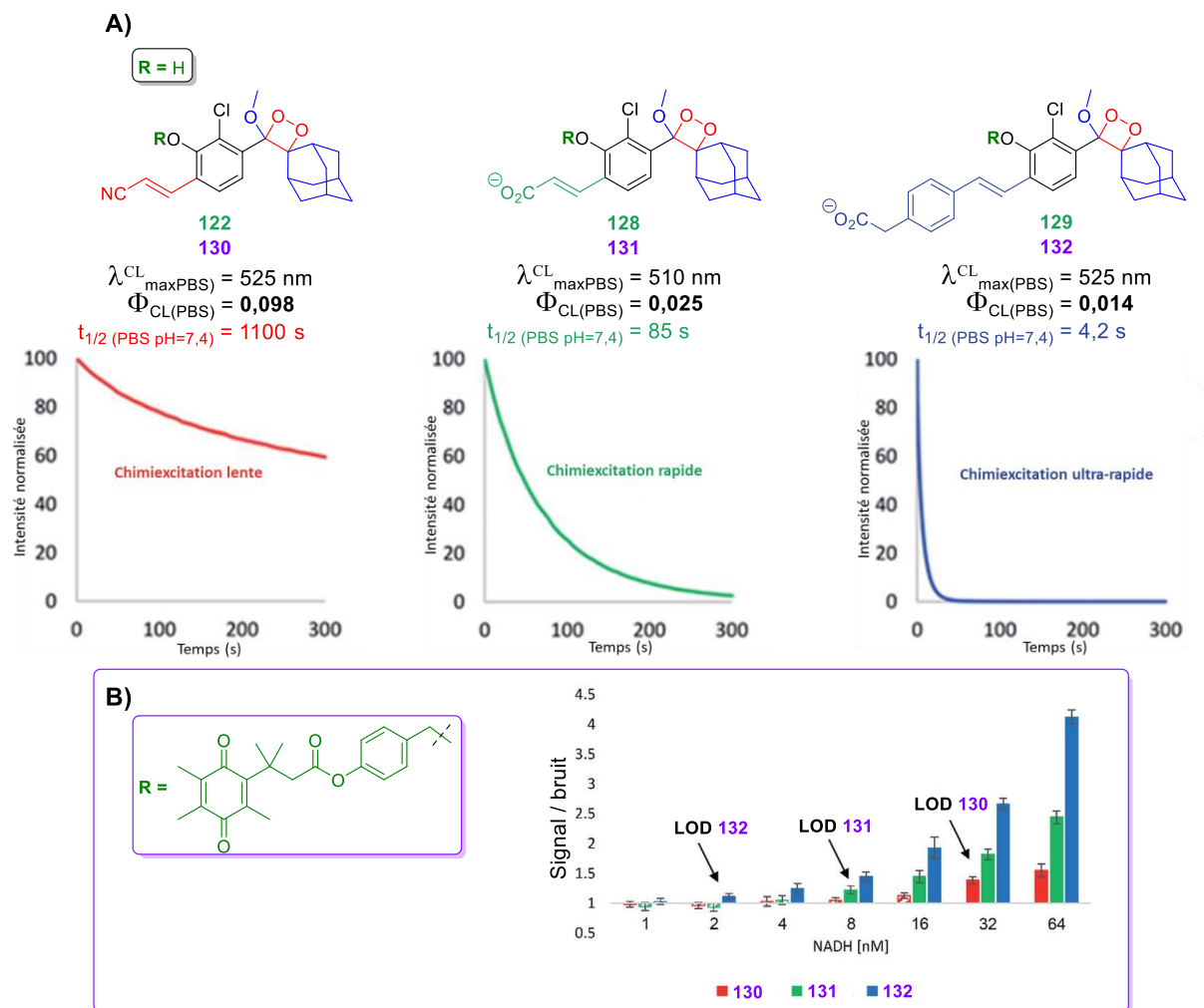


Figure 48 A) Présentation de 3 chimiluminesces possédant 3 régimes cinétiques de chimiluminescence différents. B) Représentation du rapport signal sur bruit des différentes sondes pour la détection de NADH en fonction de la concentration de l'analyte ciblé (figure adaptée).¹⁹¹

1.2.2. Exemple de chimiluminescent émettant dans le proche infrarouge.

La stratégie d'extension du système π -conjugué a été amplifiée avec le chimiluminescent **133** (Schéma 41). L'utilisation du dérivé acrylate combinée à l'utilisation du groupement électroattracteur dérivé du dicyanométhylène benzopyrane (DBP) a donné une chimiluminescence centrée à 690 nm en conservant un rendement quantique intéressant de l'ordre du pour-cent. En comparaison, la sonde **134** (qui est pourvue d'un système de délocalisation moins étendu) possède un spectre de chimiluminescence

centré sur 660 nm avec un rendement quantique en dessous du pourcent.¹⁹² Le chimiluminophore **133** a été utilisé pour imager, chez la souris, la production de peroxyde d'hydrogène induite par l'activité de lipopolysaccharides (LPS), qui sont des endotoxines pouvant induire des signes cliniques chez l'homme. En se basant sur le chimiluminophore **134**, Kanyi Pu et al¹⁹³ ont rapporté deux nouveaux chimiluminophores possédant des émissions de chimiluminescence centrées à 760 et 780 nm grâce au remplacement de l'oxygène du groupement DBP par un atome de soufre et de sélénium. A notre connaissance, ce sont les chimiluminophores qui possèdent les spectres de luminescence les plus haut en longueur d'onde. De plus, leur rendement quantique n'est que d'un ordre de grandeur plus bas que le chimiluminophore **133** et reste tout à fait correct pour une chimiluminescence dans l'eau.

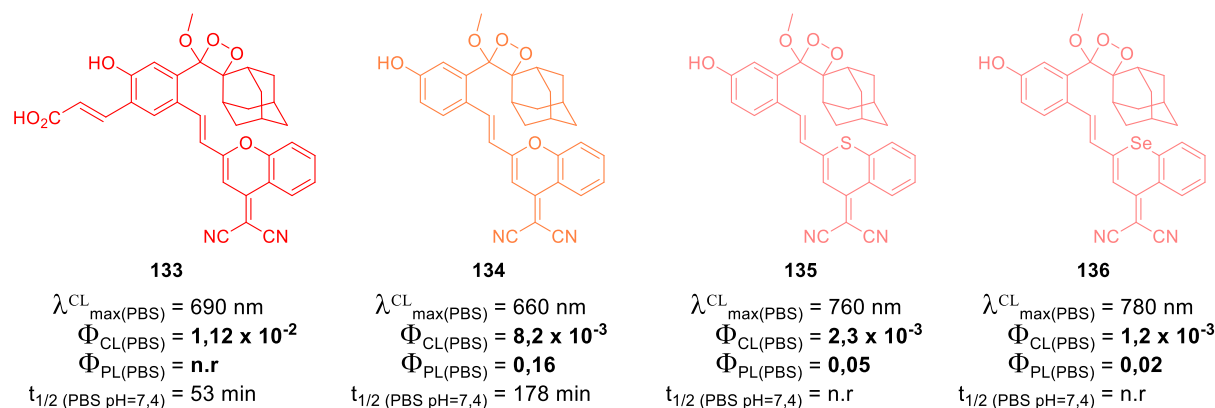


Schéma 41 Représentation des chimiluminophores émettant dans le proche IR fondés sur l'extension du système π -conjugué de la plateforme de Schaap.^{192,193}

1.3 Troisième stratégie : décalage de l'émission *via* un transfert d'énergie à travers les liaisons.

Le processus de transfert d'énergie au travers des liaisons (TBET) est une stratégie intéressante déjà bien éprouvée par la conception de cassettes fluorescentes. Cette stratégie permet d'augmenter le déplacement de Stokes en reliant deux fluorophores par un système conjugué au travers duquel l'énergie pourra être transférée. Le type de lien utilisé doit permettre une conjugaison des deux fluorophores (*e.g.* une triple liaison, un groupement phényle).¹⁹⁴ Par conséquent, contrairement au transfert d'énergie de type FRET, le recouvrement spectral de l'émission du donneur vis-à-vis de l'absorption de l'accepteur n'est pas nécessaire pour obtenir ce transfert d'énergie. C'est donc cet avantage qui est mis à profit pour obtenir des cassettes photoluminescentes possédant un grand déplacement de Stokes (dans ce cas on parle d'un pseudo déplacement de Stokes). De même, la possibilité de transférer l'énergie au travers des liaisons permet d'envisager l'imagerie multiplexée (*i.e.* méthode d'imagerie utilisant simultanément plusieurs fluorophores émettant à différentes longueurs d'onde, si possible avec une seule longueur d'onde d'excitation). K. Burgess et al¹⁹⁵ ont rapporté un

192 Green, O.; Gnaïm, S.; Blau, R.; Eldar-Boock, A.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. Near-Infrared Dioxetane Luminophores with Direct Chemiluminescence Emission Mode. *J Am Chem Soc* **2017**, *139*, 13243-13248

193 Huang, J.; Jiang, Y.; Li, J.; Huang, J.; Pu, K. Molecular Chemiluminescent Probes with a Very Long Near-Infrared Emission Wavelength for in Vivo Imaging. *Angew Chemie - Int Ed* **2021**, *60* (8), 3999-4003

194 Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X. Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: Construction and applications in ratiometric sensing. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (1), 29-43

195 Jiao, G. S.; Thoresen, L. H.; Kim, T. G.; Haaland, W. C.; Gao, F.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Metzker, M. L.; Burgess, K. Syntheses, photophysical properties, and application of through-bond energy-transfer cassettes for biotechnology. *Chem - A Eur J* **2006**, *12* (30), 7816-7826

concept simple de cassette TBET composé d'une fluorescéine conjuguée par une triple liaison à différentes rhodamines.

De même, le Pr. K. Burgess et son équipe ont également synthétisé des cassettes chimiluminescentes basées sur le TBET (Schéma 42). A l'aide du phthalhydrazide, motif principal du luminol sans la fonction amine, les molécules **137** et **138** sont à notre connaissance les premiers exemples d'une chimiexcitation suivie du processus TBET.¹⁹⁶ Le rendement quantique mesuré de ces deux chimiluminophores est relativement faible puisqu'il est plus bas que celui du luminol pour **137**, et légèrement plus élevé pour **138** ($\Phi_{CL}(\text{luminol dans eau}) = 0,012$).¹⁹⁷ En outre, la cassette **139** impliquant un bodipy est un autre exemple un peu plus performant ayant été rapporté.¹⁹⁸ Ce dernier possède un maximum d'émission de chimiluminescence à 670 nm grâce aux motifs thiophène ajoutés sur la structure du bodipy.

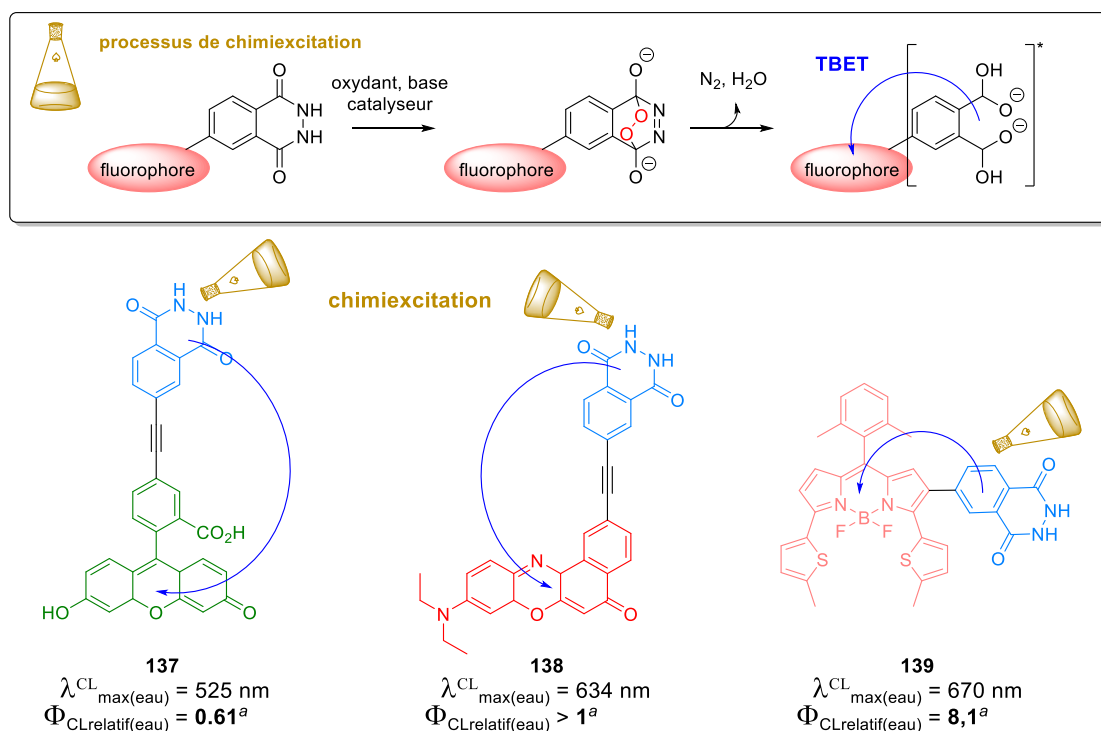


Schéma 42 Représentation de cassettes chimiluminescentes fondées sur le phénomène TBET.^a Les rendements quantiques sont relatifs au luminol.^{196,198}

Aucun chimiluminophore de type 1,2-dioxétane utilisant cette stratégie n'a été décrit dans la littérature. L'équipe du Pr. P.-Y. Renard a initié il y a quelques années la conception de tels chimiluminophores. La stratégie était fondée sur des motifs 1,2-dioxétane impliquant le cycle tétrahydrofurane qui avait été décrit comme plus stable par l'équipe de Matsumoto que l'utilisation de l'adamantyle. Cependant, les difficultés de synthèse qu'impliquaient cette architecture plus complexe n'ont pas permis d'obtenir en quantité suffisante les sondes finales pour pouvoir apporter des conclusions sur l'efficacité du TBET. Il a semblé intéressant d'explorer cette approche, mais en utilisant les sondes de Schaap.

196 Han, J.; Jose, J.; Mei, E.; Burgess, K. Chemiluminescent energy-transfer cassettes based on fluorescein and Nile red. *Angew Chemie - Int Ed* **2007**

197 LEE, J.; SELIGER, H. H. Quantum Yields of the Luminol Chemiluminescence Reaction in Aqueous and Aprotic Solvents. *Photochem Photobiol* **1972**, *15* (2), 227-237

198 Li, G.; Hirano, T.; Yamada, K. Bright near-infrared chemiluminescent dyes: Phthalhydrazides conjugated with fluorescent BODIPYs. *Dye Pigment* **2020**, *178* (March), 108339

1.4 Dernière stratégie : Conception d'un « fluorophore chimiluminescent ».

Au regard de toutes les stratégies explorées pour la conception d'un chimiluminophore 1,2-dioxétane performant, l'importance des propriétés de l'espèce émissive est un sujet récurrent. L'utilisation de la chimiluminescence indirecte *via* un transfert d'énergie est une stratégie intéressante pour obtenir de meilleures propriétés photophysiques. Néanmoins, l'intervention du transfert d'énergie est un désavantage certain dans cette approche, car limité par l'efficacité de ce transfert. C'est un facteur supplémentaire à prendre en compte. Malgré l'existence de cassettes TBET décrites comme possédant un rendement de transfert d'énergie quasi parfait ($\Phi_{TE} \approx 1$),¹⁹⁹ l'obtention d'une telle efficacité de transfert ne semble pas prédictible.

L'approche du mode de chimiluminescence direct par l'extension du système π -conjugué a montré un potentiel dans l'obtention de sondes chimiluminescentes plus performantes. Cependant, cette approche a aussi montré quelques limites dans la recherche d'une émission de chimiluminescence dans la région du rouge et du proche infra-rouge. Le rendement quantique de chimiluminescence diminue, et, par ailleurs, les longs systèmes π -conjugués non incorporés dans des cycles (aromatiques ou non) peut soulever des questions de stabilité.

L'utilisation d'un motif fluorescent connu que l'on fonctionnaliserait par un motif dioxétane déclenchable apparaît alors comme étant théoriquement la meilleure stratégie à utiliser. Toute chose étant égale par ailleurs, l'insertion de la plateforme de Schaap dans la structure d'un fluorophore connu apparaît comme le meilleur compromis pour obtenir un bon rendement quantique de chimiexcitation, combiné à un bon rendement quantique de photoluminescence. Cependant, une limitation majeure de cette stratégie est l'approche synthétique. Ainsi, avec une approche de synthèse classique (*i.e.* la voie b utilisé lors du chapitre 2) le chimiluminophore **140** a été obtenu en 9 étapes (Schéma 43). Ce chimiluminophore possède le plus haut rendement quantique de chimiluminescence dans l'eau connu à ce jour ($\Phi_{Cl(PBS)} = 0,55$) pour une sonde de type 1,2-dioxétane.²⁰⁰ L'équipe du Pr. Renard a également décrit la synthèse d'une coumarine substituée en position 5 (*meta*/phénol) par un motif 1,2-dioxétane.²⁰¹ L'obtention d'un spectre d'émission superposable à celui de la coumarine parente montre que la stratégie d'inclusion du motif 1,2-dioxétane en position *meta* d'un fluorophore à phénol est une piste prometteuse, mais se heurte aux difficultés synthétiques afférentes (la sonde coumarinique décrite dans l'article est obtenue en 17 étapes et un rendement de l'ordre de 6 %). Les détails des résultats obtenus seront présentés en préambule de la partie résultat.

Récemment, le groupe du Pr. D. Shabat a rapporté une nouvelle approche de synthèse *via* un couplage organométallique de Stille.²⁰² Cette synthèse convergente décrit le couplage d'un phénol bromé avec le dérivé stannane éther d'énol **84** (Schéma 43). Une application de cette méthode à plus de 35 molécules est proposée dans la publication avec des exemples originaux pour de potentiels nouveaux chimiluminophores fondés sur ce principe. La synthèse du chimiluminophore **140**, analogue de la

199 Cao, D.; Zhu, L.; Liu, Z.; Lin, W. Through bond energy transfer (TBET)-based fluorescent chemosensors. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* **2020**, *44*, 100371

200 Hananya, N.; Press, O.; Das, A.; Scomparin, A.; Satchi-Fainaro, R.; Sagi, I.; Shabat, D. Persistent Chemiluminescent Glow of Phenoxy-dioxetane Luminophore Enables Unique CRET-Based Detection of Proteases. *Chem - A Eur J* **2019**, *25* (64), 14679-14687

201 Koï, J.; Grandclaude, V.; Massonneau, M.; Richard, J. A.; Romieu, A.; Renard, P. Y. A novel and unusually long-lived chemiluminophore based on the 7-hydroxycoumarin scaffold. *Chem Commun* **2011**, *47* (23), 6713-6715

202 Gnaim, S.; Gholap, S. P.; Ge, L.; Das, S.; Gutkin, S.; Green, O.; Shelef, O.; Hananya, N.; Baran, P. S.; Shabat, D. Modular Access to Diverse Chemiluminescent Dioxetane-Luminophores Through Convergent Synthesis. *Angew Chemie Int Ed* **2022**, No e202202187

molécule obtenue par l'équipe du Pr. Renard avec cette voie de synthèse, est réduite à six étapes dont trois sont convergentes, et présente les mêmes propriétés de chimiluminescence que celles observées par notre équipe. Le Pr. D. Shabat a alors incorporé, *via* cette voie de synthèse, le motif de Schaap sur différents fluorophores à phénol, comme une héli-cyanine pour donner le chimiluminophore **142**. Malheureusement, ce dernier possède une cinétique de chimiluminescence plutôt lente ($t_{1/2} = 10$ h) pour un rendement quantique moins élevé qu'escompté. Le phénol dérivé de la D-luciférine **141**, molécule historique de la chimiluminescence, a pu être fonctionnalisé par le groupement éther d'énol par le biais du couplage rapporté. La chimiluminescence obtenue est relativement faible en comparaison de ce qui est obtenu avec la luciférine dans des expériences de bioluminescence. Cela est lié aux propriétés de fluorescence modestes de son espèce émissive en milieu aqueux. Ainsi, l'intensité de chimiluminescence du composé **141** a pu être augmentée par l'ajout dans le milieu de FBS (Sérum de veau fœtal – « Fetal Bovine Serum ») contenant de la BSA (Sérum albumine bovine – « Bovine Serum Albumin »), protéine connue pour se lier efficacement à des molécules possédant un caractère lipophile, et souvent utilisée pour augmenter le rendement quantique de fluorophores peu hydrosolubles.

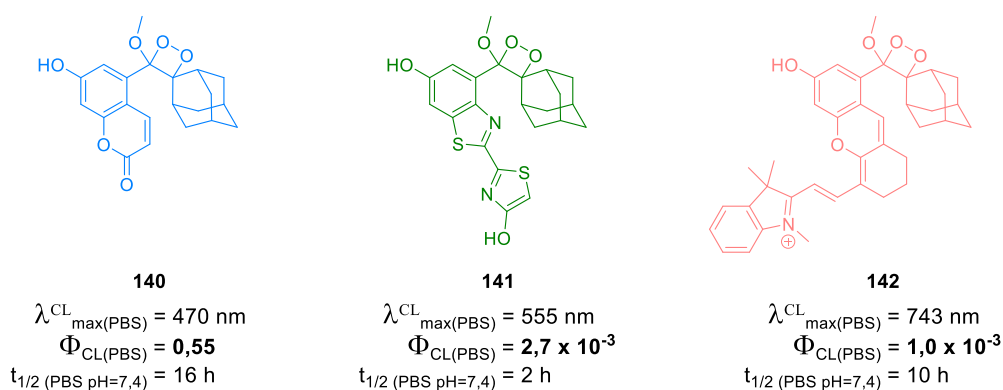
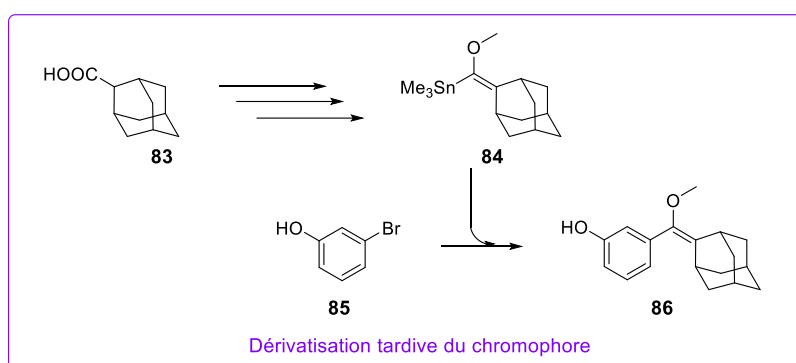


Schéma 43 Présentation de nouveaux chimiluminophores fondés sur la dérivatisation de fluorophores connus par un motif 1,2-dioxétane.²⁰²

2. Exemple d'application de sondes chimiluminescentes 1,2-dioxétane.

Dans cette sous-section, nous présentons un état de l'art non exhaustif d'applications des sondes chimiluminescentes de type 1,2-dioxétane. Le composé **143** conçu par l'équipe du Pr. Shabat est un exemple de sonde que l'on pourrait qualifier de théranostique (Schéma 44). Le β -galactose a été utilisé comme motif de reconnaissance afin de pouvoir relarguer la monométhyl auristatin E, qui est un agent

toxique capable d'inhiber la division cellulaire,²⁰³ et qui joue ici le rôle de principe actif *via* un processus d'auto-immolation une fois le phénol libéré par la β galactosidase. Ainsi, la détection par chimiluminescence des cellules surexprimant la β galactosidase a été dans un premier temps corrélée au relargage du principe actif par le biais de la mesure de la viabilité de ces mêmes cellules. Dans un second temps, une preuve de concept sur le petit animal a pu être expérimentée.²⁰⁴

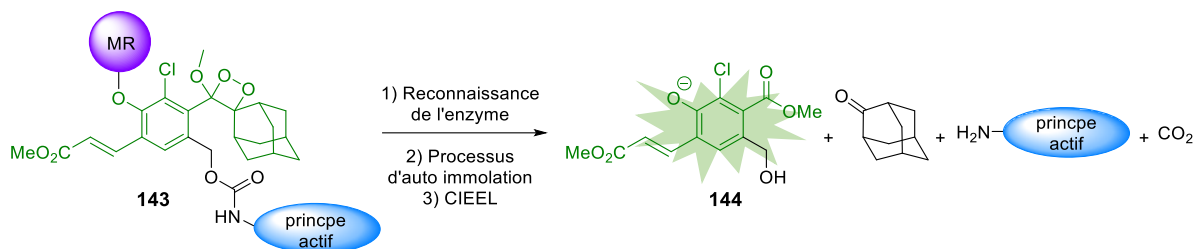


Schéma 44 Représentation schématique d'une sonde chimiluminescente théranostique.²⁰⁴

L'importance d'une cinétique d'émission de type flash a été abordée un peu plus tôt dans ce chapitre. Dans l'exemple présenté ci-dessous, Shabat *et al*²⁰⁰ rapportent un exemple original d'une utilisation d'une cinétique de chimiluminescence de type glow (*i.e.* cinétique très longue) (Schéma 45). Le chimiluminophore utilisé est la coumarine **140** fonctionnalisée en position 8 et possédant un temps de demi-vie de plus de 16 h et un très bon rendement quantique en milieu aqueux. Le concept de la sonde a été calqué sur les sondes fluorescentes OFF-ON de type FRET associant un fluorophore et un quencheur de fluorescence de type diazo.²⁰⁵ Le profil cinétique glow du chimiluminophore **140** lui a permis d'être engagé dans la sonde **145** de type CRET, comportant un quencher diazoïque ainsi qu'une séquence peptidique comme motif de reconnaissance d'une protéase. Dans son mode d'action, le chimiluminophore est donc toujours en phase de chimiexcitation avec une extinction de chimiluminescence par le biais du quencher. Lorsque le motif est reconnu par l'enzyme, l'éloignement du couple quencher-chimiluminophore induit une exaltation de luminescence. La comparaison de ce motif à son analogue fluorescent a démontré une exaltation du signal plus élevée pour la sonde chimiluminescente CRET grâce à un bruit de fond plus faible. En revanche, du fait de son long temps de vie de luminescence, la pertinence d'un tel dispositif pose question si l'on souhaite obtenir une sonde avec une LOD performante.

203 Francisco, J. A.; Cerveny, C. G.; Meyer, D. L.; Mixan, B. J.; Klussman, K.; Chace, D. F.; Rejniak, S. X.; Gordon, K. A.; DeBlanc, R.; Toki, B. E.; Law, C. L.; Doronina, S. O.; Siegall, C. B.; Senter, P. D.; Wahl, A. F. CAC10-vcMMAE, an anti-CD30-monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* **2003**, *102* (4), 1458-1465

204 Gnam, S.; Scomparin, A.; Das, S.; Blau, R.; Satchi-Fainaro, R.; Shabat, D. Direct Real-Time Monitoring of Prodrug Activation by Chemiluminescence. *Angew Chemie - Int Ed* **2018**, *57* (29), 9033-9037

205 He, G.; Lu, Y.; Qian, X.; Li, J.; Yuan, Z.; Li, C. A coumarin-based fluorescence resonance energy transfer probe targeting matrix metalloproteinase-2 for the detection of cervical cancer. *Int J Mol Med* **2017**, *39* (6), 1571-1579

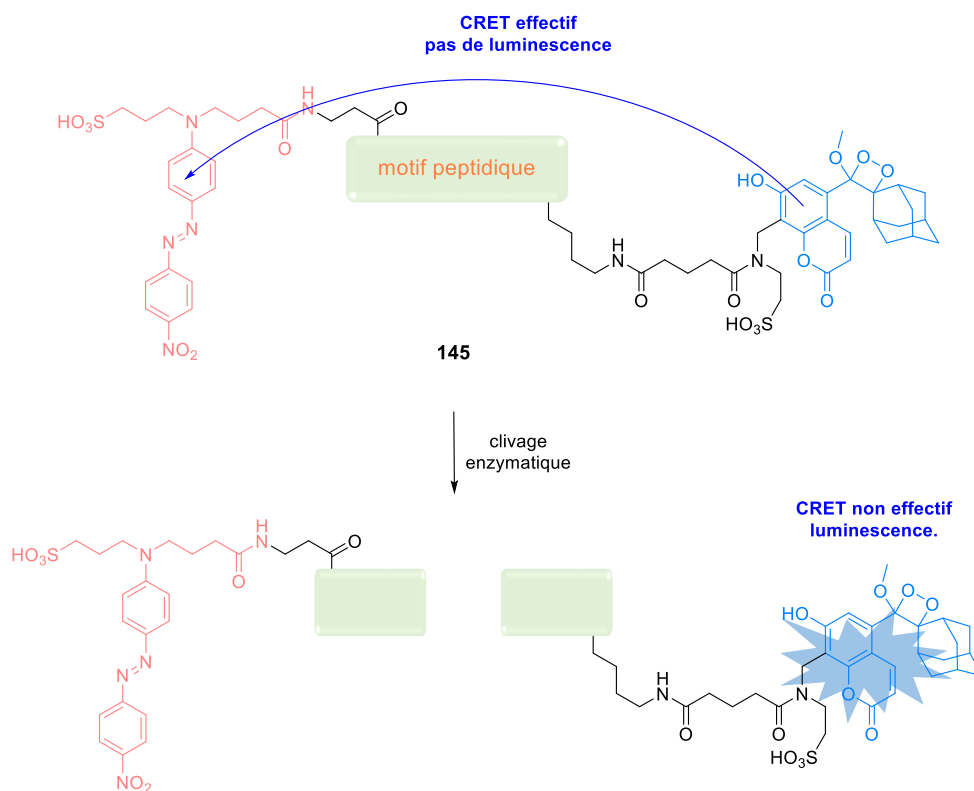


Schéma 45 Représentation d'une sonde chimiluminescente pour la détection d'une protéase, exploitant les propriétés d'une cinétique de chimiluminescence glow par extinction de luminescence via l'utilisation de CRET.²⁰⁰

Un exemple atypique de déclenchement chimiluminescent a été rapporté par le groupe de Z. Guo.²⁰⁶ Dans le cas présent, une activation en deux temps avec la formation du dioxétane *in situ* permet une exaltation de chimiluminescence par rapport à un déclenchement classique. Le « pré chimiluminophore » **147** est dans un premier temps activé par la reconnaissance de la β -Galactosidase (Figure 49A). Dans un second temps, après accumulation de ce pré chimiluminophore activé, le dioxétane est formé *in situ* par le biais d'une excitation radiative. Il s'en suit alors le mécanisme de décomposition CIEEL, puis la chimiluminescence. Les résultats de cette méthode démontrent une exaltation de l'intensité de chimiluminescence d'un ordre de grandeur avec l'apparition d'un profil cinétique de type flash dans un premier temps (Figure 49B). Le mécanisme postulé de formation *in situ* du dioxétane passerait par le biais d'un état TICT (pour « Twisted Internal Charge Transfer ») du « pré chimiluminophore » généré après l'irradiation, qui permettrait l'addition d'oxygène triplet. Cela est en contradiction avec la synthèse classique connue des dioxétanes *via* une réaction de cycloaddition de l'oxygène singulet, mais l'identification d'un sous-produit issu du « pré chimiluminophore » comportant un oxirane peut effectivement laisser penser à un mécanisme radicalaire pour l'addition du dioxygène.

Si la possibilité d'activer une sonde chimiluminescente au travers d'une excitation radiative paraît contre intuitive, elle ouvre des possibilités d'activation localisée tout en conservant les propriétés intrinsèques de la chimiluminescence. En effet, bien que cette excitation augmente *de facto* le bruit de fond, le temps

206 Zhang, Y.; Yan, C.; Wang, C.; Guo, Z.; Liu, X.; Zhu, W. A Sequential Dual-Lock Strategy for Photoactivatable Chemiluminescent Probes Enabling Bright Duplex Optical Imaging. *Angew Chemie* **2020**, *132* (23), 9144-9151

de demi-vie de chimiluminescence qui en résulte permettra tout de même d'éviter ce problème inhérent à la photoluminescence. De plus, l'utilisation d'un « pré chimiluminophore » augmente la stabilité de la sonde. Néanmoins, le mécanisme de génération *in situ* du dioxétane semble complexe, et il n'est pas assuré qu'il soit facilement applicable à d'autres chimiluminophores ou dans d'autres conditions.

