



HAL
open science

Synthèse et évaluation de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire du peroxyde d'hydrogène

Blaise Gatin-Fraudet

► **To cite this version:**

Blaise Gatin-Fraudet. Synthèse et évaluation de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire du peroxyde d'hydrogène. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASF023 . tel-04224298

HAL Id: tel-04224298

<https://theses.hal.science/tel-04224298>

Submitted on 2 Oct 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.

Synthèse et évaluation de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire du peroxyde d'hydrogène

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 571 : sciences chimiques : molécules, matériaux,
instrumentation et biosystèmes (2MIB)
Spécialité de doctorat : Chimie
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 16/10/2020, par

Blaise GATIN-FRAUDET

Composition du Jury

Laurent MICOUIN Directeur de recherche, Université Paris-Descartes	Président
Mayeul COLLOT Chargé de recherche, Université de Strasbourg	Rapporteur & Examineur
Nicolas DELSUC Chargé de recherche, ENS-PSL	Rapporteur & Examineur
Frédéric TARAN Directeur de recherche, CEA	Examineur
Dominique URBAN Chargée de recherche, Université Paris-Saclay	Directrice de thèse
Boris VAUZEILLES Directeur de recherche, Institut de Chimie des Substances Naturelles	Co-Directeur
Marie ERARD Professeure, Université Paris-Saclay	Invitée

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de thèse, Boris, pour m'avoir proposé ce sujet. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, toujours fortement enrichissantes. Ensuite, je voudrais remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, Dominique. Je te remercie pour tes conseils et ta disponibilité tout au long de ces trois années de thèse. Je pense que la recherche est avant tout une aventure collective, j'ai été très heureux de pouvoir la commencer avec toi.

Mes remerciements vont aussi à Dominique G. Merci pour tes nombreux conseils avisés. Scientifiquement et humainement, j'ai beaucoup grandi grâce à toi.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer les travaux que j'ai réalisés durant ma thèse : les Drs Mayeul Collot, Nicolas Delsuc, Frédéric Taran et Laurent Micouin et le Pr Marie Erard. Plus particulièrement, je tiens à les remercier pour leurs remarques et les différentes discussions scientifiques durant ma soutenance. Enfin, malgré les circonstances actuelles, je suis reconnaissant d'avoir pu soutenir en présentiel, cela a grandement facilité les échanges pendant la soutenance.

Je tiens également à remercier le Pr Ludovic Jullien et le Dr Thomas Le Saux pour leur aide et leur disponibilité lors de mes venues à l'ENS Ulm pour effectuer les études cinétiques. Je voudrais à nouveau remercier le Pr Marie Erard, de m'avoir suivi tout au long mon parcours universitaire en magistère ; puis lors de ma thèse en faisant partie de mon comité de suivi ; mais aussi, pour son aide avec les tests *in cellula* sur des bêtes de cirque (de leur petit nom COS7^{gp91-p22}). Enfin, je voudrais remercier le Dr Mathieu Pucheault d'avoir accepté de m'accueillir dans son équipe et le Dr Laurent Chabaud qui m'a encadré là-bas. Cette semaine m'a permis d'avoir une autre vision de la chimie du Bore.

Je remercie également Elise et Mathilde qui ont contribué à ce projet, et que j'ai eu plaisir à encadrer. Mathilde, j'espère t'avoir transmis la passion des boriniques, la suite est dans tes mains !

Pour leur aide durant mon monitorat à l'IUT je voudrais aussi remercier Valérie Declerck et Bruno Beda, ce fut une expérience extrêmement enrichissante.

Merci à Jean-Pierre Baltaze et Amandine Dos Santos pour leur aide et leur disponibilité avec les spectromètres RMN.

Je tiens à remercier les autres membres de l'équipe : Yann pour notre trafic de bande-dessinées et les discussions qui en suivaient au café, Gilles pour nos nombreuses discussions scientifiques ou non, Ludovic pour ton enthousiasme à partager tes expériences cinématographiques ou musicales. Enfin,

je remercie tous les docteurs ou futurs docteurs que j'ai côtoyé pendant ces trois années : Emilie, ma super voisine de paillasse, Karine, sauveuse d'oiseau et grimpeuse aguerrie, et enfin Océane et Dan.

Enfin, je tiens à remercier mes amis qui m'ont soutenu pendant ces trois années. Les bons moments que nous avons partagé ont beaucoup compté pour moi. Je remercie plus particulièrement Anthony et Julien, pour nos nombreuses échappées sportives souvent entrecoupées de discussions fortement réconfortantes.

Marie je te remercie pour ton aide, ton écoute, sans toi je n'aurais pas été aussi loin.

Pour finir, j'adresse tous mes remerciements à mes parents, ma tante, mon frère mais aussi à Anne-Marie et Pierre sans vous je n'aurais pas eu ce parcours.

ABRÉVIATIONS ET ANGLICISMES

4-MU : 4-méthylumbelliférone

ADN : acide désoxyribonucléique

AMC : 7-amino-4-méthylcoumarine

ATP : *acyl thioesterase protein* pour protéines acyl-thioestérase

BODIPY : 4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene

BSO : L-buthionine sulphoximine

CAT : catalase

DCF : dichlorofluorescéine

DCM : dicyanométhylène-4H-pyrane

DFT : *density functional theory* pour théorie de la fonctionnelle de la densité

DICAB : dicyclohexylaminoborane

DIPAB : diisopropylaminoborane

DPP : dicétopyrrolopyrrole

Dtbbpy : 4,4'-Di-*tert*-butyl-2,2'-dipyridyl

EGF : *epidermal growth factor* pour facteur de croissance épidermique

FRET : *förster resonance energy transfer* pour transfert d'énergie par résonance de type Förster

FRN : formes réactives de l'azote

FRO : formes réactives de l'oxygène

GFP : *green fluorescent protein* pour protéine fluorescente verte

GPx : glutathion peroxydase

GSH : glutathion (forme réduite)

GS-SG : forme oxydée du glutathion

H₂DCF : dihydrodichlorofluorescéine

H₂DCFDA : dihydrodichlorofluorescéine diacétate

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HOMO : *highest occupied molecular orbital* pour la plus haute orbitale moléculaire occupée

HRP : *horseradish peroxidase* pour peroxydase de raifort

ICP : Institut de Chimie-Physique de l'Université Paris-Saclay

ICT : *induced-charge transfer* ou transfert de charge photoinduit

IPR : *N,N'*-bis(2,6-diisopropylphényl)imidazol-2-ylidene

LPS : lipopolysaccharide

LTR : LysoTracker Red DND99

LUMO : *lowest unoccupied molecular orbital* pour la plus basse orbitale moléculaire vacante

MPO : myéloperoxydase

MTD : Mitotracker Deep Red

NHC : *N-heterocyclic carbene* pour carbène *N*-hétérocyclique

PBS : *phosphate buffer solution* pour solution tampon phosphate

PeT: *photo-induced electron transfer* pour transfert d'électron photoinduit

Pin : pinacol

PMA : phorbol 12-myristate 13-acétate

SD : sans dimension

SOD : superoxydes dismutases

TEG : triéthylène glycol

TMR : tétraméthylrhodamine

Xa : xanthine

XOD : xanthine oxydase

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : DÉTECTION DU H ₂ O ₂ À L'AIDE DE SONDES FLUOROGÉNIQUES	7
I. Les formes réactives de l'oxygène	9
1. Origine et formation.....	9
2. Systèmes antioxydants régulateurs	10
3. Le peroxyde d'hydrogène, une FRO à part.....	11
II. Les sondes fluorescentes pour la détection de H ₂ O ₂	12
1. Généralités sur la fluorescence	12
a) Diagramme de Perrin-Jablonski.....	12
b) Paramètres photophysiques de fluorescence.....	13
c) Les fluorophores organiques.....	15
2. Pro-fluorescence	17
a) Principe	17
b) Modulations de la fluorescence	18
III. Sondes organiques pour la détection de H ₂ O ₂	22
1. Sondes fluorogéniques à activation enzymatique	22
2. Amorce sulfonyle.....	25
3. Amorces basées sur l'utilisation du phosphore, du carbone ou des chalcogènes	29
a) Amorce phosphine	29
b) Sonde fluorogénique basée sur l'oxydation d'un atome de carbone	31
c) Amorce sulfure	33
d) Amorce à base de sélénium	34
e) Amorce à base de tellure.....	38
4. Amorce dicétone	40
5. Amorce boronique	44
a) Lien direct	45
b) Liaison via un bras auto-immolable :	52
6. Conclusions et remarques	61
7. Description du projet de thèse	62

CHAPITRE 2 : ÉLABORATION D'UNE SONDE FLUOROGÉNIQUE BASÉE SUR UNE AMORCE BORINIQUE.....	65
I. Les acides arylboriniques : rappels bibliographiques.....	67
1. Synthèses des acides arylboriniques symétriques.....	68
2. Synthèses des acides arylboriniques dissymétriques	73
3. Applications des acides arylboriniques.....	75
a) Catalyseurs acides.....	75
b) Réductions	81
c) C-H activation:.....	82
d) Partenaires dans les réactions de couplages croisés.....	84
e) Applications biologiques :	86
II. Synthèse d'une sonde à amorce borinique :	89
1. Étude préliminaire :	89
a) Étude de la réactivité de l'acide phénylborinique vis-à-vis du H ₂ O ₂ :.....	89
b) Étude de la réactivité des esters boriniques :	91
2. Synthèse et études d'une sonde fluorogénique à amorce borinique symétrique	94
3. Synthèse et étude d'une sonde fluorogénique à amorce borinique dissymétrique	97
a) Synthèse	97
b) Étude cinétique d'oxydation par H ₂ O ₂ comparative des acides boriniques 41 et 42	101
c) Détermination des constantes de vitesses relatives à l'oxydation de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42 par H ₂ O ₂	104
d) Tests de sélectivité des acides boriniques 41 et 42 vis-à-vis d'autres FRO	112
e) Évaluation des sondes 41 et 42 in cellula	117
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA RÉGIOSÉLECTIVITÉ DES AMORCES BORINIQUES ET APPLICATION À LA SYNTHÈSE DE NOUVELLES SONDES FLUOROGÉNIQUES..	123
I. Études et synthèses d'acides arylboriniques dissymétriques modèles	125
1. Synthèse d'acides arylboriniques dissymétriques modèles	125
a) Synthèse des acides arylboriniques dissymétriques 43 à 50 :.....	126
b) Synthèse des acides arylboriniques dissymétriques 58 et 59 :.....	129
2. Étude de la réactivité des acides arylboriniques dissymétrique vis-à-vis du H ₂ O ₂	131

II.Synthèse des nouvelles sondes possédant un groupement o-CF ₃ Ph.....	136
1.Lien direct.....	136
a) Synthèse.....	136
b) Étude de la régiosélectivité de l'acide borinique 64 :.....	137
c) Tests de sélectivité de l'acide borinique 64	139
2.Synthèse de sondes possédant un bras auto-immolable.....	140
a) Synthèses et études de sondes possédant un espaceur auto-immolable éther :	140
b) Synthèse de sondes possédant un espaceur auto-immolable carbamate :.....	147
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	155
EXPERIMENTAL SECTION	163
I.Synthesis.....	165
1.Arylborinic acids.....	166
2.Coumarins.....	178
3.Probes with self immolative spacers.....	187
II. ¹ H NMR experiments.....	200
III.Kinetic studies.....	211
IV.Selectivity tests.....	223
V.Cellular assays	226
RÉFÉRENCES.....	229

**CHAPITRE 1 : DÉTECTION DU
H₂O₂ À L'AIDE DE SONDÉS
FLUOROGÉNIQUES**

CHAPITRE 1 : DÉTECTION DU H₂O₂ À L'AIDE DE SONDES FLUOROGÉNIQUES

Ce premier chapitre sera consacré à la présentation de différents rappels bibliographiques sur les formes réactives de l'oxygène (FRO), sur le principe de fluorescence et les caractéristiques photophysiques des agents fluorescents. Enfin, les différents types de sondes organiques permettant la détection du peroxyde d'hydrogène seront aussi présentés.

I. Les formes réactives de l'oxygène

1. Origine et formation

Tous les organismes aérobies tels que les animaux, les plantes ou encore les bactéries ont besoin d'énergie pour assurer leur fonctionnement physiologique. Chez les animaux par exemple, l'énergie provient du catabolisme des aliments d'une part et de la chaîne respiratoire d'autre part. Ces deux phénomènes sont liés par l'utilisation du dioxygène, qui sert comme accepteur final des électrons à la fois pour oxyder des substrats provenant des résidus alimentaires et lors du transfert électronique de la chaîne respiratoire.

Néanmoins, un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire peut aboutir à la formation d'espèces partiellement réduites de l'oxygène, les formes réactives de l'oxygène (FRO). Il est estimé qu'environ 0,5% du dioxygène consommé est ainsi réduit de manière incomplète, conduisant à la formation de ces espèces.¹

L'anion superoxyde O₂^{-•}, issu d'une seule réduction mono-électronique du dioxygène, est la première FRO. Celle-ci se dismute spontanément en milieu physiologique pour donner le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, forme la plus stable des FRO (k = 2 × 10⁵ M⁻¹.s⁻¹).² En présence de cations métalliques comme le Fe²⁺, le peroxyde d'hydrogène peut à son tour réagir via la réaction de Fenton, pour produire le radical hydroxyle HO[•]. Enfin, ce dernier est réduit en présence d'une molécule d'eau (**Schéma 1**).

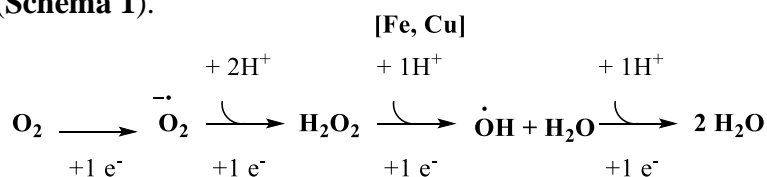


Schéma 1 : Formation des principales FRO produites lors de la chaîne respiratoire

¹ A.-C. V. Bayne, R. J. Mockett, W. C. Orr, R. S. Sohal, *Biochem. J.* **2005**, *391*, 277-284.

² C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, J. H. Livesey, A. J. Kettle, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39860-39869.

2. Systèmes antioxydants régulateurs

Les FRO sont particulièrement réactives et toxiques à cause de leur potentiel d'oxydoréduction élevé (**Tableau 1**). Ainsi, le radical hydroxyle est par exemple capable de réagir avec les acides nucléiques, les lipides ou encore les protéines.^{3,4}

Espèces	O ₂ ⁻	H ₂ O ₂	HO·
Potentiel d'oxydoréduction (V)	0.94	0.38	2.33
τ _{1/2} (s)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁹
Concentration <i>in vivo</i> (mol.L ⁻¹)	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁵

Tableau 1 : Propriétés et réactivités des principales FRO

Pour limiter les dommages causés par ces espèces, la plupart des formes de vie aérobies possède deux jeux de systèmes antioxydants. Le premier type de protection utilise des systèmes enzymatiques :

- les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes catalysant la dismutation (ou dismutation) de l'anion superoxyde O₂⁻ en peroxyde d'hydrogène. Leur action est couplée à celle d'autres enzymes qui décomposent le H₂O₂ comme la catalase ou la glutathion peroxydase.

- la catalase (CAT) est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène. Elle est localisée principalement dans le cytoplasme et également dans les peroxysomes, petites structures sphériques délimitées par une membrane lipidique présentes dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

- la glutathion peroxydase (GPx), une séléno-enzyme, qui décompose H₂O₂ en accélérant la réaction d'oxydation du glutathion (forme oxydée GS-SG) par le H₂O₂.

Le second système antioxydant fait intervenir des espèces non enzymatiques comme les vitamines A, E, C, la bilirubine, l'ubiquinone ou encore le glutathion, pseudo tripeptide possédant une fonction thiol qui pourra être oxydée (GS-SG) et qui est le cofacteur de GPx.

Une régulation fine de l'équilibre entre la production des FRO et les systèmes antioxydants est nécessaire au bon fonctionnement physiologique de l'organisme. En cas de dérégulation intense ou prolongée de ce système, les FRO peuvent s'accumuler dans les cellules et entraîner un dysfonctionnement pathologique responsable du stress oxydant. Pris séparément, ces effets

³ E. R. Stadtman, *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1250-1258.