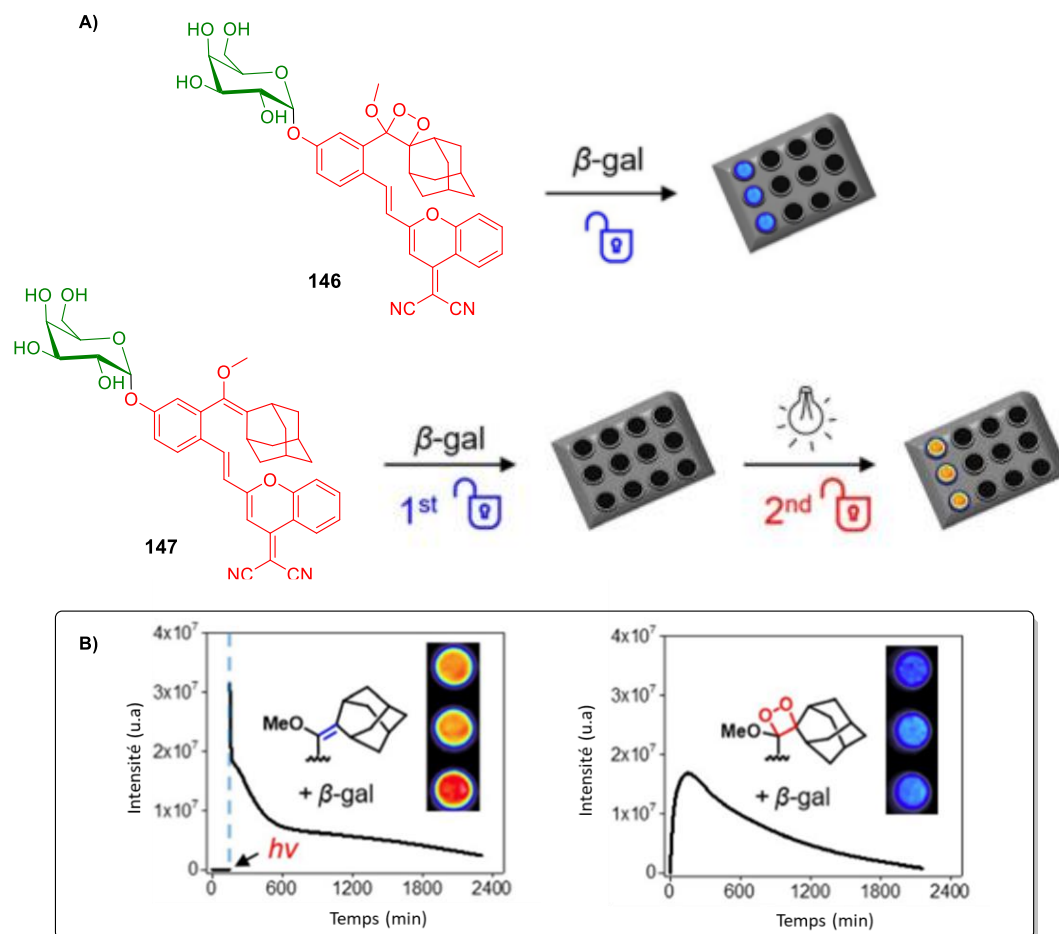


Figure 49 A) Représentation d'une sonde chimiluminescente basée sur une stratégie « dual lock » spécifiant les deux étapes d'activation, B) Profil cinétique de chimiluminescence du chimiluminophore classique **146**, et de la sonde dual lock **147** en présence de 20 U.mL⁻¹ de β -Galactosidase (figure adaptée).²⁰⁶

Dans la même publication, les auteurs ont également rapporté la synthèse de la sonde **148** (Figure 50). En plus d'être basée sur le déclenchement chimiluminescent en deux temps, le groupement électroattracteur DPB a été remplacé par un motif quinoline-malonitrile, connu pour ses propriétés d'AIE. Cette sonde conçue pour détecter la présence de peroxyde d'hydrogène a été utilisée pour imager une tumeur greffée, surexprimant le peroxyde d'hydrogène, sur le petit animal (Figure 50B).

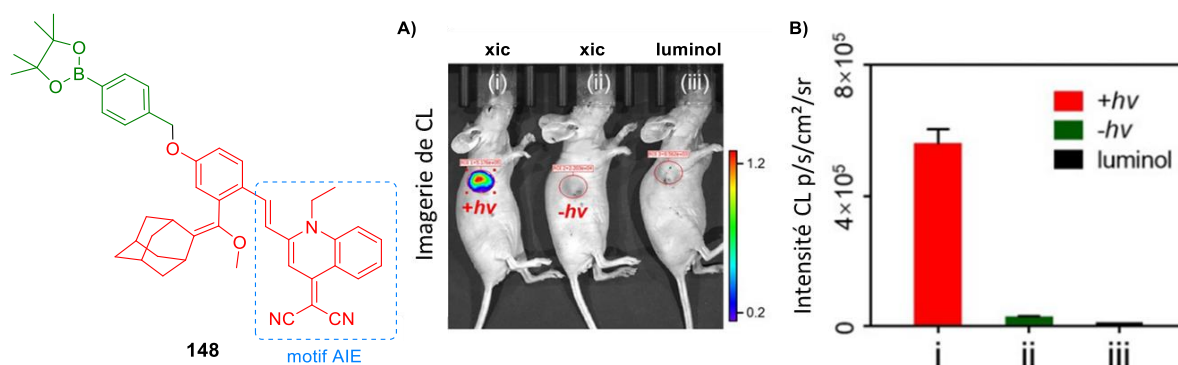


Figure 50 Sonde **148** basée sur la stratégie dual lock possédant un motif possédant des propriétés d'AIE A) Imagerie par chimiluminescence in vivo d'une tumeur greffée à la souris après injection de la sonde **148** ou du luminol B) Radiance de chimiluminescence enregistré (figure adaptée).²⁰⁶

Depuis les avancées produites par l'équipe du Pr. D. Shabat, l'utilisation de chimiluminophores de type 1,2-dioxétane a connu une réelle croissance. À la suite des nouvelles stratégies de conception combinées à des preuves de concept pour différentes applications, le groupe du Pr. Shabat a contribué au regain d'intérêt pour le sujet. Le nombre de publications et de revues^{207,208,209} portant sur les sondes dioxétane depuis les 8 dernières années atteste de cet intérêt. Parmi ces différentes publications, certains travaux peuvent être mis en avant étant donné leurs résultats prometteurs. Par exemple, le groupe de K. Pu a rapporté deux sondes utilisant un chimiluminophore développé par le Pr. Shabat (Figure 51).²¹⁰ Ainsi, la sonde **149** est une sonde dite « duale » (*i.e.* une sonde détectant deux analytes), conçue pour imager des cas d'hépatotoxicité, sujet récurrent impliquant de nombreux principes actifs développés comme potentiels médicaments. D'une part, la sonde **149** est composée d'une hémicyanine pro-fluorescente dans la région du proche infrarouge, ciblant la détection de la caspase 3. D'autre part, elle est également composée d'un chimiluminophore comportant le déclencheur trifluorométhanesulfonate afin de détecter la présence d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Le groupe a souhaité améliorer le concept des sondes fluorescentes duales en y incorporant la chimiluminescence. Cela a pour effet de diminuer les problèmes récurrents de recouvrement de signal observés avec ce type de sonde lorsque seule la photoluminescence est utilisée. En se basant sur le même chimiluminophore, K. Pu et al²¹¹ ont rapporté la molécule **150** pour la détection d'une insuffisance rénale aiguë. La sonde comporte également deux luminophores ainsi que deux motifs cyclodextrines connus pour faciliter l'élimination rénale du biomarqueur. Cependant, contrairement au composé **149**, la cyanine utilisée est toujours émissive. C'est donc le chimiluminophore qui permet de détecter une production anormale d'anion superoxyde indiquant un stress oxydatif et donc une dérégulation du milieu évalué. Enfin, la sonde **151** développée par le groupe du Pr. D. Shabat a été proposée pour détecter l'activité de la

207 Hananya, N.; Shabat, D. Recent Advances and Challenges in Luminescent Imaging: Bright Outlook for Chemiluminescence of Dioxetanes in Water. *ACS Cent Sci* **2019**, *5* (6), 949-959

208 Gnaïm, S.; Green, O.; Shabat, D. The emergence of aqueous chemiluminescence: New promising class of phenoxy 1,2-dioxetane luminophores. *Chem Commun* **2018**, *54* (17), 2073-2085

209 Wang, Y.; Bian, Y.; Chen, X.; Su, D. Chemiluminescent Probes Based on 1,2-Dioxetane Structures For Bioimaging. *Chem - An Asian J* **2022**, *17* (6)

210 Cheng, P.; Miao, Q.; Li, J.; Huang, J.; Xie, C.; Pu, K. Unimolecular Chemo-fluoro-luminescent Reporter for Crosstalk-Free Duplex Imaging of Hepatotoxicity. *J Am Chem Soc* **2019**, *141* (27), 10581-10584

211 Huang, J.; Li, J.; Lyu, Y.; Miao, Q.; Pu, K. Molecular optical imaging probes for early diagnosis of drug-induced acute kidney injury. *Nat Mater* **2019**, *18* (10), 1133-1143

NAD(P)H déshydrogénase quinone 1 (NQO1), surexprimée dans certains types de cancer.²¹² Des tests *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* sur le petit animal ont permis de valider l'efficacité de la sonde en termes de sélectivité, de biocompatibilité, et d'exaltation du signal. De plus, le chimilumiphore a démontré une sensibilité accrue par rapport à un homologue fluorescent rapporté auparavant.

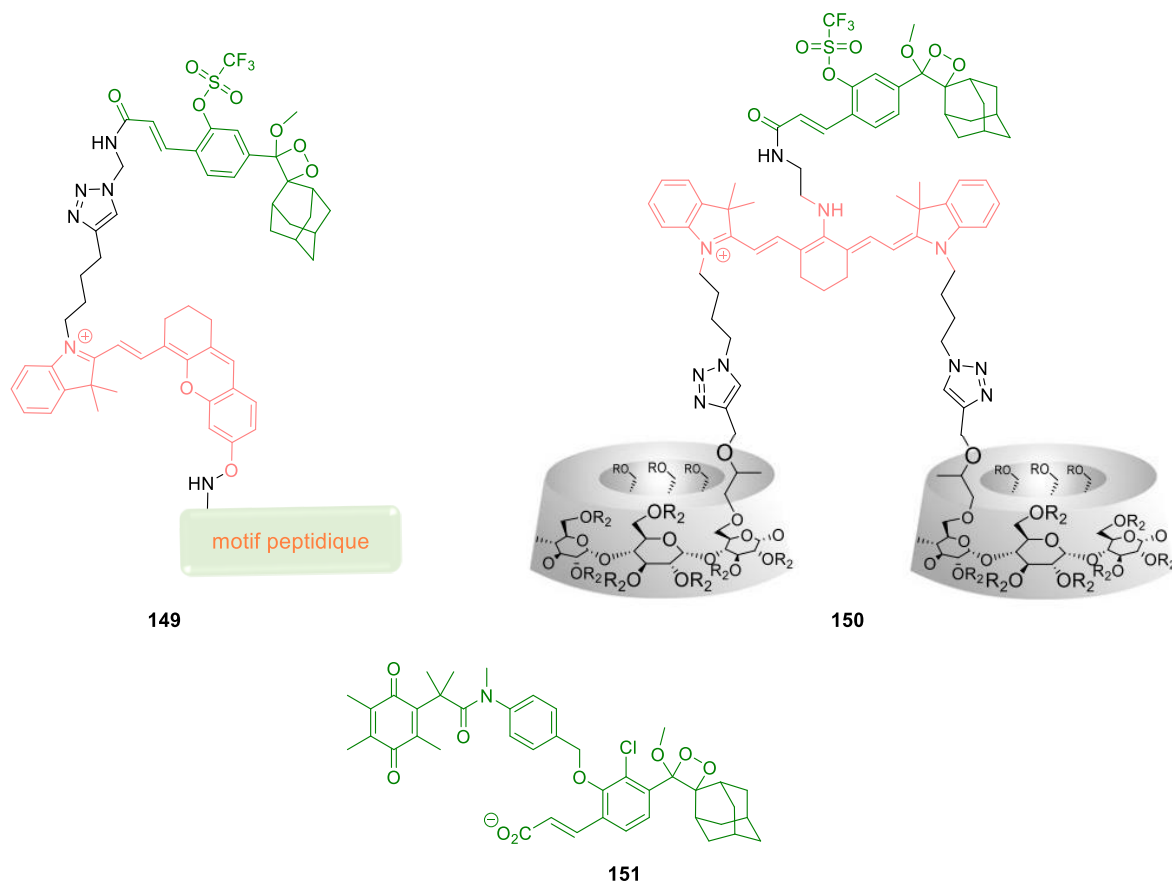


Figure 51 Représentation schématique de sondes chimiluminescentes activables aux résultats prometteurs.

3. Les fluorophores.

Cette partie du projet faisant intervenir l'accroche d'un fluorophore sur le cœur phénolique chimiluminescent, nous allons voir quelques généralités sur les fluorophores suivies d'une description plus précise des deux familles de fluorophores qui ont été choisies : les dérivés du dicyanométhylène (DCM) et les bodipy's.

3.1 Généralités.

Pour rappel, un fluorophore désigne un composé capable d'émettre un photon à la suite d'un stimulus photonique. Devant la grande diversité des fluorophores existant, nous ne nous intéresserons ici qu'aux composés organiques. Ces derniers comportent des structures de type polyaromatiques ou un système π étendu, permettant une délocalisation des électrons. Cela induit des propriétés d'absorption et d'émission de photons d'énergie allant du proche UV vers le proche IR. On retrouve certaines molécules

212 Son, S.; Won, M.; Green, O.; Hananya, N.; Sharma, A.; Jeon, Y.; Kwak, J. H.; Sessler, J. L.; Shabat, D.; Kim, J. S. Chemiluminescent Probe for the In Vitro and In Vivo Imaging of Cancers Over-Expressing NQO1. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2019, p 1739-1743

fluorescentes dans le vivant (*e.g.* le tryptophane, les différentes oxyluciférines, les hèmes ferriques), mais la majorité des fluorophores utilisés comme biomarqueurs sont d'origine synthétique.

Plusieurs familles de fluorophores sont distinguées selon leur structure et leur comportement photophysique. À titre d'exemple, les molécules polyaromatiques correspondent à la famille des fluorophores possédant la structure la plus simple. On peut également citer la famille des coumarines, des xanthènes (*i.e.* rhodamine et fluorescéine), des bodipys, des cyanines ou encore des oxazines. Parmi toutes ces familles, le choix du fluorophore à utiliser est guidé par différents paramètres selon l'application visée. La brillance, la stabilité, et les propriétés spectrales sont autant de variables à prendre en compte.

À titre d'illustration, les cyanines correspondent à une classe de fluorophores très efficaces dans la gamme spectrale du rouge et du proche infrarouge. Cependant, les cyanines sont aussi connues pour leurs photosensibilité (*i.e.* sujettes au photoblanchiment *via* une réaction irréversible à l'état excité) à cause de leur longue chaîne polyméthine. Dans de nombreux cas d'applications à la bioimagerie, l'hydrosolubilité est une des variables posant le plus de problèmes. En effet, la performance d'un fluorophore est souvent liée à la rigidité de sa structure délocalisée, cela est souvent en opposition à l'obtention d'une bonne hydrosolubilité. La présence de cycles aromatiques peut favoriser le π -stacking provoquant la formation d'agrégats devenant non fluorescents dans de nombreux cas. À cela s'ajoute la diminution de la diffusion du biomarqueur induite par son manque de solubilité, provoquant son accumulation dans les tissus adipeux ou leur complexation à des protéines hydrophobes comme la BSA, limitant leur distribution à un endroit donné, qui n'est pas nécessairement celui où l'analyte à détecter se trouve. Les solutions permettant l'hydrosolubilisation des fluorophores s'effectuent en majorité *via* l'ajout de groupements polaires tels que les groupements sulfonates ou phosphonates.

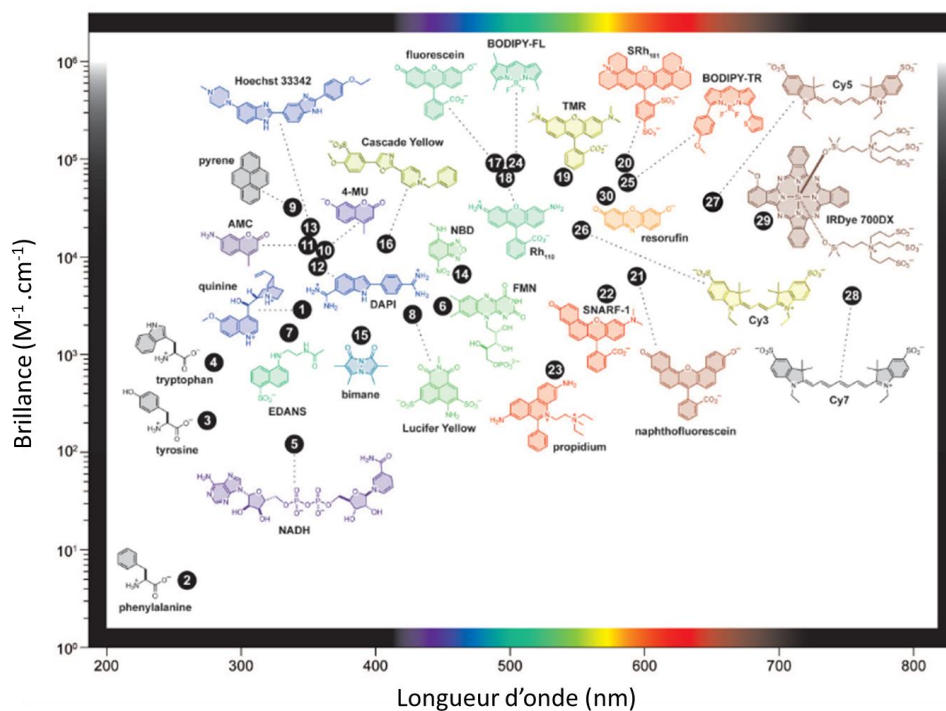


Figure 52 Graphique représentant des familles de fluorophores organiques en fonction de leur brillance et de leur longueur d'onde d'émission (figure adaptée).¹⁵⁶

3.2 Les Bodipys.

L'acronyme BODIPY (pour « BOron DIPYromethene complex ») désigne la famille des molécules dérivant du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène dont la première synthèse a été rapporté en 1968.²¹³ Les bodipys sont considérés comme des analogues de cyanine rigidifiés. Ils possèdent de bonnes propriétés photophysiques, une très bonne absorption ($\epsilon > 50\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), et des rendements quantiques assez élevés en solvant organique pour les motifs les plus simples. Les propriétés spectrales du bodipy ne sont pas influencées par la polarité du solvant. De plus, l'aromaticité du noyau indacène assure une certaine stabilité du fluorophore.²¹⁴ L'obtention d'un bodipy passe par la condensation de deux motifs pyrroles sur un aldéhyde pour donner le dipyrrométhane correspondant. Par la suite, une oxydation donne le dipyrrométhène qui permet la complexation du bore et l'obtention du bodipy. Il est également possible d'obtenir directement le dipyrrométhène en utilisant un chlorure d'acyle (ou un anhydride carboxylique) comme substrat de départ (Schéma 46). Si la chimie des pyrroles (synthon précurseur du bodipy) peut être complexe, la stabilité du bodipy permet d'effectuer une variété de réactions sur le noyau indacène. Le plus gros problème posé par les bodipys dans le domaine applicatif de la bioimagerie réside dans leur manque d'hydrosolubilité.

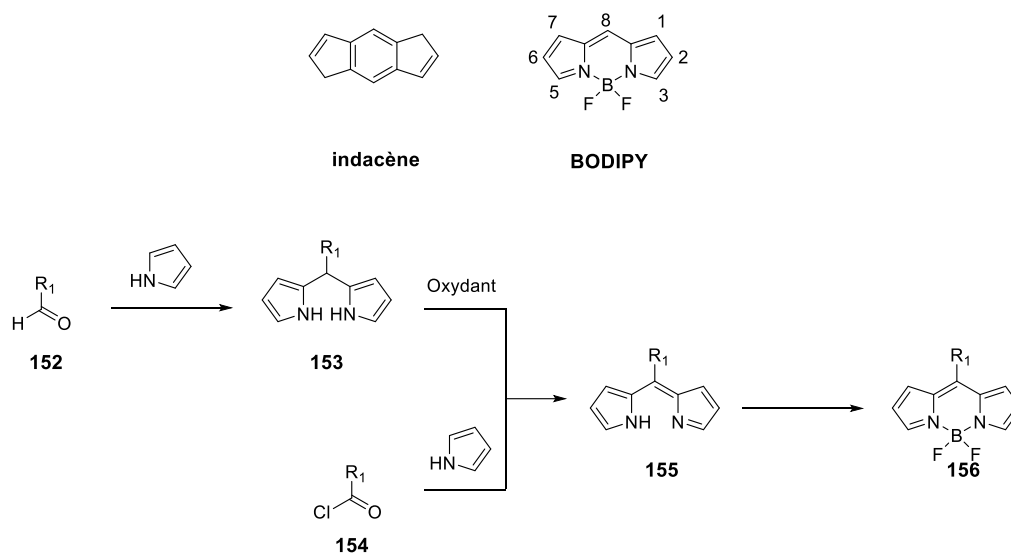


Schéma 46 Structure générale d'un bodipy et voie de synthèse classique à partir d'un aldéhyde ou d'un chlorure d'acyle.

Les propriétés optiques intrinsèques du bodipy se situent autour de 500 nm (Figure 53). Elles sont modulables en étendant le système de délocalisation sur les positions pyrroliques (*i.e.* positions 1/7, 2/6 ou 3/5). Par exemple, la fonctionnalisation d'un bodipy méthylé *via* une réaction de Knoevenagel permet, en obtenant le bodipy **158**, d'étendre le système π conjugué avec des motifs électrodonneurs anisoles. Cela a permis de décaler l'émission dans le proche IR avec un bon rendement quantique dans le dichlorométhane ($\Phi_{\text{PL}} = 0.75$). La position pseudo méso (position 8) ne permet pas de moduler les propriétés spectrales intrinsèques du bodipy. Cependant, la fonctionnalisation de cette position est simple, ce qui facilite l'ajout de groupes permettant d'interagir sur l'état excité du bodipy par le biais du PeT ou d'un transfert d'énergie. Ainsi, l'ajout d'un motif tétrazine sur le phényle en position

213 Treibs, A.; Kreuzer, F. -H.Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann Chem* **1968**, 718 (1), 208-223

214 Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew Chemie - Int Ed* **2008**, 47 (7), 1184-1201

pseudo méso a permis de concevoir la sonde intelligente **159** pour le marquage *via* une réaction bioorthogonale de Diels Alder à demande inverse.²¹⁵

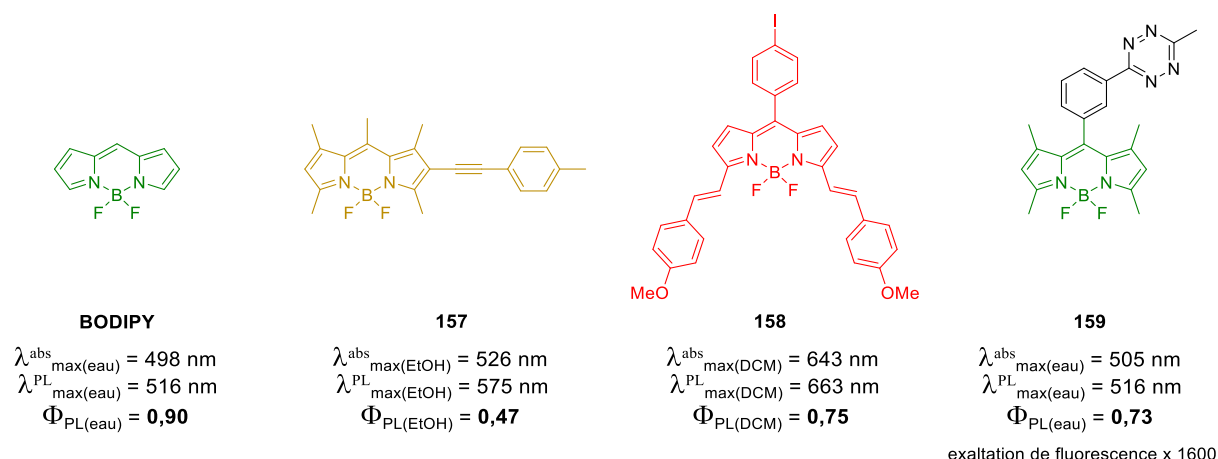


Figure 53 Représentation d'un bodipy simple et de bodipys dérivatisés avec leurs propriétés spectrales.

3.3 Les systèmes push-pull dérivés du dicyanométhylène (DCM).

Les fluorophores dérivant du motif accepteur dicyanoisoporone sont des analogues du colorant rouge et fluorophore : le dicyanométhylène (DCM). Ces fluorophores possèdent un fort caractère d'ICT du fait de leur structure donneur-accepteur et sont donc très sensibles à la polarité du solvant.²¹⁶ La présence de la double liaison centrale, permettant une libre rotation de l'accepteur et du donneur, est souvent utilisée pour sonder la viscosité du milieu.²¹⁷ En effet, le caractère ICT a tendance à se renforcer lorsque le nombre de degrés de liberté diminue. Cette famille de fluorophores est plutôt utilisée dans le domaine des matériaux grâce à leurs propriétés de fluorescence à l'état solide.²¹⁶ Dans le domaine de la bioimagerie, cette famille de fluorophores peut être utilisée pour son grand déplacement de Stokes (de l'ordre d'une centaine de nm, Figure 53). De plus, selon l'intensité du caractère ICT, l'émission de fluorescence se situera dans le domaine du rouge, voire du proche infrarouge. À titre d'illustration, le dicyanométhylène émet à 624 nm dans l'eau, en présence de BSA, pour un rendement quantique de 0,12.

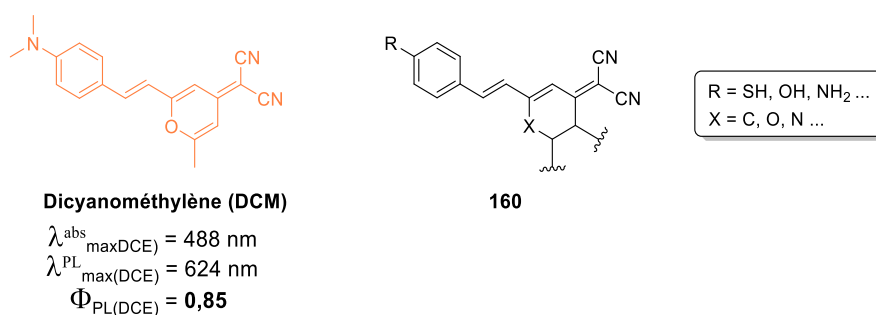


Figure 54 Structure générale des fluorophores de type push-pull basés sur le dicyanométhylène.²¹⁶

215 Carlson, J. C. T.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. BODIPY-tetrazine derivatives as superbright bioorthogonal turn-on probes. *Angew Chemie - Int Ed* **2013**, 52 (27), 6917-6920

216 Zhang, X.; Chen, Y. Synthesis and fluorescence of dicyanoisoporone derivatives. *Dye Pigment* **2013**, 99 (3), 531-536

217 Lee, S. C.; Heo, J.; Ryu, J. W.; Lee, C. L.; Kim, S.; Tae, J. S.; Rhee, B. O.; Kim, S. W.; Kwon, O. P. Pyrrolic molecular rotors acting as viscosity sensors with high fluorescence contrast. *Chem Commun* **2016**, 52 (94), 13695-13698

L'un des avantages de l'utilisation des fluorophores dérivant du dicyanométhylène réside dans leur facilité d'accès. Deux condensations de Knoevenagel successives permettent de synthétiser ces molécules en peu d'étapes (Schéma 47). Cela permet une modulation des propriétés spectrales simplifiée, en jouant sur le choix des groupements électrodonneurs et électroattracteurs. L'utilisation d'un motif basé sur l'isophorone prend tout son sens lors de la synthèse, puisqu'il évite *de facto* la bis condensation de Knoevenagel pouvant être nuisible lors de l'utilisation du motif 2,6-diméthyl-4H pyrane 4-one pour la formation du DCM.²¹⁸

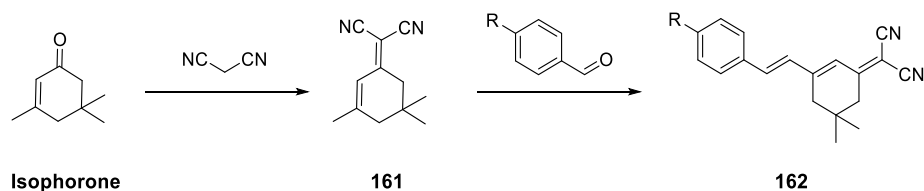


Schéma 47 Schéma général de synthèse d'un système push pull dérivé du motif dicyanoisophorone.

La molécule **163** dérivée du motif dicyanoisophorone est un exemple d'application de cette classe de fluorophore. L'article décrit cette molécule comme une sonde conçue pour imager les lysosomes, organites cellulaires présents dans toutes les cellules eucaryotes ayant pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire. Le marquage des lysosomes est permis par le caractère ON-OFF de la sonde. En effet, la différence de pH entre le milieu cellulaire et l'environnement au sein des lysosomes (pH plus acides) permet de marquer spécifiquement les lysosomes. Ainsi, le fluorophore est luminescent en milieu acide permettant de ne pas marquer le reste du milieu cellulaire. En outre, la sonde **163** a démontré une bonne photo-stabilité combinée à un déplacement de Stokes idéal (224 nm ou $44\,642\text{ cm}^{-1}$), avec un rendement quantique raisonnable ($\Phi_{\text{PL}} = 0,15$). Cela leur a permis de comparer cette sonde à des marqueurs fluorescents déjà connus pour sonder les lysosomes (Figure 55).²¹⁹

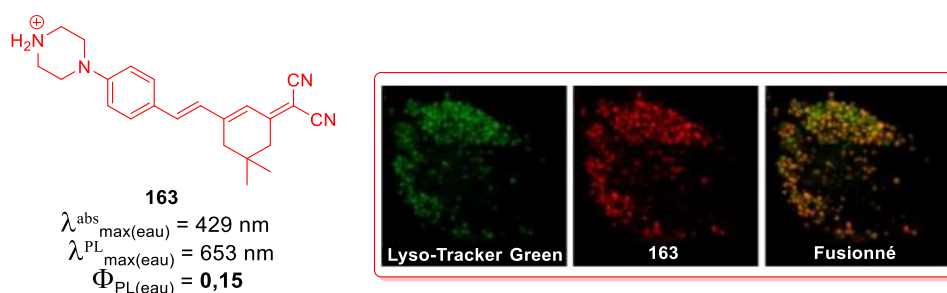


Figure 55 Sonde lysosomale **163** basée sur le motif isophorone. Imagerie cellulaire de la sonde **163** comparée au Lyso-Tracker green (figure adaptée).²¹⁹

Cependant, il faut noter que le faible coefficient d'absorption molaire ($\epsilon \approx 6000$) des fluorophores dérivant du motif dicyanoisophorone (que l'on appellera par la suite DCI) est sans doute un désavantage. Dans le cadre d'une application à une cassette chimiluminescente, cela ne défavoriserait pas les performances du chimiluminophore.

218 Jung, B. J.; Lee, J. I.; Chu, H. Y.; Do, L. M.; Lee, J.; Shim, H. K. A new family of bis-DCM based dopants for red OLEDs. *J Mater Chem* **2005**, *15* (25), 2470-2475

219 Hong, J.; Li, Q.; Xia, Q.; Feng, G. Real-Time and High-Fidelity Tracking of Lysosomal Dynamics with a Dicyanoisophorone-Based Fluorescent Probe. *Anal Chem* **2021**, No 93, 16956-16964

4. Présentation des travaux antérieurs au sein du laboratoire.

Afin de placer les résultats des travaux de cette thèse dans leur contexte, il est important de revenir sur les travaux effectués dans l'équipe avant le début de ce projet. Dans un premier temps, la réalisation de sondes chimiluminescentes a consisté à une prise en main du concept par l'adaptation de la sonde de Schaap à la détection de la caspase 3 (voir chapitre 2). Puis, l'équipe a axé ses efforts sur la synthèse de cassettes chimiluminescentes à transfert d'énergie.

4.1 Synthèse d'une coumarine chimiluminescente par insertion du motif dioxétane.

La fusion du motif de Schaap au sein d'un fluorophore à phénol comme la 7-hydroxycoumarine a été mentionné dans l'état de l'art afin d'obtenir un chimiluminophore ayant les propriétés d'émission du fluorophore à phénol parent. Cette stratégie a été conçue et mise en œuvre dès 2010 par notre équipe, au cours des travaux de thèse du Dr. V. Grandclaude en collaboration avec le Dr. J. Koci.^{201,220} Un hybride coumarine dioxétane a été synthétisé en utilisant le groupement stabilisant de Matsumoto pour le motif dioxétane. Grâce au pKa du phénol d'une coumarine plus bas qu'un phénol classique et le très bon rendement quantique de fluorescence d'une coumarine dans un tampon PBS, cela a permis d'envisager un déclenchement en conditions physiologiques. La conception de la sonde **164** pour la détection d'estérase a donc semblé idéale pour une première preuve de concept de « fluorophore chimiluminescent » (Schéma 48).

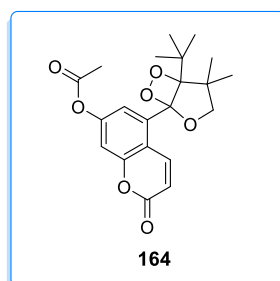


Schéma 48 Coumarine chimiluminescente synthétisée au sein du laboratoire.