⁴ S. Kanvah, J. Joseph, G. B. Schuster, R. N. Barnett, C. L. Cleveland, U. Landman, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 280-287.

néfastes peuvent être traités, mais un stress oxydant prolongé entraîne une accumulation irréversible des dommages, responsables à terme du vieillissement cellulaire ainsi que des maladies qui lui sont liées comme des maladies neurodégénératives, des diabètes ou encore des cancers.⁵

3. Le peroxyde d'hydrogène, une FRO à part

Parmi les principales FRO, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle particulier. Il est celui qui est présent en plus grande quantité et le plus stable (**Tableau 1**). Malgré sa toxicité intrinsèque, il est aussi impliqué dans de nombreux processus physiologiques en tant que :

- messenger secondaire de signaux en réponse à des stimuli de croissance ou de stress.⁶
- modulateur d'activité protéique via l'oxydation réversible de cystéines au sein des protéines. En effet, la formation des liaisons disulfures induit un changement conformationnel des protéines qui module l'activité de celles-ci.⁷
- partenaire de la réponse immunitaire. Dans un environnement inflammé, les macrophages produisent de larges quantités de FRO ($[H_2O_2]_{in vivo}$ jusqu'à 100 μM) permettant la dégradation des agents pathogènes extérieurs.⁸ De même, le H_2O_2 sert de déclencheur à la cicatrisation en favorisant la prolifération de cellules endothéliales, de fibroblastes et de kératinocytes, qui vont respectivement former les vaisseaux sanguins, le derme et l'épiderme.⁹

Ces processus sont possibles car le peroxyde d'hydrogène est capable de diffuser rapidement depuis son site de production dans ou à la surface de la cellule vers des cellules voisines permettant ainsi une communication intercellulaire essentielle.

Ainsi le double jeu des FRO et particulièrement celui du H_2O_2 a suscité l'intérêt de nombreux laboratoires qui tentent à présent d'élucider leurs rôles et leurs degrés d'implications dans les processus physiologiques et pathologiques.

⁵ M. P. Mattson, *Nature* **2004**, 430, 631-639.

⁶ M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44-84.

⁷ S. G. Rhee, K.-S. Yang, S. W. Kang, H. A. Woo, T.-S. Chang, *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, 7, 619-626.

⁸ E. Rendra, V. Riabov, D. M. Mossel, T. Sevastyanova, M. C. Harmsen, J. Kzhyshkowska, *Immunobiology* **2019**, 224, 242-253.

⁹ S. Schreml, M. Landthaler, M. Schaferling, P. Babilas, *Exp. Dermatol.* **2011**, 20, 229-231.

II. Les sondes fluorescentes pour la détection de H₂O₂

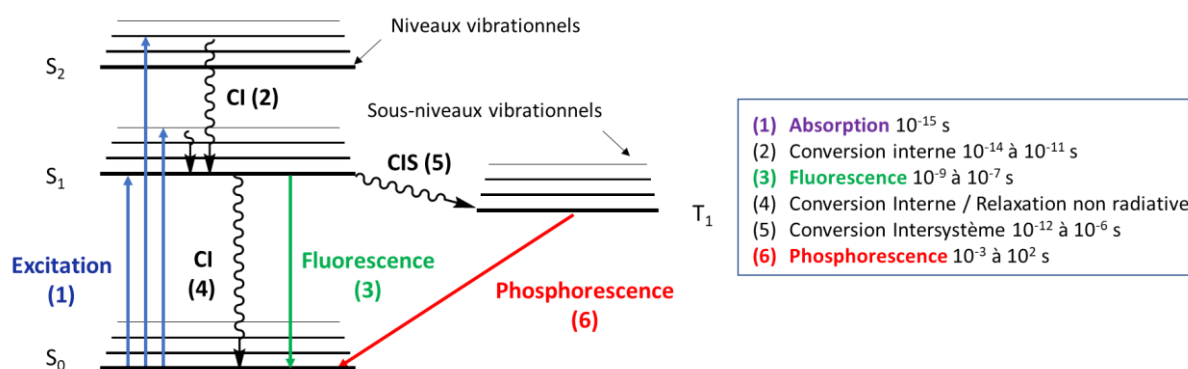
L'imagerie optique et en particulier la fluorescence présentent plusieurs avantages pour l'étude des FRO dans l'organisme comme une étude non-invasive avec une grande résolution spatiale et temporelle. Au cours de ces dernières années, de très nombreuses sondes fluorescentes ont été développées et ont permis une meilleure compréhension des différents phénomènes dans lesquels le peroxyde d'hydrogène est impliqué.

Avant de détailler les principales sondes développées dans le domaine ces dernières années, un bref rappel du principe de fluorescence et des caractéristiques des agents fluorescents est présenté dans la partie suivante.

1. Généralités sur la fluorescence

a) Diagramme de Perrin-Jablonski

La fluorescence est un phénomène particulier de photoluminescence. Ces phénomènes regroupent tous les processus impliquant une excitation par un ou plusieurs photons d'une espèce (un atome ou une molécule) suivie d'une émission lumineuse lors de sa désexcitation. Ces mécanismes peuvent être explicités à l'aide d'un diagramme de Perrin-Jablonski,¹⁰ qui représente l'ensemble des processus photophysiques ayant lieu entre les différents états quantiques vibrationnels pour une espèce donnée (**Figure 1**).



*Figure 1 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié
Les divers processus radiatifs ou non-radiatifs sont donnés avec leur temps caractéristique¹⁰*

Tout d'abord, l'absorption d'un ou plusieurs photons par une molécule induit un changement d'état, de son état fondamental (S₀) vers un état excité (S_n) (1). En revanche, celle-ci peut avoir uniquement lieu si l'énergie due au rayonnement correspond exactement à la différence

¹⁰ M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*, WILEY-VCH, 2011.

énergétique entre deux niveaux énergétiques de l'espèce à exciter. L'ensemble des transitions d'une molécule constitue son spectre d'absorption.

Si une molécule se trouve dans un état excité autre que (S_1), très rapidement (10^{-14} à 10^{-11} s), la molécule revient à son premier état excité (S_1) par relaxation vibrationnelle, aussi appelée conversion interne (2). L'énergie perdue est alors réémise sous forme de chaleur.

Une fois l'état S_1 atteint, le retour de la molécule à l'état fondamental (S_0) peut avoir lieu de trois manières différentes : soit par émission de lumière (processus radiatif), c'est-à-dire par fluorescence (3), soit par conversion interne (4) c'est-à-dire sans émission lumineuse (relaxation non radiative) ou par une conversion intersystème (5). Ce dernier processus implique un changement d'état de spin (passage d'un état excité singulet S_1 vers un état triplet T_1 par exemple). Ces transitions sont interdites donc peu probables, les règles de sélections prohibant un changement de spin au cours d'une transition. Lorsqu'une molécule est dans l'état excité T_1 , celle-ci peut alors retourner dans l'état S_0 soit par conversion intersystème puis relaxation radiative (fluorescence retardée), soit directement par relaxation radiative (phosphorescence (6)). Dans le dernier cas, la transition est interdite car elle implique un changement de spin. Ainsi, la phosphorescence est une émission de longue durée (de quelques millisecondes à la dizaine de secondes après l'extinction de la source lumineuse) alors que la fluorescence est une émission de très courte durée (quelques nanosecondes à la centaine de nanosecondes après l'extinction de la source lumineuse).

b) Paramètres photophysiques de fluorescence

Chaque composé fluorescent possède différents paramètres photophysiques qui lui sont propres.¹¹ Ainsi un fluorophore possède un spectre d'absorption, caractérisé par une ou plusieurs longueurs d'onde d'absorptions maximales notées dans ce manuscrit λ_{abs} (nm). De la même manière, son spectre d'émission est obtenu après excitation à une longueur d'onde d'excitation notée λ_{ex} (nm) précise et est caractérisé par une ou plusieurs longueurs d'onde d'émissions maximales λ_{em} (nm). D'autres paramètres sont importants pour la caractérisation d'un fluorophore :

- le **déplacement de Stokes** noté $\Delta\lambda$ (cm^{-1} ou nm), qui correspond à la différence entre les longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximale d'un fluorophore. Pour obtenir une détection de fluorescence optimale, la différence entre la longueur d'onde d'excitation et

¹¹ J. R. Lakowicz, *Principles Of Fluorescence Spectroscopy*, New York, NY: Springer, 2006.

d'émission doit être significative. Ainsi, il est préférable que le fluorophore possède un déplacement de Stokes de plus de 50 nm.

- le **coefficient d'absorption molaire** ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$) qui caractérise la capacité d'un composé à absorber la lumière. L'absorbance est reliée à ce coefficient via la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon.l.[C]$ avec A l'absorbance (sans dimension, SD), l la longueur du trajet optique (cm) et $[C]$ la concentration du composé ($mol.L^{-1}$ ou M).

- le **temps de vie de fluorescence** τ (s) qui correspond au temps moyen de résidence d'un électron dans l'état excité avant son retour à l'état fondamental. Il permet de déterminer la fenêtre temporelle où il est possible d'observer efficacement l'émission de lumière. Par exemple, le temps de vie de (S_1) est généralement de l'ordre de la nanoseconde. La dépopulation d'un niveau excité par les processus radiatifs et non radiatifs suit une loi exponentielle dont τ est le temps caractéristique et dont le déclin de l'intensité de fluorescence peut s'écrire : $I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$ où $\tau = \frac{1}{K_r + K_{nr}}$ avec K_r la constante de désexcitation radiative et K_{nr} la constante de désexcitation non radiative.

- le **rendement quantique** Φ_F (SD) qui correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par une entité fluorescente. Il permet d'évaluer la proportion des phénomènes radiatifs durant la désexcitation d'une molécule. Autrement dit, il permet d'évaluer l'intensité de l'émission d'un fluorophore. Il s'écrit : $\Phi_F = \frac{N_{photons\ emis}}{N_{photons\ reçus}}$ avec $0 < \Phi_F < 1$; une autre écriture permet de relier le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence τ : $\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \tau k_r$

- la **brillance** B ($M^{-1}.cm^{-1}$) qui permet de relier les capacités d'absorption et d'émission d'un fluorophore. Elle s'écrit $B = \Phi_F.\epsilon$; c'est le paramètre photophysique le plus adapté pour comparer deux fluorophores entre eux.

Au-delà des caractéristiques photophysiques d'un fluorophore, d'autres paramètres sont à prendre en compte pour l'utilisation d'un fluorophore. Divers facteurs peuvent influencer les propriétés intrinsèques d'un fluorophore. En premier lieu, c'est la **structure moléculaire** qui donne aux fluorophores la plupart de leurs propriétés. Le plus souvent, les fluorophores sont des molécules aromatiques conjuguées. Par exemple, l'augmentation de la conjugaison π au sein de la structure permet généralement de déplacer les longueurs d'ondes d'absorption vers le rouge.

Le solvant, et plus précisément **la polarité d'un solvant**, influence fortement les propriétés photophysiques d'un fluorophore en modifiant les niveaux énergétiques de ce dernier.

De plus, la **photostabilité**, c'est-à-dire la capacité d'une molécule fluorescente à subir de nombreuses excitations lumineuses sans perte de signal de fluorescence est essentielle dans le choix d'un fluorophore.

Enfin, dans le cas d'études *in cellula*, réalisées en milieu aqueux, l'**hydrosolubilité**, la **capacité à diffuser** à travers la membrane, la **toxicité** du fluorophore devront également être prises en considération. Lors des tests *in vivo*, en plus des critères précédemment énoncés, l'utilisation de fluorophores dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission sont dans le proche infrarouge est préférable. En effet, l'autofluorescence de certaines protéines, mais aussi les phénomènes de diffusion lors de la pénétration à travers les tissus biologiques sont des freins à l'utilisation de composés dont les propriétés optiques ne sont pas dans cette fenêtre spectrale. La *sous-partie* suivante sera consacrée à présenter différentes structures fluorescentes couramment utilisées pour détecter le peroxyde d'hydrogène.

c) *Les fluorophores organiques*

Au cours des vingt dernières années, l'utilisation des fluorophores organiques s'est intensifiée dans le cadre de la détection du peroxyde d'hydrogène (**Figure 2**).^{12, 13} Ils peuvent être classés en sept grandes familles en fonction de leurs structures :

- les composés **polyaromatiques**, comme le naphthalène, l'anthracène, tétracène ou encore le pyrène dont les émissions varient de l'ultraviolet au vert. Leur utilisation reste limitée par le caractère fortement hydrophobe de ce type de structure et par leur faible longueur d'onde d'émission.

- les **coumarines**, famille de composés naturels présentant le motif 2*H*-1-benzopyrane-2-one dont les émissions varient du bleu au vert lorsqu'elles sont substituées par des groupements électrodonneurs. Les deux représentants les plus utilisés sont la 4-méthylumbelliférone (4-MU) et la 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC).

- les **naphthalimides**, famille de composés synthétiques dont les émissions varient du bleu au jaune. La structure de ce type de composés est basée principalement sur un motif naphthalène

¹² J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973-984.

¹³ D.-J. Zheng, Y.-S. Yang, H.-L. Zhu, *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 625-651.

fonctionnalisés possédant un motif imide cyclique. Ils sont particulièrement sensibles à leur environnement (pH, viscosité, etc...).

- les **dérivés du xanthène**, famille de composés synthétiques dont le représentant le plus connu est la fluorescéine. La fluorescence de ce composé dépend fortement du pH et ce type de composés a une forte tendance au photoblanchiment. Pour pallier ces problèmes, de nombreuses structures dérivées ont été synthétisées comme les rhodamines, analogues aminés de la fluorescéine. Ces deux types de structures et leurs dérivés, dont les émissions varient du vert au jaune, ont permis de nombreuses études en milieu biologique et notamment pour la détection du H_2O_2 .

- les **oxazines**, l'une des plus anciennes familles de structures fluorescentes connues pour leurs émissions pouvant atteindre le proche infrarouge. En revanche, leur utilisation en milieu biologique a nécessité d'améliorer leur faible solubilité en milieu polaire. Par exemple, la résorufine est rarement utilisée.

- les **BODIPY** (ou *boron-dipyrrromethene*), famille de composés synthétiques possédant de nombreux avantages pour une application en milieu biologique. Tout d'abord, des modifications structurales permettent de modifier facilement leurs propriétés d'émission (du vert au proche infrarouge). De plus, leurs propriétés photophysiques sont insensibles à la polarité et au pH du milieu. Enfin, ils sont stables en milieu physiologique et ne photoblanchissent pas. En revanche, ce type de structure (BODIPY-FL ou du BODIPY-TR par exemple) possède une faible solubilité en milieu physiologique.

- les **cyanines**, famille de fluorophores synthétiques dont les propriétés d'émission vont du rouge au proche infrarouge avec une brillance élevée en milieu physiologique. Ces propriétés rendent ce type de fluorophore particulièrement adapté pour l'imagerie *in vivo*. Par exemple, la cyanine Cys5 possède une brillance de $50\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ avec des propriétés d'émission dans le proche infrarouge, faisant d'elle une des structures fluorescentes les plus performantes.

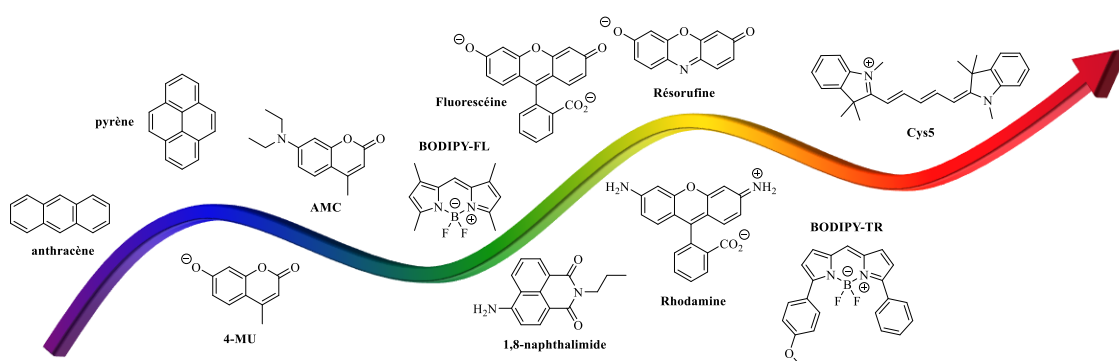


Figure 2 : Représentation des structures fluorescentes majoritairement utilisées en fonction de leurs propriétés d'émission

2. Pro-fluorescence

a) Principe

Une utilisation élégante de la fluorescence pour détecter un bioanalyte ou un événement biologique est basée sur l'utilisation d'un système dont l'émission lumineuse serait modulée par ce composé. Ces sondes sont qualifiées de sondes fluorogéniques, de sondes activables, de pro-sondes ou encore de sondes intelligentes. Lavis, Chao et Raines sont les premiers à parler de pro-fluorescence lors de l'utilisation de ce type de sonde pour détecter l'activité d'une enzyme.¹⁴ Le système idéal n'émet pas de lumière en l'absence de l'espèce à détecter puis devient fluorescent en présence de cette dernière (système « OFF-ON »). Il existe aussi des systèmes dits ratiométriques basés sur le rapport de deux maxima d'émission (système « ON-ON »). Enfin, plus rarement, certains systèmes sont basés sur l'extinction de fluorescence en présence de la cible (système « ON-OFF »).¹⁵ Dans les systèmes OFF-ON, la modulation de la fluorescence intervient après la formation ou la rupture d'une liaison chimique (covalente ou non-covalente), ou encore à la suite d'une réaction en cascade (**Figure 3**).