Cependant, le déclenchement enzymatique de la sonde **164** n'a pas donné lieu à une émission de chimiluminescence. Pourtant, le bon déroulement du clivage enzymatique et du mécanisme CIEEL a bien été confirmé *via* l'enregistrement d'une exaltation de fluorescence combinée à une étude RP-HPLC. Par ailleurs, un déclenchement en milieux aqueux à pH 9 n'a pas non plus donné lieu à un signal de chimiluminescence. En conséquence, l'équipe s'est reporté sur un déclenchement en milieu organique dans le DMSO. Ainsi une émission de chimiluminescence correspondant à celle de la coumarine a pu être observée (Figure 56).

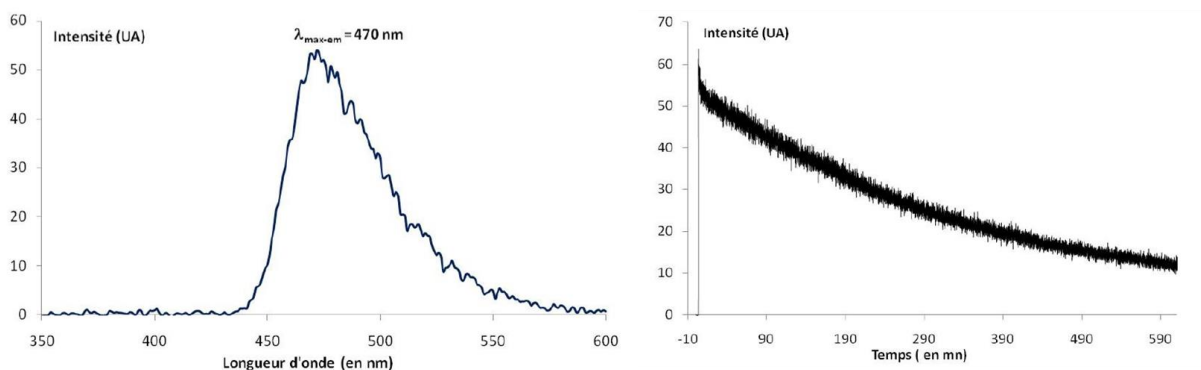


Figure 56 À gauche : spectre de chimiluminescence de la sonde **164** à droite enregistrement de la cinétique de chimiluminescence à 460 nm (conditions : 170 μ M de la sonde dans le DMSO, addition d'une solution de TBAF à 1 M).²²⁰

L'objectif visé a partiellement été atteint *via* la synthèse d'un hybride coumarine dioxétane combiné à une première preuve de concept en milieu organique. Toutefois, l'absence de résultats positifs en milieu aqueux combiné aux 17 étapes de synthèse nécessaires pour obtenir la sonde **164** ont conduit l'équipe à mettre de côté cette approche au profit d'une stratégie basée sur un transfert d'énergie.

4.2 Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR *via* une cassette chimiluminescente à transfert d'énergie « TBET » phénolique.

Durant les travaux de thèse du Dr. J.A. Richard, un projet de synthèse de sonde chimiluminescente de type CRET a été exploré. Afin d'optimiser les chances de recouvrement avec un fluorophore émettant dans le proche infrarouge, l'équipe s'est appuyée sur l'utilisation d'un motif naphtholique déjà éprouvé par le Pr. Matsumoto. Cependant, des problèmes synthétiques combinés à l'apparition de publications rapportant des cassettes de type TBET dans la littérature poussa l'équipe à s'orienter vers un projet de synthèse de cassette chimiluminescente de type TBET.¹⁶⁷

La première approche de cassette TBET a consisté à synthétiser une plateforme chimiluminescente basée sur un cœur phénolique combiné au motif stabilisant développé par le groupe de Matsumoto. Le défi synthétique de ce projet a reposé sur l'introduction d'une triple liaison servant de point d'accroche pour lier le chimiluminophore au fluorophore afin de former la molécule finale **170** (Schéma 49). Pour ce faire, le résorcinol substitué **165** a été utilisé comme substrat de départ. La première phase de la synthèse a consisté à obtenir la plateforme phénolique **169** comportant le motif stabilisant dihydrofurane. Cette première partie de la synthèse s'est très bien déroulée. Néanmoins, l'insertion de la triple liaison *via* un couplage de Sonogashira n'a pas pu être réalisée.

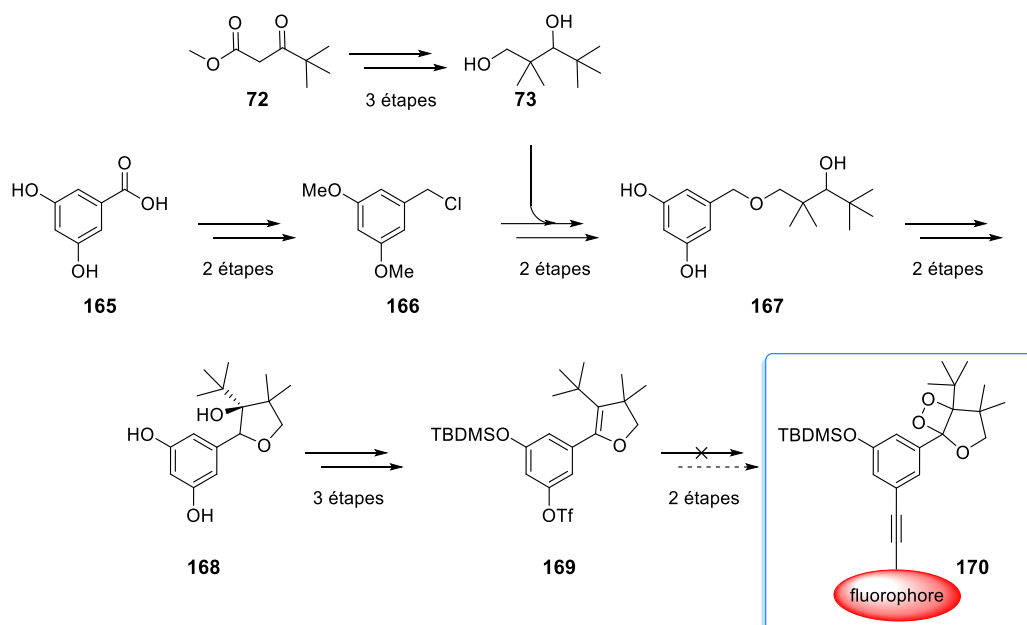


Schéma 49 Représentation de la voie de synthèse effectuée pour la synthèse d'une première cassette chimiluminescente phénolique.

Différentes conditions ont été essayées pour insérer la triple liaison sur la plateforme phénolique *via* un couplage de Sonogashira entre le triflate et un acétylénure (Schéma 50). Dans le cas de la voie a, l'absence de couplage a été attribué à l'encombrement du groupement TBDMS. Cependant, la mise en œuvre de la réaction de Sonogashira entre le phénol non protégé (dérivé **172**) et l'acétylène triméthyl silyl n'a pas rencontré plus de succès.

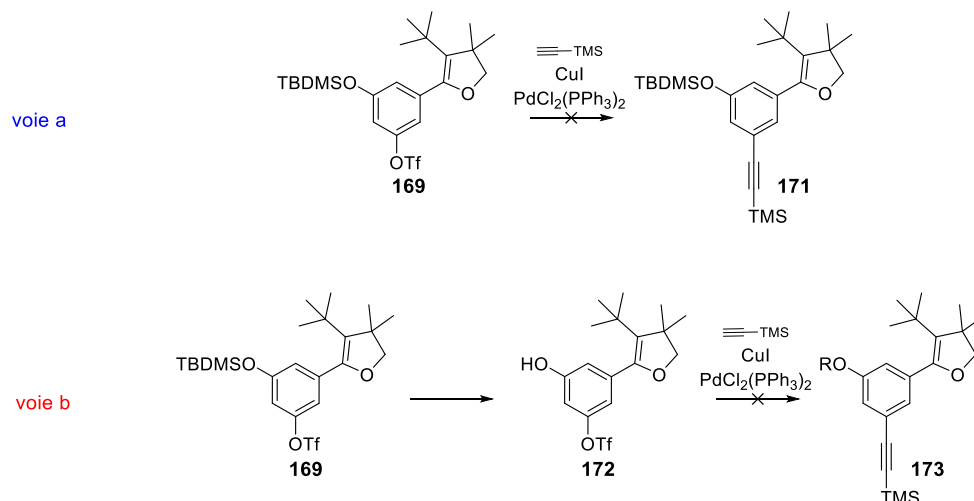


Schéma 50 Représentation schématique des deux voies de synthèse mises en œuvre.

Les conditions classiques utilisées pour la réaction de couplage de Sonogashira à partir d'un triflate n'ont donc pas permis d'insérer une triple liaison.

4.3 Extension de l'émission de chimiluminescence vers le proche IR *via* une cassette chimiluminescente à transfert d'énergie « TBET » naphtholique.

Les difficultés synthétiques rencontrées lors des travaux de thèse du Dr J.A. Richard concernant la conception d'une cassette TBET au cœur phénolique ont guidées l'équipe vers le choix d'une plateforme

naphtolique. Initialement, la conception d'une cassette chimiluminescente TBET s'est appuyée sur les travaux du Pr. K. Burgess déjà cités.¹⁹⁶ Ainsi, le choix du fluorophore utilisé pour ces travaux s'est porté sur le Nile Red afin de mimer le plus fidèlement possible le design rapporté dans la littérature.

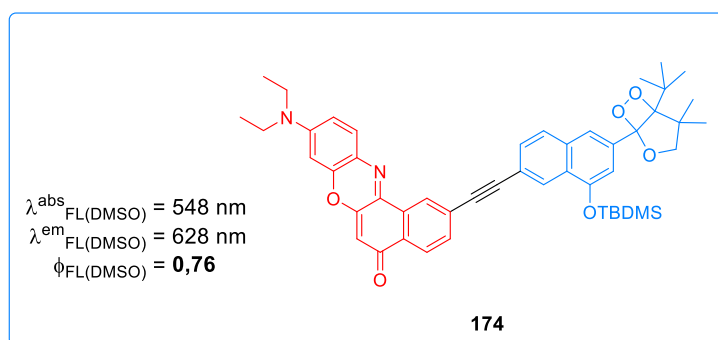


Schéma 51 Structure de la cassette chimiluminescente visée.

La synthèse de la cassette **174** est représentée sur le Schéma 52. À partir du para-hydroxybenzaldéhyde **175**, la première tentative de synthèse permit d'obtenir le noyau naphtolique *via* la réaction de Stobbe suivi d'une réaction de Friedel Craft. Une fois le noyau naphtolique formé, une séquence de sept étapes permet d'introduire le dihydrofurane et le groupement triflate pour mener au composé **178**. Malheureusement, aucun produit de couplage n'a été isolé durant la tentative de couplage de Sonogashira entre le fluorophore fonctionnalisé par l'alcyne vrai et le composé **178**. L'introduction de l'alcyne sur la plateforme phénolique a révélé des problèmes de compatibilité entre cette fonction et le clivage du groupement methoxy. Cette information sera prise en compte pour les travaux de synthèse suivants.

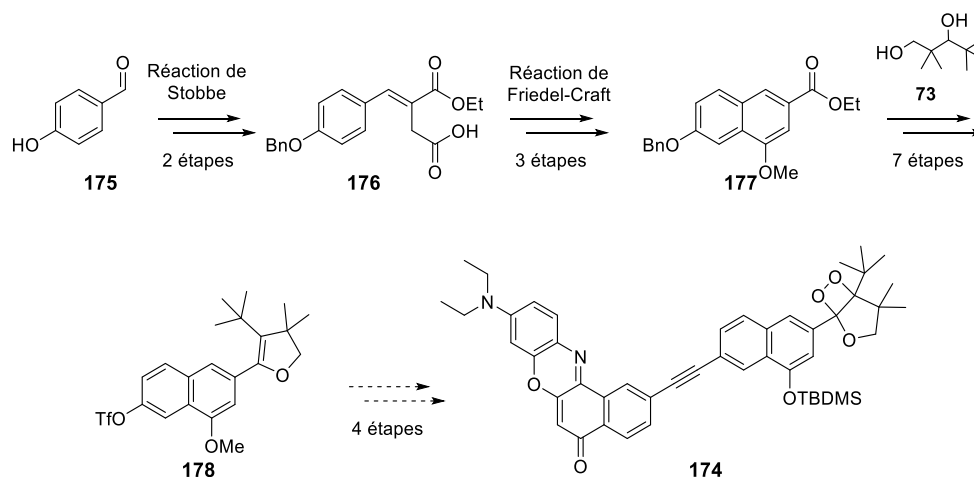


Schéma 52 Représentation de la voie de synthèse explorée par le Dr. J.A Richard.

À partir des travaux exploratoires du Dr. J.A Richard (Schéma 53), l'équipe s'est attelée à l'optimisation de la synthèse. Cette fois-ci, l'alcool utilisé pour l'insertion de la triple liaison a été remplacé par un atome de brome. Le groupement protecteur methoxy a été remplacé par un groupement benzyle, ce qui a permis la synthèse de la plateforme comportant l'alcyne vrai. Cependant, le rendement de déprotection en présence de l'alcyne reste en dessous de 40 % ce qui est handicapant après seize étapes de synthèse. La molécule finale **174** a tout de même été obtenue. Toutefois, une partie non négligeable

du dioxétane formé s'est ouvert durant la réaction de formation du dioxétane, et le composé final n'a pas pu être séparé du produit d'ouverture (Schéma 53).

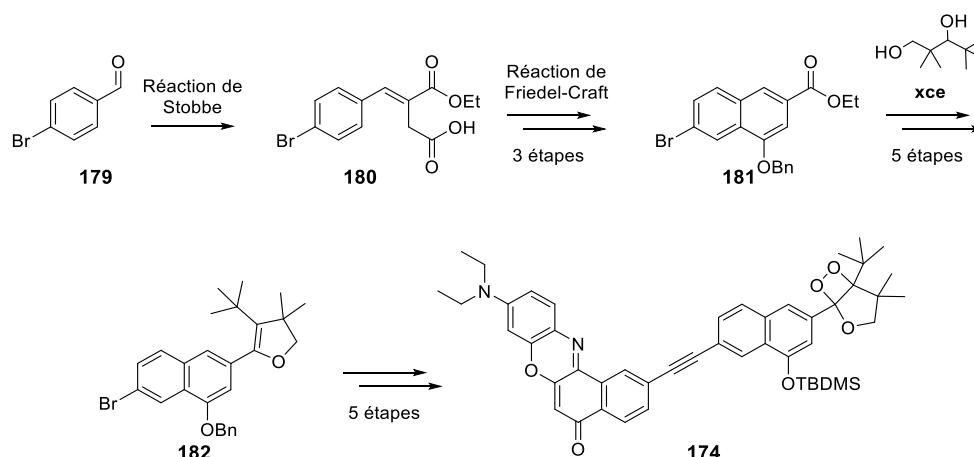


Schéma 53 Représentation de la voie de synthèse de la sonde **174** développée.

o Déclenchement de chimiluminescence et propriétés photophysiques :

Les propriétés de la molécule **174** ont donc été mesurées sur un mélange dioxétane : produit d'ouverture (55:45) dans le DMSO. Les spectres d'absorption UV-visible et de fluorescence ont confirmé la conservation des propriétés lumineuses intrinsèques au Nile Red. Un déclenchement de chimiluminescence a été obtenu à l'aide d'anions fluorures grâce au fluorure de tétrabutylammonium (TBAF). Les spectres de chimiluminescence ont été enregistrés à intervalle régulier. La présence d'une bande d'émission de chimiluminescence à 630 nm tend à confirmer l'effectivité du transfert d'énergie (Figure 57). Cependant, l'épaule présente autour de 560 nm laisse transparaître un transfert d'énergie incomplet puisqu'il s'agit sans doute de l'émission du cœur naphtholique de la plateforme chimiluminescente.

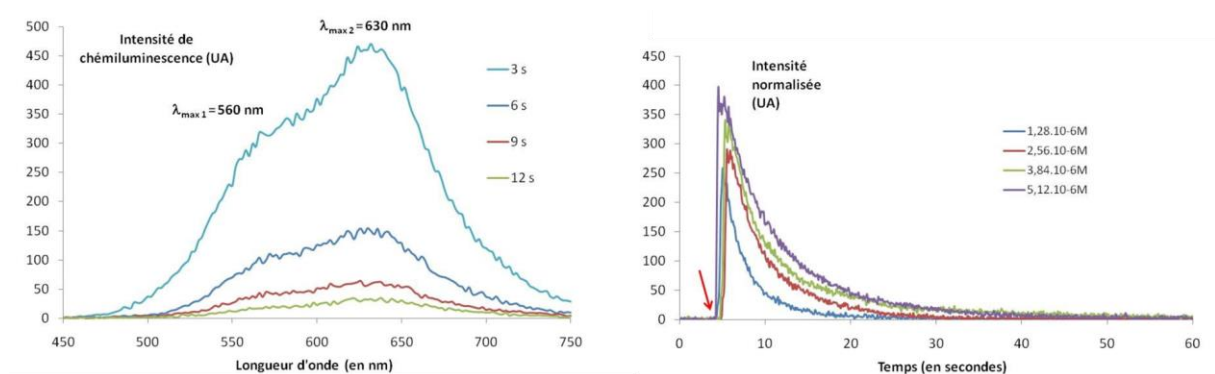


Figure 57 À gauche : spectre d'émission de chimiluminescence de la sonde **174** à droite enregistrement de la cinétique de chimiluminescence à 630 nm (conditions : 1,28 mM de la sonde dans le DMSO, addition d'une solution de TBAF à 1 M) (figure extraite).²²⁰

À la suite de ces travaux, le Dr. K. Solmont s'est attelée à la synthèse de cette même cassette en y incorporant un Nile Red hydrosoluble par le biais de fonctions sulfonates ajoutées sur le Nile Red. Malheureusement, le couplage du fluorophore hydrosoluble et de la plateforme s'est avéré plus compliqué que prévu. De plus, les nombreuses étapes de synthèse requises pour accéder au motif naphtholique possédant le groupement stabilisant de Matsumoto ne permet pas l'obtention de la

cassette dans le temps imparti par la thèse. Il est clairement apparu que l'accès au motif dihydrofurane stabilisant le 1,2-dioxétane était trop coûteux en terme du nombre d'étapes de synthèse et qu'il devait être remplacé par un éther d'énol dérivé de l'adamantane, comme les sondes de Schaap. De plus, les motifs naphhtols ne sont pas requis pour l'accès aux cassettes TBET, nous avons donc décidé de nous concentrer sur les motifs phénol.

II. Résultats et Discussion.

1. Présentation des molécules cibles et des objectifs.

Durant la phase de mise au point de cette seconde partie du projet, un détail concernant le déclenchement de la sonde chimiluminescente **174** a attiré notre attention. En effet, la concentration de 1,23 mM utilisée pour cette preuve de concept (Figure 57) semble très élevée pour une émission relativement faible. De plus, la synthèse de molécules hydrosolubles est connue pour compliquer les voies de synthèses. Nous avons donc effectué un retour en arrière afin de clarifier le résultat obtenu avant de viser une application biologique. Par conséquent, le projet traitant de la synthèse de cassette chimiluminescente a eu pour objectif de confirmer la preuve de concept réalisée auparavant en milieu organique. Par ailleurs, étant donné les bons résultats obtenus par l'équipe du Pr. Shabat, nous avons également souhaité nous engager dans le développement de chimiluminophores par le biais d'une extension du système π -conjugué.

Comme il a été mentionné au cours du chapitre 2, les objectifs de synthèse représentés dans le Schéma 54 permettent de justifier l'obtention de l'intermédiaire clé **88** en grande quantité. En effet, à partir du dérivé aldéhyde **96** il a été possible d'obtenir le chimiluminophore au complexe de lanthanide **78**, dont les efforts de synthèse ont été décrits au chapitre 2, mais la synthèse de composés de type **184** *via* une condensation de Knoevenagel devient également envisageable. Concernant la synthèse de cassettes chimiluminescentes de type TBET, une iodation permet d'envisager le couplage de Sonogashira afin d'obtenir un fluorophore attaché à notre plateforme chimiluminescente par une triple liaison. Nous nous sommes permis quelques libertés pour le choix des fluorophores utilisés. Le bodipy a été utilisé pour ses bonnes propriétés photophysiques, et, par ailleurs, des travaux de thèse antérieurs au sein de l'équipe nous ont permis de bénéficier de bodipys prêts à être couplés. Le choix du fluorophore dérivé du « dicyanoisophorone » (que l'on appellera par la suite DCI) a été motivé par ses propriétés de fluorescence dans le proche infrarouge, ainsi que sa facilité d'accès. De plus, ce fluorophore ne semble pas incompatible à une utilisation en milieu biologique. Enfin, l'obtention du chimiluminophore **185** n'a pas été planifiée dans un premier temps. Cependant, toujours dans l'optique de conception de cassette TBET, il nous a tout de même semblé intéressant d'essayer d'obtenir ce composé à partir de l'aldéhyde **96**.

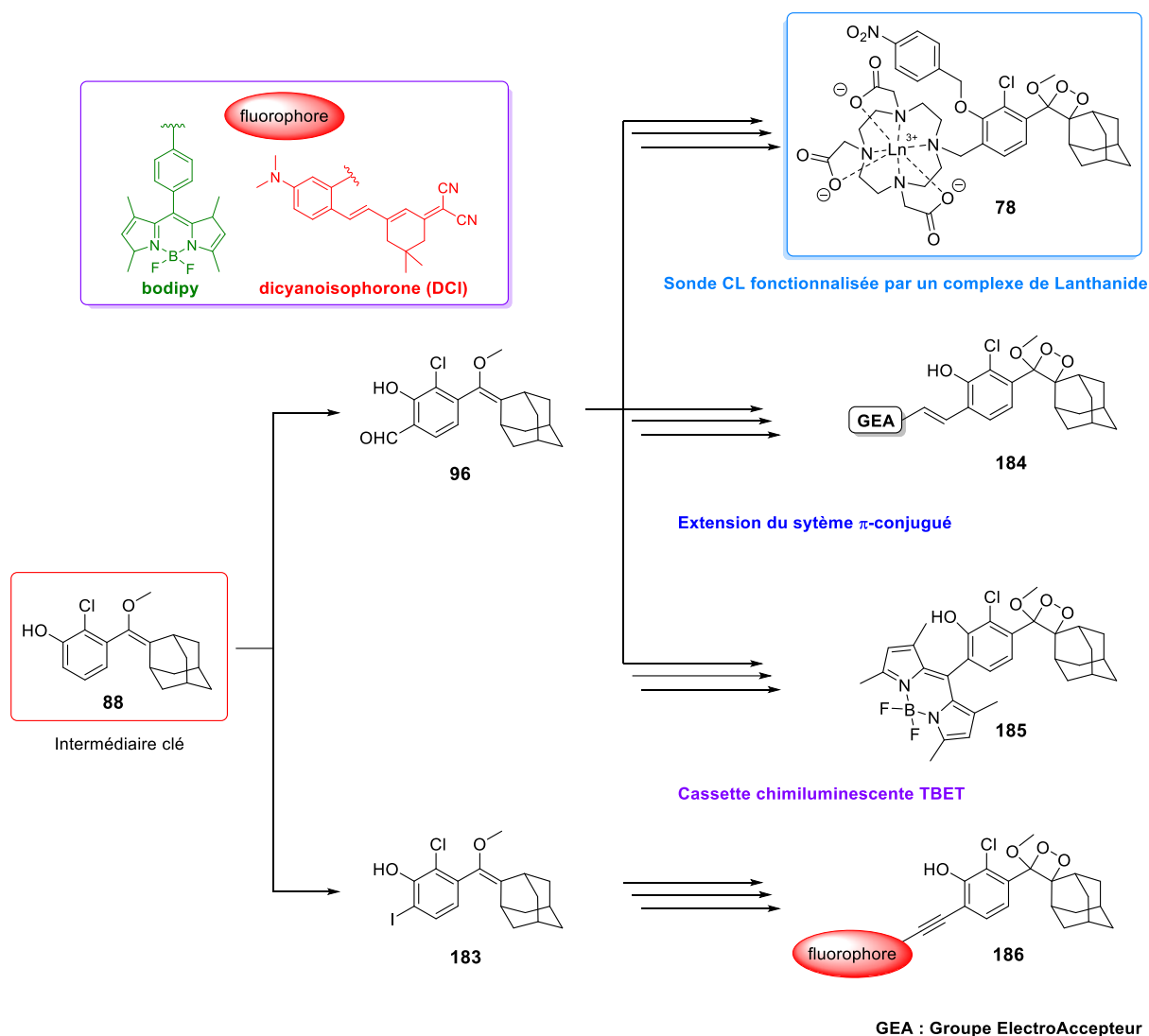


Schéma 54 Présentation des différentes structures visées dans la conception de sondes chimiluminescentes et leur stratégie de synthèse associée.

Dans un premier temps, nous présenterons la synthèse des cassettes chimiluminescentes, suivies de la synthèse de chimiluminophores *via* la stratégie développée par l'équipe du Pr. Shabat. Enfin, nous terminerons cette partie de résultat par la caractérisation des chimiluminophores obtenus.

2. Synthèse de cassettes TBET chimiluminescentes *via* l'insertion d'une triple liaison.

2.1 Présentation des différentes stratégies de synthèse.

Compte tenu des travaux effectués par le Dr. J.A. Richard concernant l'insertion d'une triple liaison sur le cœur phénolique, l'insertion de cette dernière a été le premier défi à relever. La synthèse du composé iodé **183** a été réalisée à partir de travaux rapportés dans la littérature.¹⁸⁸ D'une part, nous avons envisagé une insertion de la triple liaison sur la plateforme chimiluminescente (voie a Schéma 55) afin d'éviter des étapes de synthèse sur les fluorophores et d'obtenir une plateforme prête à être couplée avec tout fluorophore fonctionnalisé par un halogène. D'autre part, la seconde approche consistant à fonctionnaliser le fluorophore par la fonction alcyne a également été envisagée (voie b).

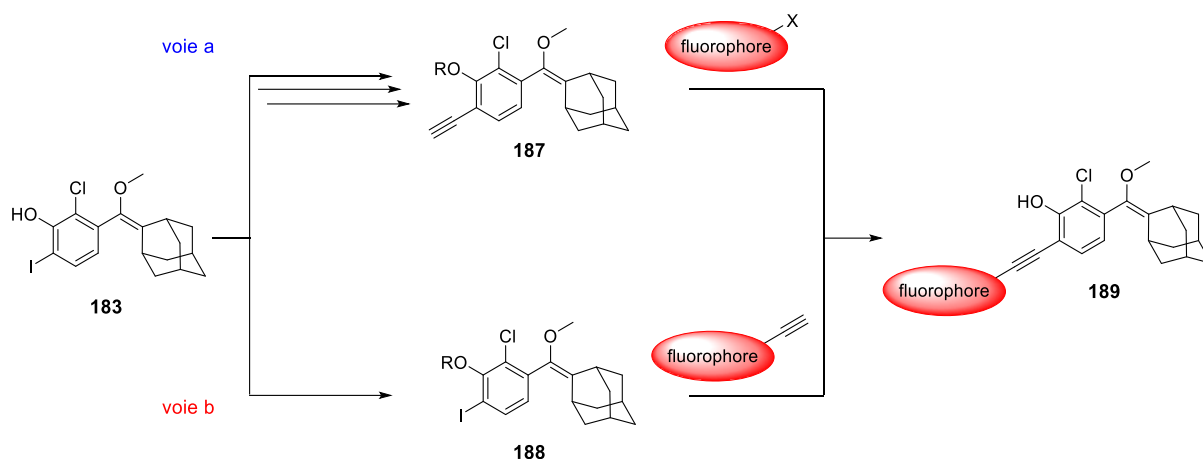


Schéma 55 Stratégies de synthèse envisagées pour l'insertion du fluorophore via un couplage de Sonogashira.

2.2 Première stratégie : introduction de l'acétylène sur la plateforme.

Le composé iodé **183** a été obtenu par la mise en réaction de notre intermédiaire clé **88** avec du N-Iodosuccinimide (NIS) dans le dichlorométhane à 0°C (Schéma 56). Le rendement obtenu de 40 % reste modeste à cause de la formation d'un sous-produit de diiodation difficilement évitable. Afin de limiter la chute du rendement, il est important d'ajouter le NIS par portion à froid. Du fait de la diiodation, l'utilisation d'un seul équivalent de NIS ne permet pas de convertir tout le substrat de départ. Ce dernier peut donc être purifié et réengagé par la suite.

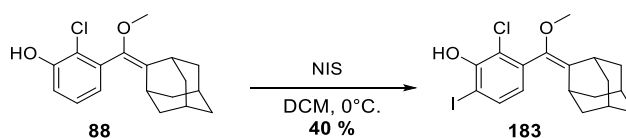


Schéma 56 Synthèse du dérivé iodé en position ortho **183**.

Afin de pouvoir effectuer la réaction de couplage de Sonogashira, le composé iodé **183** a été mis en réaction avec le TBDMS-Cl pour protéger la fonction phénol avec un très bon rendement de 95 %. À ce stade du projet, l'introduction du groupement silylé était considéré comme le groupement déclencheur du mécanisme de décomposition du dioxétane de nos différentes molécules. Le phénol silylé **190** a ensuite été engagé avec du triméthylsilyl acétylène en présence d'une quantité catalytique de palladium(0) tetrakis(triphenylphosphine), d'iodure de cuivre et d'un excès de triéthylamine afin de donner le composé de couplage silylé **191** (Schéma 57).

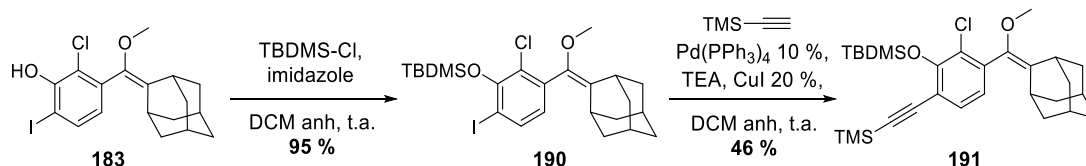


Schéma 57 Insertion de la triple liaison sur la plateforme chimiluminescente.

Nous avons ensuite essayé de déprotéger sélectivement le groupement protecteur de l'alcyne en présence de carbonate de potassium à température ambiante, sans succès (Schéma 58). Malgré les faibles probabilités de réussite d'une déprotection sélective, nous pensions pouvoir tirer parti des conditions de clivage de phénol silylé rapportés dans la littérature, faisant état de l'utilisation d'un

cryptand et d'une température plus élevée (de l'ordre de 55°C).^{221,222} Dans notre cas, la déprotection du phénol a été la première à se produire, seules des traces du produit désiré **194** ont été observées par UPHLC-MS.

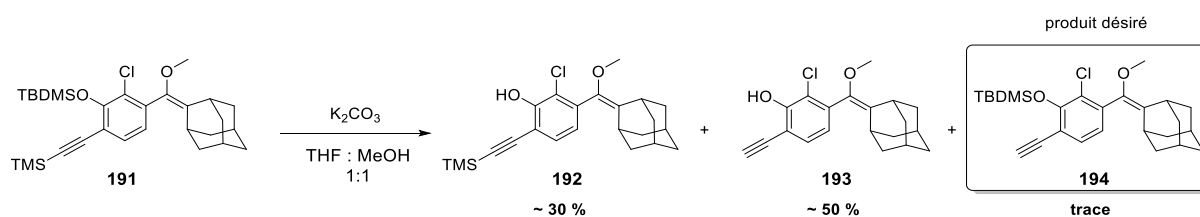


Schéma 58 Tentative de déprotection sélective de l'alcyne vrai.

Nous avons ensuite envisagé d'insérer la triple liaison sans protéger le phénol, afin de pouvoir obtenir l'alcyne vrai sans se poser la question de déprotection par la suite. Cependant, devant le faible rendement de 20 % obtenu durant cette réaction de couplage, nous avons décidé d'abandonner cette stratégie. Par conséquent, nous nous sommes reportés sur la seconde approche visant à fonctionnaliser le fluorophore en amont, pour ensuite effectuer la réaction de couplage.

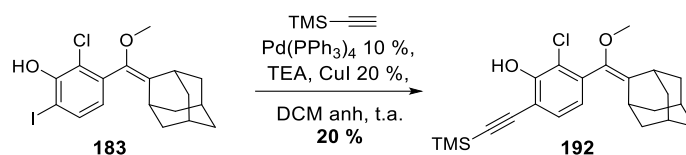


Schéma 59 Tentative d'insertion de la triple liaison sans protection du phénol.

2.3 Deuxième stratégie : introduction de l'acétylène sur le fluorophore.

o Synthèse du Bodipy fonctionnalisé par une triple liaison :

Comme mentionné auparavant, des travaux de thèse antérieurs portant sur les bodipys nous ont permis de commencer notre synthèse avec le bodipy **195** possédant un groupement iodo phényl en position pseudo méso. En suivant des protocoles décrits dans la littérature,^{223,224} le composé **195** a été fonctionnalisé par la triple liaison protégée pour donner le bodipy **196** avec un très bon rendement de 95 %. Puis, en présence d'hydroxyde de potassium le groupement silylé a été clivé pour donner le bodipy **197** avec un rendement de 85 % (Schéma 60).