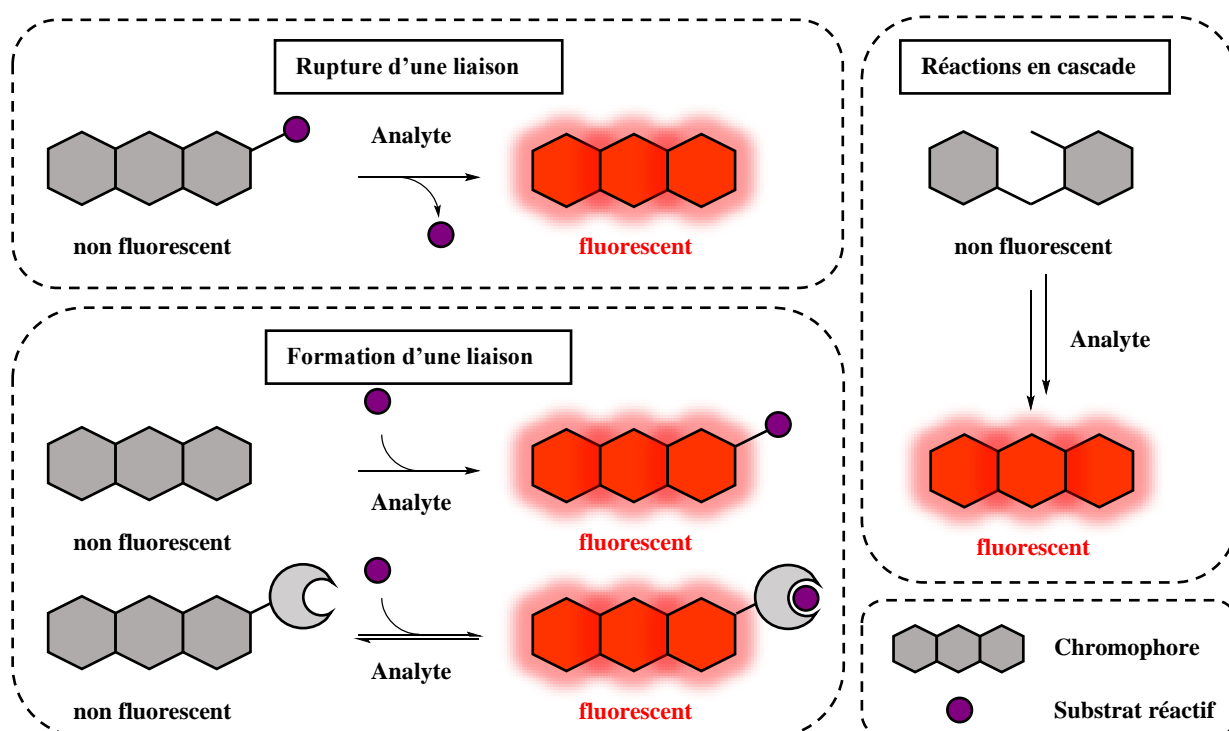


Figure 3 : Représentation des différents systèmes pro-fluorescents adaptés de L. Lavis¹⁵

¹⁴ L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1151-1154.

¹⁵ J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 113 (Ed.: M. C. Morris), Academic Press, **2013**, pp. 1-34.

La **Figure 4** montre quelques exemples de ce type d'approches : i) la libération d'un fluorophore en présence d'une estérase, ii) la formation d'une liaison en présence de cuivre (Cu^{II}) entraînant la formation d'une espèce fluorescente et iii) des réactions en cascade après l'action d'une phosphatase (PTP) entraînant la formation d'un composé fluorescent.^{16, 17}

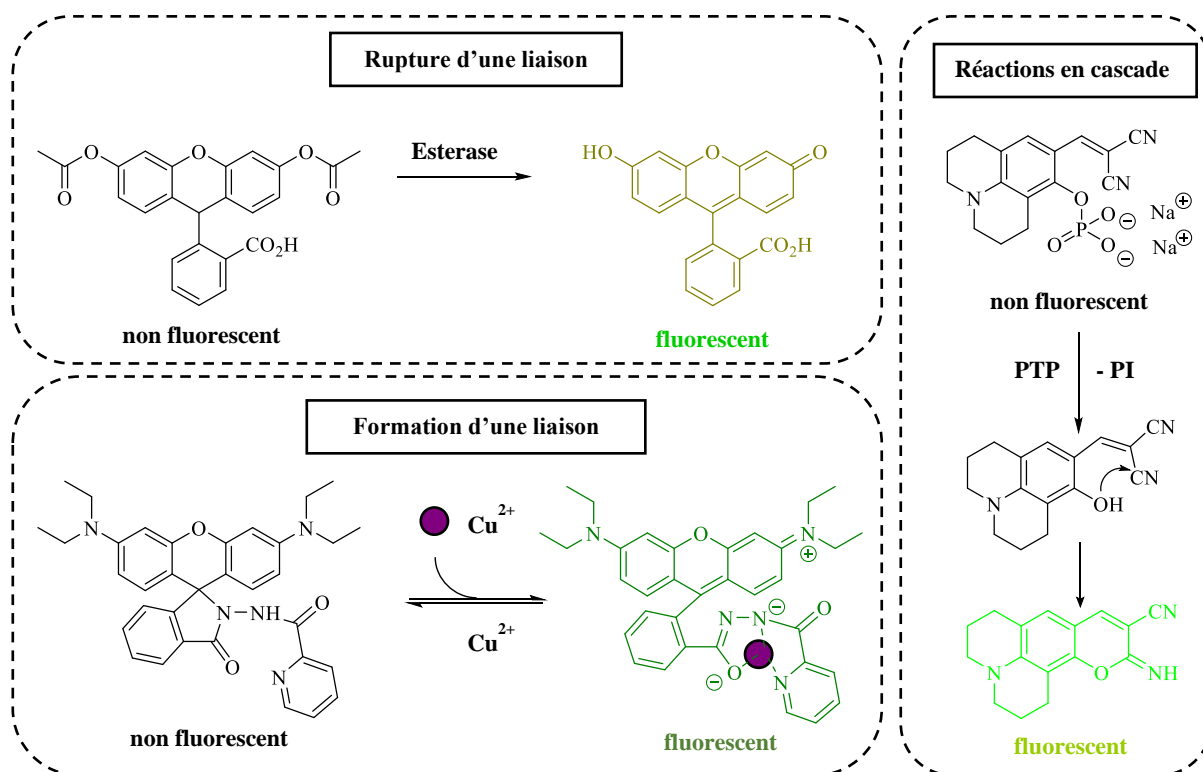


Figure 4 : Différents exemples de systèmes pro-fluorescents basés sur une rupture¹⁵ ou formation d'une liaison,¹⁶ ou réactions en cascade¹⁷

Le principe de ces sondes repose donc sur la présence d'une entité réactive dans la molécule initiale qui donnera lieu à la génération de l'entité fluorescente. La fluorescence peut être modulée suivant différents mécanismes photophysiques qui vont être présentés brièvement dans les sous-parties suivantes.

b) Modulations de la fluorescence

i. Transfert d'électron photoinduit (PeT, Photo-induced electron Transfer)

Les propriétés oxydantes ou réductrices d'une molécule sont exaltées à l'état excité. Or, beaucoup de fluorophores possèdent des groupements susceptibles d'être oxydés ou réduits qui peuvent être responsables de l'inhibition de la fluorescence suivant un mécanisme d'oxydoréduction à l'état excité. Ces groupements sont alors appelés « quencheurs ». Ainsi, pour

¹⁶ Y. Liu, Y. Sun, J. Du, X. Lv, Y. Zhao, M. Chen, P. Wang, W. Guo, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 432-437.

¹⁷ T. I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9825-9827.

ce type de système, la sonde fluorogénique est divisée en deux parties, un motif fluorescent (donneur d'énergie) et un « quencheur » (accepteur d'énergie).

Deux possibilités sont envisageables : soit un mécanisme oxydatif soit un mécanisme réducteur. La théorie des orbitales frontières permet d'expliquer ces mécanismes d'inhibition de fluorescence. Dans le cas d'un PeT oxydatif (**Figure 5, A**) : après une excitation lumineuse (lors de l'absorption d'un photon), un électron excité du fluorophore est transféré de la LUMO de ce dernier (notée D, pour donneuse) vers la LUMO vacante du « quencheur » (notée A, pour acceptrice). Ainsi, la désexcitation a lieu via un mécanisme non radiatif plutôt que par fluorescence. Dans le cas d'un PeT réducteur (**Figure 5, B**), après une excitation lumineuse, un électron de la HOMO du « quencheur » (notée D, car il joue cette fois le rôle de donneur) vient occuper la HOMO du fluorophore (notée A, pour acceptrice), empêchant ainsi l'électron excité présent dans la LUMO du fluorophore de revenir à l'état fondamental par fluorescence.

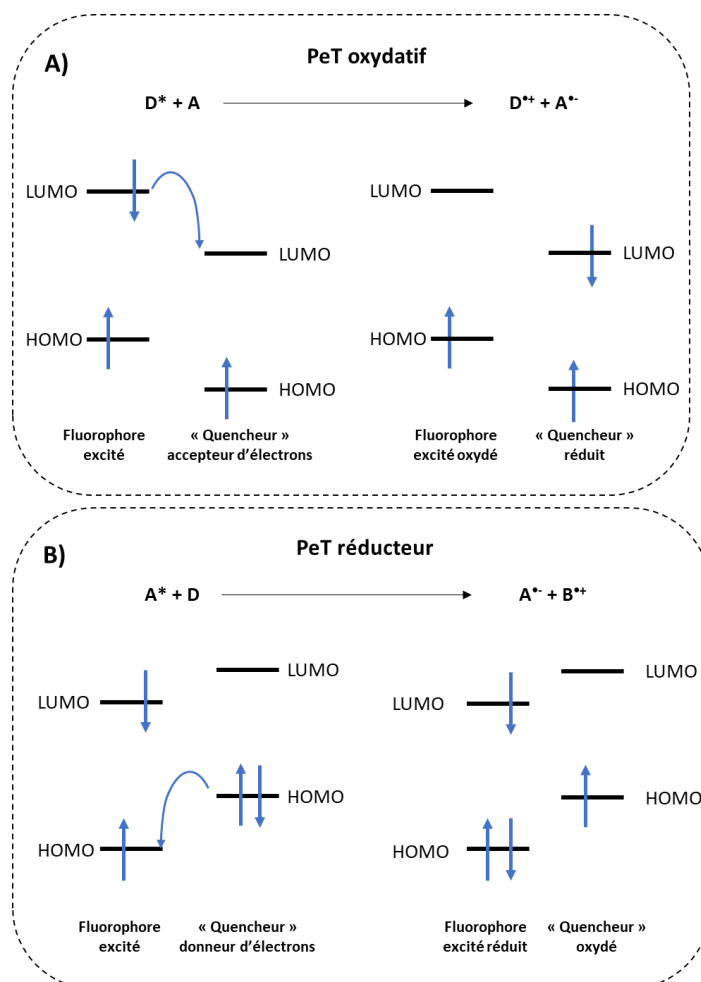


Figure 5 : Diagramme d'orbitales moléculaires représentant les mécanismes de PeT

Par exemple, la fluorescence éteinte par un phénomène de PeT dans certaines sondes fluorogéniques sera rétablie par oxydation par un analyte. Ainsi, l'intensité de la fluorescence rétablie peut être corrélée avec la présence de l'analyte.

ii. *Transfert de charge photoinduit (ICT, Induced-Charge Transfer)*

Comme les propriétés d'oxydoréduction, la répartition de charge (ou les moments dipolaires) d'un fluorophore sont souvent différents entre l'état fondamental et l'état excité. Dans le cas de l'ICT, le rôle du solvant est prépondérant. En effet, en fonction de leur nature et leurs propriétés les molécules du solvant permettent de plus ou moins stabiliser l'état excité du fluorophore. En se réorganisant autour du fluorophore, elles permettent une minimisation de son état de charge et donc de stabiliser l'état excité. Il s'agit d'un phénomène très rapide (en 10^{-10} s, plus rapide que la fluorescence) qui dépend de la polarité du solvant et implique un déplacement bathochrome (vers des longueurs d'ondes plus grandes) du maximum d'émission du fluorophore (**Figure 6**).

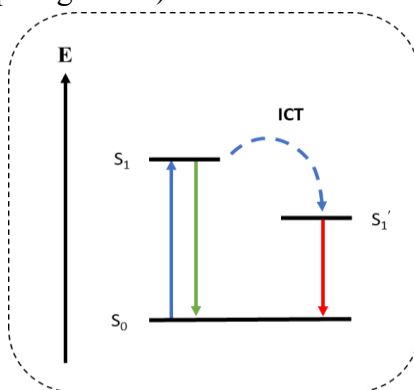


Figure 6 : Diagramme d'orbitales moléculaires représentant l'ICT

Ce processus permet de préparer des sondes pro-fluorescentes sensibles à l'environnement, comme par exemple des sondes fluorogéniques qui rétabliront leur fluorescence dans des compartiments cellulaires fortement hydrophobes (lipides, membranaires cellulaires). En contrepartie, ce type de système nécessite un adressage cellulaire bien identifié.

iii. *Transfert de proton photoinduit*

Les propriétés acido-basiques d'un fluorophore peuvent être modifiées à l'état excité. Un transfert de proton intramoléculaire peut avoir lieu entre une partie acide (fonction phénol) et une partie basique du fluorophore (amine). Un transfert intermoléculaire peut aussi avoir lieu avec les molécules d'un solvant protique, comme l'eau. C'est sur ce principe que de nombreuses sondes sensibles au pH sont basées. En revanche, ce type de modulation peut s'avérer être un frein dans le cadre de la détection d'analytes ou d'événements biologiques. Lors de la détection d'analytes dans les cellules, la spécificité des sondes fluorogéniques peut être altérée par la force ionique, la température, et même la présence de certains ions comme le Fe²⁺ ou le Ca²⁺.

iv. *Transfert d'énergie FRET (Förster Resonance Energy Transfer)*

Le FRET, aussi appelé transfert par résonance de type Förster, est un processus de désexcitation non radiatif entre deux motifs fluorescents. Plusieurs critères doivent être remplis pour que ce processus puisse avoir lieu. Le premier critère est un critère énergétique : l'un des motifs doit jouer le rôle d'accepteur d'énergie tandis que l'autre celui de donneur d'énergie. Pour cela, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'excitation de l'accepteur (**Figure 7, A**). De plus, ce type de transfert est efficace uniquement lorsque les motifs donneur et accepteur sont spatialement proches (entre 10 et 100 Å). Ainsi le rayon de Förster est une grandeur qui définit la distance accepteur-donneur où le transfert d'énergie non radiatif de l'accepteur est de 50%. Pour que le processus soit effectif, la distance réelle entre les deux fluorophores ne doit pas dépasser 1,8 fois le rayon de Förster. Lorsque tous ces critères sont remplis, alors un processus de FRET (**Figure 7, B**) peut avoir lieu.

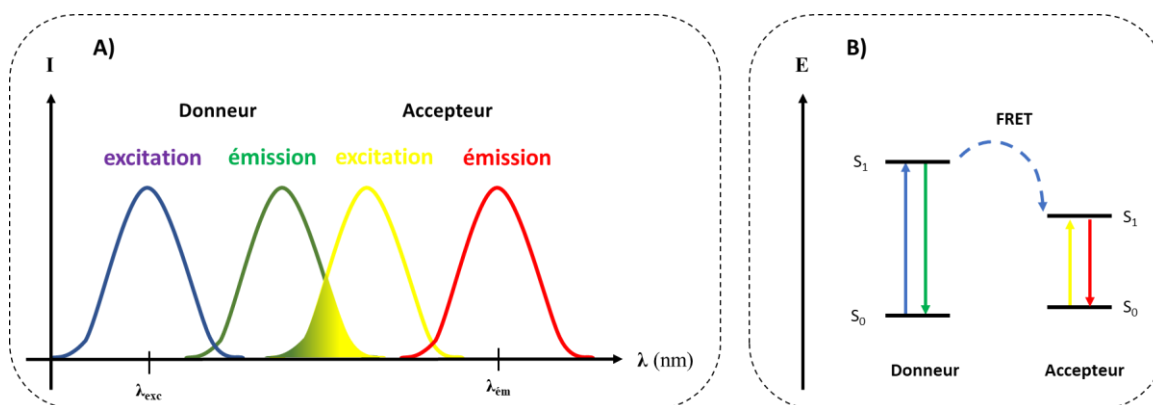


Figure 7 : A) Conditions de recouvrement spectrale entre les fluorophores donneur et accepteur ;
B) Diagramme d'orbitales moléculaires représentant le phénomène de FRET

D'autres mécanismes de transfert d'énergie peuvent avoir lieu dans un couple donneur/accepteur (transfert énergétique à travers les liaisons, formation d'exciplexes, etc...) mais ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

III. Sondes organiques pour la détection de H₂O₂

Il existe actuellement trois types de systèmes fluorescents qui ont été mis au point pour détecter les FRO : des systèmes basés sur des fluorophores organiques, des protéines fluorescentes comme la *Green Fluorescent Protein* (GFP) et enfin, des nanoparticules. Seuls les fluorophores organiques seront détaillés dans ce manuscrit.

1. Sondes fluorogéniques à activation enzymatique

Actuellement une des méthodes les plus utilisées pour détecter le peroxyde d'hydrogène extracellulaire combine une sonde fluorogénique commerciale l'Amplex Red[®] avec l'emploi de la peroxydase de raifort (HRP, *horseradish peroxidase*). En présence de H₂O₂, cette enzyme catalyse l'oxydation mono-électronique de l'Amplex Red[®] (non-fluorescent), entraînant la libération d'une molécule de résorufine (fluorescente) (**Figure 8**).

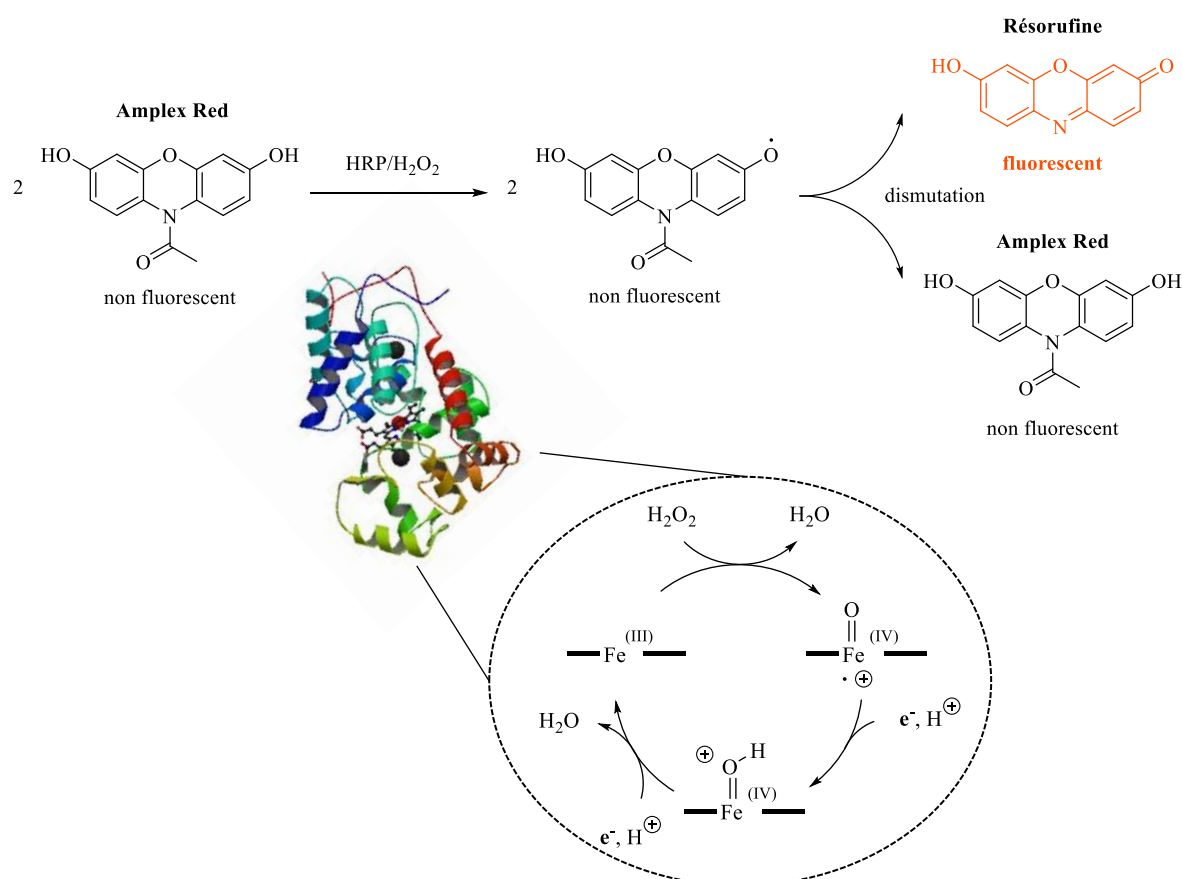


Figure 8 : Mécanisme général de l'oxydation de l'Amplex Red par H₂O₂, catalysée par la HRP adapté de Gorris et Walt ¹⁸

Tout d'abord, la présence de peroxyde d'hydrogène catalyse l'oxydation à deux électrons du fer hémique de la HRP (Fe^{III}) vers un complexe radical cation oxoferryle (Fe^{IV}). Celui-ci revient à son état initial par oxydations mono-électroniques successives de deux molécules d'Amplex Red[®] (transfert de deux électrons et deux protons, encadré **Figure 8**). Ces oxydations entraînent

la formation de radicaux dérivés de l'Amplex Red[®], qui par une réaction de dismutation, libèrent une molécule d'Amplex Red[®] et une molécule de résorufine fluorescente.¹⁸

Malheureusement ce système possède de nombreuses limitations. Par exemple, l'activité enzymatique de la HRP est fortement liée à son environnement, comme le pH. De plus, la résorufine formée peut servir de photocatalyseur et induire une photooxydation de l'Amplex Red[®].¹⁹ De même, des phénomènes tels que l'inactivation de l'enzyme obligent à prendre des précautions quant à l'analyse quantitative des résultats. Néanmoins, ce système de détection a aussi été utilisé avec d'autres couples de sondes fluorogéniques/peroxydase HRP, comme par exemple avec la sonde organique dihydrorhodamine.²⁰

Pour s'affranchir de l'utilisation de la HRP et permettre la détection du H₂O₂ intracellulaire, d'autres systèmes impliquant une sonde fluorogénique ont été mis au point. Une des sondes les plus couramment utilisées est la sonde diacétate de dichlorofluorescéine (H₂DCFDA).²¹ Les groupements acétates permettent à la sonde fluorogénique de franchir facilement les membranes cellulaires. Une fois entrée dans la cellule, des estérases permettent l'hydrolyse des esters conduisant à la forme H₂DCF. Enfin l'oxydation de H₂DCF par H₂O₂ conduit à la formation de la dichlorofluorescéine (DCF) fluorescente (**Figure 9**).

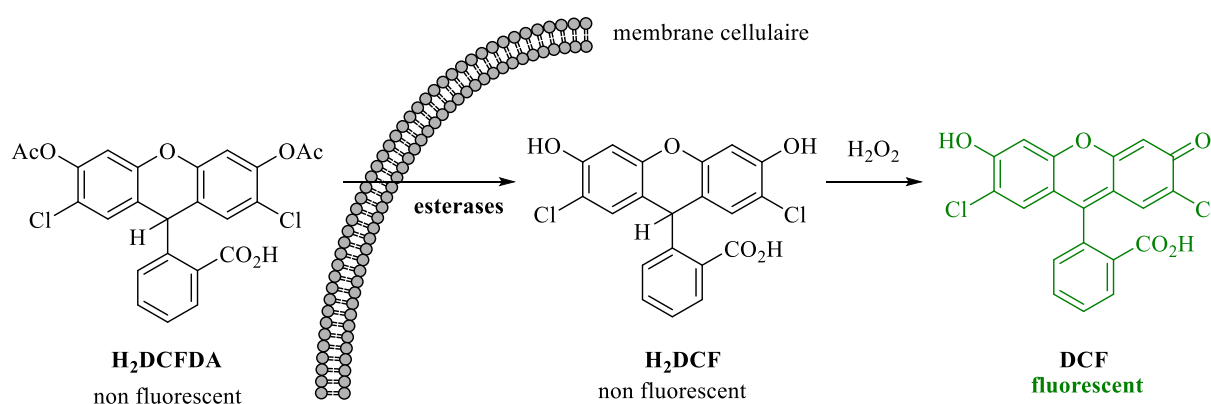


Figure 9 : Mécanisme d'action de la sonde H₂DCFDA en présence d'estérases et de H₂O₂

L'utilisation de cette sonde présente deux inconvénients majeurs : sa faible spécificité au peroxyde d'hydrogène comparée à l'hypochlorite et au monoxyde d'azote, et sa capacité de produire des FRO après photooxydation.²² Ceci conduit donc à une augmentation de la fluorescence non spécifique au peroxyde d'hydrogène ce qui complique les interprétations.

¹⁸ H. H. Gorris, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6277-6282.

¹⁹ B. Zhao, F. A. Summers, R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1080-1087.

²⁰ J. P. Crow, *Nitric Oxide* **1997**, *1*, 145-157.

²¹ C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227-231.

²² M. Afzal, S. Matsugo, M. Sasai, B. Xu, K. Aoyama, T. Takeuchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 619-624.

Les deux systèmes présentés ci-dessus sont utilisés aujourd'hui par de nombreuses équipes de biologistes pour la détection intra et extracellulaire du H₂O₂. En revanche, cette détection se fait grâce à des intermédiaires réactionnels formés au cours de l'oxydation. Ces derniers peuvent aussi réagir avec d'autres espèces, perturbant ainsi le bon déroulement de la détection.²³

Pour s'affranchir de l'activation enzymatique et dépasser ces limitations, d'autres sondes fluorogéniques susceptibles de réagir directement avec le H₂O₂ ont été élaborées. Dans la suite de cette partie, différents types d'amorces chimiques réagissant directement avec le peroxyde d'hydrogène seront détaillés (système fluorogénique basé sur la rupture d'une liaison, **Figure 3**).

²³ P. Wardman, *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 43, 995-1022.

2. Amorce sulfonyle

En 2004, Maeda et son équipe ont été les premiers à développer des sondes fluorogéniques pour la détection du peroxyde d'hydrogène basées sur l'utilisation d'une amorce chimique sulfonyle. Après une réaction de déprotection du groupement sulfonyle induite par la nucléophilie du H₂O₂, le phénol est régénéré (**Schéma 2**).²⁴

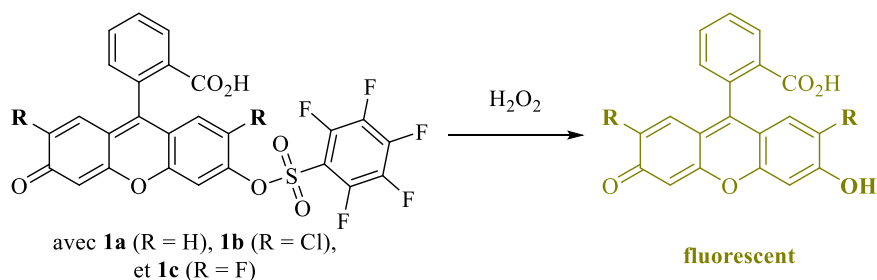


Schéma 2 : Détection du H₂O₂ par les sondes 1a-c

Les sondes **1a-c** dérivées de fluorescéine possèdent de très faibles rendements quantiques (Φ_F compris entre 0.003 et 0.01 pour $\lambda_{ex} = 492$ nm dans un tampon HEPES à pH = 7.4 et 25 °C) comparés aux fluorescéines dont elles sont issues. L'un des inconvénients de ces sondes est qu'elles réagissent aussi bien avec le peroxyde d'hydrogène que les autres espèces réactives de l'oxygène, et plus particulièrement avec l'anion superoxyde. De plus, la cinétique de coupure de l'amorce de la sonde est relativement lente puisque l'équipe de Maeda a mesuré des constantes de vitesse allant de 6.3 à $25 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans des conditions physiologiques (pH = 7.4, T = 37°C).

Malgré ces limitations, différents groupes ont utilisé ce type d'amorce pour diverses applications. Récemment, Kulak et son groupe ont utilisé la sonde **1a** pour étudier la formation de FRO lors du clivage de l'ADN induit par des métallo-nucléases.²⁵ Au cours de leur étude, ils ont observé les mêmes sélectivité et cinétique que l'équipe de Maeda.²⁴ Le groupe de Tang a aussi utilisé cette amorce en présence d'un autre fluorophore, un dérivé de la naphthofluorescéine dont la longueur d'émission est décalée vers le rouge par rapport aux sondes **1a-c** (**Schéma 3**).²⁶

²⁴ H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2389-2391.

²⁵ S. Lechnitz, J. Heinrich, N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13411-13414.

²⁶ K. Xu, B. Tang, H. Huang, G. Yang, Z. Chen, P. Li, L. An, *Chem. Commun.* **2005**, 5974-5976.

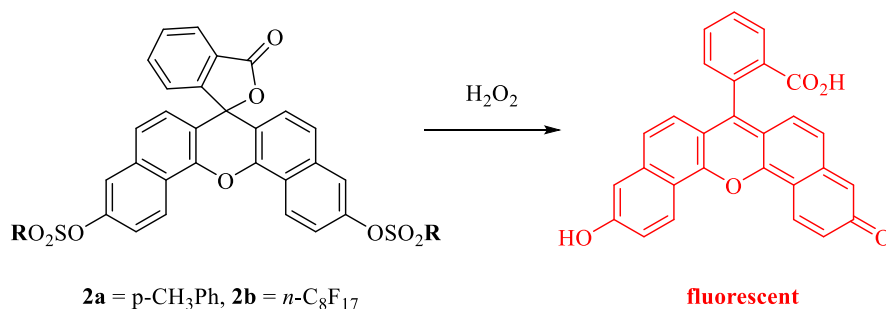
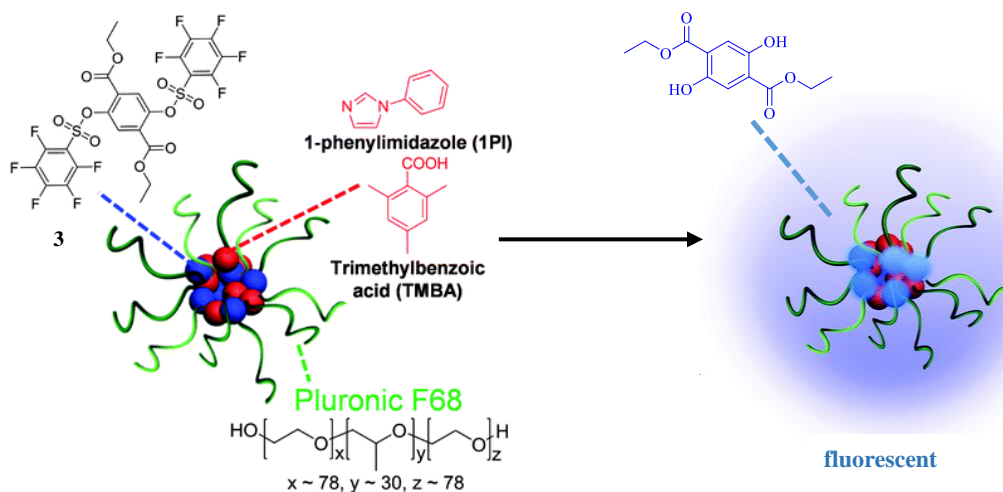


Schéma 3 : Détection du H_2O_2 par les sondes $2\mathbf{a}\text{-b}$

Différents substituants du motif sulfonyle ont été introduits pour améliorer la réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, une chaîne octyle perfluorée a été introduite (sonde **2b**) mais celle-ci ne s'est pas avérée suffisamment stable en milieu physiologique pour y être testée. Aussi seule **2a** a été étudiée pour la détection de peroxyde d'hydrogène sur des cellules de macrophages péritonéales de souris après activation au phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). De manière surprenante, les auteurs décrivent une sélectivité différente de celle observée par le groupe de Maeda. En effet, ils observent une intensité de fluorescence 4 à 7 fois plus importante en présence de H_2O_2 que de O_2^- en fonction de la manière dont ce dernier est généré. De même, ils n'observent pas ou peu de réponse de leur sonde vis à vis des autres espèces réactives de l'oxygène. En revanche, aucune détermination de constante de vitesse n'a été rapportée.