221 Prakash, C.; Saleh, S.; Blair, I. A. Selective removal of phenolic and alcoholic silyl ethers. *Tetrahedron Lett* **1994**, *35* (41), 7565-7568

222 Wilson, N. S.; Keay, B. A. Mild base mediated desilylation of various phenolic silyl ethers. *Tetrahedron Lett* **1997**, *38* (2), 187-190

223 Hu, B.; Su, Q.; Lu, P.; Wang, Y. BODIPY modified 9-cycloheptatrienyliidene fluorene derivatives: Fluorescent « turn-on » for detecting Cu 2+ with acidity independence. *Sensors Actuators, B Chem* **2012**, *168*, 310-317

224 Haefele, A.; Ulrich, G.; Retailleau, P.; Ziesel, R. Synthesis of multi-branched dipyrromethene dyes with soluble diethynylphenyl links. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49* (23), 3716-3721

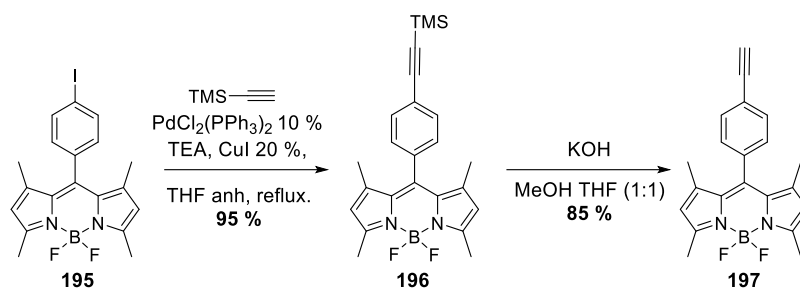


Schéma 60 Synthèse du bodipy alcyne vrai **197**.

o Synthèse du fluorophore DCI fonctionnalisé par une triple liaison :

La synthèse du fluorophore DCI (Schéma 61), a été réalisée à partir de la 3-bromo-N,N-diméthylaniline **198** en débutant par une réaction de formylation de Vilsmeier-Haack. Le dérivé **199** a été obtenu avec un rendement de 50 %. Il a ensuite été engagé dans une première réaction de couplage de Sonogashira afin d'insérer la triple liaison avec un bon rendement de 82 %. L'aldéhyde **200** a été mis en réaction avec le dérivé de l'isophorone **161**, synthétisé au laboratoire par le Dr. M. Boujut, en présence de pipéridine et d'une quantité catalytique d'acide acétique. La réaction de condensation de Knoevenagel permet de synthétiser le composé **201** avec une sélectivité proche de 100 % en faveur de l'isomère E. Néanmoins cette structure s'est révélée photosensible, ce qui a ralenti l'optimisation des modes opératoires de synthèse de ces dérivés. Des précautions doivent être prises pour éviter une irradiation prolongée du composé, afin d'éviter la photo-isomérisation. Enfin le groupement TMS de la triple liaison du composé **201** a été clivé à l'aide de TBAF à 0°C avec un bon rendement de 80 %.

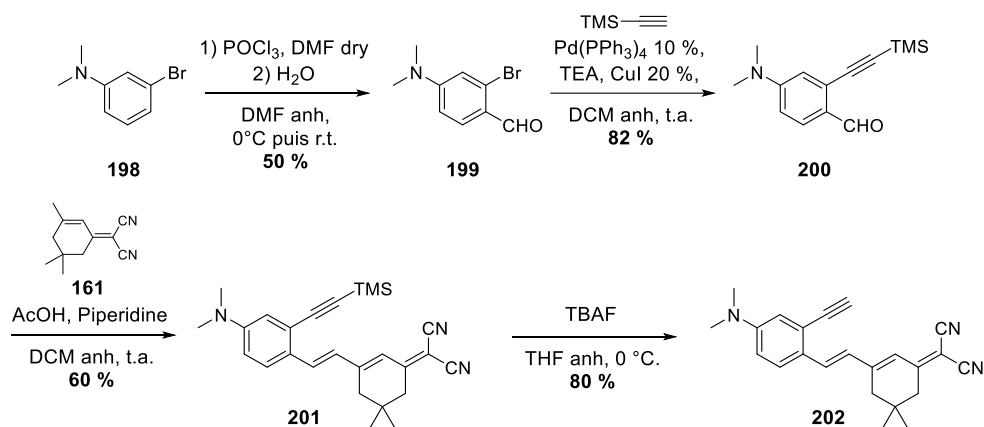
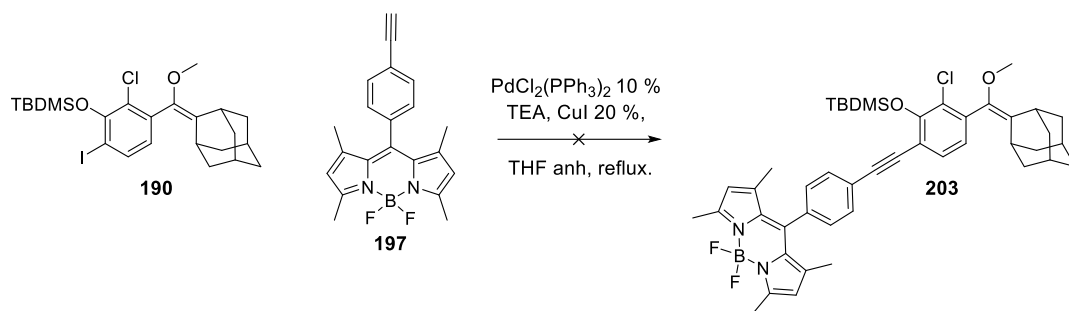


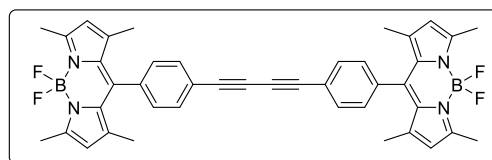
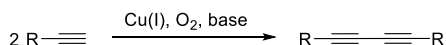
Schéma 61 Synthèse du fluorophore de type dicyanisophorone DCI **202** fonctionnalisé par un alcyne vrai.

2.3.1. Synthèse de la cassette chimiluminescente fonctionnalisée avec un Bodipy.

La plateforme iodée **190** a été mise en réaction avec le bodipy **197** fonctionnalisé par un alcyne vrai en utilisant les conditions classiquement utilisé pour une réaction de couplage de Sonogashira. Malheureusement, le produit d'homocouplage de Glaser s'est retrouvé majoritaire et le composé attendu **203** issu du couplage n'a pas été observé. En effet, la réaction d'homocouplage de Glaser est connue pour être une réaction parasite de la réaction de Sonogashira. Elle peut avoir lieu en présence de cuivre I, de dioxygène et d'une base. Par ailleurs, afin d'éviter l'oxydation du palladium, le milieu réactionnel est soumis à un dégazage en faisant barboter un gaz inerte avant l'ajout du catalyseur et de l'iodure de cuivre (Schéma 62).



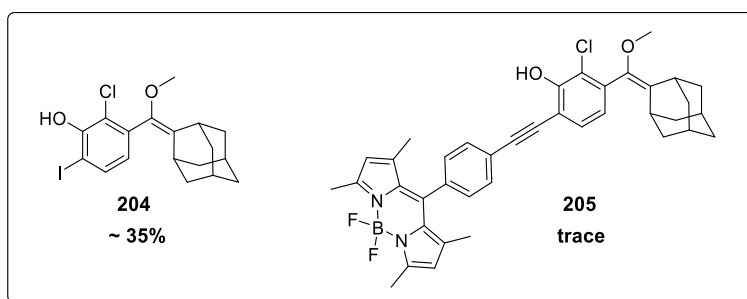
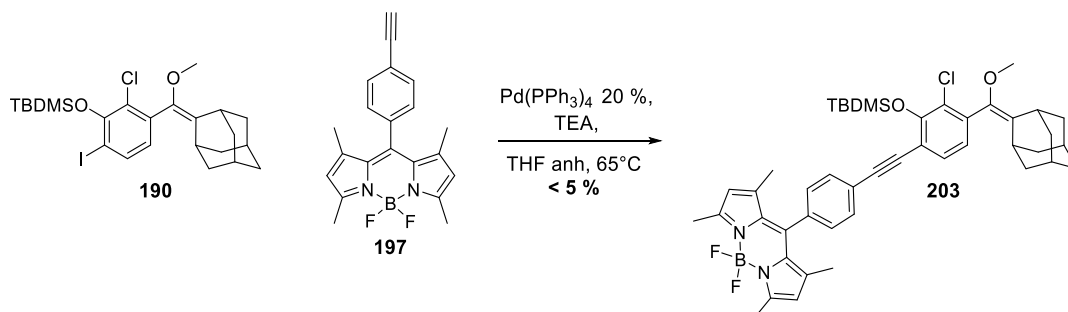
Condition pour une réaction d'homocouplage de Glaser :



sous produit de Glaser majoritaire

Schéma 62 Tentative de couplage entre la plateforme **190** et le bodipy **197**.

Pour remédier au problème qu'implique la réaction de Glaser, nous avons essayé la réaction de Sonogashira en absence de cuivre. En conséquence, nous avons doublé la charge catalytique de palladium ce qui a permis de former des traces du produit **203**. Cependant, les dérivés **204** et **205**, sans leur groupement protecteur TBDMS, ont également été isolés (Schéma 63).



sous produits identifiés

Schéma 63 Tentative de couplage entre la plateforme **190** et le bodipy **197** sans cuivre.

Lors de la tentative d'insertion du TMS-acétylène (Schéma 59), nous avons remarqué l'inefficacité de la réaction de Sonogashira en présence de notre fonction phénol. Afin d'augmenter nos chances de réussite, nous avons décidé de remédier au problème de clivage non souhaité du groupement TBDMS. Il est apparu probable que les conditions de réaction de couplage ont été trop drastiques. En conséquence, le choix du nouveau groupement protecteur s'est porté sur l'utilisation de l'orthonitrobenzyle groupement connu pour être plus stable qu'un éther silylé et qui a la particularité

d'être photoclivable grâce à une irradiation UV.²²⁵ Le phénol **183** a donc été mis en réaction avec le bromure d'orthonitrobenzyle en présence de carbonate de potassium dans le DMF, à 80°C, pour donner le phénol protégé **206** avec un bon rendement de 80 % (Schéma 64).

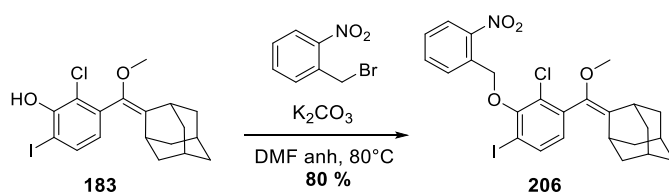


Schéma 64 Protection du composé iodé **183** par un groupement orthonitrobenzyle.

Dans un premier temps, nous avons donc engagé le composé iodé **206** dans des conditions de réaction de couplage de Sonogashira sans cuivre. Après 2 jours de réaction, nous avons pu obtenir le composé de couplage avec un faible rendement de 10 %. Devant ce modeste résultat, nous avons décidé de revenir sur notre protocole en changeant notre angle d'attaque concernant la réaction d'homocouplage. En postulant que la présence d'oxygène pouvait être rédhibitoire, nous avons changé la méthode de dégazage du milieu. En effet, il est couramment admis que la méthode de barbotage d'un gaz inerte pour désoxygéner un solvant n'est pas la plus efficace. La méthode de freeze pump thraw, (*i.e.* congeler, mettre sous vide, dégeler) permet d'abaisser le taux d'oxygène dissout dans un solvant de façon bien plus efficace. Cette méthode nous a permis de remédier au problème d'homocouplage. Ainsi, en appliquant un protocole de freeze pump thraw, le composé **206** mis en réaction avec le bodipy **197** dans des conditions classiques de réaction de Sonogashira a donné lieu à la formation du composé **207** avec un bon rendement de 70 % (Schéma 65).

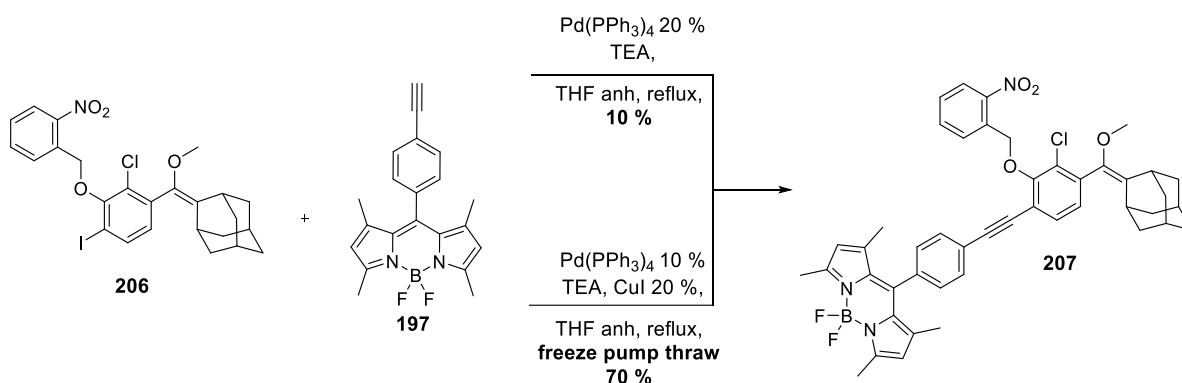


Schéma 65 Optimisation de la réaction de couplage de Sonogashira pour la synthèse du composé **207**.

La molécule **207** issue du couplage entre notre plateforme et le bodipy a été engagée dans la réaction de photoclivage du groupement orthonitrobenzyle. En présence d'un équivalent d'acide formique dans le dichlorométhane et à l'aide d'une lampe UV irradiant à 380 nm, le composé **208** a été obtenu avec un rendement modéré de 50 %. Une part importante de dégradation a été observée pendant cette réaction (Schéma 66).

À la suite de problèmes de dégradation durant l'utilisation du TBAF, le déclenchement des chimiluminophores par ajout d'anions fluorure a été abandonné. Afin de déprotoner le phénol sans

225 Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable protecting groups in chemistry and biology: Reaction mechanisms and efficacy. *Chem Rev* **2013**, *113* (1), 119-191

généraliser de sous-produit, nous nous sommes donc tournés vers un déclenchement *via* l'ajout d'une base. La molécule finale a donc été synthétisée sans groupement protecteur. Ainsi, le dioxétane **209** a été obtenu par photocycloaddition de l'oxygène singulet avec un très bon rendement de 80 % (Schéma 66).

Finalement, le composé **209** a été obtenu en 6 étapes, dont 2 étapes convergentes, à partir de l'intermédiaire clé **183** et du bodipy iodé **195** avec un rendement de 18%.

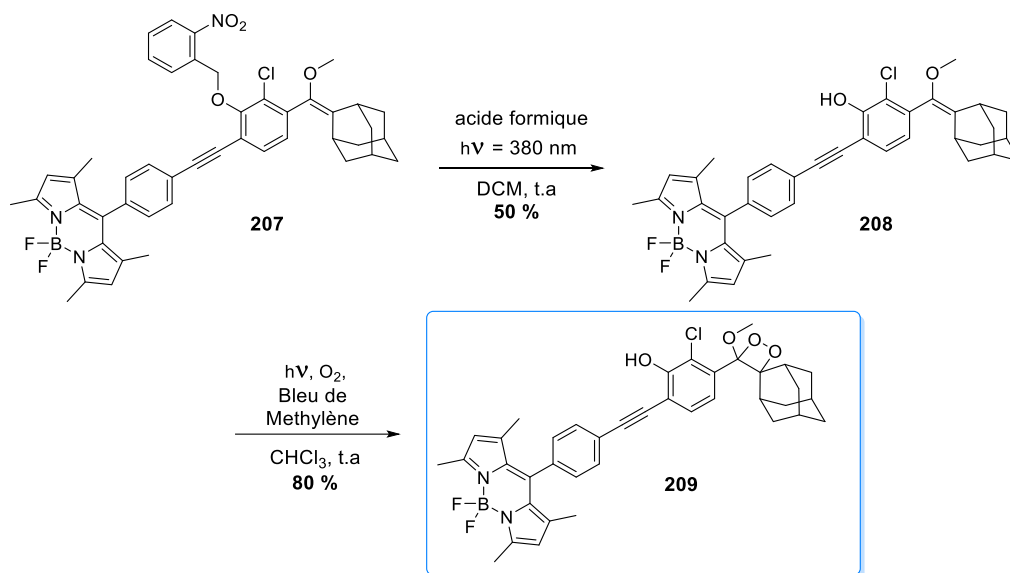


Schéma 66 Synthèse du dioxétane final **209** à partir du dérivé de couplage **207**.

2.3.2. Synthèse de la cassette chimiluminescentes fonctionnalisée avec un DCI.

La synthèse de la cassette chimiluminescente comportant le DCI n'a pas pu bénéficier du groupement protecteur *o*-nitrobenzyle (Schéma 67). En effet, la photosensibilité du fluorophore n'autorisa pas l'utilisation de ce groupement protecteur. C'est donc le phénol protégé par le groupement TBDMS **190** que nous avons engagé avec le DCI **202** fonctionnalisé par un alcyne vrai. Dans le cas présent, la réaction de couplage fonctionna en absence de cuivre. Néanmoins, les problèmes de déprotection du phénol de départ sont toujours présents. Cela expliquerait en partie le modeste rendement de 45 % obtenu. Par la suite, le composé issu du couplage **210** a été déprotégé à l'aide de TBAF à 0°C pour donner **211** avec un bon rendement de 80 %. Enfin, la réaction de photocycloaddition [2+2] a été mise en œuvre dans les conditions classiques avec un filtre passe haut à 600 nm pour minimiser au maximum l'absorption du chimiluminophore. Cependant, le temps d'irradiation conséquent (plusieurs heures à plusieurs jours) ne permit pas d'obtenir le dioxétane **212** sans mélange d'isomères (mélange 80 : 20 E : Z déterminé par UHPLC-MS) rendant la caractérisation finale du composé plus complexe.

Le choix de ne pas utiliser le groupement TBDMS comme groupement déclencheur a été motivé par les mêmes raisons que le chimiluminophore précédent. D'ailleurs, la déprotection du groupement TBDMS, a été effectué à 0°C afin de limiter des réactions parasite provoquant une dégradation de notre molécule (probablement au niveau du DCI).

In fine, le composé **212** été obtenu en 8 étapes au totale, dont quatre étapes convergent, avec un rendement global de 3 % à partir de l'intermédiaire clé **183** et la molécule **198**

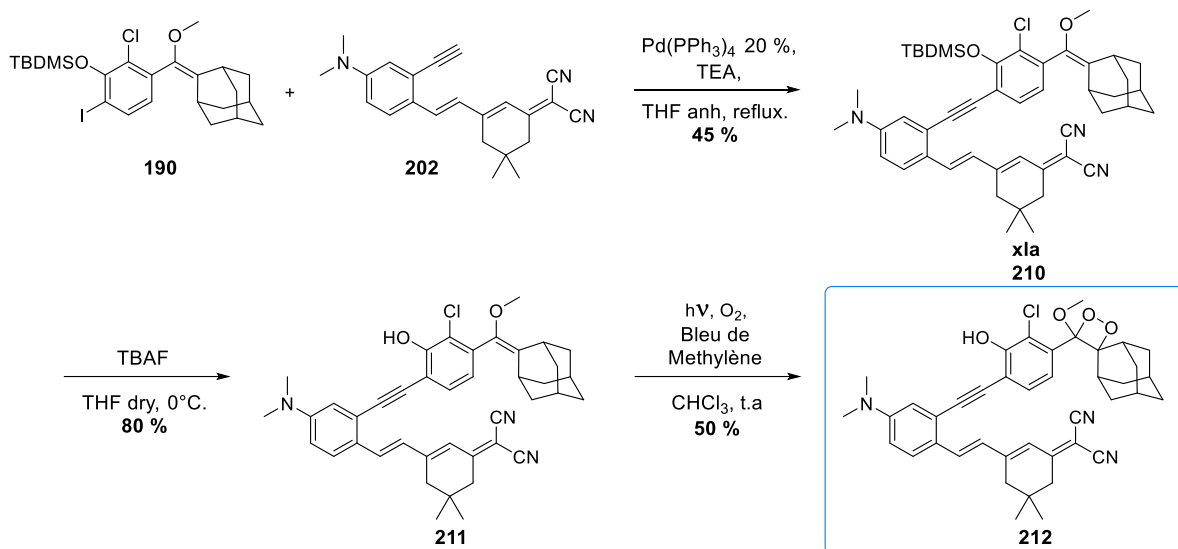


Schéma 67 Synthèse du chimiluminophore **212**.

3. Condensation d'un Bodipy en position ortho du phénol.

L'obtention d'un bodipy en position ortho du phénol de la plateforme est rendu possible par la possibilité d'introduire une fonction aldéhyde en cette position (*cf.* chapitre 2). Pour former le bodipy, nous nous sommes appuyés sur la séquence réactionnelle impliquant une condensation de pyrrole sur l'aldéhyde afin de former le dipyrrométhane suivi par une oxydation et d'une complexation du bore.

Tout d'abord, nous avons choisi de protéger le phénol par le groupement TBDMS, ce qui a été effectué avec un bon rendement de 85 % (Schéma 68). Par la suite, l'aldéhyde **213** a été mis en réaction avec le 2,4-diméthylpyrrole en présence d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique (TFA) afin d'obtenir avec un rendement de 80% le dipyrrométhane **214**. Puis, ce dernier a été engagé dans une séquence de deux réactions one pot pour obtenir le bodipy. Dans un premier temps, le composé a été oxydé en dipyrrométhène à l'aide du 2,3-Dicyano-5,6-Dichloro-1,4-benzoquinone (DDQ). Dans un second temps, la complexation du bore a été effectuée à l'aide de de diéthyle étherate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) en présence d'une base pour déprotoner le dipyrrométhène. Malheureusement, à l'issue de cette séquence réactionnelle un mélange complexe est obtenu. Le bodipy **215** n'a été formé qu'à l'état de trace, et son dérivé déprotégé a également été identifié.

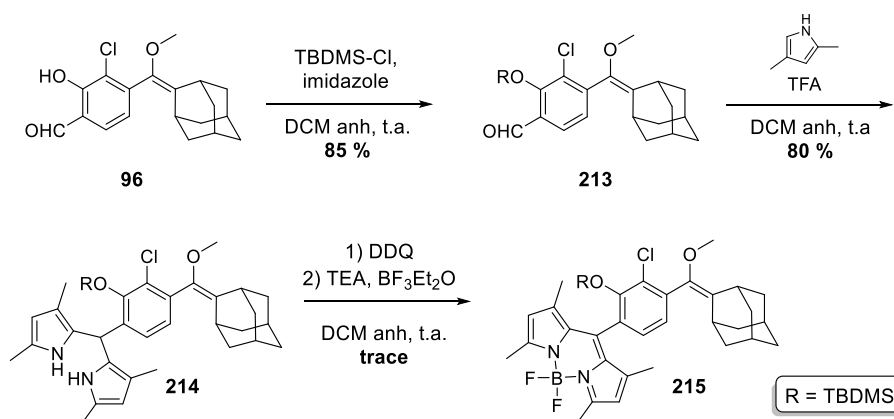


Schéma 68 Tentative de synthèse du bodipy sur la plateforme **215**.

À l'image du chimiluminophore **209** comportant un bodipy, nous avons choisi de remplacer le groupement TBDMS par le groupement *o*-nitrobenzyle. L'aldéhyde protégé **216** a ensuite été engagé dans la réaction de condensation afin de former le dipyrrométhane **217** (Schéma 69).

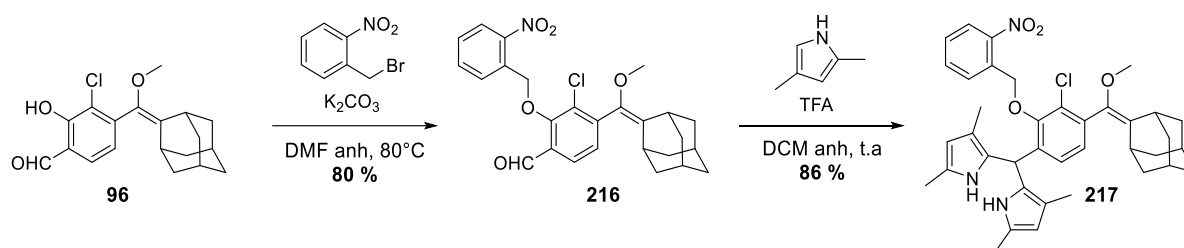


Schéma 69 Synthèse du dipyrrométhane **217**.

Tout d'abord, l'application au dipyrrométhane **217** des conditions de réaction utilisées précédemment (Schéma 68) ont donné à peu près le même résultat. Une optimisation des conditions a donc été entreprise. Dans un premier temps, nous avons augmenté de façon significative le nombre d'équivalent de base et de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ utilisé (passage respectivement de 8 à 28 et de 4 à 20 équivalents). Ces modifications ont permis d'obtenir un rendement de réaction d'environ 15 %. Dans un second temps, nous avons remplacé le dichlorométhane, par du toluène afin de pouvoir chauffer le milieu réactionnel lors de la phase de complexation, ce qui a permis d'augmenter le rendement à une trentaine de pour-cent (Schéma 70). Bien que modeste, ce résultat est correct pour ce type de séquence réactionnelle. Les formations de bodipy à partir d'un aldéhyde ne sont pas connues pour donner des rendements très élevés. L'utilisation du DDQ, composé très oxydant et très réactif, est probablement responsable d'un nombre non négligeable de réactions parasites.

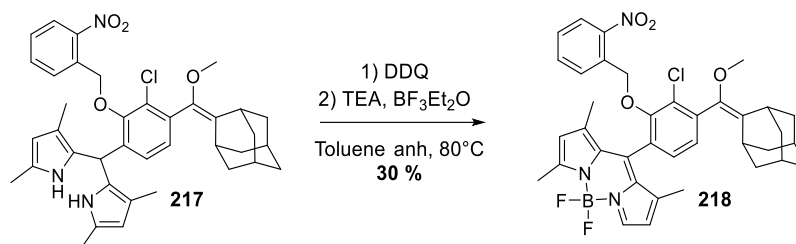


Schéma 70 Synthèse du bodipy fusionné **218**.

Enfin, la molécule **218** a pu être déprotégée avec un rendement modeste de 40 %. Une fois le phénol déprotégé, il a été engagé dans la réaction de photocycloaddition du dioxygène singulet. De même que pour le dioxétane **209**, la conversion du produit de départ a été totale sans production significative de sous-produit. En revanche, ce dioxétane semble particulièrement sensible à la silice en comparaison au dioxétane **209**, ceci expliquant le modeste rendement de 45 % obtenu après purification (Schéma 71).

Finalement, le chimiluminophore **185** a été obtenu en 6 étapes à partir de la plateforme **96** et un rendement de 4 %.

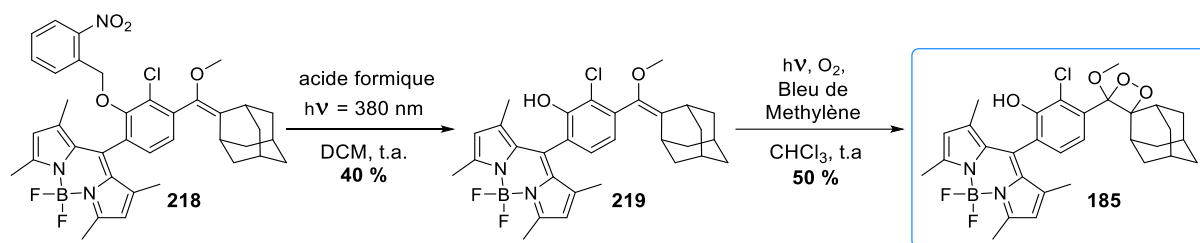


Schéma 71 Synthèse du chimiluminophore **185**.

4. Synthèse de chimiluminophores avec une extension du système π -conjugué.

4.1 Présentation de la stratégie de synthèse.

Ce projet a été réalisé au cours du stage de master 2 de l'étudiante Cassandra Catrouillet, que j'ai co-encadré avec le Dr. A. Haefelé. L'objectif de ce projet était de tirer parti du dérivé aldéhyde **96** afin de créer un système donneur-accepteur grâce à la réaction de condensation de Knoevenagel. Les deux accepteurs utilisés ont été synthétisés durant les travaux de thèse du Dr M. Boujut (Schéma 72).²²⁶

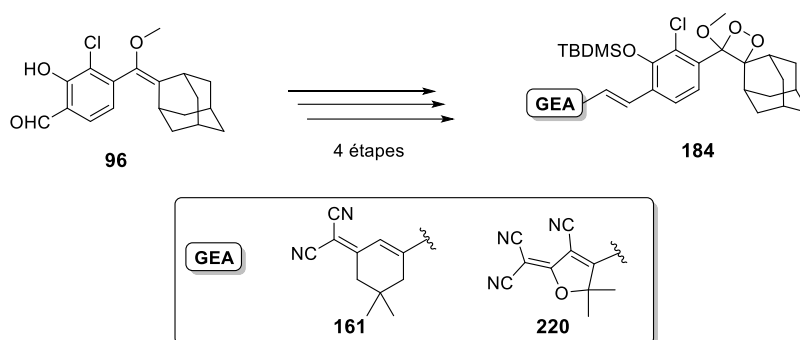


Schéma 72 Présentation de la stratégie de synthèse.

Dans un premier temps, la réaction de condensation de Knoevenagel a été mise en place avec des conditions rapportés dans la littérature.^{216,218} Ainsi, l'aldéhyde **213** a été mis en réaction avec l'isophorone **161** dans l'acétonitrile à reflux, en présence de 1,1 équivalent de pipéridine. Ces conditions ont conduit à la formation d'un grand nombre de sous-produits, dont plusieurs issus de la déprotection du groupement silylé. Nous avons également pu identifier les composés **222** et **223** comportant une fonction amide (Schéma 73).

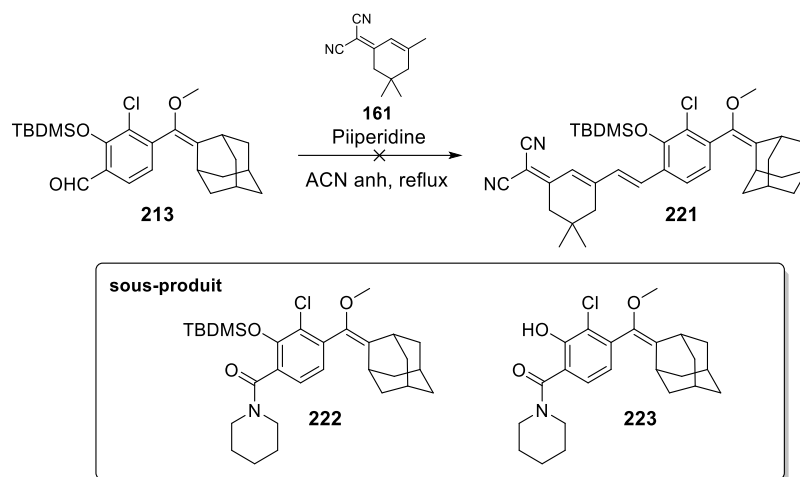


Schéma 73 Tentative de synthèse du composé **221**.

Le remplacement de la piperidine par de la triéthylamine n'a conduit qu'à des résultats mitigés. Le rendement de formation observé du composé **221** est resté très faible (de l'ordre de quelques pour-cent). L'ajout d'une quantité catalytique de piperidine a permis de débloquent la situation et le composé **221** a été obtenu avec un rendement de 45 %. Afin de remédier au problème de clivage du TBDMS, nous avons testé la réaction de Knoevenagel en présence de la fonction phénol, sans succès. En appliquant ces conditions optimisées, le composé **224** a été obtenu avec un rendement modeste de 28 % (Schéma 74).

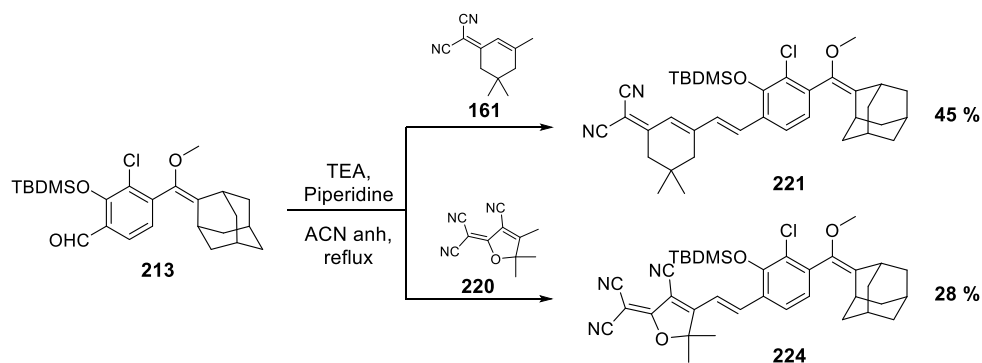


Schéma 74 Obtention des composés **221** et **224** via une condensation de Knoevenagel.

Enfin, le dioxétane final **225** a pu être synthétisé avec un très modeste rendement de 25 %. La présence du système polyméthine a certainement rendu la molécule sensible à un clivage oxydant provoqué par la cycloaddition de l'oxygène singulet, de plus, le dioxétane **225** s'est révélé fragile en présence de silice. La formation du dioxétane sur la molécule **224** n'a pas été mis en œuvre par manque de temps.

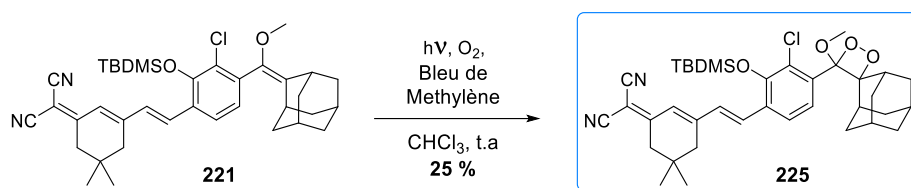


Schéma 75 Synthèse du chimiluminophore **225**.

Au global le chimiluminophore **225** a été obtenu avec un rendement de 9 % à partir de l'aldéhyde **96**.

5. Caractérisations photophysiques.

5.1 Déclenchements chimiluminescents.

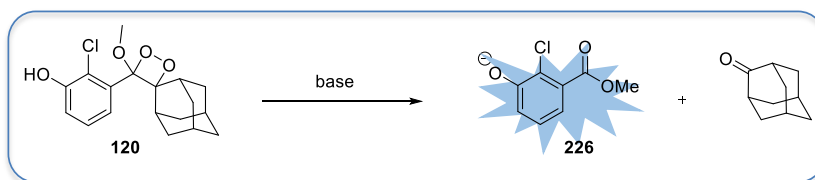
5.1.1. Optimisation des conditions de déclenchement sur le modèle de Schaap chloré.

Afin de maîtriser correctement l'expérience de déclenchement chimiluminescent, nous avons utilisé la sonde de Schaap chlorée en ortho du phénol **120** comme modèle. Ainsi, différentes conditions de déclenchement ont été testées et analysées au spectrophotomètre et suivi par UHPLC-MS afin de confirmer le bon déroulement de la réaction. Le tableau représenté dans la Figure 58 résume les différentes données acquises qui ont guidées l'optimisation de nos conditions de déclenchement. Pour un suivi par UHPLC efficace, nous avons volontairement utilisé une concentration plutôt élevée de chimiluminophore (250 μM).

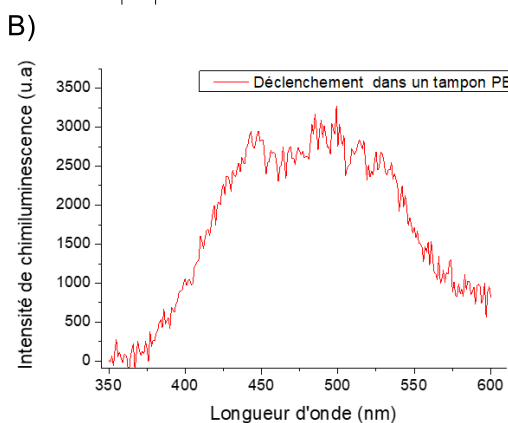
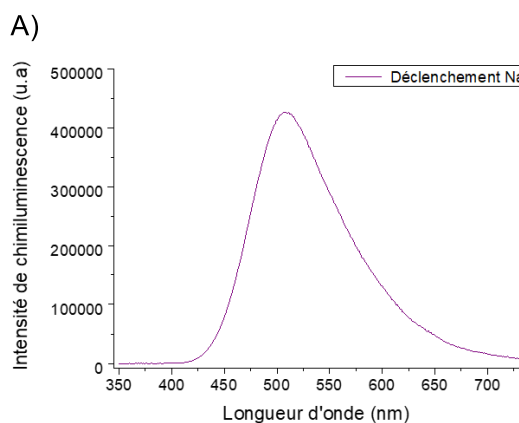
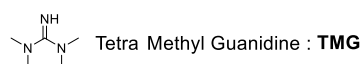
Nous avons été étonnés dans un premier temps de l'absence de déclenchement en milieu organique lors de l'ajout de triéthylamine. Cette observation est cependant conforme à l'inversion des pKa entre un phénol et une amine tertiaire dans le DMSO (pKa phénol_{(DMSO)} \approx 18, pKa TEA_{(DMSO)} \approx 9).²²⁷ Dans l'optique d'effectuer un déclenchement avec une base organique, la tétraméthylguanidine a été utilisée comme base aminée plus forte que la triéthylamine. Malheureusement, l'utilisation de cette dernière provoque la formation d'un composé de dégradation que nous n'avons pas pu identifier (Figure 58). L'utilisation d'une solution de soude diluée nous a permis d'observer la chimiluminescence caractéristique de la plateforme de Schaap à 470 nm (Figure 58A). De plus, le bon déroulement du déclenchement a été confirmé par un suivi UHPLC-MS (Figure 58). Nous avons également essayé de déclencher le chimiluminophore **120** dans un tampon PBS à 0.01M. Le signal de chimiluminescence obtenu (Figure 58B) est faible et mal défini. Cependant, le suivi UHPLC de la réaction nous a également montré une décomposition du dioxétane sans sous-produits. La faiblesse du signal peut être attribué à la faible efficacité de chimiluminescence de **120** dans l'eau ($\Phi_{\text{CL}} = 3,2 \times 10^{-5}$).¹⁸⁸ Par ailleurs, la forte concentration combinée à la très faible hydrosolubilité de cette molécule a certainement provoqué la formation d'agrégat non luminescent.}}

Ainsi, à l'issue de cette optimisation, le choix d'un déclenchement *via* une solution diluée de soude nous a semblé le plus approprié pour étudier nos chimiluminophores.

227 Heller, S. T.; Silverstein, T. P. pKa values in the undergraduate curriculum: introducing pK a values measured in DMSO to illustrate solvent effects. *ChemTexts* **2020**, *6* (2)



| Concentration | Solvant | Déclencheur | Signal | Observation |
|-------------------|--|------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| 250 μM | Tampon PBS 0,01 M pH = 7,4 5 % DMSO | - | OK | R.A.S |
| 250 μM | DMSO | 100 μL NaOH 0,5 M | OK | R.A.S |
| 250 μM | DMSO | Excès TMG | OK | Présence de composés de dégradation |
| 250 μM | DMSO | Excès TEA | Pas de signal | Présence du dioxétane |



suivi UHPLC du déclenchement à l'aide d'une solution diluée de NaOH

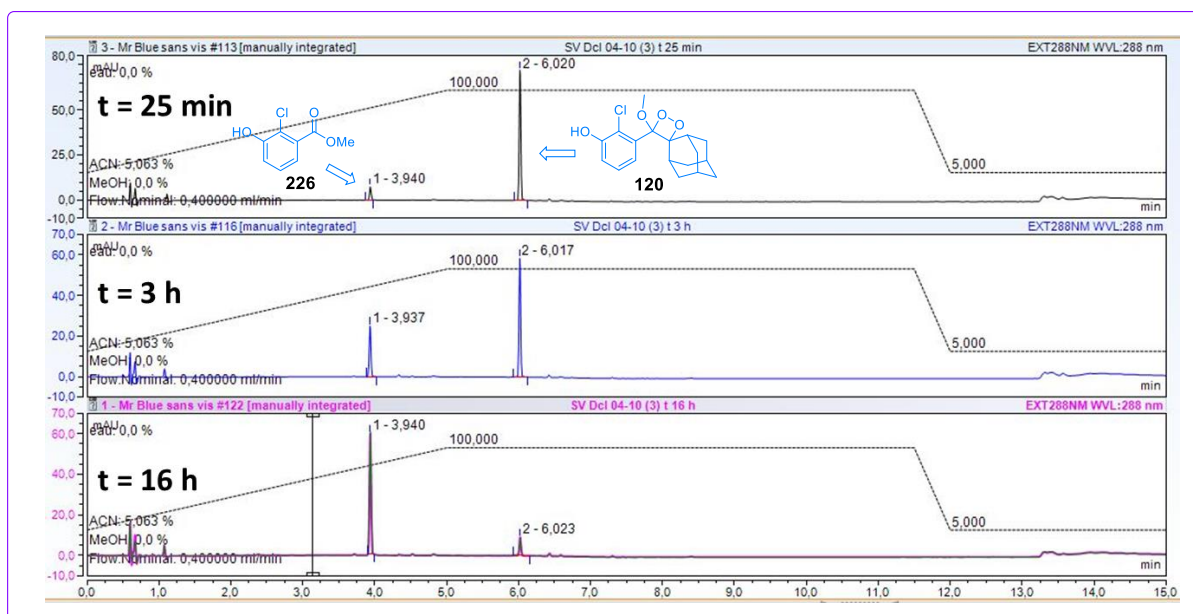


Figure 58 Optimisation des conditions de déclenchements.

5.1.2. Déclenchement des chimiluminophores synthétisés.

○ Déclenchement à l'aide de NaOH des chimiluminophores 209 et 212 :

En premier lieu, le déclenchement des chimiluminophores obtenus a donc été effectué par ajout d'une solution de NaOH à 0,5 M, dans le DMSO. Dans le cas du bodipy **209**, nous avons pu observer un spectre d'émission de chimiluminescence centré à 500 nm combiné à un profil cinétique de chimiluminescence de type glow. A ce stade, l'absence d'une émission centrée aux alentours de 520 nm qui serait caractéristique du bodipy a éveillé nos soupçons (Figure 59A). Cela nous a permis de mettre en lumière la dégradation de la molécule déclenchée en effectuant les mesures d'absorption UV-visible à la suite du déclenchement. Ces spectres nous ont montré la disparition de la bande d'absorption caractéristique au bodipy à la suite du déclenchement (*i.e.* la bande centrée à 490 nm) (Figure 59C).

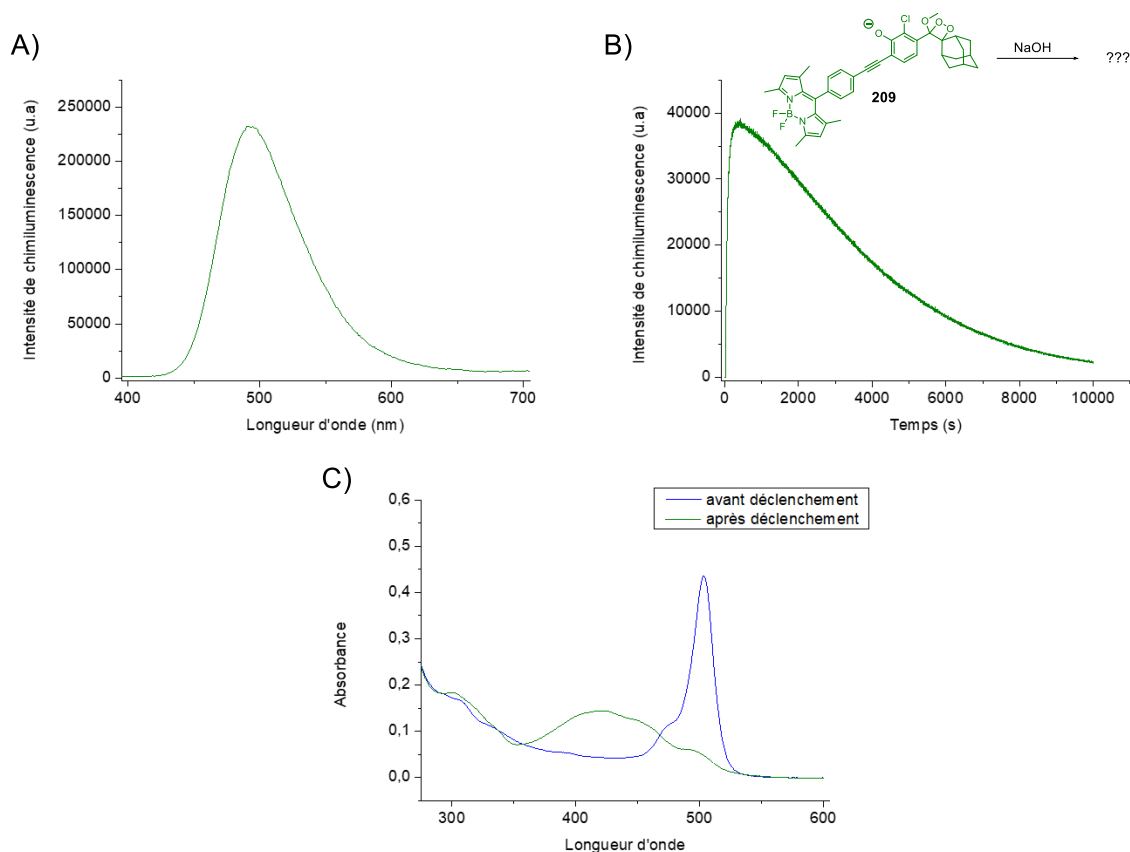


Figure 59 Spectre de chimiluminescence du dioxétane **209** [7,7 μ M dans le DMSO], après un ajout de 200 μ L d'une solution de NaOH à 0,5 M A) Spectre de chimiluminescence B) Cinétique de chimiluminescence à 470 nm.

Le chimiluminophore **212** a également été déclenché dans les mêmes conditions. Étonnement, une chimiluminescence centrée à 506 nm, similaire à celle de **209**, a été observée. Dans ce cas présent, le résultat du déclenchement a été analysé par UHPLC-MS. Le chromatogramme obtenu (Figure 60B) a permis de répondre sans ambiguïté quant à la non-viabilité de ce mode de déclenchement, de nombreux sous-produits ayant été obtenus. Le produit d'ouverture du dioxétane correspondant à l'ester de méthyle, ou le dioxétane lui-même, n'ont pas été identifiés. Par ailleurs, une analyse rapide des masses obtenues ne permet pas d'identifier de sous-produit.

L'utilisation d'une solution de soude 0,5 M s'est donc révélée incompatible avec la structure des chimiluminophores.

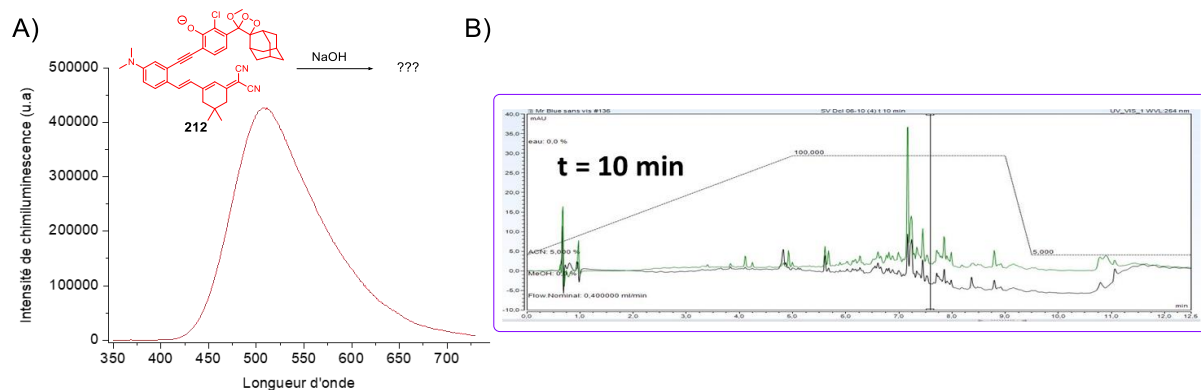


Figure 60 Déclenchement du chimiluminophore **212** [250 μ M dans le DMSO) après un ajout de 200 μ L d'une solution de NaOH à 0,5 M.

o Déclenchement à l'aide de tampon PBS basique des chimiluminophores **185**, **209** et **212** :

La recherche d'un mode de déclenchement viable des chimiluminophores s'est révélée moins évidente que prévue. En effet, le déclenchement en milieu aqueux des différents chimiluminophores a été essayé sans succès. Les problèmes de solubilité évoqués auparavant n'ont pas permis de rationaliser les résultats obtenus. Néanmoins, cela ouvra la voie à l'utilisation du tampon PBS comme déclencheur dans le DMSO. Ainsi, l'ajout à une solution de chimiluminophore dans le DMSO (2 mL à 5-68 μ M), de 100 μ L de tampon PBS (0.01 M, pH 11,6), basifié *via* l'ajout de NaOH, a permis d'effectuer le déclenchement des différents chimiluminophores. Malheureusement, l'intensité des différents spectres de chimiluminescence enregistrés est très faible voire quasi-nulle (Figure 61). Le spectre de chimiluminescence de la molécule **209** semble montrer deux bandes d'émissions ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} \approx 460$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} \approx 520$ nm) qui pourraient correspondre à l'émission du phénolate et du bodipy, même s'il est difficile de statuer (Figure 61B). De même, le chimiluminophore **212** possède également deux bandes d'émissions ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} \approx 500$ nm, $\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} \approx 700$ nm) que l'on peut vraisemblablement attribuer respectivement à l'émission de la plateforme phénolique et du fluorophore DCI (Figure 61C). Quant au chimiluminophore **185**, il semble que le profil soit identique aux deux autres cassettes, néanmoins la faiblesse du signal ne permet pas de conclure sans ambiguïté (Figure 61A).

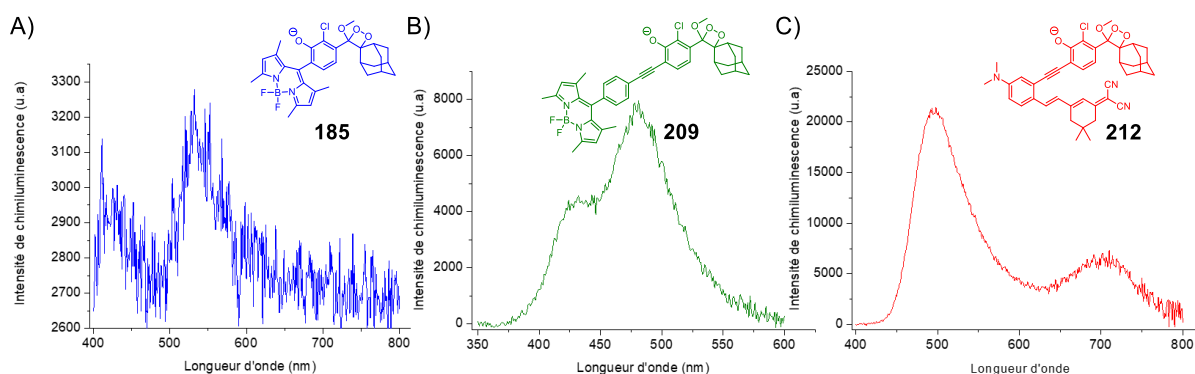


Figure 61 Spectres de chimiluminescence dans le DMSO avec une addition de 100 μ L de tampon PBS 0,01 M à pH 11,6 avec une concentration de A) 5 μ M pour **185** B) 49 μ M pour **209** C) et 68 μ M pour **212**. Ces spectres n'ont pas vocation à être comparés entre eux de façon quantitative.

Le profil cinétique des différents chimiluminophores a été enregistré dans les mêmes conditions décrites précédemment. Dans les trois cas, nous pouvons observer le même comportement. Étonnement, il semble y avoir deux régimes cinétiques, le premier de type flash tout de suite après l'ajout du déclencheur (ici, le tampon PBS), le second de type glow. Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer la présence simultanée de ces deux régimes cinétiques.

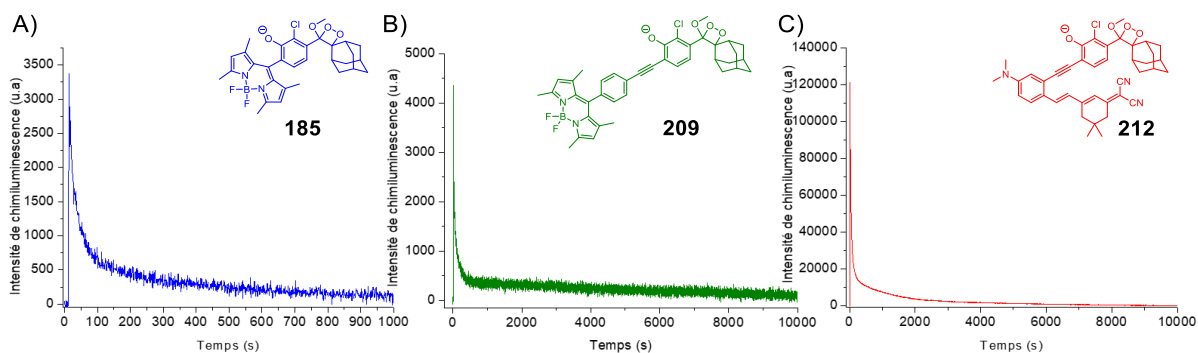


Figure 62 Profil cinétique de chimiluminescence enregistré à toutes les longueurs d'onde dans le DMSO avec une addition de 100 μ L de tampon PBS 0.01 M à pH 11,6 avec une concentration de A) 35 μ M B) 86 μ M C) et 178 μ M.

Afin de valider les résultats obtenus, chacun des déclenchements a été analysé par UHPLC-MS. À la vue des différents chromatogrammes (Figure 63), les conditions appliquées ont permis d'obtenir une décomposition du dioxétane ne faisant apparaître qu'un seul produit de réaction. L'observation, en spectrométrie de masse, d'un pic moléculaire correspondant à chacun des ester de méthyle attendus à l'issue du mécanisme CIEEL, nous a permis de confirmer la structure des espèces émissives **227**, **228** et **229**.

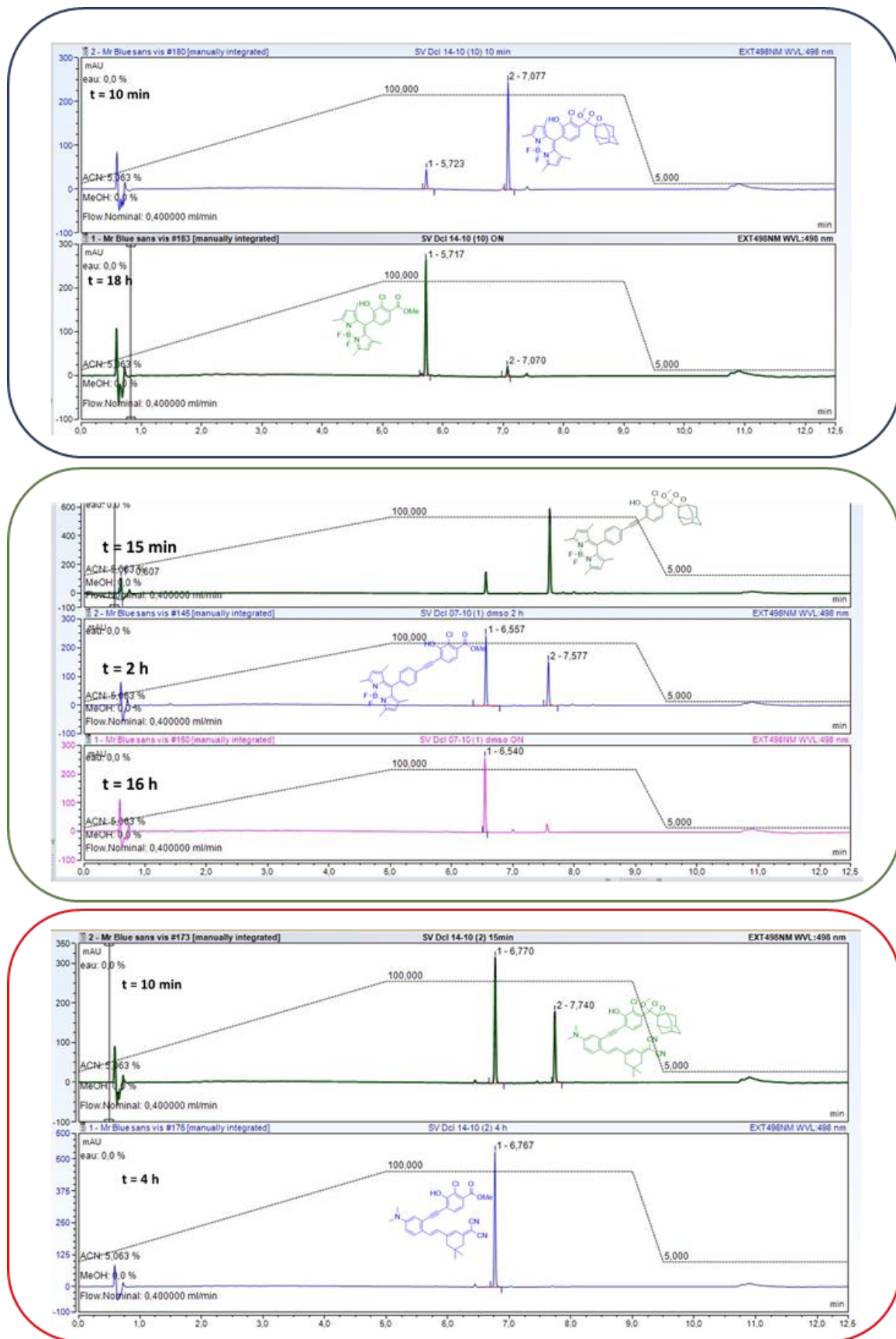


Figure 63 Chromatogrammes UHPLC obtenus lors du déclenchement des chimiluminophores **209** et **212**. La structure du composé obtenu a été confirmée par spectrométrie de masse pour les différents déclenchements (Système B).

5.2 Photoluminescence et Chimiluminescence, corrélation entre le chimiluminophore et son espèce émissives.

Dans une optique de compréhension du comportement des chimiluminophores, leurs espèces émissives respectives ont été isolées afin d'effectuer les mesures de leurs propriétés photoluminescentes. Ces molécules ont été obtenues en déclenchant le mécanisme CIEEL sur une quantité de matière suffisante (de 5 à 10 mg) à la mise en œuvre d'une purification par chromatographie sur silice (Schéma 76). Les molécules **227**, **228** et **229** ont donc été obtenues en petite quantité.

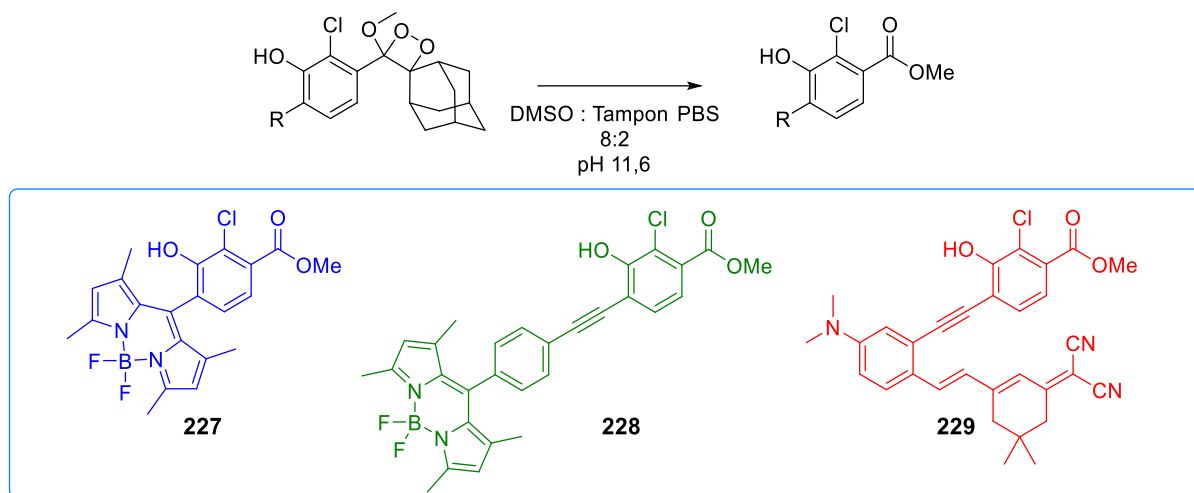


Schéma 76 Synthèse des espèces émissives des chimiluminophores.

Les caractéristiques photophysiques des espèces émissives des différents chimiluminophores sous leur formes phénol et phénolate ont été mesurées dans le DMSO (Figure 64). Sans ajout de base donc sous forme phénol, les molécules **227-OH** et **228-OH** disposent d'une bande d'absorption et d'émission caractéristiques du bodipy, (respectivement $\lambda_{\max}^{\text{abs}} \approx 507$ nm, $\lambda_{\max}^{\text{abs}} \approx 503$ nm et $\lambda_{\max}^{\text{PL}} \approx 523$ nm, $\lambda_{\max}^{\text{PL}} \approx 519$ nm) (Figure 64A et B). Le bodipy **227** possède un rendement quantique relatif bien plus élevé que le bodipy **228-OH** ($\Phi_{\text{PL}} \approx 1$ contre $\Phi_{\text{PL}} \approx 0.67$). Le fluorophore DCI accroché à la plateforme chimiluminescente **229** possède une émission de fluorescence centrée à 700 nm. Il est intéressant de noter que celle-ci est décalée de 40 nm vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport aux propriétés intrinsèques du fluorophore DCI correspondant.²²⁸ De plus, il possède également un rendement quantique plus élevé que son analogue isolé ne comportant pas le phénol greffé ($\Phi_{\text{PL}} \approx 0,29$ contre $\Phi_{\text{PL}} \approx 0.10$ rapporté dans la littérature).²²⁸ Par ailleurs, les mesures photophysiques ont permis de mettre en évidence l'influence du couple phénol/phénolate sur la fluorescence. Ces mesures ont été effectuées *via* l'ajout de 100 μL de tampon PBS (0,01 M pH 11,6). Lors de cet ajout une bande d'absorption d'UV-visible, caractéristique de la bande d'absorption d'un phénolate,²²⁹ a été observée aux alentours de 350 – 425 nm selon les composés. Les spectres de photoluminescence des trois composés ont tous révélé une extinction de fluorescence plus ou moins forte. Dans le cas du bodipy **227-O⁻**, l'inhibition de fluorescence est quasi totale, tandis qu'une émission résiduelle est tout de même observée pour les composés **228-O⁻** et **229-O⁻**.

228 Gao, Z.; Zhang, X.; Chen, Y. Red fluorescence thin film based on a strong push-pull dicyanoisophorone system. *Dye Pigment* **2015**, *113*, 257-262

229 Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Badertscher, M. *Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data*; 2009

En conclusion, les mesures spectroscopiques des molécules **227** et **228** ont permis de confirmer le maintien des propriétés intrinsèque du bodipy ou du DCI en présence du phénol. Cependant, elles mettent également en évidence un phénomène d’extinction de fluorescence en présence du phénolate. Le phénolate étant un groupement fortement électrodonneur, un phénomène de transfert d’électron à l’état excité du phénolate vers le fluorophore pourrait être à l’origine de cette extinction. Cependant, pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser d’autres mesures photophysiques.

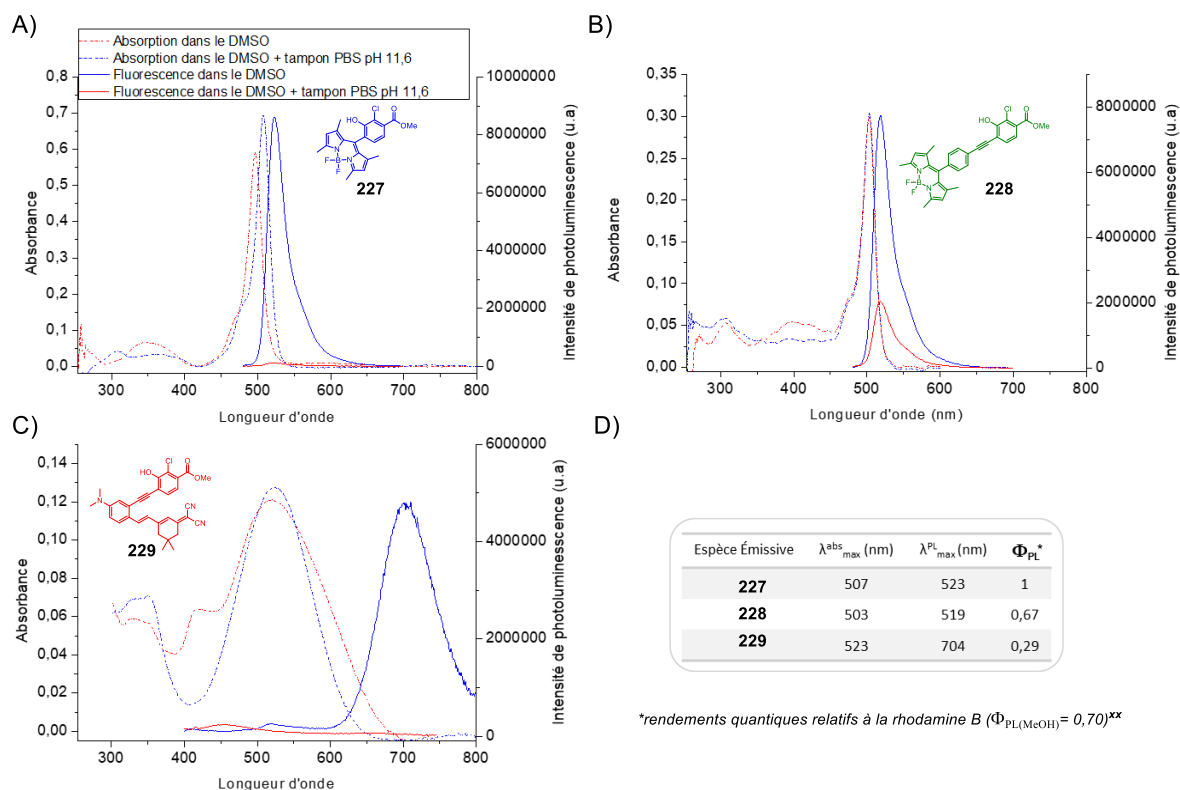


Figure 64 Spectres d’absorption et de photoluminescence des espèces émissives (DMSO, t.a.) A) λ_{exc} : 460 nm B) λ_{exc} : 460 nm C) λ_{exc} : 520 nm. D) Résumé des caractéristiques photophysiques.²³⁰

Afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de chimiluminescence par le biais de la photoluminescence, nous avons souhaité procéder à des mesures en ne cherchant à exciter que la plateforme chimiluminescente. Ces spectres ont été superposés aux spectres de chimiluminescence obtenus. Dans le cas du chimiluminophore **212** (Figure 65B), les profils semblent les mêmes. On observe bien deux bandes d’émission dont les maxima se superposent parfaitement avec le spectre de chimiluminescence. Cette superposition confirme que c’est bien l’espèce sous forme phénolate qui est émissive lors du déclenchement de chimiluminescence. Concernant le chimiluminophore **209**, les deux spectres de chimi- et photoluminescence se superposent également mais avec deux légères différences : 1) le rapport d’intensité entre les deux bandes d’émissions varie en faveur de l’émission du bodipy dans le cas de la photoluminescence (la luminescence du bodipy semble plus intense) et 2) un léger décalage du maximum d’émission de la bande caractéristique du bodipy est observé ($\lambda_{\text{max}}^{\text{CL}} = 531$ nm et $\lambda_{\text{max}}^{\text{PL}} = 519$ nm). Ces deux différences peuvent être rationalisées par des biais relatifs aux expériences. Tout d’abord, il n’est pas possible de garantir une excitation photonique

230 Brouwer, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC technical report). *Pure Appl Chem* **2011**, 83 (12), 2213-2228

spécifique du cœur phénolique de la molécule **228-O⁻**. En effet, même si l'absorption intrinsèque d'un bodipy est connue pour être faible à 400 nm, elle n'est pas inexistante. Contrairement au mode d'excitation chimique, on peut légitimement penser qu'une excitation directe du cœur indacène a également lieu. Ensuite, la différence des maxima d'émission pourrait être expliquée par une concentration utilisée pour la chimiluminescence bien plus élevée (49 μ M contre 14 μ M pour les mesures de photoluminescence), pouvant potentiellement mener à la formation d'agrégats et à un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde de l'émission.