Plus récemment, Hao et ses collègues ont développé une sonde **3** possédant deux amorces sulfonyles.²⁷ Celle-ci a ensuite été intégrée au sein d'un système micellaire contenant un catalyseur (1-phénylimidazole ou l'acide triméthylbenzoïque) et un surfactant, le *pluronic F68*, de manière à former un nano-réacteur catalysant la réaction permettant la détection du H_2O_2 (**Schéma 4**).



*Schéma 4 : Détection du H_2O_2 dans le système micellaire par la sonde **3** (adapté de ²⁷)*

²⁷ J. Heo, C.-K. Lim, Y. Kim, H.-J. Cho, Y.-D. Lee, J.-H. Maeng, D.-R. Ahn, S. Lee, J. Bang, S. Y. Park, S. Kim, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 1131-1134.

Les auteurs ont aussi déterminé des constantes cinétiques de pseudo premier-ordre (k_{obs}) de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène comprises entre 8.8×10^{-5} et $2.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ en fonction du catalyseur choisi. Enfin, ils se sont intéressés à la sélectivité de leur système vis-à-vis d'autres FRO dans diverses conditions de pH (acide, neutre et basique). Leur système s'est avéré très sélectif du peroxyde d'hydrogène en conditions basiques. Cette sélectivité est plus faible dans les autres conditions. Ce système a été utilisé dans divers tests *in cellula*, notamment lors de la production endogène du H_2O_2 par des cellules A431 après stimulation avec l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou encore par des cellules RAW 264.7 après activation au PMA.

Enfin, les équipes de Chen et Yu ont développé une sonde **4** dérivée de la benzohémicyanine possédant une amorce sulfonyle dérivée du pentafluorobenzène.²⁸ Celle-ci a permis la détection de la formation du H_2O_2 lors de la mitose cellulaire ou encore les variations de concentration en H_2O_2 lors du développement du cerveau de souris (**Schéma 5**).

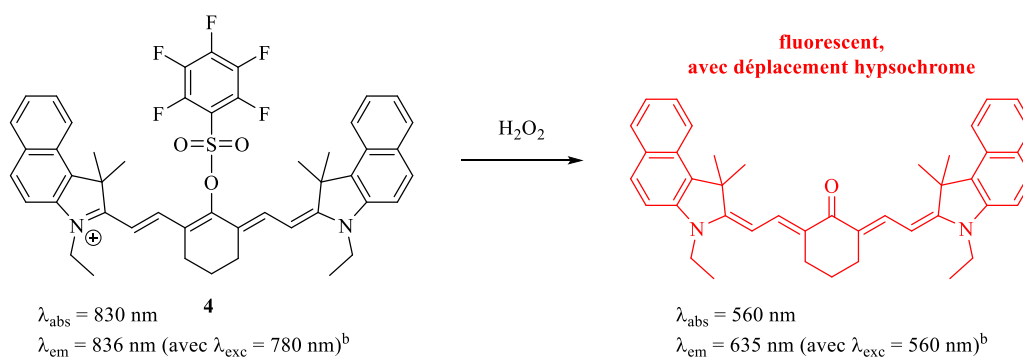


Schéma 5 : Détection du H_2O_2 par la sonde 4

Les auteurs ont par ailleurs déterminé une constante cinétique (k_{obs} , pseudo ordre 1) de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène de $6.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ dans des conditions physiologiques (pH = 7.4, 37°C). De plus, ils ont montré qu'en présence de 10 équivalents de différents FRO, cette sonde s'est révélée sélective vis à vis du peroxyde d'hydrogène.

En conclusion, l'amorce de type sulfonyle a été utilisée pour la détection du peroxyde d'hydrogène *in cellula* voire *in vivo*. Ces sondes sont facilement accessibles après protection d'une fonction alcool ou énol sous forme de sulfonate. Le groupement sulfonate qui a été préférentiellement choisi est celui issu du chlorure de pentafluorobenzène, qui permettrait selon les auteurs d'accélérer la réaction avec H_2O_2 . Mais ces études ont conduit à des résultats contradictoires à deux niveaux principalement : la sélectivité et la réactivité de cette amorce. En

²⁸ H. Guo, G. Chen, M. Gao, R. Wang, Y. Liu, F. Yu, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1203-1210.

^b 10 μM , HEPES, pH = 7.4, 37 °C.

effet, certaines études décrivent une grande sélectivité pour le H_2O_2 alors que d'autres soulignent aussi la grande réactivité de cette amorce avec l'anion superoxyde. De même pour la vitesse de la réaction mise en jeu avec le H_2O_2 , l'équipe de Maeda a déterminé des constantes de vitesse lentes alors que les autres équipes évoquent des vitesses plus rapides, quand elles sont déterminées.

3. Amorces basées sur l'utilisation du phosphore, du carbone ou des chalcogènes

Les éléments de la 16^{ème} période autrement appelés chalcogène mais aussi d'autres éléments comme le phosphore ou le carbone peuvent être oxydés par le H₂O₂ dans certaines conditions. Ainsi diverses sondes ont été développées en utilisant ce principe.

a) Amorce phosphine

En 2003, Oneda et son équipe ont été les premiers à utiliser une amorce phosphine pour détecter une FRO, l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (^tBuOO•).²⁹ Pour cela ils ont synthétisé deux nouveaux fluorophores **5a** et **5b**, dérivés du motif benzofurazane (**Schéma 6**).

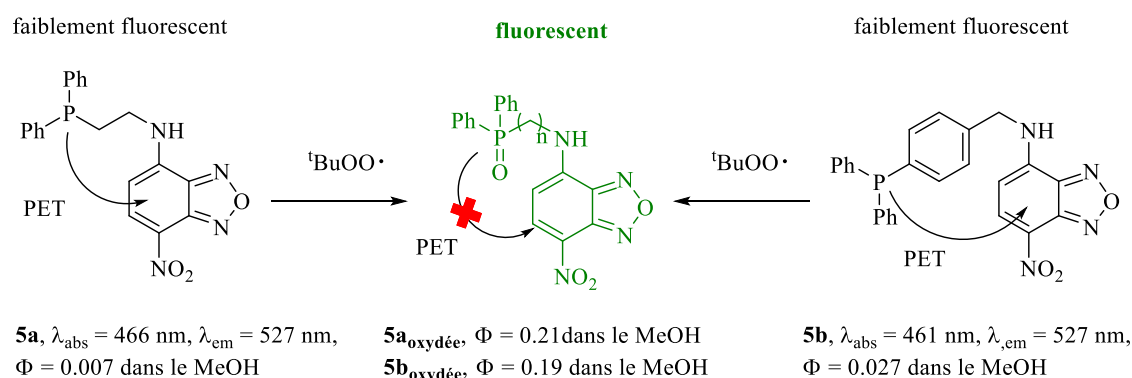


Schéma 6 : Détection du H₂O₂ par les sondes **5a** et **5b**

Ces sondes ont une fluorescence désactivée sous leurs formes réduites à cause du phénomène de transfert d'électrons photoinduit (PeT) entre le groupement phosphine (donneur) et le motif benzofurazane (accepteur). En présence de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle, le phosphore est oxydé, inactivant ainsi le transfert d'électrons photoinduit et rétablissant la fluorescence de la sonde. Malheureusement, aucune étude sur la cinétique ou la sélectivité de ces sondes n'a été proposée par les auteurs.

Puis en 2005, l'équipe de Imato a utilisé la même approche avec la sonde **6**, dérivée de la 7-hydroxy-3-carboxycoumarine pour la détection du peroxyde d'hydrogène.³⁰ Comme précédemment, la fluorescence de la sonde **6** est modérément désactivée grâce à un phénomène de PeT entre la phosphine donneuse et la 7-hydroxycoumarine acceptrice. En présence d'une espèce oxydante, comme le peroxyde d'hydrogène, elle est rétablie (le rendement quantique est multiplié par 1,4) (**Schéma 7**).

²⁹ M. Onoda, S. Uchiyama, A. Endo, H. Tokuyama, T. Santa, I. Imai, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1459-1461.

³⁰ N. Soh, O. Sakawaki, K. Makihara, Y. Odo, T. Fukaminato, T. Kawai, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1131-1139.

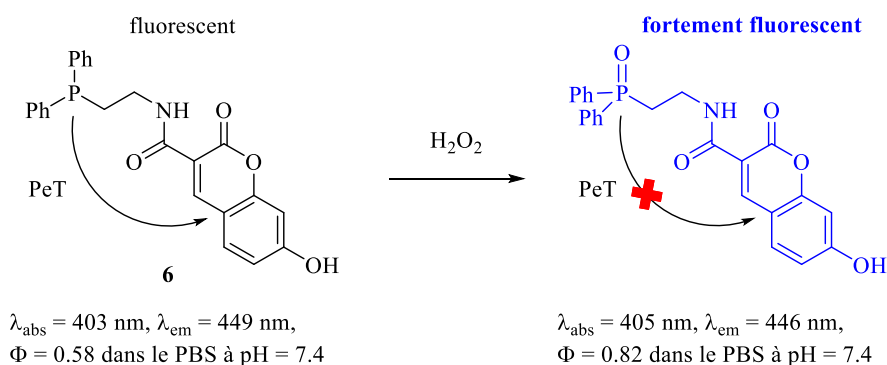


Schéma 7 : Détection du H₂O₂ avec la sonde 6

Quant à la sélectivité, la sonde **6** s'est avérée être aussi réactive avec le peroxyde d'hydrogène qu'avec l'anion superoxyde ou encore avec le monoxyde d'azote. De manière surprenante, cette sonde n'est pas ou peu oxydée par les espèces plus oxydantes que le peroxyde d'hydrogène comme le radical hydroxyle ou le peroxyde nitrite. En revanche, la cinétique d'oxydation n'a pas été évaluée.

Cette sonde a ainsi permis de détecter le peroxyde d'hydrogène exogène ou celui produit *in vitro* par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase/superoxyde dismutase (XA/XOD/SOD). Les auteurs ont réalisé les mêmes expériences en présence de catalase, une enzyme catalysant la dismutation du H₂O₂, et dans ce cas ils ont observé un arrêt de l'augmentation de fluorescence révélant ainsi la sélectivité de la sonde pour le peroxyde d'hydrogène (**Figure 10**).

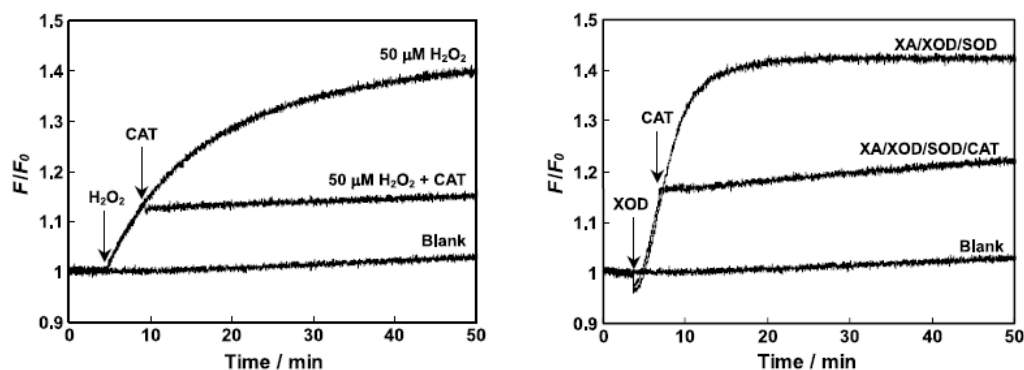


Figure 10 : Rapport des intensités de fluorescence des formes réduite et oxydée la sonde 6 (5μM), en présence de H₂O₂ ou des systèmes enzymatiques XA/XOD/SOD et XA/XOD/SOD/CAT

Enfin plus récemment, l'équipe de Lee a étudié les propriétés photophysiques des sondes fluorogéniques **7a** et **7b** comportant, un motif carbazole (partie acceptrice) et une phosphine (partie donneuse) (**Schéma 8**).³¹

³¹ Y. H. Lee, S. Jana, H. Lee, S. U. Lee, M. H. Lee, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 12069-12072.

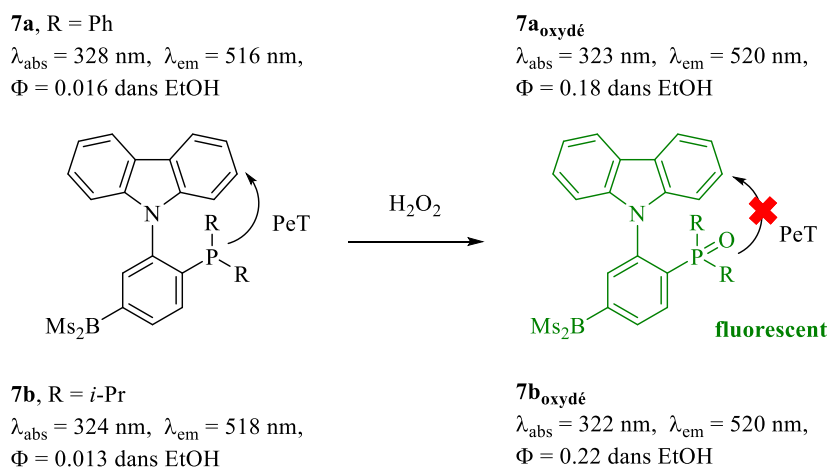


Schéma 8 : Détection du H_2O_2 avec les sondes **7a** et **7b**

En présence de 10 équivalents de H_2O_2 , une augmentation du rendement quantique de fluorescence d'un rapport de 11 pour **7a** et de 17 pour **7b** a été observée. Divers tests de sélectivité ont été réalisés pour la sonde **7a** en présence d'hydroperoxyde de *tert*-butyle, de glutathion, d'acide ascorbique, d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de peroxyde d'hydrogène. Une réponse modérée a été observée pour $^t\text{BuO}^\cdot$ alors qu'une réponse intense est observée en présence de H_2O_2 . En revanche, les auteurs n'ont pas testé leur sonde vis à vis de l'anion superoxyde ou du radical hydroxyle. De plus, aucune détermination de constante cinétique n'a été effectuée.

b) Sonde fluorogénique basée sur l'oxydation d'un atome de carbone

En 2015, Ojida et son équipe ont développé une sonde **8a** permettant de détecter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans des compartiments cellulaires de faible pH.³² Pour cela les auteurs se sont basés sur la particularité de la sonde **8a** qui s'oxyde plus rapidement en milieu faiblement acide (pH compris entre 5-6) en présence de H_2O_2 (Schéma 9).

La sonde **8a** a été synthétisée en 8 étapes et son produit d'oxydation **8a_{oxydé}** en 4 étapes à partir du même précurseur. La sonde **8a** ($5 \mu\text{M}$), en présence de 100 équivalents de peroxyde d'hydrogène, est graduellement transformée en **8a_{oxydé}**, que les auteurs ont pu identifier par différentes méthodes comme la spectroscopie d'absorption et de fluorescence ou la spectrométrie de masse.

³² I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi, A. Ojida, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2038-2044.

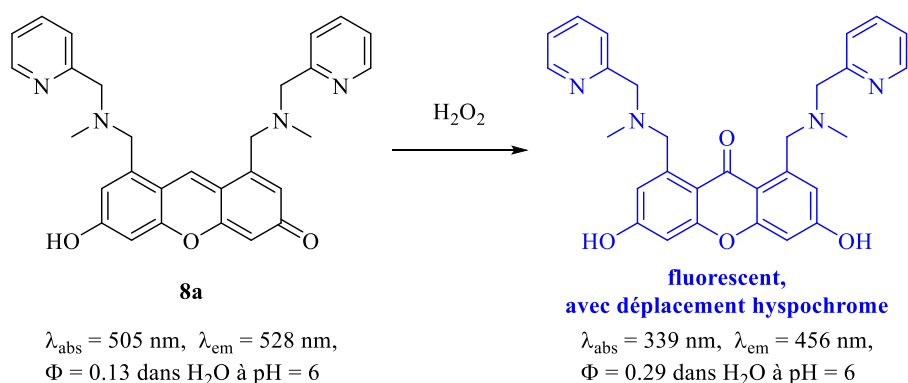


Schéma 9: Détection du H₂O₂ avec la sonde 8a

Les auteurs ont aussi déterminé les constantes cinétiques (k_{obs} , pseudo ordre 1) de réaction de **8a** avec le peroxyde d'hydrogène à différents pH. Ainsi à pH 6.0, la constante de vitesse calculée est de $2.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ alors que pour un pH de 7.4, la valeur diminue à $0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Au niveau de la sélectivité, la sonde **8a** s'est avérée sélective du H₂O₂ vis-à-vis des autres FRO (pour 100 équivalents de FRO, 25°C) à pH = 6.0.