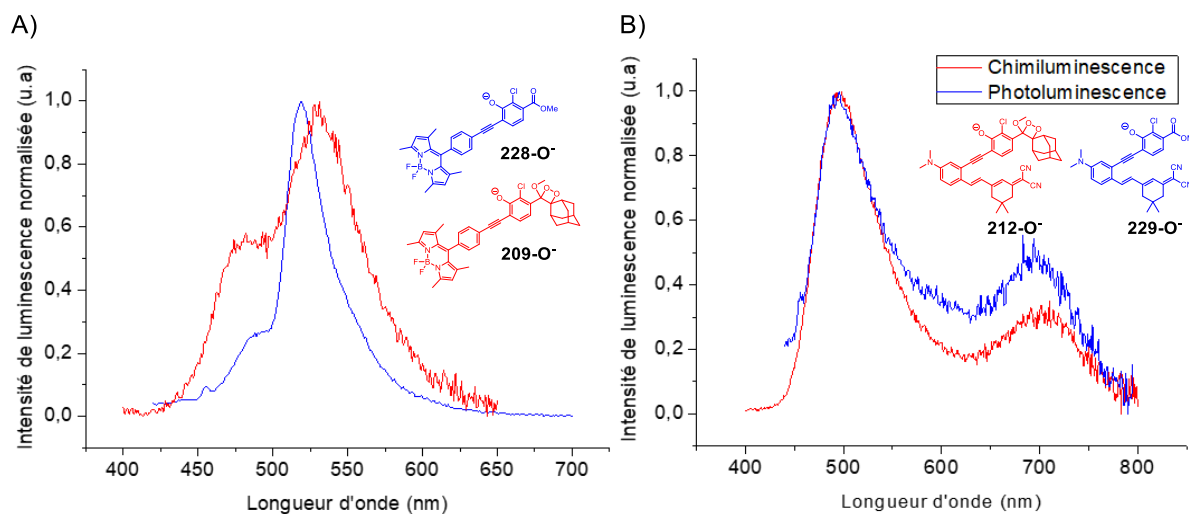


Figure 65 Comparaison de la photoluminescence et la chimiluminescence dans le DMSO, à température ambiante, en présence de 200 μ L de tampon PBS pH 11,6 0,01 M avec une concentration de A) [14 μ M] de **209** pour la chimiluminescence et [49 μ M] de **228** pour la photoluminescence B) [68 μ M] de **212** pour la chimiluminescence et non renseignée pour la photoluminescence.

En conclusion, les mesures spectroscopiques des molécules **227** et **228** ont permis de confirmer le maintien des propriétés intrinsèques du bodipy et du DCI. Cependant, elles montrent une extinction de photoluminescence non négligeable en présence de la fonction phénolate, ce qui semble expliquer la faible émission de chimiluminescence observée. En substance, les spectres enregistrés (Figure 61) correspondraient à la chimiluminescence résiduelle n'ayant pas été quenchée par l'extinction de luminescence.

5.3 Déclenchement thermique de la chimiluminescence. « Thermochimiluminescence ».

La faible intensité de chimiluminescence semble être liée à une extinction de luminescence causée par le phénolate. Cette inhibition tend à prouver l'effectivité du transfert d'énergie au travers des liaisons. En effet, l'absence de ce transfert d'énergie serait traduite par une émission efficace de la plateforme de Schaap (donc un signal fort à 470 nm). Le déclenchement de chimiluminescence par voie d'activation thermique (*i.e.* thermochimiluminescence) a été testé pour obtenir un spectre d'émission en l'absence du phénolate et éviter ainsi le phénomène d'extinction de la fluorescence (Figure 66). Les enregistrements ont été effectués à 100°C dans le DMSO (2 mL) en présence de 50 μ L de tampon PBS (0,01 M, pH 4,2). Dans ces conditions, nous avons pu observer les bandes d'émission attendues pour les trois chimiluminophores correspondant aux propriétés intrinsèques de leur fluorophore respectif. Il est intéressant de noter que la bande d'émission caractéristique du cœur phénolique à 470 nm est absente, ce qui tend à prouver que le transfert d'énergie entre le phénol (excité par la décomposition du

dioxétane) et le fluorophore est effectif et, ce, quelle que soit la longueur d'onde d'absorption de ce dernier.

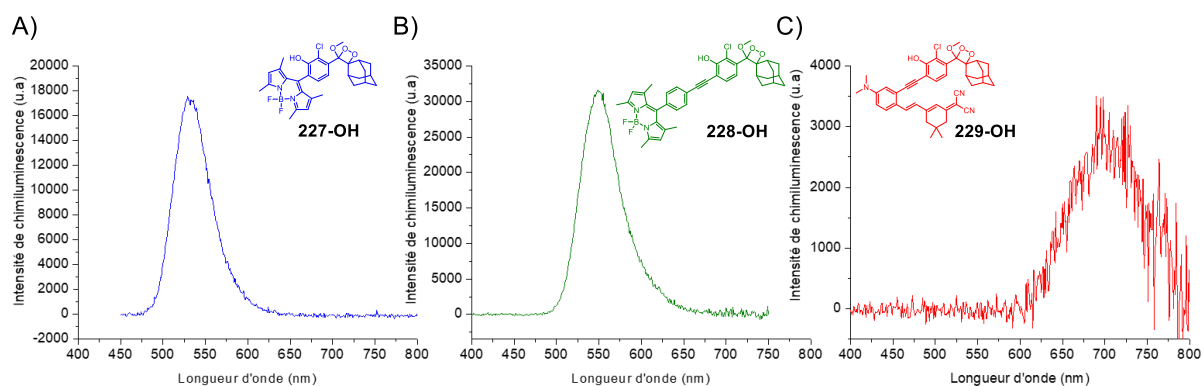


Figure 66 Spectre de thermochimiluminescence (DMSO, 100°C) en présence de 50 μ L de tampon PBS 0.01 pH 4,6 avec une concentration de A) [23 μ M] pour **185** B) [139 μ M] pour **209** C) [142 μ M] pour **212**.

Toutefois, une différence entre les maxima d'émission a été remarquée pour le chimiluminophore **209**. La corrélation chimiluminescence-thermochimiluminescence montrée dans la Figure 67A souligne l'influence de la concentration sur le maximum d'émissions et vient lever le doute. Ces expériences de thermochimiluminescence rendent compte du caractère majoritaire du transfert d'énergie. En effet dans les trois cas, il n'est pas possible de discerner la bande d'émission correspondant à l'émission du cœur phénolique (Figure 67).

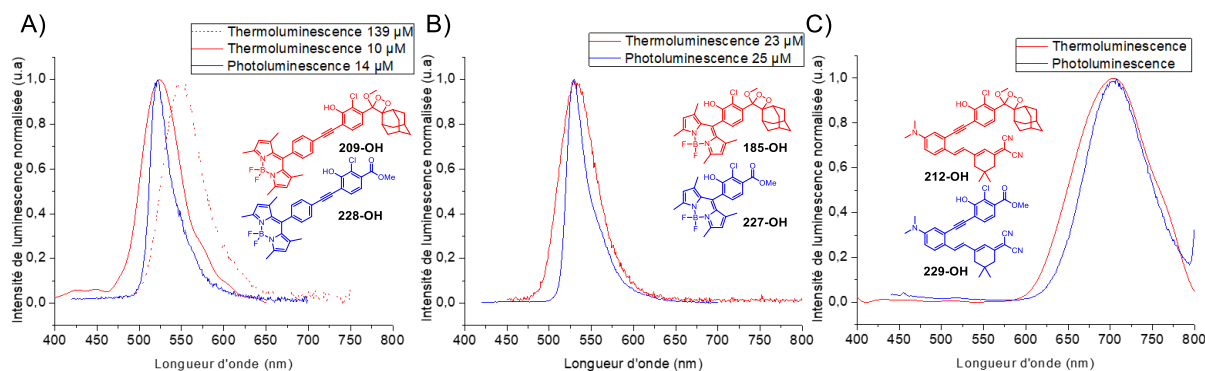


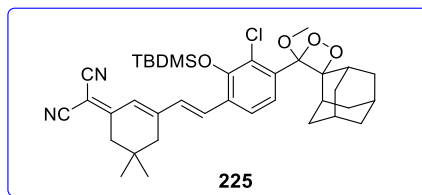
Figure 67 Comparaison de la photoluminescence (DMSO, t.a.) et de la thermochimiluminescence (DMSO, 100°C) en présence d'un tampon PBS à pH 4,6.

6. Conclusion et perspectives.

Au cours de ce chapitre, deux autres stratégies de conception de chimiluminophores susceptibles d'émettre dans le proche infra-rouge ont donc été présentées. Dans un premier temps, la synthèse de trois cassettes chimiluminescentes TBET a pu être réalisée, dont deux empruntant une voie de synthèse impliquant un couplage de Sonogashira (Schéma 77). Les limites d'un groupement protecteur silylé, facile à cliver, mais fragile, ont été soulignées. Le groupement protecteur photoclivable *o*-nitrobenzyle a donné quelques gages de satisfaction. Cependant, les conditions de son clivage ne sont pas compatibles avec tous les fluorophores. Dans un second temps, seul un chimiluminophore basé sur l'extension du système π du cœur phénolique a été obtenu. La réaction de condensation de Knoevenagel a été optimisée pour varier les accepteurs de Michael. Néanmoins, là encore, le groupement silylé ne semble pas assez robuste pour la réaction. Des déclenchements par le biais

d'anions fluorures ont été effectués sur le chimiluminophore **225**. Malheureusement, les résultats obtenus ne sont pas interprétables à cause de la multiplicité des sous-produits observés. Par manque de temps, il n'a pas été possible d'obtenir ces dioxétanes avec la fonction phénol déprotégée afin de pouvoir les caractériser.

Extension du système π -conjugué



Cassette chimiluminescente TBET

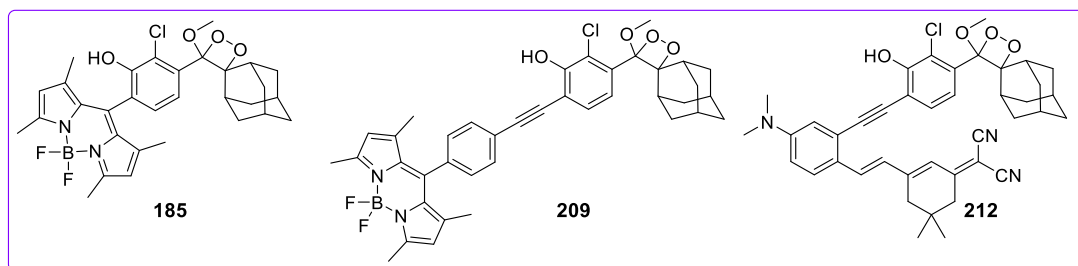


Schéma 77 Résumé des chimiluminophore obtenus.

Contrairement au dioxétane **225**, les propriétés photophysiques des cassettes chimiluminescentes TBET ont été caractérisées. Comme rapporté dans la littérature, la structure de l'espèce émissive a été corrélée par superposition des spectres de chimiluminescence et photoluminescence et analyse des chromatogrammes UHPLC-MS. Par ailleurs, la corrélation entre la thermochimiluminescence et la photoluminescence nous autorise à confirmer la présence d'un transfert à travers les liaisons efficaces entre la plateforme et le fluorophore. Malheureusement, les chimiluminophores n'ont pas été aussi performants qu'escompté à cause d'un phénomène d'inhibition probablement lié à la fonction phénolate. Cette extinction de luminescence est dans la plupart des cas attribuée au phénomène de transfert d'électron photo-induit.^{219,231,232,233} En effet, dans le cas du bodipy, il a déjà été rapporté dans la littérature la possibilité d'éteindre la fluorescence par le biais d'un phénol en position pseudo méso.^{234,235} Bien qu'aucune étude ne rapporte de mécanisme PeT pour des photoluminophores aux structures proches de **228** et **229**, le recoupement des données tendent à attribuer cette extinction de luminescence à ce mécanisme de transfert d'électrons.

En postulant le mécanisme de PeT comme étant responsable de l'extinction de fluorescence observé, nous pouvons proposer le mécanisme suivant pour les cassettes chimiluminescentes obtenues (Schéma 78). Lorsque le mécanisme CIEEL est déclenché, le transfert d'énergie entre le cœur phénolique et le

231 Erande, Y.; Chemate, S.; More, A.; Sekar, N. PET governed fluorescence « Turn ON » BODIPY probe for selective detection of picric acid. *RSC Adv* **2015**, *5* (109), 89482-89487

232 Sukato, R.; Sangpetch, N.; Palaga, T.; Jantra, S.; Vchirawongkwin, V.; Jongwohan, C.; Sukwattanasinitt, M.; Wacharasindhu, S. New turn-on fluorescent and colorimetric probe for cyanide detection based on BODIPY-salicylaldehyde and its application in cell imaging. *J Hazard Mater* **2016**, *314*, 277-285

233 Zhang, Y.; Hao, Y.; Ma, X.; Chen, S.; Xu, M. A dicyanoisophorone-based highly sensitive and selective near-infrared fluorescent probe for sensing thiophenol in water samples and living cells. *Environ Pollut* **2020**, *265*, 114958

234 Gareis, T.; Huber, C.; Wolfbeis, O. S.; Daub, J. Phenol / phenolate-dependent on / off switching of the luminescence of. *Chem Commun* **1997**, *1*, 1717-1718

235 Sunahara, H.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron-transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (17), 5597-5604

fluorophore à bien lieu de façon vraisemblablement efficace. Puis, un phénomène de transfert d'électrons, dans le cas présent chimie-induit, provoque une extinction de chimiluminescence.

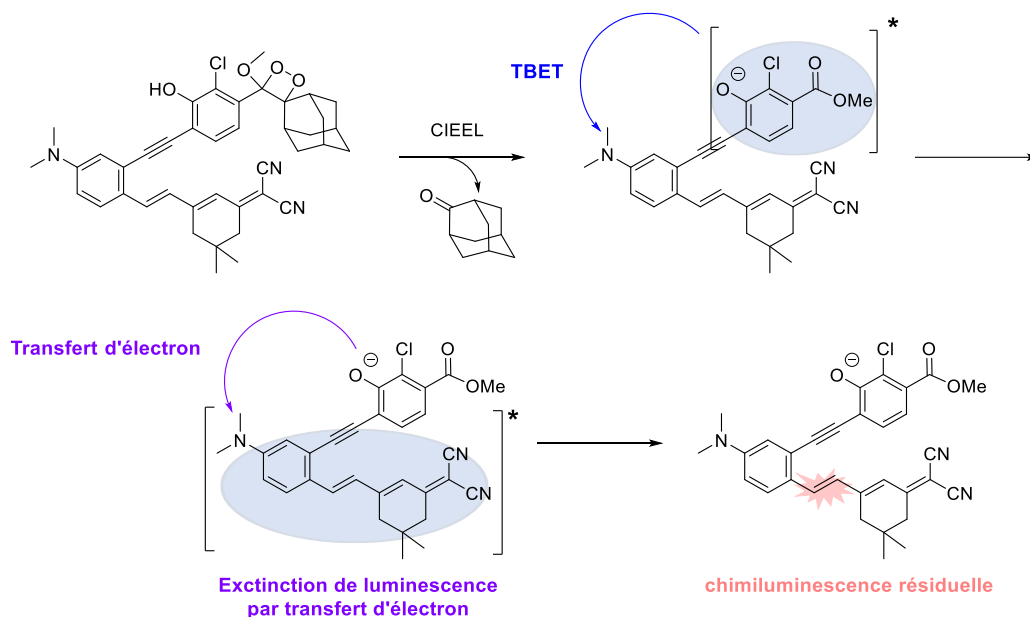


Schéma 78 Mécanisme proposé de l'extinction de chimiluminescence par transfert d'électrons.

Ces résultats viennent clarifier les doutes concernant la cassette chimiluminescente obtenue par le Dr. V Grandclaude exposée dans l'introduction de ce chapitre. Même si, nous ne pouvons pas l'affirmer, il est probable que cette cassette développée souffre également d'un phénomène d'extinction de luminescence *via* un transfert d'électrons. Au regard des résultats, cette stratégie ne semble pas compatible à une application pour la bioimagerie. En effet, la nécessité d'obtenir la fonction phénolate pour obtenir une activation du signal juxtaposée au phénomène de transfert d'électrons semble poser une équation insoluble.

Bien que nos trois (voire quatre) exemples ne soient pas généralisables, le transfert d'électron photoinduit est un phénomène courant. Le nombre de sondes fluorescentes utilisant ce processus afin d'obtenir des sondes dites intelligentes témoigne de la simplicité de la mise en œuvre d'un tel processus. Plus encore, la capture d'énergie du monde végétal est en grande partie basée sur ce phénomène de transfert d'électron.

Toutefois, toute chose étant égale par ailleurs, la découverte d'un fluorophore insensible au mécanisme de transfert d'électrons induit par le cœur phénolique permettrait de concevoir un chimiluminophore efficace.

Conclusion générale et Perspectives.

Ces travaux de thèse se sont inscrits dans le développement de sondes pour l'imagerie optique, avec un objectif d'application en imagerie médicale. Cette thématique connaît un succès non négligeable compte tenu de son faible coût, son caractère non invasif, et d'une certaine facilité d'accès en comparaison d'autres modalités d'imagerie. La luminescence étant le phénomène physique principal de l'imagerie optique, le nombre d'articles concernant la conception et l'utilisation de biomarqueurs et de sondes luminescents ne cesse d'augmenter. La photoluminescence est le phénomène le plus populaire du fait de la maîtrise acquise et de sa simplicité d'accès. En effet, la découverte et la caractérisation de différentes familles de fluorophores offrent un large éventail de choix aux chimobiologistes et biologistes. Cependant, l'utilisation de la photoluminescence peut induire une diminution de la résolution spatiale à cause de l'autofluorescence des tissus biologiques. De plus, l'anisotropie des milieux biologiques ainsi que l'absorption des tissus environnants sont autant de difficultés à surmonter, et impliquent l'utilisation préférentielle de sondes émettant (et absorbant le cas échéant) dans le proche infrarouge. La chimiluminescence se distingue des autres modalités de luminescence grâce à une émission de photons qui s'affranchit de source d'excitation photonique, permettant de diminuer les contraintes liées à l'autofluorescence des tissus.

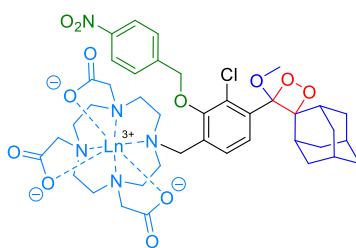
Tout d'abord, la chimiluminescence s'est limitée à l'utilisation de la bioluminescence, système efficace en termes de sensibilité, mais contraignant à mettre en place. En effet, l'implication d'une enzyme (luciférase) en plus de l'espèce émissive (luciférine) limite l'éventail de détection d'analytes possibles, étant donné les structures imposées des luciférines, ainsi que l'ingénierie génétique nécessaire à sa mise place. Par ailleurs, les premières sondes chimiluminescentes (e.g. luminol, peroxyoxalate) sont fondées sur une réaction d'oxydation qui permet la formation *in situ* d'un cycle endoperoxyde, jouant le rôle de source d'énergie. De fait, leur emploi en imagerie médicale est cantonné à la détection d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La découverte des sondes activables de type 1,2-dioxétane par le Pr. Schaap dans les années 90 a permis d'ouvrir le champ des possibles quant à la détection d'analytes divers et variés.

Cette «sonde de Schaap» permet de détecter pour la première fois l'activité d'une enzyme par le biais de la chimiluminescence. Néanmoins, les limites de cette structure ont rapidement été atteintes. En effet, son émission centrée à 460 nm ne se situe dans aucune des deux fenêtres de transparence biologique, et son rendement quantique de chimiluminescence en milieu aqueux est trop faible. Ce problème peut être contourné par l'utilisation d'une architecture micellaire fluorescente rendant l'utilisation de la sonde plus complexe. Dans un premier temps, la conception d'une sonde unimoléculaire, sans structure micellaire, basée sur le CRET pour décaler l'émission de chimiluminescence ne permit pas d'obtenir des sondes dioxétane efficaces. Dans un second temps, l'équipe du Pr. Shabat relança la thématique en introduisant une nouvelle approche consistant à étendre le système de délocalisation des électrons directement sur la structure phénolique émettrice.

1. Projet n°1 : Fonctionnalisation de la sonde de Schaap par un complexe de lanthanide.

Le projet principal de ces travaux de thèse a été mené dans la continuité des travaux de thèse du Dr. Kathleen Solmont. L'objectif premier a consisté à synthétiser une sonde de Schaap originale grâce à

une fonctionnalisation par un complexe de lanthanide afin de décaler l'émission de chimiluminescence vers les plus grandes longueurs d'onde d'une part, et d'augmenter le rendement quantique de chimiluminescence d'autre part. Le ligand DO3A a été choisi pour ses bonnes propriétés de chélation vis-à-vis des lanthanides et ses nombreuses applications dans le domaine de la chimobiologie. L'ajout d'un atome de chlore en position ortho du phénol permet d'assurer la déprotonation du phénol dans un milieu physiologique, conditions *sine qua none* pour obtenir une sonde apte à détecter la plupart des enzymes. Une fois l'objet obtenu (Figure 68), l'établissement d'une preuve de concept *via* la détection de la nitroréductase a été visée. La validation d'une première preuve de concept permettrait par la suite d'envisager des tests *in cellulo*, ou *in vivo*. Enfin, le design des sondes de Schaap permettrait à terme, de varier simplement les analytes ciblés en changeant le groupement porté par le phénol.



Design moléculaire visé

Figure 68 Représentation de la sonde moléculaire visée.

Malgré quelques difficultés de synthèse rencontrées avec le ligand DO3A, nous avons pu obtenir la molécule finale **78** (Figure 69) en 8 étapes et avec un rendement de 11 % à partir d'une plateforme phénolique décrite par l'équipe du Pr Shabat, dont nous avons pu reproduire efficacement la synthèse afin d'atteindre l'échelle d'une quarantaine de grammes.

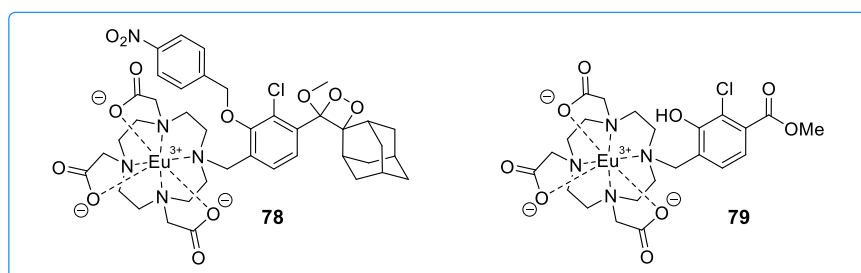


Figure 69 Molécules obtenues à ce jour.

Cependant, le déclenchement enzymatique de la molécule **78** faisant office de preuve de concept n'a pas montré les résultats escomptés. En effet, le signal de chimiluminescence obtenu est très faible, et principalement centré sur 470 nm (*i.e.* l'émission de la plateforme de Schaap sous forme phénolate) sans émission observable à 615 nm. De plus, l'analyse UHPLC-MS du déclenchement n'a pas permis de statuer sur l'espèce émissive obtenue. La synthèse et l'isolement de l'espèce émissive théorique **79** a été effectuée afin de caractériser ses propriétés photophysiques par le biais de la photoluminescence. Malheureusement, le composé supposé correspondre à l'espèce émissive n'a été obtenu qu'en très petite quantité, et sa caractérisation n'a pas pu être complétée. Cependant, nous pensons avoir mis en lumière un faible transfert du cœur phénolique au complexe de lanthanide, par l'obtention de photoluminescence à 615 nm (émission caractéristique de l'eupromium) du composé **79** avec un temps de vie de l'ordre de la μ s. Par ailleurs, la tentative de synthèse du chimiluminophore sans groupement

protecteur a conduit à un grand nombre de sous-produits, laissant penser à une certaine instabilité du composé **111** (Schéma 79).

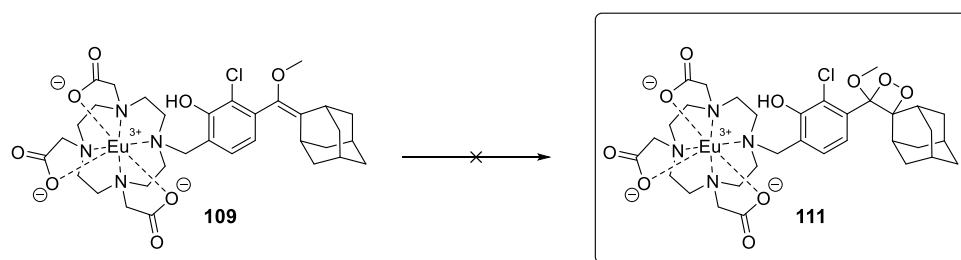


Schéma 79 Echech d'obtention du dioxétane **111**.

Des questions fondamentales restent en suspens : la structure de l'espèce émissive d'une part et donc le bon déroulement du mécanisme CIEEL ; l'efficacité réelle du chimiluminophore conçu d'autre part.

En perspectives, un déclenchement en milieu organique devrait permettre d'obtenir quelques réponses. Par ailleurs, le problème de transfert d'électron chimio-induit évoqué dans le chapitre 3 peut être envisagé dans le cas du complexe de lanthanide. Il serait donc intéressant de mesurer, dans un premier temps, la photoluminescence en présence du phénolate. Dans un second temps, si le complexe est assez stable, une mesure de thermochimiluminescence du dioxétane **78** serait à effectuer. Une fois l'hypothèse du transfert d'électron levée, l'obtention de la sonde à fluorure **xek** devrait pouvoir permettre un déclenchement en milieu organique.

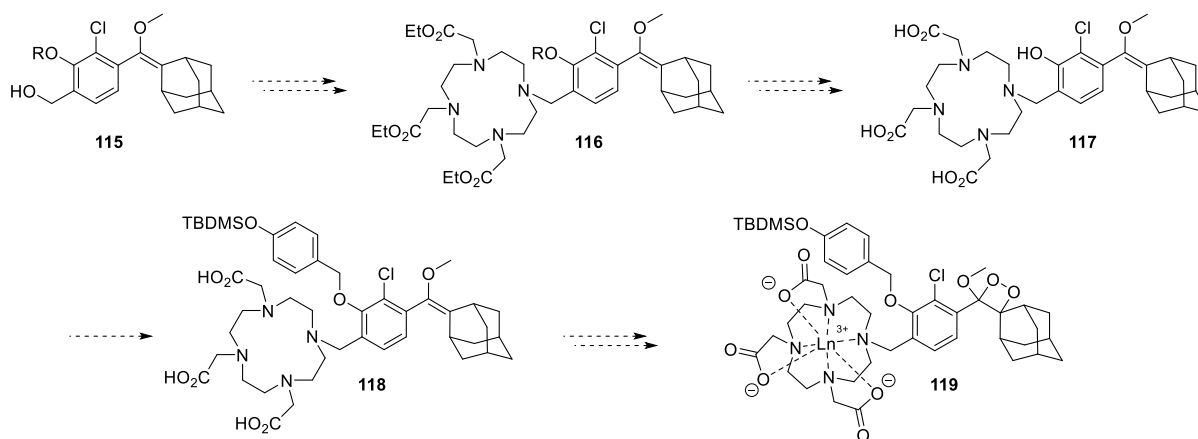


Schéma 80 Voie de synthèse envisagée pour obtenir un dioxétane déclenchable en milieu organique.

2. Projet n°2 : Synthèse de cassette chimiluminescente de type TBET.

Les efforts du second projet se sont portés sur la synthèse de cassettes chimiluminescentes utilisant le transfert d'énergie à travers les liaisons. Une première cassette TBET avait été précédemment synthétisée au sein du laboratoire, basée sur l'utilisation d'un cœur naphtholique combiné au Nile red. Cependant, les résultats n'ont été que partiellement satisfaisant à cause d'un transfert non total et d'une faible intensité de chimiluminescence. Notre objectif premier a été de lever les doutes quant à l'efficacité de cette stratégie en synthétisant une cassette TBET chimiluminescente avec la sonde de Schaap. Dans un premier temps, nous avons visé une caractérisation de la chimiluminescence en milieu organique. En conséquence, le choix des fluorophores n'a donc pas été contraint par des problématiques d'hydrosolubilité. Ainsi, la synthèse des chimiluminophores **185**, **209** et **212** (Figure 70),

rapportée dans le chapitre 3, a été obtenue avec des rendements respectifs de 2, 9, 8 % en 7, 5 et 5 étapes respectivement à partir de la plateforme **88**.

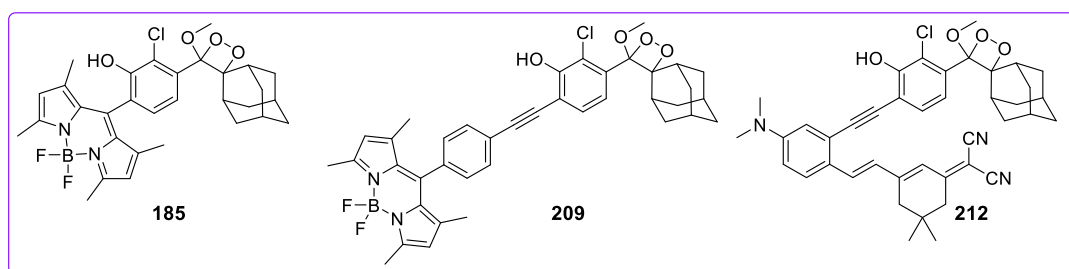


Figure 70 Cassettes chimiluminescentes TBET synthétisées.

Pour ce faire, une optimisation des groupements protecteurs utilisés ainsi que la mise en place de la réaction de couplage de Sonogashira ont été effectuées pour les chimiluminophore **209** et **212**. La condensation de groupements pyrroles sur une fonction aldéhyde du cœur phénolique a permis la synthèse du bodipy **185**. Une fois obtenus, ces trois chimiluminophores de type TBET ont pu être caractérisés. Cependant, la corrélation des différentes mesures de chimi- et photoluminescences ont mis en évidence la présence d'un phénomène d'extinction de luminescence probablement dû à un transfert d'électron entre le groupement phénolate et le fluorophore greffé sur les structures chimiluminescentes (Schéma 81).

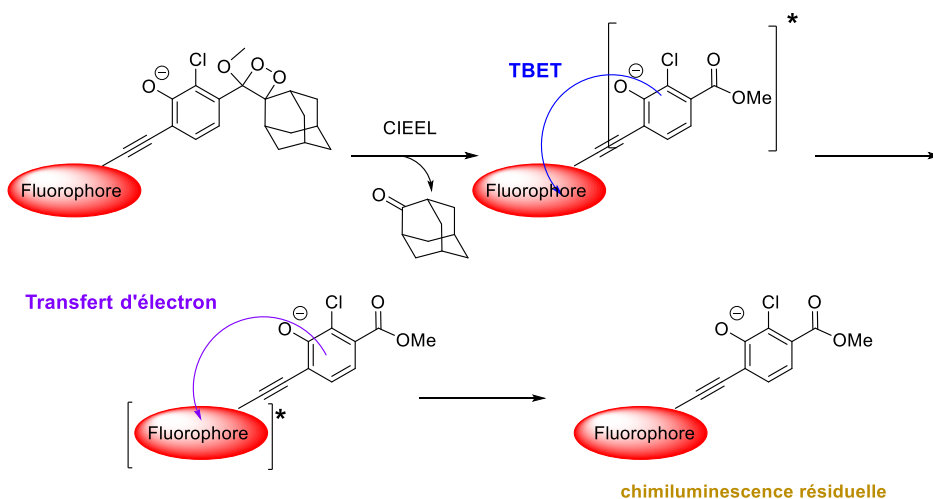


Schéma 81 Mécanisme général proposé d'extinction de la chimiluminescence.