Forts de ces résultats, les auteurs ont ensuite voulu tester leur sonde durant la mitophagie, processus de dégradation des mitochondries endommagées impliqué dans de nombreux processus biologiques normaux ou pathologiques de certaines maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson³³) ou lors de la croissance tumorale.³⁴ Au cours de la mitophagie, la concentration locale de peroxyde d'hydrogène est élevée (supérieure à 100 μM).

Pour y parvenir, ils ont modifié leur sonde en incorporant un groupement *p*-acétoxybenzyle. L'incorporation de ce motif leur a permis d'obtenir une sonde permettant une meilleure pénétration cellulaire. Lors de l'autophagie de cellules Hela sous activation au 2-[(3-chlorophényl)-hydrazono]malononitrile (10 μM), les auteurs ont pu observer la bande caractéristique d'émission de **8a**_{oxydée} par spectroscopie de fluorescence. En effet, une fois internalisée, une hydrolyse de cette pro-sonde **8b** catalysée par des estérases a permis selon un processus d'auto-immolation, d'engendrer le fluorophore **8a** qui par oxydation par le peroxyde d'hydrogène conduit au fluorophore **8a**_{oxydée} (**Schéma 10**).

³³ D. Narendra, A. Tanaka, D.-F. Suen, R. J. Youle, *J. Cell Biol.* **2008**, 183, 795-803.

³⁴ G. Ashrafi, T. L. Schwarz, *Cell Death Differ.* **2013**, 20, 31-42.

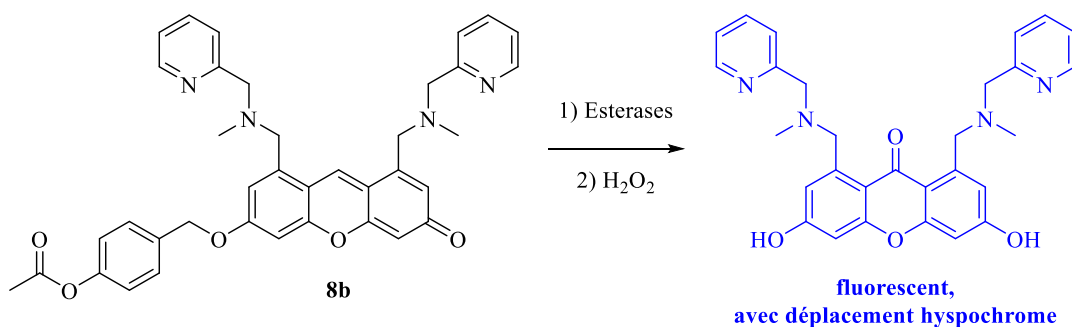


Schéma 10 : Détection du H₂O₂ avec la sonde 8b

Enfin, la colocalisation de la sonde **8a** issue de **8b**, à l'aide de deux agents de colocalisation commerciaux le LysoTracker Red DND99 (LTR), et Mitotracker Deep Red (MTD) a permis de confirmer que leur sonde était localisée à la fois dans des lysosomes et dans les mitochondries.

c) Amorce sulfure

L'amorce sulfure a été également utilisée pour la détection de FRO, en l'occurrence l'hypochlorite de sodium produit *in vitro* à partir de H₂O₂ par une myéloperoxydase (MPO).³⁵ Il s'agit de la première détection indirecte du peroxyde d'hydrogène via l'oxydation d'une amorce sulfure.

Récemment, les équipes de Xu et Ge ont synthétisé une nouvelle sonde **9** basée sur l'oxydation d'un atome de soufre dont la fluorescence est désactivée par un phénomène de PeT entre le motif phénoxazidium (accepteur) et la partie arylthioéther (donneuse).³⁶ En présence de peroxyde d'hydrogène la fluorescence est rétablie (le rendement quantique est ainsi multiplié par 6) (Schéma 11).

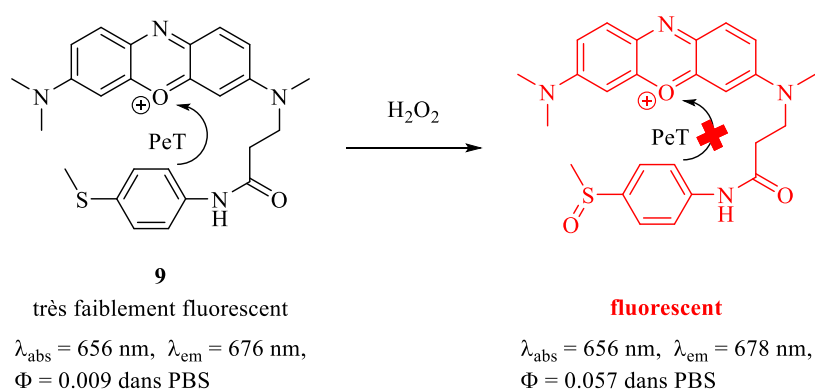


Schéma 11 : Détection du H₂O₂ par la sonde 9

Par ailleurs, la sonde **9** est sélective du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des autres FRO utilisées à hauteur de 100 équivalents par rapport à la sonde (dans le PBS à pH = 7.4). En

³⁵ J. Jing, J.-L. Zhang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2947-2952.

³⁶ Y. Chen, W.-J. Zhu, X.-R. Wei, Y.-J. Xu, R. Sun, J.-F. Ge, *Anal. Meth.* **2018**, *10*, 3754-3758.

revanche, les auteurs n'ont pas déterminé de constantes cinétiques. Après 25 minutes et en présence de 35 équivalents de H_2O_2 , ils n'observent plus d'évolution de l'intensité de fluorescence *in vitro* (dans le PBS à pH = 7.4). La sonde **9** a été ensuite évaluée pour la détection de peroxyde d'hydrogène endogène dans des cellules Hela. Malheureusement, une réponse de faible intensité a été observée. Enfin, l'utilisation d'un agent de colocalisation commercial, le LysoTracker Green DND-26, en présence de la sonde **9** et de H_2O_2 exogène (100 équivalents), a permis de montrer que la sonde était sélectivement adressée dans les lysosomes des cellules.

d) Amorce à base de sélénium

Deux catégories de sondes à base d'amorces sélénées ont été décrites comportant ou non le motif ebselen.

i. Amorces dérivées du motif ebselen

L'enzyme glutathion peroxydase (GPx), une séléno-enzyme, joue un rôle important dans la régulation des FRO. En effet, elle catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH) en conditions normales ou en conditions oxydantes (**Figure 11**).

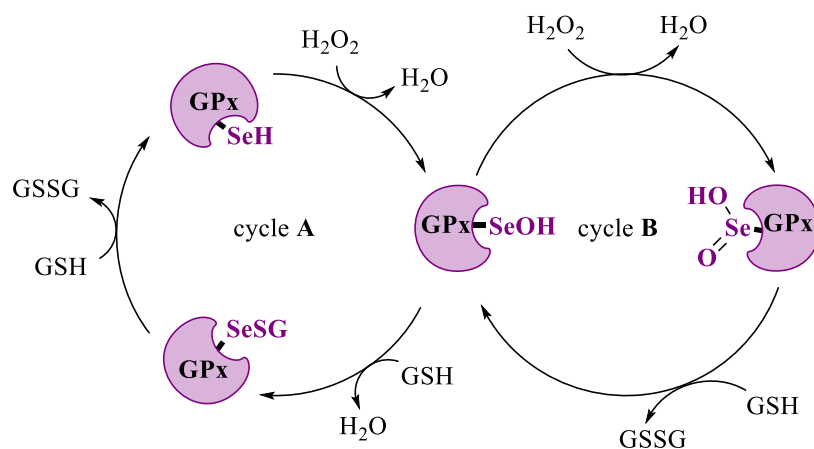


Figure 11 : Mécanisme d'action de GPx proposé ;
 cycle A : conditions normales ; cycle B : conditions de stress oxydant (adapté de H. Ungati et al.⁴⁰)

L'ebselen, un composé synthétique aux propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, s'est avéré être un mime du GPx.³⁷ Aujourd'hui encore les rôles des différents intermédiaires formés en cellules lors de la régulation de H_2O_2 par ce composé, notamment dans les conditions oxydantes, ne sont pas clairement établis (**Figure 12**). Ainsi, différentes équipes se sont intéressées à la synthèse et l'étude de sondes fluorescentes incorporant le motif ebselen pour pouvoir élucider la manière dont ces mimes pourraient réguler la production de H_2O_2 .

³⁷ A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi, G. Tiegs, R. Otter, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3241-3245.

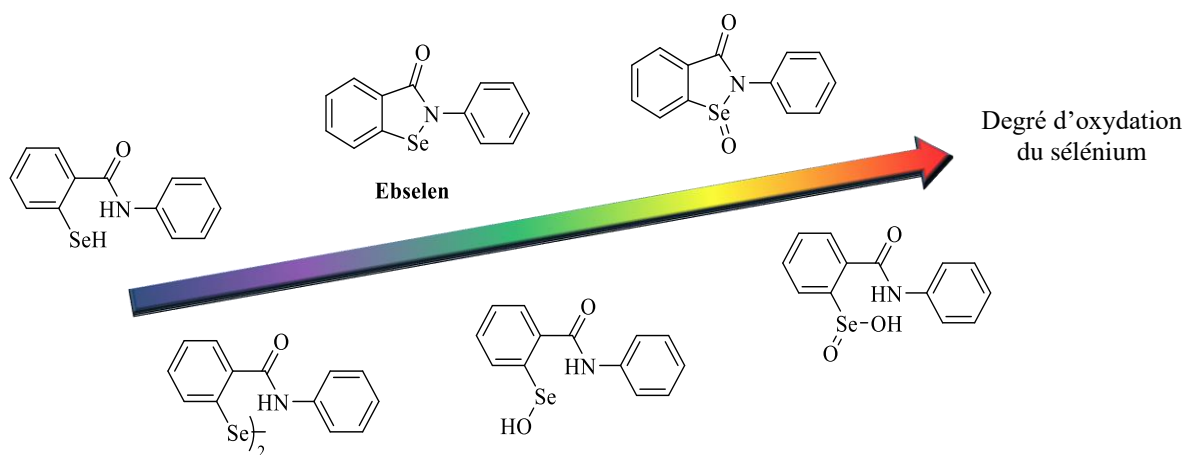


Figure 12 : Structure de l'Ebselen, et des différents intermédiaires observés lors de son mécanisme biochimique mimant GPx

En 2013, Tang et son équipe ont utilisé une amorce sélénée dérivée du motif ebselen sur une plateforme cyanine.³⁸ En présence d'un réducteur comme le glutathion, la sonde **10** est réduite sous forme sélénol. Ce groupement (donneur) induit alors un phénomène de PeT avec la plateforme cyanine (acceptrice), conduisant à l'extinction de fluorescence de **10**_{réduite}. En présence de peroxyde d'hydrogène, le groupement sélénol est oxydé pour restituer le motif ebselen de la sonde **10** (Schéma 12).

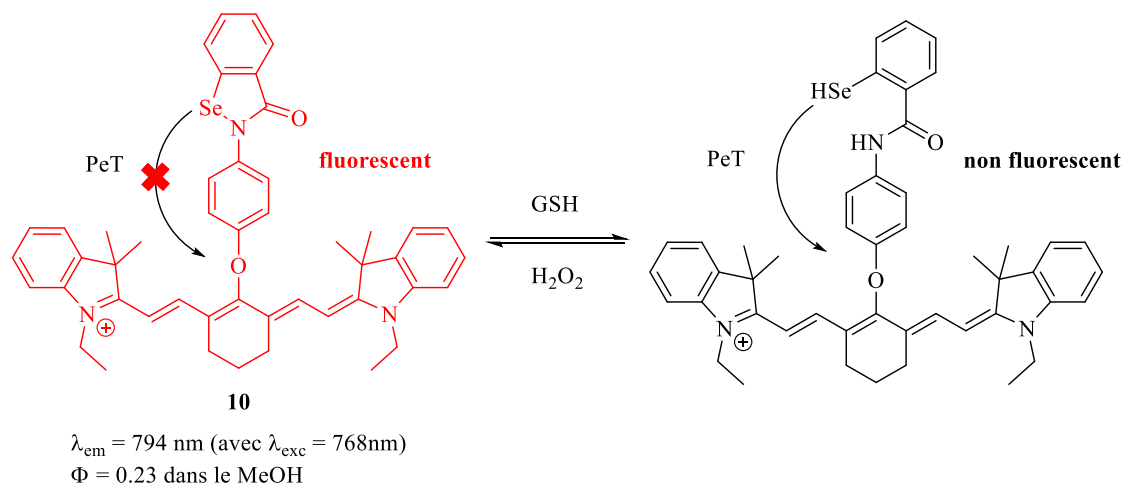


Schéma 12 : détection du H₂O₂ par la sonde **10**

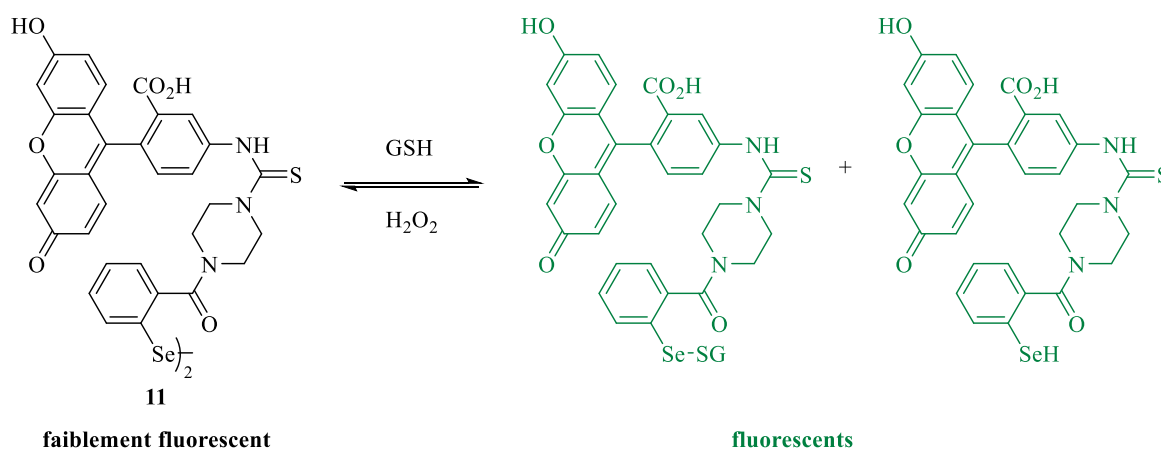
La formation de **10**_{réduite}, ainsi que le mécanisme d'oxydoréduction ont été confirmés lors d'un suivi par spectroscopie de fluorescence et par spectrométrie de masse. Après réduction par le GSH, les auteurs ont aussi testé la sélectivité de la sonde réduite vis à vis de l'hydroperoxyde de *tert*-butyle et de l'anion hypochlorite. La sonde **10**_{réduite} n'est pas oxydée en présence de ces oxydants révélant la bonne sélectivité de la sonde pour le peroxyde d'hydrogène. D'autres FRO, dont le pouvoir oxydant est supérieur à celui de H₂O₂ comme l'anion superoxyde ou le radical

³⁸ K. Xu, M. Qiang, W. Gao, R. Su, N. Li, Y. Gao, Y. Xie, F. Kong, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1079-1086.

hydroxyle, n'ont malheureusement pas été testées. De plus, les auteurs n'ont pas déterminé de constante de vitesse relative à l'oxydation de **10** réduite en **10**.

Par la suite, ils ont évalué le nombre de cycles d'oxydoréduction que leur sonde pouvait réaliser *in cellula*. Ainsi, dans des cellules HepG2 en présence de GSH et de H₂O₂ exogène, ils ont pu suivre par microscopie confocale une série de quatre cycles de réduction/oxydation successifs sans perte de signal. De plus, à l'aide d'un agent de colocalisation commercial, le Mitotracker Green FM, ils ont confirmé que cette sonde se localisait dans les mitochondries. Enfin grâce à leur sonde, ils ont pu détecter l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans des cellules HL7702 lors d'apoptose induite par la L-buthionine sulfoximine (BSO).