Ces résultats sont venus lever les doutes sur la première cassette obtenue par le Dr. V. Grandclaude. Malheureusement, il paraît complexe d'imaginer une suite à cette stratégie de synthèse. Les probabilités de trouver un fluorophore insensible au transfert d'électron dans l'état excité par le groupement phénolate semblent faibles.

3. Projet n°3 : Synthèse de chimiluminophore via une extension du système π -conjugué du cœur phénolique.

Le troisième axe de recherche s'est porté sur la stratégie déjà éprouvée par l'équipe du Pr. D. Shabat. En effet, il a été démontré que l'extension du système π du cœur phénolique permet de décaler les longueurs d'onde d'émission vers le rouge d'une part et d'augmenter le rendement quantique de chimiluminescence d'autre part. La synthèse de telles molécules a été rendu accessible rapidement par

une condensation de Knoevenagel. À ce jour les molécules **225** et **224** ont été obtenues. Néanmoins, le dioxétane **225** a semblé trop fragile pour un déclenchement par le biais d'anions fluorures, probablement à cause de la chaîne polyméthine.

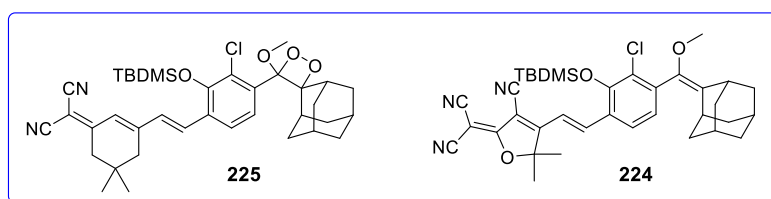


Figure 71 Molécules obtenues à ce jour.

En l'état, il suffit de déprotéger les composés **224** et **221** afin de pouvoir former le dioxétane par la suite pour caractériser leurs propriétés de luminescence (Schéma 82). Une émission centrée aux alentours de 550 – 580 nm serait attendue pour ces chimiluminophores.

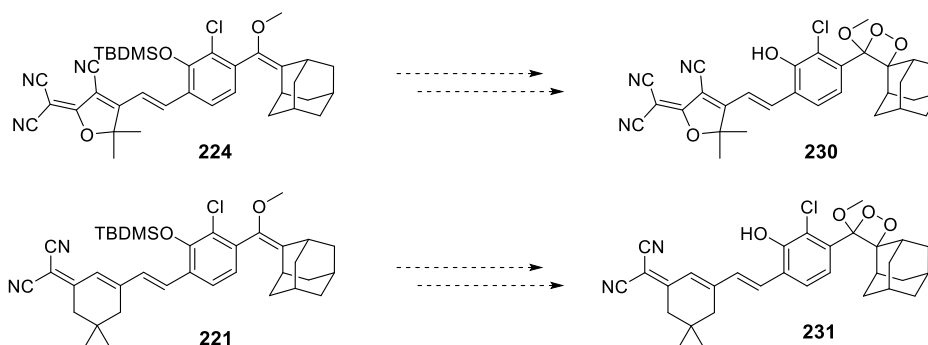


Schéma 82 Étapes restantes pour obtenir les chimiluminophores **230** et **231**.

4. Un nouvel axe de recherche ?

La stratégie de synthèse développée par l'équipe du Pr. Shabat visant à coupler tardivement le dérivé éther d'énol d'adamantyle au chromophore, associé aux résultats de l'équipe sur le dérivé de coumarine, permet d'envisager de nouveaux chimiluminophores, directement dérivés de fluorophores existants. L'obtention d'un chimiluminophore efficient passe par un bon rendement de chimiexcitation, combiné à un rendement quantique de fluorescence de l'espèce émissive élevé. Cependant, afin de prévenir un potentiel phénomène de transfert d'électron dans l'état excité, il faut s'assurer que la fonction phénol soit intégrée au système push-pull responsable de l'émission de luminescence. Cela réduit *de facto* le nombre de fluorophores potentiels tels que les bodipy, rhodamine, cyanine, etc. En conséquence, les fluorophores dérivants des structures de type coumarines, résorfurine, fluorescéine, naphthofluorescéine ou dérivés du DDAO²³⁶ (afin de palier au potentiel pKa élevé du phénol) deviennent de potentielles structures de base de chimiluminophores à étudier (Figure 72). Les structures **232**, **233**, **234** proposées visent à concevoir des « fluorophores chimiluminescents ». Dans ces cas présents, l'écart de 3 carbones entre le phénol et le point d'accroche du motif dioxétane a été conservé. Néanmoins, aucune preuve tangible tend à confirmer ou infirmer la conservation des propriétés intrinsèques de chimiexcitation du motif de Schaap au sein d'une structure polyaromatique.

236 Warther, D.; Bolze, F.; Léonard, J.; Gug, S.; Specht, A.; Puliti, D.; Sun, X. H.; Kessler, P.; Lutz, Y.; Vonesch, J. L.; Winsor, B.; Nicoud, J. F.; Goeldner, M. Live-cell one- and two-photon uncaging of a far-red emitting acridinone fluorophore. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (8), 2585-2590

En somme, il n'est pas interdit de penser obtenir un meilleur rendement chimiluminescence sur une autre position.

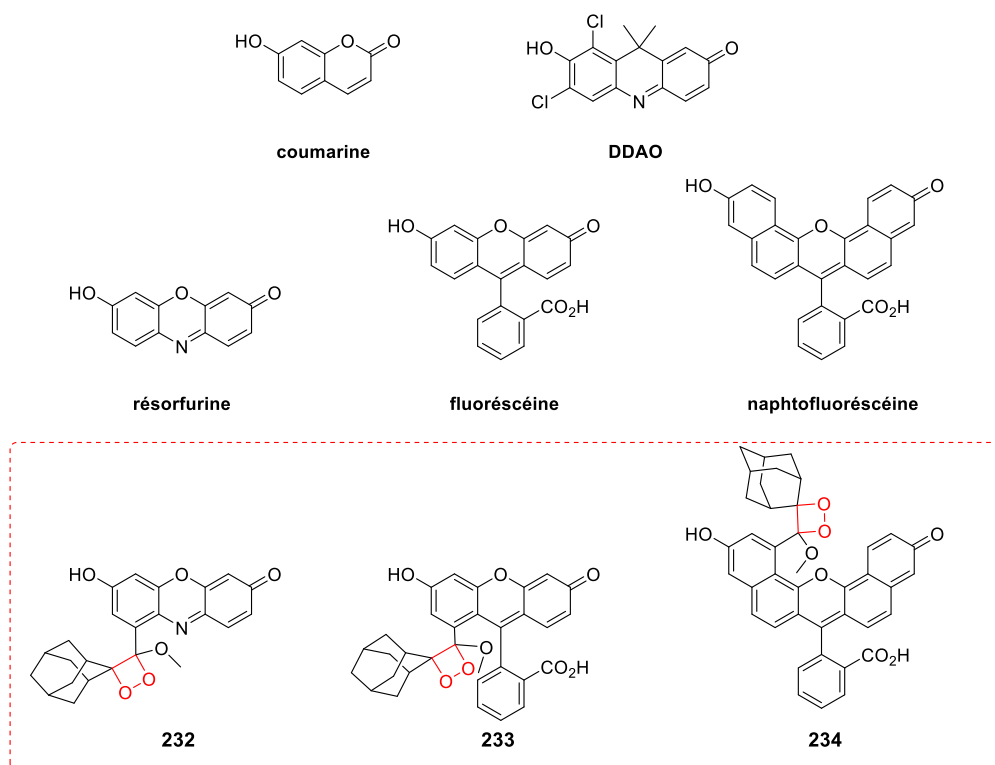


Figure 72 Propositions de structures pour la conception de "fluorophores chimiluminescents".

L'obtention des chimiluminophores **232** ou encore **234** nécessiterait un assez gros travail exploratoire pour obtenir le synthon permettant la formation des fluorophores avec le brome à la bonne position. En revanche, la synthèse du chimiluminophore **233** est tout à fait envisageable à partir de la molécule commerciale **235**. Une première déprotection des fonctions méthoxys permettrait l'obtention de la molécule **236**. Puis, à l'aide d'anhydride phtalique et de résorcinol, la fluorescéine **237** pourrait être synthétisée avant d'être couplée au motif éther d'énol pour finalement former le cycle dioxétane **233**. La possibilité d'obtenir une fluorescéine dibromée est non négligeable, cependant l'obtention de cette molécule ne serait pas inintéressante à étudier.

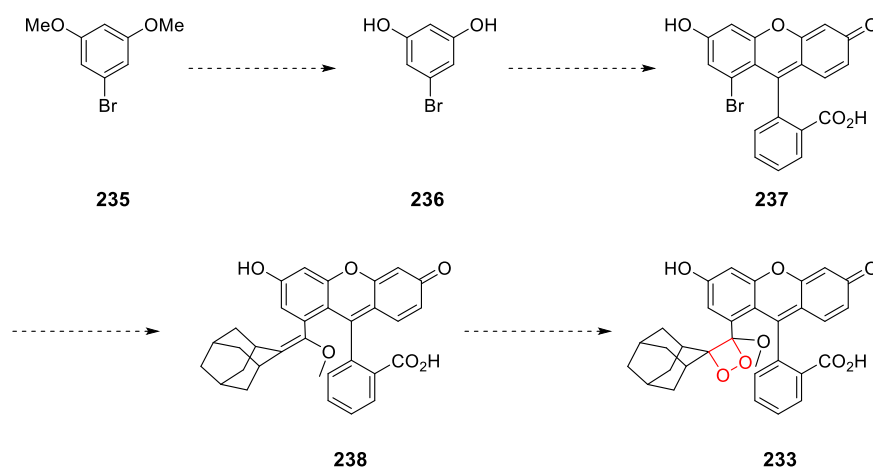


Schéma 83 voie de synthèse envisageable pour **233**.

Toutefois, des questions concernant la délocalisation de la charge sur l'ensemble de la structure du xanthène pourrait poser un problème. En effet, le caractère donneur de la structure est primordial pour déclencher le mécanisme CIEEL. Une cinétique de type glow serait attendue.

Experimental part.

1. General.

1.1 General information.

All chemicals were used as received from commercial sources without further purification, unless notified. Solvents, unless otherwise stated, were purchased in reagent grade or HPLC grade and used as received. PBS (pH 7.4, 0.01 M), Tris Buffer (pH 7.6, 0.05 M) and aq. mobile phases for HPLC were prepared with water that was purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 MΩ.cm.) All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC). TLC were carried out on Merck DC Kiesel gel 60 F-254 aluminium sheets. Visualization of spots was performed under a UV lamp at $\lambda = 254$ or 365 nm, and/or staining with a KMnO₄ solution/K₂CO₃ + 5% NaOH, developed with heat. Compounds **161**,²³⁷ **196**,²³⁸ **197**,²³⁹ **DO3ABn**,²⁴⁰ **DO3AMe**²⁴¹ were synthesized following literature procedures.

1.2 Instruments and Methods.

Purification steps were performed using silica columns from Interchim (4, 12, 25, 40, 80 or 120 g), either SI-HP (high purification) columns with a particle size of 30 μm or SI-HC (high capacity) columns with a particle size of 15 μm . It was performed on automated flash purification devices: either Biotage (Simple UV detection) or Puriflash 430 from Interchim (diode array detector) or Combiflash nextgen 300 from Teledyne Isco (diode array detector). Preparative purifications on reverse phase were performed on a Puriflash 4250 from Interchim (diode array detector).

¹H, ¹³C spectra were recorded on 300 MHz Bruker FT-NMR machine operating at ambient probe temperature. The solvent resonance was used as the internal standard for ¹H-NMR (chloroform-d at 7.26 ppm; DMSO-d₆ at 2.50) and ¹³C-NMR (CDCl₃ at 77.16 ppm; MeOH-d₄ at 49.0 ppm; DMSO-d₆ at 39.5). Chemical shifts (δ) were quoted in parts per million (ppm). Coupling constants (J) were quoted in Hertz (Hz). The following abbreviations were used to give the multiplicity of the NMR signals: s: singlet, bs: broad singlet, d: doublet, t: triplet, dd: doublet of doublet ddd doublet of doublet of doublet td: triplet of doublet.

High Resolution Mass spectrometry (HRMS) was performed using a Waters Micromass LCT Premier XE[®] equipped with an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) and an electrospray source in positive or negative mode.

UV-Vis spectroscopy was performed on a Agilent Cary 60 UV-Vis[®] and was performed using a quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 \times 10 mm, pathlength 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Fluorolog-3-21

237 Sun, X.; Liu, Y.; Xu, X.; Yang, C.; Yu, G.; Chen, S.; Zhao, Z.; Qiu, W.; Li, Y.; Zhu, D. Novel electroactive and photoactive molecular materials based on conjugated donor-acceptor structures for optoelectronic device applications. *Journal of Physical Chemistry B*. 2005, p 10786-10792

238 Hu, B.; Su, Q.; Lu, P.; Wang, Y. BODIPY modified 9-cycloheptatrienylidene fluorene derivatives: Fluorescent « turn-on » for detecting Cu²⁺ with acidity independence. *Sensors Actuators, B Chem* **2012**, *168*, 310-317

239 Haefele, A.; Ulrich, G.; Retailleau, P.; Ziessel, R. Synthesis of multi-branched dipyrromethene dyes with soluble diethynylphenyl links. *Tetrahedron Lett* **2008**, *49* (23), 3716-3721

240 Karfeld, L. S.; Bull, S. D.; Davis, N. E.; Meade, T. J.; Barron, A. E. Use of a Genetically Engineered Protein for the Design of a Multivalent MRI Contrast Agent. *Bioconjug Chem* **2013**, *18* (6), 1697-1700

241 Jagadish, B.; Ozumerzifon, T. J.; Roberts, S. A.; Hall, G. B.; Mash, E. A.; Raghunand, N. Improved synthesis of 10-(2-alkylamino-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid derivatives bearing acid-sensitive linkers. *Synth Commun* **2014**, *44* (3), 441-449

(Horiba) spectrophotometer using a quartz fluorescence cell (Hellma, 104FQS, 10 × 10 mm, pathlength 10 mm, chamber volume 3.5 mL). The samples were irradiated by a continuous 450 W Xe lamp, equipped with a double 330 nm grating monochromator and the luminescence was collected at 90° through a simple 500 nm grating monochromator and measured by a Hamamatsu photomultiplier tube R13456. The O.D. of the samples was kept below 0.1 to avoid inner filter effect and self-quenching. A correction factor was applied to take into account excitation fluctuation and detector and grating spectral response.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_{FL}(x) = \frac{A_s F_x}{A_x F_s} \left(\frac{n_x}{n_s}\right)^2 \Phi_s$$

Where A is the absorbance (from 0.01 to 0.1), F correspond to the integration of the fluorescence spectra, n is the solvent refractive index (at 25°C) used in measurement and the subscripts s and x refers to the reference and unknown compounds, respectively. The following refractive index values were used: 1.326 for MeOH and 1.477 for DMSO

Chemiluminescence emission spectra were recorded by using a magnet stirring. A first homogenization was handled with the syringe, by adding the trigger solution while keeping the darkness with a black waste bag. Emission spectrum was recorded just after the addition. Chemiluminescence kinetics was recorded in the same conditions. The recording was started before the addition for the kinetics baseline. Thermochemiluminescence emission spectra were recorded in the same conditions than chemiluminescence spectra at 100°C.

1.3 Purification and Analytical HPLC System.

RP-UHPLC analyses were performed with a Thermo Scientific Ultimate® 3000 RS instrument, equipped with a diode array detector (DAD-3000RS) and temperature of the column compartment was fixed at 25 °C. A Thermo Fisher Hypersyl GOLD® column (1.9 µm, 2.1 × 50 mm) was used with a binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1.5 min; 5% MeCN for 2 min) at a flow rate of 0.600 mL/min.

RP-UHPLC-MS analyses were performed with a Thermo Scientific Vanquish® (binary pump system) and a Thermo Scientific ISQ® EC instruments, equipped with a Waters BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) with a diode array detector (DAD-3000RS) coupled with a low-resolution MS detector (ESI⁺ or ESI⁻). Temperature was maintained to 40 °C.

Analytical methods

System A on the Waters BEH C18 column was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 10 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 0.5 min; 5% MeCN for 3 min) at a flow rate of 0.400 mL/min. UV detection at 254 nm.

System B on the Waters BEH C18 column was composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 10 min; linear gradient

from 100 to 5% MeCN over 0.5 min; 5% MeCN for 3 min) at a flow rate of 0.400 mL/min. UV detection at 498 nm.

System C was composed binary solvent system composed of MeCN and 0.1% aq. formic acid (aq. FA, pH 2) as eluents (linear gradient from 5 to 100% MeCN over 6 min; 100% MeCN for 1.5 min; linear gradient from 100 to 5% MeCN over 1.5 min; 5% MeCN for 2 min) at a flow rate of 0.600 mL/min. UV detection at 270 nm.

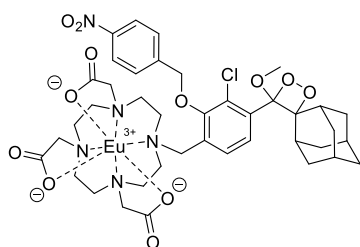
Preparative HPLC methods

System A: Semi-preparative RP-HPLC were performed with a Thermo Scientific Spectra SYSTEM SCM1000/P4000 equipped with a UV-visible detector, and a Thermo Scientific Synchronis Aq column (5 μ m, 20 x 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. FA as eluents (95% FA for 5 min, linear gradient from 5 to 100% MeCN over 25 min) at a flow rate of 15 ml/min.

2. Synthesis.

Compounds are listed in ascending order

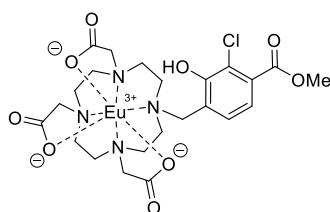
Compound 78



Enol ether **107** (50 mg, 0.052 mmol, 1 equiv) was dissolved in 5 mL of CHCl_3 and a catalytic amount of methylene blue (0,89 mg, 0.0027 mmol, 0.05 equiv) was added. The reaction mixture was stirred, under a positive oxygen pressure by bubbling it, and irradiated with filtered white light (high-pass filter 435 nm). The reaction was monitored by UHPLC (System A). Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. The residue was purified by an automatic RP-HPLC (System A) without UV detection ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ 90:10) and afforded dioxetane **78** as a white powder (35 mg, 0.036 mmol, 70%).

HRMS (ESI⁻) m/z : calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{ClEuN}_5\text{O}_{14}^-$ ($[\text{M}+\text{HCO}_2^-]$): 1024.2272, found: 1024.2285; UHPLC-MS (ESI⁻) (System A) t_r (min), relative area (%), m/z : 7.40, 90.00, 1024.3 $[\text{M}+\text{HCO}_2^-]$.

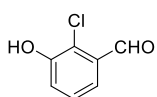
Compound 79



To a solution of dioxetane **78** (9 mg, 0.0095 mmol, 1 equiv) in 1 mL of a THF-MeOH mixture (1:1) was added Indium powder (8 mg, 0.076 mmol, 1 equiv) and 1 mL of a NH_4Cl saturated solution. The reaction mixture was heated to 70°C until completion (monitored by UHPLC, System A). Then the solvent was evaporated under vacuum and the residue was purified by RP-HPLC (System A) to afford benzoate **79** as a translucent oil (1 mg, 0.0014 mmol 16 %).

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClEuN}_4\text{O}_5^+$ ($[\text{M}+\text{HCO}_2^-]$): 695.1008 found: 698.1022 UHPLC-MS (ESI⁺) (System A) t_r (min), relative area (%), m/z : 4.25, 95.0, 739.2 $[\text{M}+\text{HCO}_2^-]$.

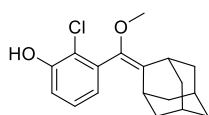
Compound 87



Commercially available 3-hydroxybenzaldehyde (25 g, 200 mmol, 1 equiv.) and DCDMH (40.1 g, 200 mmol, 1 equiv.) were dissolved in 2 L of toluene. A catalytic amount of diisopropylamine hydrochloride salt (1.4 g, 10 mmol, 0.05 equiv.) was added, at 0°C the solution was stirred, in dark conditions, for 4 hours. Then the crude product was concentrated under vacuum and washed several times with deionized water with sonication until the total removal of the by-product. Aldehyde **87** was obtained as a brown powder (15 g, 96 mmol, 47%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.40 (s, 1H), 7.53 (dd, $J = 7.2, 2.1$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 5.84 (s, 1H). Analysis data were consistent with literature.^{xx}

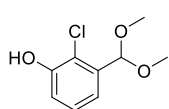
Compound 88



To a solution of compound **93** (3 g, 7.1 mmol, 1 equiv.) in 35 mL of THF was added TBAF (1 M in THF, 8.6 mmol, 8.6 mL, 1.2 equiv.) at room temperature. The reaction mixture was stirred 10 minutes, upon completion monitored by TLC, then extracted with ethyl acetate (100 mL). The organic layer was washed with an aqueous saturated solution of NH_4Cl , dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane:AcOEt 90:10) afforded phenol **88** as a white powder (1.9 g, 6.4 mmol, 90%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.21 (dd, $J = 8.2, 7.5$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 1H), 5.73 (s, 1H), 3.36 (s, 3H), 3.33 (s, 1H), 2.16 (s, 1H), 2.05 – 1.71 (m, 12H). Analysis data were consistent with literature.^{xx}

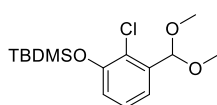
Compound 90



Compound **87** (11.4 g, 72.8 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 60 mL of dry methanol. Trimethyl orthoformate (17.8 mL, 116.4 mmol, 1.6 equiv.) and tetrabutylammonium tribromide (1.747 g, 3.64 mmol, 0.05 equiv.) were added, and the solution was stirred for 10 minutes at room temperature. The reaction mixture was quenched by adding 30 mL of a 5% sodium bicarbonate aqueous solution. The crude product was extracted with ethyl acetate, then the organic layer was washed with 5% sodium bicarbonate aqueous solution, dried over MgSO_4 , and concentrated under vacuum. Acetal **90** was obtained as a crude white solid (11.3 g, 17.2 mmol, 97%) and was engaged without further purification.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.24 – 7.16 (m, 2H), 7.03 (dd, $J = 6.0, 3.7$ Hz, 1H), 5.57 (s, 1H), 3.37 (s, 6H). Analysis data were consistent with literature.¹⁷⁸

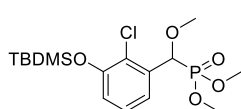
Compound 91



To a solution of chloro phenol acetal **90** (39.6 g, 196 mmol, 1 equiv.) in 200 mL of dry dichloromethane were added imidazole (21.7 g, 313 mmol, 1.6 equiv.) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (32.4 g, 215 mmol, 1.1 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 1 hour until completion (monitored by TLC cyclohexane AcOEt 8:2). The white precipitate was filtered off and the organic layer was washed twice with a 1 M sodium hydroxide solution, washed twice with deionized water, dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Acetal **91** was obtained as a crude brown oil (58 g, 190 mmol, 97%) and was engaged without further purification.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.23 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.88 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H), 5.63 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.36 (s, 1H), 1.04 (s, 9H), 0.23 (s, 6H). Analysis data were consistent with literature.¹⁷⁸

Compound 92

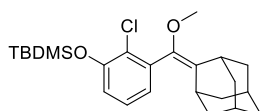


To a solution of acetal **91** (20 g, 63.2 mmol, 1 equiv.) and trimethyl phosphite (9.7 g, 75.8 mmol, 1.2 equiv.) in 180 mL of dry dichloromethane was added carefully at 0°C titanium chloride (15.5 g, 82.1 mmol, 9 mL, 1.3 equiv.) The reaction mixture was stirred approximately 1 hour until completion (monitored by TLC cyclohexane AcOEt 6:4) and quenched by a saturated aqueous solution of NaHCO_3 at 0°C , a white precipitate was observed.

Dichloromethane was added until the precipitate was dissolved. Then the organic layer was washed twice with deionized water and a 1 M solution of aqueous sodium hydroxide. The organic phase was finally dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. Phosphonate **92** was obtained as crude /brown oil (22 g, 55.6 mmol, 88%) and was engaged without purification.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.29 (ddd, *J* = 7.9, 2.5, 1.7 Hz, 1H), 7.20 (m, , 1H), 6.89 (ddd, *J* = 8.0, 2.5, 1.7 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 3.79 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H), 3.65 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H), 3.36 (s, 3H), 1.03 (s, 9H), 0.23 (s, 6H). Analysis data were consistent with literature.¹⁷⁸

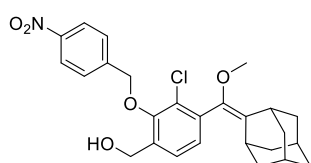
Compound 93



To a solution of phosphonate **92** (23 g, 58.3 mmol, 1 equiv.) in 300 mL of dry THF was added, at -78 °C, a solution of 1 M LDA in THF (7.5 g, 70 mmol, 35 mL, 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred 20 minutes at -78°C adamantanone (8.3 g, 64,1 mmol, 1.1 equiv.) was then added. The reaction mixture was stirred, at -78°C, for 20 minutes then warmed to room temperature and stirred for approximately 4 hours. The reaction was monitored by TLC. The mixture was extracted with ethyl acetate and washed with an aqueous solution of saturated NaCl, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. A recrystallisation in acetonitrile afforded enol ether **93** as a white powder (17,1 g, 40.8 mmol, 70%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.10 (dd, *J* = 8.3, 7.3 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.3, 1.6 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.27 (bs, 1H), 2.06 (bs, 1H), 1.99 – 1.48 (m, 12H), 1.04 (s, 9H), 0.23 (s, 6H). Analysis data were consistent with literature.¹⁷⁸

Compound 94

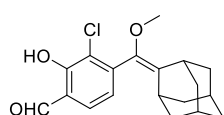


To a solution of aldehyde **97** (1.15 g, 31.1 mmol, 1 equiv.) in 9 mL of a mixture of dichloromethane and methanol (2:1, v/v) was added sodium borohydride (1.176 g, 31.1 mmol, 1 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 minutes until completion (monitored by TLC). The reaction mixture was diluted with 30 mL of dichloromethane, and washed twice with deionized water, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. Alcohol **94** was obtained without purification as a yellowish amorphous powder (1.05 g, 31.78 mmol, 99%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.74 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 3.29 (s, 1H), 2.07 (s, 1H), 1.64-2.00 (m, 12H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 152.6, 147.7, 144.2, 139.6, 136.1, 135.3, 132.3, 128.6, 128.3, 128.2, 126.9, 123.8, 73.9, 60.9, 57.2, 39.2, 39.1, 38.8, 38.6, 37.1, 32.9, 29.7, 28.4, 28.2

HRMS (ESI⁻) *m/z*: calcd. for C₂₆H₂₇ClNO₅⁻ ([M-H]): 468.1578, found: 468.1583.

Compound 96



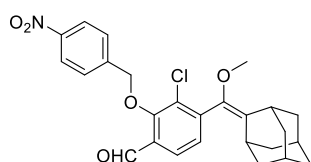
To a solution of phenol **88** (4.5 g, 14.8 mmol, 1 equiv.) in 160 mL of dry acetonitrile, under argon, was added anhydrous MgCl₂ (3 g, 32.5 mmol, 2.2 equiv.), paraformaldehyde (3.5 g, 118.4 mmol, 8 equiv.)²⁴² and dry triethylamine (5.6 g,

²⁴² MgCl₂ and [CH₂-O]_n kept one day before in a desiccator over P₂O₅

55.5 mmol, 7.4 mL, 3.75 equiv.). The reaction mixture was heated under reflux and stirred overnight. Then the reaction mixture was cooled down. The mixture was extracted with ethyl acetate and washed with a 1 M aqueous solution of HCl, twice with deionized water, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO₂, toluene DCM 90:10) afforded aldehyde **96** as a yellow powder (3.2 g, 9.5 mmol 65%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.62 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.28 (bs, 1H), 2.08 (bs, 1H), 2.00 – 1.59 (m, 12H). Analysis data were consistent with literature.^{xx}

Compound 97

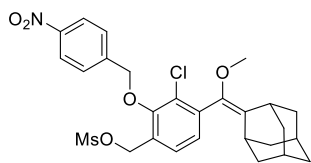


To a solution of aldehyde **96** (1 g, 3 mmol, 1 equiv.) in 55 mL of dry acetonitrile was added potassium carbonate (0.714 g, 3.31 mmol, 1 equiv.) and 4-nitrobenzyl bromide (0.832 g, 6. mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for around 4 hours until completion, monitored by TLC. The reaction mixture was extracted with 150 mL of ethyl acetate, washed with a NH₄Cl aqueous saturated solution, dried over MgSO₄, and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (cyclohexane Ethyl Acetate 95:5) afforded ether **97** as a slight yellow powder (1.1 g, 2.4 mmol, 65%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.27 (s, Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 7.9, 1H), 5.26 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.28 (bs, 1H), 2.06 (s, 1H), 2.02-1.60 (m, 12H). ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 188.3, 157.0, 147.8, 143.0, 142.9, 139.0, 133.5, 130.1, 129.5, 128.4, 128.3, 126.6, 123.7, 75.5, 57.5, 39.0, 38.9, 38.6, 38.5, 36.8, 32.9, 29.7, 28.2, 28.1.

HRMS (ESI⁻) *m/z*: calcd. for C₂₆H₂₅ClNO₅⁻ ([M-H]): 466.1421, found: 466.1418.

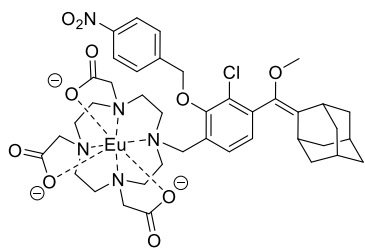
Compound 102



To a solution of benzyl alcohol **94** (150 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.) in 2 mL of dry THF, was added mesylchloride (108 mg, 0.95 mmol, 72 μL, 3 equiv) and triethylamine (101 mg, 1 mmol, 3.5 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for around 15 minutes until completion (monitored by TLC). The reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with 5 mL of ethyl acetate, washed twice with a saturated solution of NaHCO₃, deionized water, dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO₂, Heptane Ethyl Acetate 90:10) afforded mesylate **102** as a translucent oil (135 mg, 0.24 mmol, 77%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 5.21 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.29 (s, 1H), 3.01 (s, 3H), 2.05 (bs, 1H), 2.02-1.60 (m, 12H). For stability reasons, further characterization analysis could not be recorded.

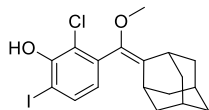
Compound 107



To a solution of the nitrogen macrocycle **DO3AEt** (111 mg, 0.26 mmol, 1.1 equiv) in 7 mL of ACN were added potassium iodide salt (33 mg, 0.24 mmol, 1 equiv) and potassium carbonate (159 mg, 0.96 mmol, 4 equiv). Then the mesylate compound **102** (137 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred and gently heated to 50°C. The completion of the reaction was monitored by UHPLC (System A) (around 4 hours). The reaction mixture was filtered and evaporated. The crude was engaged without further purification for the saponification. The crude was solubilized in 8 mL of MeOH and LiOH (1 M solution, 2.4 mL, 2.4 mmol, 10 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for a day. The reaction completion was checked by UHPLC (System A). Then MeOH was removed and 8 mL of mili Q water was added to the reaction mixture. Europium chloride salt (87.8 mg, 0.28 mmol, 1.2 equiv) was added portion wise. The reaction mixture pH was carefully kept between 6 and 8. The precipitate was recovered and dried to afford complex **107** as a white powder. (112 mg, 0.12 mmol, 50%).

HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₄₀H₄₉ClEuN₅O₁₀⁺ ([M+H]): 948.2475, found: 948.2396; UHPLC-MS (ESI⁻) (System A) *tr* (min), relative area (%), *m/z*: 7.00, 95.00, 992.5 [M+HCO₂].

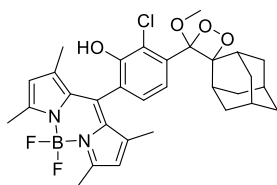
Compound 183



Under dark condition, to a solution of enol ether **88** (1.7 g, 5.6 mmol, 1 equiv.) in 120 mL of dichloromethane was added N-Iodosuccinimide (1.25 g, 5.6 mmol, 1 equiv.) by portion at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for approximately 2 hours (monitored by TLC). Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment and purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane DCM 80:20) afforded iodophenol **183** as a white solid (1.02 g, 2,4 mmol, 40%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.11 (s, 1H), 3.31 (s, 3H) 3.26 (bs, 1H), 2.09 (bs, 1H), 1.95-1.74 (m, 12H). Analysis data were consistent with literature to.