Han et son équipe ont synthétisé une sonde diséléniure dérivée de fluorescéine **11**, en cinq étapes, à partir d'acide 2-aminobenzoïque, de sélénium métallique et d'isocyanate de fluorescéine (**Schéma 13**).³⁹ La sonde **11** possède une faible fluorescence à cause de l'autoquenching de fluorescence par un phénomène de FRET entre les deux motifs fluorescéine. Une fois réduit par le GSH, le diséléniure est transformé en séléniol et thioséléniure, rétablissant la fluorescence du motif fluorescéine. Puis en présence de H₂O₂, le diséléniure est reformé réduisant ainsi la fluorescence.



*Schéma 13 : Réactions d'oxydoréduction de la sonde **11** en présence de H₂O₂/GSH*

Une série d'au moins trois cycles de réduction/oxydation successifs a pu être observée sans perte significative de signal. La réduction a d'ailleurs lieu très rapidement avec une constante de vitesse de l'ordre de $8.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (dans le PBS, à pH = 7.4 et à 25°C). Un cycle complet de réduction/oxydation dure environ trois heures dont la plus grande partie correspond à la réaction d'oxydation, dont la constante de vitesse d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène n'a pas été déterminée par les auteurs.

³⁹ Z. Lou, P. Li, X. Sun, S. Yang, B. Wang, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 391-393.

De plus, après réduction par le GSH, différents tests de sélectivité ont été menés mais aucune sélectivité n'a été observée entre les différentes FRO testées. Par exemple, en présence de H₂O₂, d'hydroperoxyde de *tert*-butyle ou de peroxydinitrite, 55 à 65% de l'intensité de fluorescence sont retrouvés lors de l'utilisation d'un second équivalent de GSH. Enfin, la sonde **11** a été mise en présence de cellules Hela, incubées avec de l'acide α -lipoïque favorisant la génération de GSH. Rapidement, une augmentation de fluorescence a été observée par microscopie confocale. Puis, en présence de peroxyde d'hydrogène exogène, les auteurs ont observé une diminution graduelle de l'intensité de fluorescence.

D'autres sondes ont été synthétisées par les équipes de Muges⁴⁰ et de Li et Xu⁴¹ basées respectivement sur le motif naphthalimide ou le motif 2-phenyl-benzimidazole. Celles-ci possèdent une fluorescence désactivée par un phénomène de PeT entre le sélénium du motif ebselen et le motif fluorescent. Elles ont permis de visualiser uniquement du H₂O₂ exogène.

ii. *Amorces sélénées non basées sur le motif ebselen*

Seules les équipes de Xu et Qiang ont récemment utilisé une sonde dont l'amorce sélénée n'était pas issue de l'ebselen.⁴² La sonde **12** basée sur motif BODIPY, a été obtenue grâce à une synthèse convergente par combinaison d'un motif chloroBODIPY et d'un dérivé sélénomorpholine.

Les auteurs ont ensuite déterminé les propriétés photophysiques de leur sonde à différents pH et en présence de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, ils n'ont observé aucune variation des propriétés d'absorption et d'émission ($\lambda_{\text{abs}} = 492$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 504$ nm, dans du PBS/EtOH 1:1). En revanche, ils ont observé de grandes différences pour le rendement quantique de fluorescence. À pH physiologique, la fluorescence de la sonde est désactivée par un phénomène de PeT ($\Phi = 0.012$ avec $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm, pH = 7). Pour des pH faiblement acides, la fluorescence est en partie retrouvée ($\Phi = 0.15$ avec $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm, pH = 5). Enfin, après ajout de peroxyde d'hydrogène, le sélénium est oxydé, inhibant le phénomène PeT et rétablissant ainsi la fluorescence ($\Phi = 0.52$ avec $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm, pH = 5). A noter, qu'en présence de peroxyde d'hydrogène et à pH physiologique, la fluorescence est désactivée ($\Phi = 0.032$ avec $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm, pH = 7). Les auteurs émettent l'hypothèse d'un transfert de proton photoinduit pour expliquer ce résultat (**Schéma 14**). Tous ces résultats expérimentaux ont d'ailleurs été confirmés par des calculs DFT.

⁴⁰ H. Ungati, V. Govindaraj, M. Narayanan, G. Muges, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 8156-8160.

⁴¹ Y. X. Liao, K. Li, M. Y. Wu, T. Wu, X. Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3004-3008.

⁴² C. Xu, Y. Qian, *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 2714-2721.

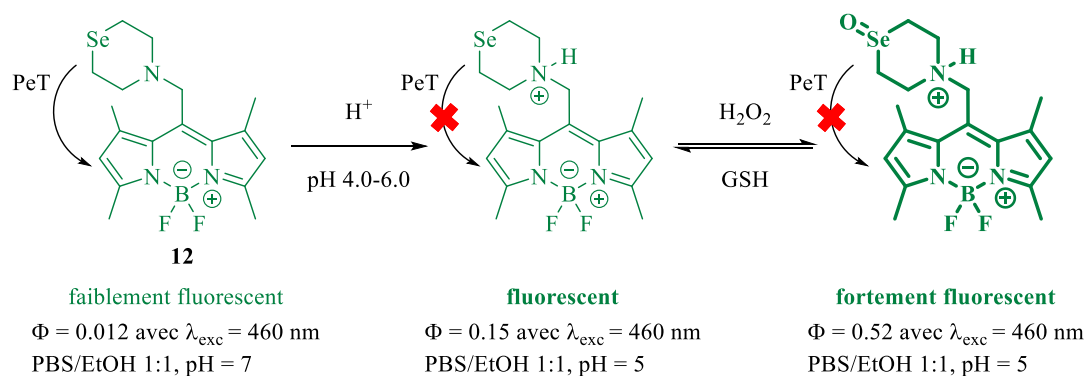


Schéma 14 : Détection du H_2O_2 par la sonde 12

Cette sonde s'est révélée sélective du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des autres FRO (20 équivalents). De plus, les auteurs décrivent une réponse rapide de la sonde, avec un maximum de fluorescence atteint après 5 min en présence de $200 \mu M$ de H_2O_2 mais sans avoir évalué la constante d'oxydation. Par la suite, la sonde **12** a permis la détection de H_2O_2 endogène dans des lignées cellulaires hépatiques cancéreuses (HepG 2) activées par l'addition de PMA. Par ailleurs, en présence de LysoTracker Deep Red, un agent de co-localisation commercial, ils ont obtenu un coefficient de Pearson de 0.96 indiquant que la sonde **12** se localise dans les lysosomes de ces cellules. Enfin, elle a aussi permis la détection de H_2O_2 exogène ($20 \mu M$) dans des poisson-zèbres (conditions *in vivo*).

e) Amorce à base de tellure

En 2013, Choi et son équipe ont développé une sonde colorimétrique **13** basée sur le motif dicétopyrrolopyrrole (DPP).⁴³ Les fluorophores basés sur ce motif sont d'ailleurs très utilisés dans des encres, vernis ou des peintures industrielles. La sonde **13** possède un motif tellurophène conjugué à deux dérivés de dicétopyrrolopyrrole qui, en présence de peroxyde d'hydrogène, s'oxyde (**Schéma 15**).

⁴³ M. Kaur, D. S. Yang, K. Choi, M. J. Cho, D. H. Choi, *Dyes Pigm.* **2014**, *100*, 118-126.

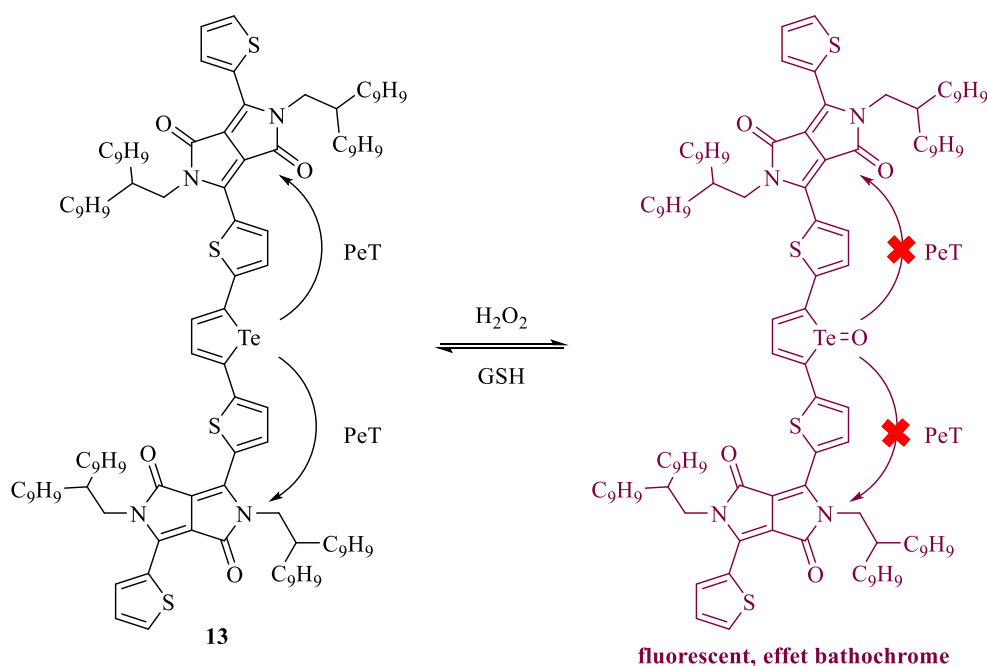


Schéma 15: Détection du H₂O₂ par 13

Comme pour les sondes précédemment présentées dans cette sous-partie, la sonde **13** possède une fluorescence désactivée par un phénomène de PeT entre le motif tellurophène donneur et les motifs DDP accepteurs, phénomène absent dans la forme oxydée. Par ailleurs, les auteurs ont observé que la sonde **13** est sélective du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des autres FRO (75 équivalents dans du HEPES avec 20% de DMSO à pH 7.4). Enfin, en présence de glutathion (GSH), la sonde oxydée peut être réduite pour redonner la sonde **13** détectée par spectroscopie UV et par fluorescence. En revanche, les auteurs se sont arrêtés aux tests photophysiques et aucune détermination précise des constantes de vitesse relative à l'oxydation de la sonde **13** ou à la réduction de sa forme oxydée par le GSH n'a été effectuée.

En conclusion, l'utilisation d'amorces basées sur l'oxydation de chalcogènes ou de phosphore voire de carbone a permis de développer des stratégies originales aboutissant à des systèmes innovants. En revanche, beaucoup de ces travaux en sont restés au stade d'études photophysiques. Enfin, les travaux dans ce domaine très actif montrent qu'il n'y a pas de consensus sur la manière d'aborder l'étude de ces sondes quant à leur sélectivité ou la détermination des cinétiques d'oxydation ce qui rend difficile l'accès à une étude comparative entre ces différentes approches.

4. Amorce dicétone

En 1979, Foote et Sawaki ont montré que le motif benzile pouvait réagir en présence de peroxyde d'hydrogène dans des conditions basiques pour conduire à la formation d'anhydride benzoïque par une réaction d'oxydation de type Baeyer-Villiger⁴⁴ (**Schéma 16**). La même année, le groupe de Siegel a rapporté la décarboxylation de phénylglyoxylate en présence de H₂O₂ en conditions acides (**Schéma 16**, avec R² = H).⁴⁵

avec R¹ = fluorophore

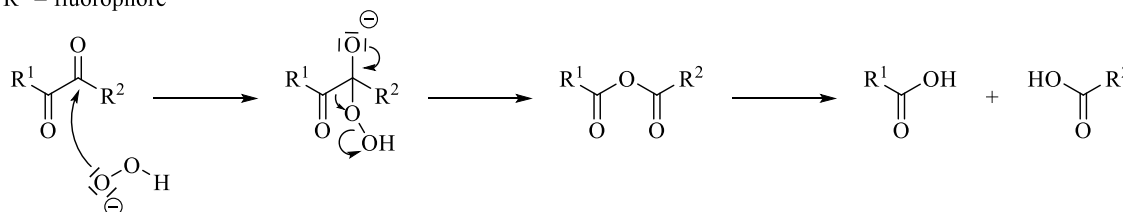


Schéma 16 : Mécanisme réactionnel d'une oxydation de type Baeyer-Villiger

Il faut attendre l'année 2011 pour que l'équipe de Abo utilise cette amorce pour la détection du peroxyde d'hydrogène.⁴⁶ Ainsi la sonde **14**, synthétisée en 3 étapes à partir de la 5-aminofluorescéine, est composée de fluorescéine (R¹) reliée par une amorce dicétone à un groupement *p*-nitrophényle (R²), qui, par un phénomène de PeT, permet d'inhiber la fluorescence de la sonde **14** (**Schéma 17**).

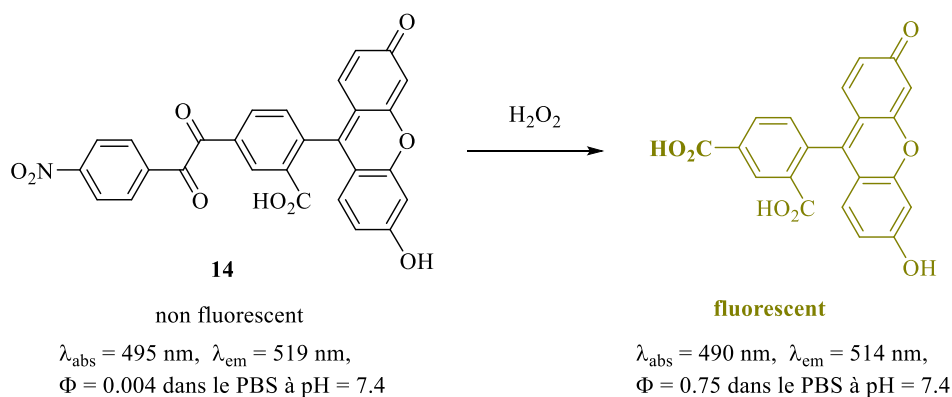


Schéma 17 : Détection du H₂O₂ par la sonde 14

En présence de peroxyde d'hydrogène, la 5-carboxyfluorescéine est générée permettant de rétablir la fluorescence ; le rendement quantique est ainsi multiplié par un facteur de 200. De plus, cette sonde s'est avérée spécifique du H₂O₂. En dehors de ce dernier, les auteurs ont observé uniquement une faible réponse en présence de peroxyde d'azote ou de ^tBuO[•] et aucune réponse pour les autres FRO ou FRN testées (radical hydroxyle, anion superoxyde, monoxyde d'azote, etc...).

⁴⁴ Y. Sawaki, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6292-6296.

⁴⁵ B. Siegel, J. Lanphear, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 942-946.

⁴⁶ M. Abo, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10629-10637.

Ils ont aussi déterminé une constante cinétique de pseudo ordre 1, plutôt lente, de $4.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (en présence 1mM de H_2O_2 , à pH 7.4, 37°C). Malgré ces limitations, cette sonde a permis de visualiser le peroxyde d'hydrogène produit par des cellules de macrophages RAW264.7 après activation au PMA ou la production endogène de H_2O_2 dans des cellules A431 stimulées par l'EGF.

En 2014, les auteurs ont utilisé la même sonde couplée à un système de marquage de protéines SNAP-tag.⁴⁷ Ce système mis au point par l'équipe de Johnsson, permet de lier une molécule préalablement fonctionnalisée à une protéine d'intérêt de façon spécifique et covalente dans les cellules vivantes (**Schéma 18**).^{48, 49}

La stratégie SNAP-tag dérive d'une modification d'une enzyme de réparation de l'ADN humain, l'AGT (*O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase). L'AGT « sauvage » permet de réparer les lésions mutagènes et cytotoxiques de l'ADN qui résultent de l'alkylation de la position *O*⁶ des guanines sous forme de *O*⁶-benzylguanine. L'AGT catalyse une réaction de type $\text{S}_\text{N}2$ impliquant une cystéine de son site actif conduisant *in fine* à la formation d'une liaison covalente entre la partie benzyle et la protéine. Le SNAP-tag est une variante de cette enzyme issue de l'ingénierie des protéines utilisée sous forme de protéine recombinante fusionnée avec une protéine d'intérêt. Le SNAP-tag catalyse le transfert covalent, du groupe benzyle du substrat *O*⁶-benzylguanine sur la cystéine catalytique, conduisant ainsi à la formation une protéine modifiée de façon covalente par cette molécule.