Compound 185

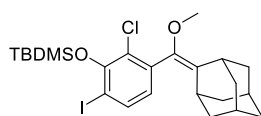


Enol ether **219** (5 mg, 9 μmol, 1 equiv) was engaged in 5 mL of DCM and a catalytic amount of methylene blue was added (0,145 mg, 0.9 μmol, 0.1 equiv). The reaction mixture was stirred and irradiated with filtered white light (high-pass filter 550 nm). The reaction was monitored by UHPLC (System B). Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. Purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane DCM 1:1) afforded dioxetane **185** as a red solid (2,7 mg, 4.6 μmol, 50 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 5.93 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.97 (bs, 1H), 2.49 (s, 6H), 2.21 (bs, 1H), 2.17 (bs, 1H), 2.00 (bs, 1H), 1.93 – 1.53 (m, 10H), 1.41 (s, 3H), 1.40 (s, 3H). 581.2182. For stability reasons, further NMR characterization analysis could not be recorded.

HRMS (ESI⁻) *m/z*: calcd. for C₃₁H₃₃BClF₂N₂O₄⁻ ([M-H]): 581.2195, found: UHPLC-MS (ESI⁻) (System B) *tr* (min), relative area (%), *m/z*: 7.07, 85.0, 581.1 [M-H].

Compound 190

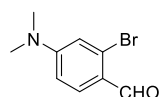


To a solution of iodophenol **183** (280 mg, 0.69 mmol, 1 equiv.) in 10 mL of dry dichloromethane were added imidazole (102 mg, 2.2 mmol, 3.2 equiv.) and *tert*-butyldimethylsilyl chloride (229 mg, 1.52 mmol, 2.2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 3 hours until completion (monitored by TLC). The white precipitate was filtered off and the organic layer was washed twice with a 1 M sodium hydroxide solution, washed twice with deionized water, dried over MgSO₄ and evaporated. Purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane DCM 80:20) afforded protected phenol **190** as a translucent oil (342 mg, 0.65 mmol, 95%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.65 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.25 (bs, 1H), 2.04 (bs, 1H), 2.00 – 1.62 (m, 12H), 1.05 (s, 9H), 0.38 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 152.4, 139.7, 137.3, 136.6, 131.2, 126.1, 125.9, 90.4, 56.9, 39.2, 39.0, 38.7, 38.6, 37.2, 33.0, 29.7, 28.5, 28.3, 26.4, 19.1, -1.52.

HRMS (ESI⁺) m/z: calcd. for C₂₄H₃₅ClIO₂Si⁺ ([M+H⁺]): 545.1140, found: 545.1124.

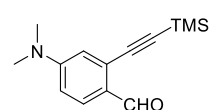
Compound 199



POCl₃ (4.21 g, 27.5 mmol, 6.86 mL, 1.1 equiv.) was added to dry DMF (11.8 g, 162 mmol, 11.1 mL, 6.5 equiv.) at 0°C and under argon. The reaction mixture was stirred for 30 minutes at 0°C, warmed up to room temperature and stirred for 15 minutes. Then 3-bromo-N,N-dimethylaniline (5 g, 25 mmol, 1 equiv.) was added, at 0°C, and the reaction mixture was warmed up to room temperature. A red precipitate appeared, and the reaction mixture was heated up until dissolution of the precipitate and stirred for 4 hours. The reaction mixture was poured over a mixture of deionized water and crushed ice, then neutralized to pH 6~7 with a sodium acetate saturated aqueous solution and kept in a cold room overnight. Finally, the precipitate was filtered and purified by column chromatography (SiO₂, cyclohexane AcOEt 95:5) to afford aldehyde **199** as a slightly pink powder (2.78 g, 63.4 mmol, 48%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.09 (s, 1H), 7.80 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.64 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 3.08 (s, 6H) Analysis data were consistent with literature.²⁴³

Compound 200



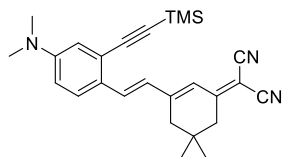
Aldehyde **199** (1 g, 4.38 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 50 mL of dry DCM, under argon, in dark conditions. Ethynyltrimethylsilane (1.28 g, 13.1 mmol, 0.81 mL, 3 equiv.) and triethylamine (14.5 g, 144 mmol, 147 mL, 33 equiv.) were added and the solution was deoxygenated by bubbling argon in the solution for 20 minutes. [Pd(PPh₃)₄] (0.253 g, 0.22 mmol, 0.05 equiv.) and copper iodide (0.083 g, 0.44 mmol, 0.1 equiv.) were added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum and a purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane AcOEt 95:5) afforded alkyne **200** as a beige powder (0.883 g, 3.6 mmol, 82%).

243 Hanaoka, K.; Kagami, Y.; Piao, W.; Myochin, T.; Numasawa, K.; Kuriki, Y.; Ikeno, T.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Synthesis of unsymmetrical Si-rhodamine fluorophores and application to a far-red to near-infrared fluorescence probe for hypoxia. *Chem Commun* **2018**, 54 (50), 6939-6942

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.28 (s, 1H), 7.81 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 8.9, 2.6, 1H), 3.08 (s, 6H), 0.27 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 190.1, 153.5, 128.9, 128.5, 125.2, 114.7, 111.9, 101.4, 100.4, 40.1, 0.0.

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NOSi}^+$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$): 246.1314, found: 246.1309.

Compound 201

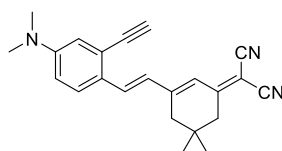


Aldehyde **200** (300 mg, 1.22 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 12 mL of dry toluene, under argon, in dark conditions. dicyanoisophorone **161** (238 mg, 1.28 mmol, 1.05 equiv.), piperidine (114 mg, 1.34 mmol, 90 μL , 1.1 equiv.) and a catalytic amount of acetic acid (7.2 mg, 0.12 mmol, 6.8 μL , 0.1 equiv.) were added and the solution was heated to reflux one day, the reaction was monitored by TLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum and a purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM TEA 69:30:1) afforded compound **201** as a red powder (226 mg, 0.44 mmol, 45%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.76 (bs, 1H), 6.75 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.58 (s, 2H), 2.49 (s, 2H), 1.07 (s, 6H), 0.31 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.1, 155.3, 150.6, 136.0, 126.5, 125.3, 125.1, 124.9, 121.9, 120.6, 114.8, 113.2, 103.6, 99.7, 76.1, 42.9, 40.1, 39.2, 31.9, 28.1, 0.1.

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{Si}^+$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$): 414.2365, found: 414.2376.

Compound 202

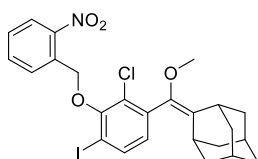


To a solution of protected alkyne **201** (73 mg, 0.17 mmol, 1 equiv.) in 5 mL of dry THF was added, at 0°C, TBAF (1 M in THF, 0.19 mmol, 190 μL , 1.2 equiv.). The reaction mixture was stirred for 5 minutes, and the reaction was quenched by a saturated solution of NH_4Cl . Then the desired compound was extracted with ethyl acetate and the organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane AcOEt 90:10) afforded a dark red powder (46 mg, 0.136 mmol, 80%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.73 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 1H), 3.39 (s, 1H), 3.04 (s, 6H), 2.56 (s, 2H), 2.47 (s, 2H), 1.07 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.2, 155.2, 150.5, 135.2, 126.6, 125.9, 125.1, 123.7, 122.2, 115.6, 114.1, 113.4, 82.2, 82.1, 76.3, 43.0, 40.1, 39.0, 32.0, 28.0.

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3^+$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$): 342.1970, found: 342.1961.

Compound 206

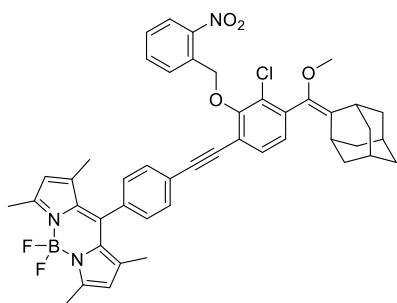


To a solution of iodophenol **183** (1.5 g, 2.7 mmol, 1 equiv.) in 15 mL of dry DMF, was added potassium carbonate (400 mg, 2.9 mmol, 1.1 equiv.) and 2-nitrobenzyl bromide (1 888 mg, 5.5 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was stirred at 80°C overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane Ethyl Acetate 95:5) afforded ether **206** as a brown solid (1.22 g, 2.16 mmol, 80%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 8.20 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.78 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.52 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.48 (s, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.27 (s, 1H), 2.10 (bs, 1H), 2.03 – 1.60 (m, 12H) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 154.38, 146.42, 139.1, 137.1, 136.9, 134.1, 133.8, 132.7, 129.6, 129.0, 128.8, 128.1, 124.7, 91.9, 70.5, 57.3, 39.2, 39.1, 38.7, 38.6, 37.0, 32.9, 29.7, 28.3, 28.2.

HRMS (ESI $^+$) m/z : calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{ClINO}_4^+$ ($[\text{M}+\text{H}^+]$): 566.0595, found: 566.0591.

Compound 207

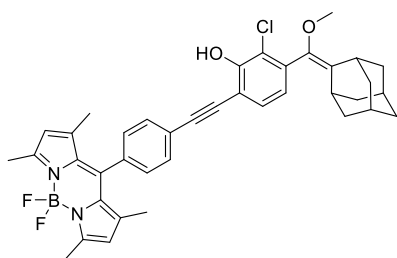


Under argon, in a dry schlenck $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (57 mg, 0.049 mmol, 0,1 equiv) and copper iodide were added. In another dry round bottom flask, compound **206** (270 mg, 0.50 mmol, 1 equiv.) and bodipy alkyne **197** (173 mg, 0,50 mmol, 1 equiv.) were dissolved in 10 mL of a dry THF-TEA mixture (6:1). The reaction mixture was degassed by 3 freeze-pump-thaw cycles and the resulting solution was added onto the palladium-copper mixture. The reaction mixture was heated to reflux overnight. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum and a purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 80:20) afforded compound **207** as a beige powder (270 mg, 0.035 mmol, 71%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 8.13 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.72 (td, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.36 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 5.73 (s, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.30 (bs, 1H), 2.54 (s, 6H), 2.16 (s, 1H), 2.01 – 1.70 (m, 12H), 1.38 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.8, 155.7, 146.5, 142.9, 140.5, 139.3, 137.0, 135.3, 134.2, 134.0, 132.6, 132.0, 131.0, 130.9, 129.0, 128.8, 128.1, 128.1, 127.5, 124.6, 123.3, 121.3, 117.8, 94.2, 85.9, 71.7, 57.3, 39.2, 39.1, 39.0, 38.6, 38.5, 37.0, 32.9, 29.7, 28.3, 28.1, 14.6.

HRMS (ESI $^-$) m/z : calcd. for $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{BClF}_2\text{N}_3\text{O}_4^-$ ($[\text{M}-\text{H}]$): 784.2925, found: 784.2929.

Compound 208

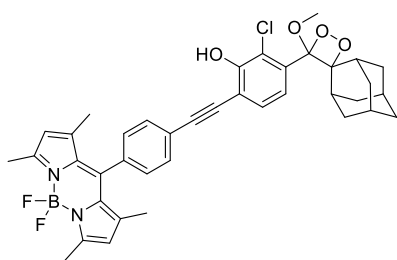


Enol ether **207** (285 mg, 0.37 mmol, 1 equiv) was dissolved in 50 mL of DCM, with formic acid (17 mg, 0.37 mmol, 12 μL , 1 equiv). The reaction mixture was stirred in a photo-reactor under UV illumination (380 nm) from 12 light bulbs. The reaction was monitored by TLC (DCM). Then the reaction mixture was concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 20:80) afforded phenol **208** as a red solid (120 mg, 0.185 mmol 50%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.23 (s, 1H), 5.99 (s, 2H) 3.33 (s, 3H), 3.28 (s, 1H), 2.55 (s, 6H), 2.12 (bs, 1H), 2.08 – 1.66 (m, 12H), 1.43 (s, 6H) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 152.7, 143.0, 140.6, 139.4, 136.4, 135.5, 132.6, 132.5, 131.2, 130.2, 128.4, 123.6, 123.5, 121.5, 121.4, 121.0, 110.3, 94.9, 84.9, 57.3, 47.0, 39.3, 38.7, 37.1, 36.3, 32.9, 29.7, 28.3, 27.5, 14.7.

HRMS (ESI $^-$) m/z : calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{39}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_2^-$ ($[\text{M}-\text{H}]$): 651.2761, found: 651.2761.

Compound 209

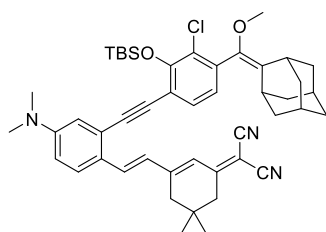


Enol ether **208** (20 mg, 0.030 mmol, 1 equiv) was dissolved in 5 mL of CHCl_3 and a catalytic amount of methylene blue was added (0.488 mg, 0.3 μmol , 0.01 equiv). The reaction mixture was stirred, under a positive oxygen pressure by bubbling it, and irradiated with filtered white light (high-pass filter 550 nm). The reaction was monitored by UHPLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 4:6) afforded dioxetane **209** as a red solid (18 mg, 0.026 mmol, 85%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.00 (s, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.03 (bs, 1H), 2.56 (s, 6H), 2.27 (m, 2H), 2.05 (bs, 1H), 1.92 – 1.23 (m, 10H) 1.44 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 156.0, 153.1, 143.0, 140.6, 135.9, 133.6, 132.6, 131.2, 130.5, 128.5, 124.8, 123.3, 121.5, 118.3, 112.6, 111.8, 96.4, 95.8, 84.6, 49.8, 39.4, 36.7, 34.1, 33.6, 32.9, 32.3, 31.7, 31.6, 26.3, 25.9, 14.7.

HRMS (ESI $^-$) m/z : calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{37}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_4$ $^-$ ([M-H]): 681.2508, found: 681.2504; UHPLC-MS (ESI $^-$) (System B) t_r (min), relative area (%), m/z : 7.60, 93.2, 681.6 [M-H].

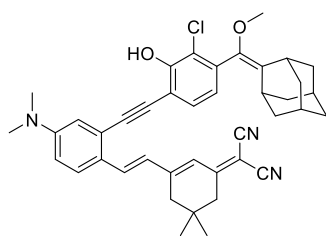
Compound 210



Compound **190** (36 mg, 0.067 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 7 mL of a dry THF:TEA (6:1) mixture, under argon, in dark conditions. Compound **202** (23 mg, 0.067 mmol, 1 equiv.) was added and the solution was deoxygenated by bubbling argon in the solution for 20 minutes. $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (7.7 mg, 0.0067 mmol, 0.1 equiv.) was added and the reaction mixture was heated to reflux, overnight. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum and a purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 80:10) afforded compound **210** as a dark red powder (22 mg, 0.030 mmol, 45%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H) 7.38 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.79 (bs, 1H), 6.74 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H) 3.34 (s, 3H), 3.27 (bs, 1H), 3.05 (s, 6H), 2.58 (s, 2H), 2.50 (s, 2H), 2.07 (bs, 1H), 2.00 – 1.60 (m, 12H), 1.06 (s, 9H), 0.31 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.2, 155.3, 152.8, 150.7, 139.8, 137.0, 136.0, 131.5, 130.8, 127.5, 126.9, 125.6, 125.1, 124.7, 122.1, 116.8, 114.6, 114.2, 113.4, 113.2, 92.8, 92.0, 76.7, 57.1, 43.1, 40.2, 39.4, 39.2, 38.7, 37.2, 33.1, 32.1, 29.7, 28.5, 28.1, 26.1, 18.9, -2.9. HRMS (ESI $^-$) m/z : calcd. for $\text{C}_{47}\text{H}_{56}\text{ClN}_3\text{NaO}_2\text{Si}^-$ ([M-H]): 780.3728, found: 780.3759.

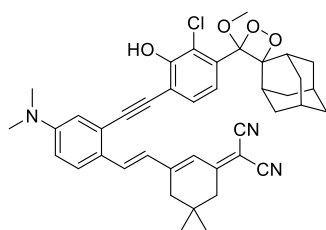
Compound 211



To a solution of protected phenol **210** (22 mg, 0.029 mmol, 1 equiv.) in 5 mL of THF, TBAF (1 M in THF, 0.031 mmol, 31 μ L, 1.1 equiv.) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred 5 minutes and the reaction was quenched by a saturated solution of NH_4Cl . Then the desired compound was extracted with ethyl acetate and the organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 80:20) afforded phenol **211** as a dark red powder (15 mg, 0.024 mmol, 83%)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.75 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.73 (dd, J = 9.0, 2.8 Hz, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.28 (bs, 1H), 3.06 (s, 6H), 2.55 (s, 2H), 2.52 (s, 2H), 2.13 (s, 1H), 1.99 – 1.66 (m, 12H), 1.06 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.6, 152.8, 150.7, 139.4, 136.1, 135.9, 132.8, 130.2, 127.3, 125.9, 124.9, 124.5, 123.7, 121.7, 121.2, 114.9, 114.2, 113.6, 113.3, 110.8, 94.3, 89.2, 76.1, 57.4, 43.0, 40.2, 39.7, 39.1, 38.8, 37.1, 33.0, 32.0, 29.8, 28.3, 28.1, 27.0. HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{ClN}_3\text{O}_2^+$ ([M+H]): 644.3044, found: 644.3046.

Compound 212

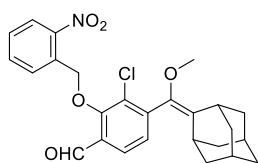


Enol ether **211** (15 mg, 0.023 mmol, 1 equiv) was engaged in 5 mL of CHCl_3 and a catalytic amount of methylene blue was added (0.776 mg, 0.0023 mmol, 0.01 equiv). The reaction mixture was stirred, under a positive oxygen pressure by bubbling it and irradiated with a filtered white light (high-pass filter 550 nm). The reaction was monitored by UHPLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane DCM 4:6) afforded dioxetane **212** as a dark red solid (7 mg, 0.010 mmol, 45%) as a mixture of E and Z isomers (E:Z 80:20 determined by UHPLC).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.85 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.75 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.07 (s, 6H), 2.58 (s, 2H), 2.54 (s, 2H), 2.26 (s, 1H), 2.05 (s, 1H), 1.93 – 1.23 (m, 12H), 1.08 (s, 6H).

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{ClN}_3\text{O}_4^+$ ([M+H]): 676.2942, found: 676.2930. UHPLC-MS (ESI⁺) (System B) t_r (min), relative area (%), m/z : 7.78(E) 7.58(Z), 72.4. 17.8, 674.3 [M-H]⁻.

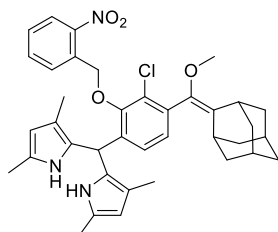
Compound 216



To a solution of aldehyde **96** (400 mg, 1.2 mmol, 1 equiv.) in 4 mL of dry DMF, was added potassium carbonate (179 mg, 1.3 mmol, 1.1 equiv.) and 2-nitrobenzyl bromide (518 mg, 2.4 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was stirred at 80°C temperature overnight. After cooling to room temperature, the reaction mixture was concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane Ethyl Acetate 95:5) afforded a slight yellow oil (455 mg, 0.96 mmol, 80%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.27 (s, 1H), 8.18 (m, 2H), 7.79 (m, 2H), 7.56 (m, 1H), 5.57 (s, 2H) 3.35 (s, 3H), 3.29 (s, 1H), 2.06 (s, 1H), 2.01 – 1.63 (m, 12H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 188.4, 157.4, 146.6, 142.9, 139.1, 134.3, 133.7, 132.9, 130.2, 129.7, 128.8, 128.5, 126.5, 125.0, 73.5, 57.6, 39.2, 39.1, 38.7, 38.6, 37.0, 33.0, 29.8, 28.3, 28.2. HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{ClNO}_5^+$ ([M+H]): 468.1578, found: 468.1562.

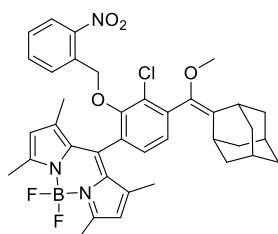
Compound 217



Aldehyde **216** (455 mg, 1.2 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 90 mL of dry DCM, under argon, in dark conditions and the solution was deoxygenated by bubbling argon in the solution for 20 minutes. Then, 2,4-dimethylpyrrole (199 mg, 2.1 mmol, 0.171 mL, 2.2 equiv.) and one drop of trifluoroacetic acid were added and the reaction mixture was stirred until completion of the reaction. Vapor of bromine was used to stain the formation of the desired compound (pink spot). Then the reaction mixture was treated with deionized water several times, dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane AcOEt TEA 90:10 0.1%) afforded dipyrromethene **217** as a yellow powder (532 mg, 1.03 mmol, 86%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (m, 2H), 7.72 (m, 1H), 7.53 (bs, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.05 (s, 2H), 5.64 (m, 3H), 4.98 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.32 (bs, 1H), 2.16 (bs, 1H), 2.10 (bs, 6H), 2.00-1.70 (m, 18H).

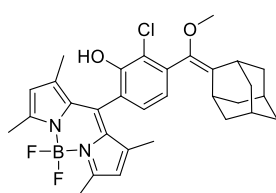
Compound 218



Dipyrromethane **217** (390 mg, 0.61 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 25 mL of dry toluene, in dark conditions, with DDQ (272 mg, 1.2 mmol, 2 equiv). Then after the completion of the oxidation, triethylamine (1700 mg, 17.08 mmol, 2.1 mL, 28 equiv) was added at 0°C and the reaction mixture was stirred for around 15 minutes. Then $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (2066 mg, 14.64 mmol, 1.7 mL, 24 equiv.) was added slowly at 0°C and the reaction mixture was heated to 80°C overnight. Then the reaction mixture was treated with deionized water several times, dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO_2 , cyclohexane AcOEt 80:20) afforded bodipy **218** as a red solid (140 mg, 0.195 mmol, 32%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 5.96 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.32 (bs, 1H), 2.49 (s, 6H), 2.08 (s, 1H), 2.00-1.70 (m, 12H), 1.57 (s, 3H), 1.55 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 152.7, 145.8, 142.2, 142.1, 139.2, 137.6, 136.1, 134.0, 133.7, 132.3, 131.2, 131.1, 129.9, 129.7, 128.5, 127.9, 127.8, 127.4, 124.5, 121.6, 71.8, 57.0, 47.1, 39.1, 39.0, 38.6, 38.5, 37.0, 33.3, 29.7, 28.3, 28.2, 14.6, 14.2, 14.0. HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{BClF}_2\text{N}_3\text{O}_4^+$ ([M+H]): 686.2768, found: 686.2670.

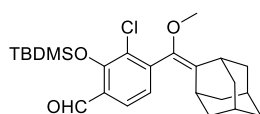
Compound 219



Protected phenol **218** (140 mg, 0.2 mmol, 1 equiv) was dissolved in 50 mL of DCM, with formic acid (9.4 mg, 0.2 mmol, 7 μ L, 1 equiv). The reaction mixture was stirred in a photo-reactor under UV illumination (380 nm) from 12 light bulbs. The reaction was monitored by TLC (DCM). Then the reaction mixture was concentrated under vacuum. Purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane DCM 20:80) afforded phenol **219** as a red solid (35 mg, 0.06 mmol, 30 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.08 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.00 (s, 2H), 5.88 (s, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.31 (s, 1H), 2.55 (s, 6H), 2.07 (bs, 1H), 2.01 – 1.69 (m, 12H), 1.53 (bs, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 155.9, 148.8, 142.3, 139.2, 135.9, 135.8, 132.3, 131.1, 127.4, 124.5, 121.9, 121.5, 121.3, 56.9, 39.0, 38.6, 37.0, 33.2, 29.6, 28.2, 26.9, 14.6, 13.7. HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₃₁H₃₄BClF₂N₂NaO₂⁺ ([M+Na⁺]): 573.2268, found: 573.2283.

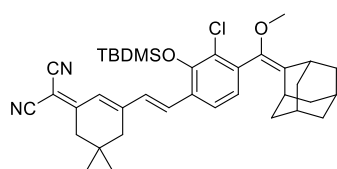
Compound 213



To a solution of aldehyde **96** (400 mg, 1.2 mmol, 1 equiv.) in 5 mL of dry dichloromethane were added imidazole (163 mg, 2.4 mmol, 2 equiv.), and the *tert*-butyldimethylsilyl chloride (361 mg, 2.4 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for approximately 1 hour until completion (monitored by TLC). The white precipitate was filtered off and the organic layer was washed twice with a 1 M sodium hydroxide solution, washed twice with deionized water, dried over MgSO₄ and evaporated. Purification by column chromatography (SiO₂, cyclohexane DCM 70:30) afforded compound **213** as a yellow oil (320 mg, 0.71 mmol 60%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 10.38 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 0.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.32 (m, 1H), 2.09 (m, 1H) 1.87 (m, 12H) 1.12 (s, 9H), 0.30 (s, 3H), 0.29 (s, 3H). HRMS (ESI⁺) *m/z*: calcd. for C₂₅H₃₆ClO₃Si⁺ ([M-H]): 447.2122, found: 447.2125.

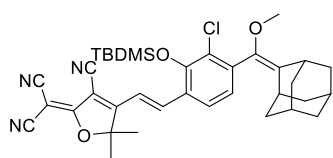
Compound 221



Under argon in 6 ml of dry acetonitrile with 3A molecular sieves, aldehyde **213** (100 mg, 0.22 mmol, 1 equiv) was engaged with dicyanoisophorone **161** (50 mg, 0.27 mmol, 1.1 equiv), triethylamine (27 mg, 0.27 mmol, 36 μ L, 1.1 equiv) and a catalytic amount of piperidine (2 mg, 0.022 mmol, 2 μ L, 0.1 equiv). The reaction mixture was stirred and heated to reflux and monitored by TLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. Purification by column chromatography (SiO₂, Cyclohexane DCM 80:20) afforded compound **221** as a yellow solid (50 mg, 0.099 mmol, 45 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.27 (s, 1H), 2.62 (s, 2H), 2.46 (s, 2H), 2.06 (s, 1H), 1.85 - 1.75 (m, 12H), 1.08 (s, 6H), 1.07 (s, 9H), 0.23 (s, 6H).

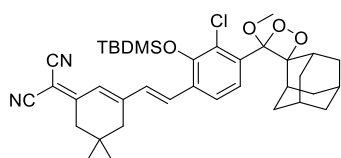
Compound 224



Compound **224** was synthesized according to the same procedure described for **221** from the aldehyde **213** (100 mg, 0.22 mmol, 1 equiv) with the compound **220** (54 mg, 0.26 mmol, 1 equiv), triethylamine (27 mg, 0.27 mmol, 36 μ L, 1.1 equiv) and a catalytic amount of piperidine (2 mg, 0.022 mmol, 2 μ L, 0.1 equiv) to afford a brown solid (40 mg, 0.063 mmol 29 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 16.6 Hz, 7H), 3.33 (s, 3H), 3.27 (s, 1H), 2.04 (s, 1H), 1.86-1.75 (m, 12H), 1.79 (s, 6H), 1.07 (s, 9H), 0.24 (s, 6H).

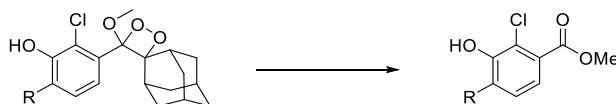
Compound 225



Enol ether **221** (25 mg, 0.05 mmol, 1 equiv) was engaged in 5 mL of DCM and a catalytic amount of methylene blue was added (0.805 mg, 0.005 mmol, 0.1 equiv). The reaction mixture was stirred and irradiated with filtered white light (high-pass filter 550 nm). The reaction was monitored by UHPLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment and the purification by column chromatography (SiO_2 , Cyclohexane DCM 80:20) afforded dioxetane **225** as a yellow oil (6 mg, 0.012 mmol 25%).

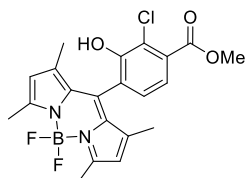
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.01 (s, 1H), 2.63 (s, 2H), 2.55 (s, 1H), 2.46 (2H), 2.20 – 1.57 (m, 12H), 1.54 (s, 6H), 1.26 (s, 9H), 1.08 (s, 6H).

General Procedure:



The dioxetane compound was diluted in a mixture of DMSO PBS buffer at 0.01 M, pH 11.6 (8:2) and stirred at room temperature. The reaction was monitored by TLC. Then the reaction mixture was concentrated under vacuum without treatment. The final compound was isolated through a column chromatography with (SiO_2 , cyclohexane DCM 20: 80).

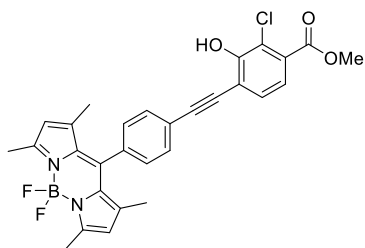
Compound 227



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.55 (s, 6H), 1.51 (s, 6H).

HRMS (ESI⁺) m/z : calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_3^+$ ($[\text{M}+\text{H}]$): 433.1302, found: 433.1313. UHPLC-MS (ESI⁺) (System B) t_r (min), relative area (%), m/z : 5.71, 95.00, 431.2 $[\text{M}-\text{H}]$.

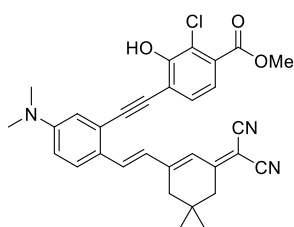
Compound 228



$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.71 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.00 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 2.56 (s, 6H), 1.43 (s, 6H).

HRMS (ESI $^-$) m/z : calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_3^-$ ([M+H]): 531.1464, found: 531.1545. UHPLC-MS (ESI $^-$) (System B) t_r (min), relative area (%), m/z : 7.6, 95.00, 531.1 [M-H].

Compound 229



$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.75 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J = 9.0, 2.8$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.07 (s, 6H), 2.58 (s, 2H), 2.52 (s, 2H), 1.08 (s, 6H).

HRMS (ESI $^+$) m/z : calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{ClN}_3\text{O}_3^+$ ([M+H]): 526.1897, found: 526.1892. UHPLC-MS (ESI $^+$) (System B) t_r (min), relative area (%), m/z : 6.76,

92.0, 524.4 [M-H].

Résumé :

L'avènement de la « médecine personnalisée » va de pair avec l'émergence de techniques d'imagerie moléculaire permettant d'accroître la compréhension des nombreux processus biologiques. Dans cette perspective, l'imagerie optique connaît un succès non-négligeable compte tenu de sa facilité d'accès, son caractère non invasif ainsi que son faible coût. Ainsi, dans le domaine de l'imagerie optique l'utilisation de biomarqueurs fluorescents est la plus populaire pour les chimobiologistes et les biologistes. Les sondes chimiluminescentes se distinguent étant donné leur habilité à augmenter le rapport signal sur bruit grâce à l'absence d'excitation photonique. Ces trois dernières décennies, le développement des sondes 1,2-dioxétane a permis d'augmenter le champ de détection par la chimiluminescence, initialement restreint aux espèces oxygénées réactives. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le développement de différentes stratégies de conceptions de sonde 1,2-dioxétane chimiluminescentes pour la détection de l'activité enzymatique. Trois axes ont été développés dans l'optique d'obtenir une sonde efficace pour une application *in vivo*. Le premier propose une synthèse originale d'une sonde chimiluminescente fonctionnalisée par un complexe d'euprécium. Le second axe est fondé sur le processus de transfert d'énergie à travers les liaisons vers un fluorophore efficace. Enfin, le troisième et dernier axe explore la possibilité de modifier directement la structure de la plateforme chimiluminescente afin d'étendre son système de délocalisation des électrons.

Mots clés : Chimiluminescence, 1,2-dioxétane, complexe de lanthanide, transfert d'énergie, détection d'activité enzymatique

Abstract :

The personalized medicine advent is correlated with the emergence of molecular bioimaging techniques increasing the understanding of many biological processes. In this field, optical imaging is particularly interesting thanks to its non-invasive characteristic, its low cost, and its ease of access. In this field, fluorescent probes are the most popular but chemiluminescent probes are distinguished by their better ratio signal to noise. The development of 1,2-dioxetane probes allowed to increase the detection ability which was first restricted to reactive oxygen species. This PhD thesis is part of the development of different strategies of 1,2-dioxetane probe conception for enzymatic activity detection. Three approaches of chemiluminescent probe conception for *in vivo* application are described in this manuscript. First, an original approach describes the synthesis of a chemiluminescent platform, functionalized with a lanthanide complex. Then, the possibility to enhance the chemiluminescence efficiency through TBET process to another fluorophore is reported. Finally, the direct modification of the phenol core to tune its photophysical properties by extending the electron delocalization is detailed.

Keywords: Chemiluminescence, 1,2 dioxetane, lanthanide complex, energy transfer, activity-based probes