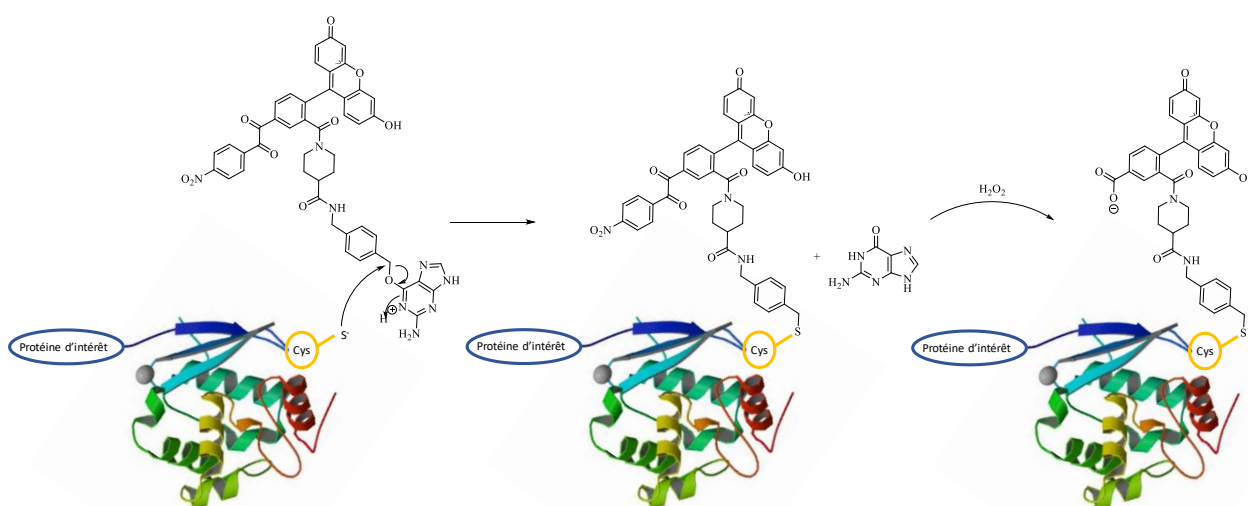


Schéma 18 : Mécanisme d'action du SNAP-tag appliqué à la détection du H_2O_2 avec la sonde 15

⁴⁷ M. Abo, R. Minakami, K. Miyano, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano, H. Sumimoto, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5983-5990.

⁴⁸ A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.

⁴⁹ A. Juillerat, C. Heinis, I. Sielaff, J. Barnikow, H. Jaccard, B. Kunz, A. Tersikh, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1263-1269.

Ainsi, Abo a élaboré une nouvelle sonde selon cette stratégie. La sonde comporte donc 3 parties : une amorce dicétone, un motif fluorescéine comme profluorophore et une guanine *O*⁶-benzylée comme motif substrat de l'enzyme SNAP-Tag (**Figure 13**). Le greffage de la sonde **15** sur la protéine d'intérêt en sonde **SNAP-15** induit de faibles modifications photophysiques pour ce qui est des propriétés d'absorption et d'émission. Les mesures des constantes cinétiques de pseudo-ordre 1 obtenues (en présence de 1000 équivalents de H₂O₂, à pH 7.4 et à 37°C) avec le motif SNAP-tag et une fois la sonde greffée en cellules se sont avérées être du même ordre de grandeur que pour la sonde **14**, donc suffisantes pour l'étude en cellules vivantes.

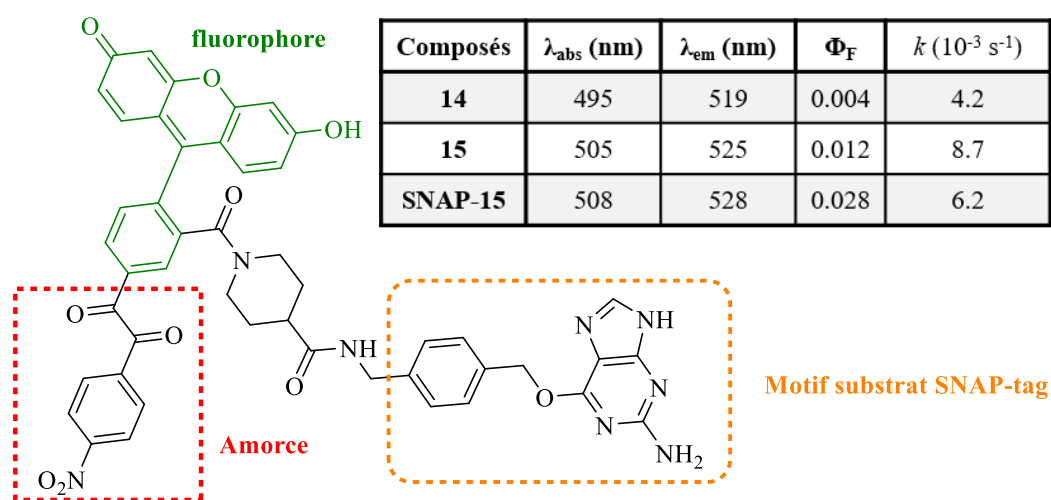


Figure 13 : Structure et propriétés de la sonde 15

Diverses études *in cellula* ont été conduites sur des cellules choisies pour exprimer l'enzyme SNAP-tag sur la surface extracellulaire de la membrane plasmique. Pour s'en assurer, les auteurs ont pu le vérifier à l'aide d'un substrat modèle commercial, SNAP-Surface Alexa Fluor 546, servant d'agent de co-localisation et d'agent de contrôle de l'enzyme. Ainsi, la sonde **15** a permis de détecter du H₂O₂ exogène dans des cellules HEK293T, mais aussi de suivre la production endogène du peroxyde d'hydrogène durant la phagocytose de cellules RAW 264.7.

Depuis, d'autres groupes ont aussi utilisé une amorce dicétone reliée à un groupement *p*-nitrophényle pour détecter le peroxyde d'hydrogène à l'aide de sondes fluorogéniques possédant diverses plateformes fluorescentes. Ainsi, des dérivés de coumarines,⁵⁰ de naphthalimide,^{51,52}

⁵⁰ K. M. Zhang, W. Dou, P. X. Li, R. Shen, J. X. Ru, W. Liu, Y. M. Cui, C. Y. Chen, W. S. Liu, D. C. Bai, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 542-546.

⁵¹ C. Gao, Y. Tian, R. Zhang, J. Jing, X. Zhang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12945-12950.

⁵² J. Peng, X. Hou, F. Zeng, S. Wu, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 278-285.

hémicyanine,⁵³ BODIPY,^{54, 55} ou encore dicyanométhylène-4H-pyrane (DCM)⁵⁶ ont été synthétisés et utilisés (**Figure 14**).

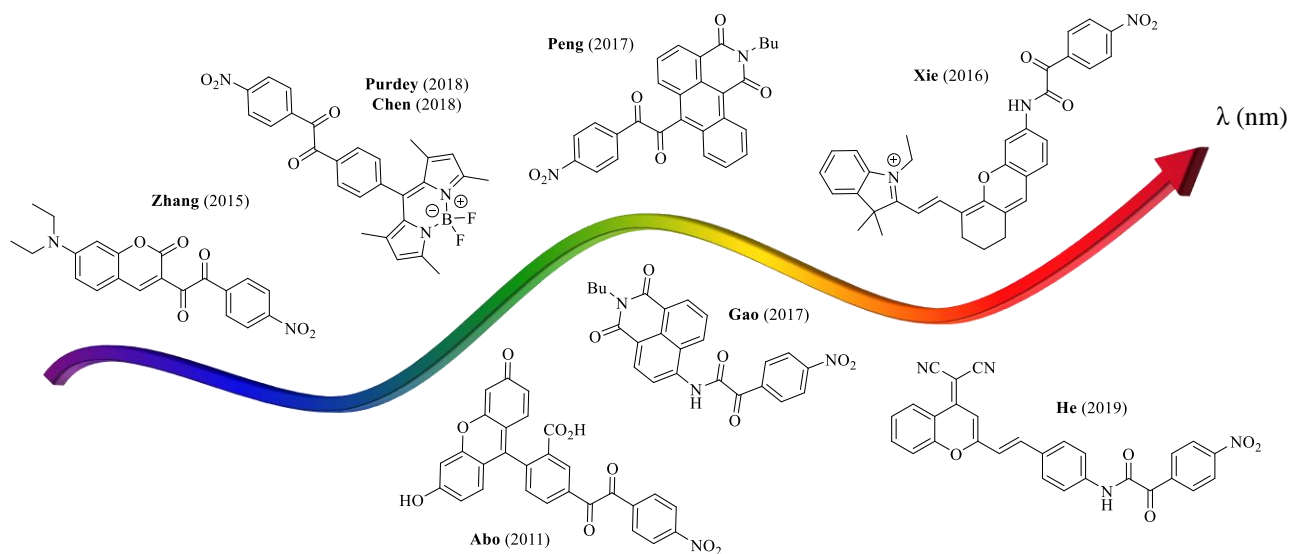


Figure 14 : Structures des différentes sondes basées sur l'amorce dicétone pour détecter du H_2O_2

Diverses applications *in cellula* voire *in vivo* ont été réalisées en fonction des propriétés spectrales des fluorophores. Par exemple, la sonde dérivée du motif benzophthalimide développé par Peng *et al.* a permis de détecter le H_2O_2 endogène produit par des cellules RAW264.7 activées au PMA.⁵² Alors que la sonde dérivée d'un BODIPY de l'équipe de Chen et Sun a permis de détecter les vapeurs de H_2O_2 .⁵⁴ Ces études ont été possibles car ce type d'amorce possède une bonne sélectivité pour le peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des autres FRO. En revanche, comme la cinétique d'activation est lente, les études ont été menées après un temps d'incubation d'au minimum 30 minutes.

⁵³ X. Xie, X. Yang, T. Wu, Y. Li, M. Li, Q. Tan, X. Wang, B. Tang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8019-8025.

⁵⁴ B. Li, J.-B. Chen, Y. Xiong, X. Yang, C. Zhao, J. Sun, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *268*, 475-484.

⁵⁵ M. S. Purdey, H. J. McLennan, M. L. Sutton-McDowall, D. W. Drumm, X. Zhang, P. K. Capon, S. Heng, J. G. Thompson, A. D. Abell, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *262*, 750-757.

⁵⁶ Y. He, L. Miao, L. Yu, Q. Chen, Y. Qiao, J.-F. Zhang, Y. Zhou, *Dyes Pigm.* **2019**, *168*, 160-165.

5. Amorce boronique

Bien que toutes les amorces précédemment décrites aient permis de nombreuses avancées dans l'élaboration de sondes fluorogéniques pour la détection du H_2O_2 , leur utilisation reste relativement marginale en comparaison de l'amorce boronique. Depuis sa découverte, les sondes utilisant l'amorce boronique sont de plus en plus élaborées. Ainsi, les différentes stratégies mises en place dans le domaine des sondes fluorogéniques pour la détection du peroxyde d'hydrogène ont quasiment toujours été testées avec l'amorce boronique.

L'oxydation de dérivés du bore par le peroxyde d'hydrogène est une réaction ancienne. Elle a notamment été étudiée par Kuivila dès 1957.⁵⁷ Son mécanisme et les différents intermédiaires réactionnels formés peuvent être représentés à l'aide de l'exemple de l'oxydation de l'acide phénylboronique par le peroxyde d'hydrogène (**Schéma 19**).

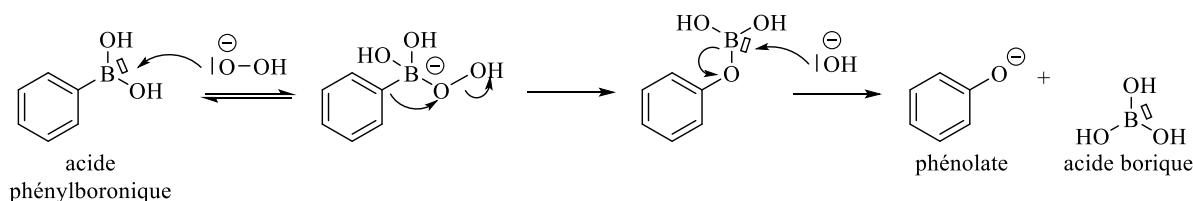


Schéma 19 : Mécanisme général d'oxydation de l'acide phénylboronique par le H_2O_2

Cette réaction d'oxydation peut être décomposée en trois étapes : addition nucléophile de l'anion conjugué de H_2O_2 , l'ion peroxydate, sur la lacune de l'atome de bore. La migration du groupement carboné, ici le phényle, suivie de l'addition nucléophile de l'anion hydroxyde permet de générer l'acide borique et un alcoolate, le phénolate dans le cas considéré ici.

Historiquement, Lo *et al.* ont été les premiers à utiliser ce type d'amorce pour la détection du H_2O_2 .⁵⁸ Depuis, le groupe de Chang a largement contribué à populariser cette amorce, en améliorant les sondes fluorogéniques permettant la détection du peroxyde d'hydrogène en milieu biologique.⁵⁹ Dans la littérature la plateforme fluorescente peut être directement liée à l'amorce ou via un espaceur définissant deux stratégies possédant chacune des avantages et des inconvénients. Ces deux stratégies seront détaillées successivement dans les sous-parties suivantes.

⁵⁷ H. G. Kuivila, A. G. Armour, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 5659-5662.

⁵⁸ L. C. Lo, C. Y. Chu, *Chem. Commun.* **2003**, 2728-2729.

⁵⁹ A. R. Lippert, G. C. Van de Bittner, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 793-804.

a) *Lien direct*

À partir de 2004, Chang *et coll.* ont développé une série de sondes portant une double amorce boronate directement reliées à des dérivés de fluorescéines **PF1** et **NPF1**,^{60,61} de xanthone **PR1** ou à la résorufine **PX1** (**Figure 15, B**).⁶² Les esters boroniques ont été introduits par une réaction de couplage pallado-catalysée de Miyaura en position 3' et 6' des différents motifs fluorescents.⁶³ En présence de H₂O₂, les esters boroniques sont convertis en phénol permettant de rétablir la fluorescence (**Figure 15, A**).

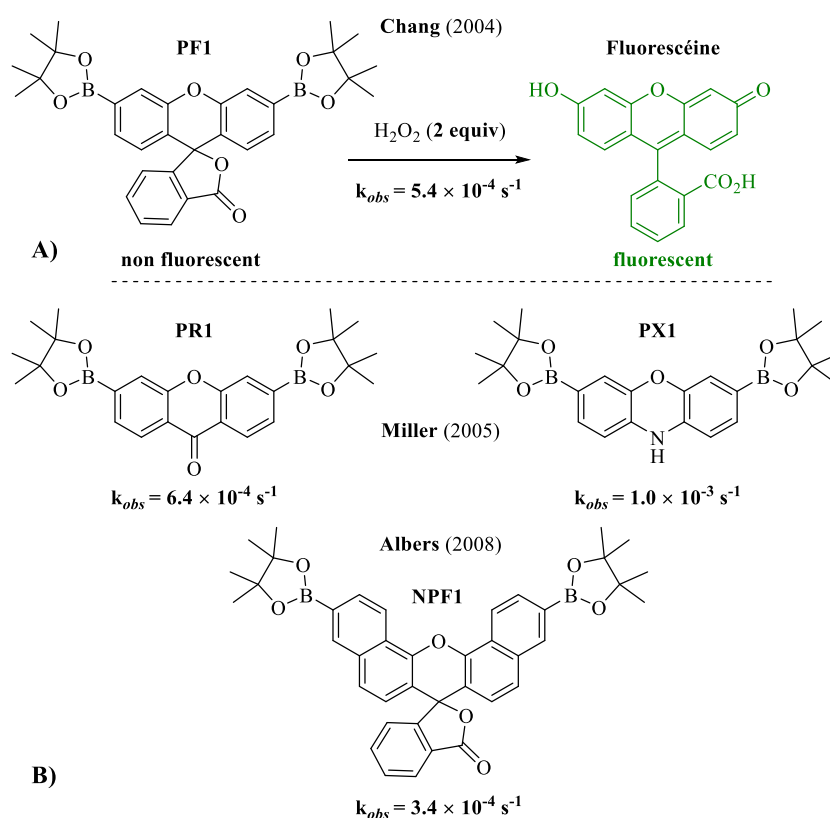


Figure 15 : A) Détection du H₂O₂ par la sonde **PF1** ;

B) Structures des sondes fluorogéniques **NPF1**, **PR1**, **PX1** avec les constantes de vitesse de pseudo ordre 1 associées

Ce type de sondes diboronates nécessite deux équivalents de H₂O₂ pour être activées, aussi les constantes de vitesse de pseudo ordre 1 mesurées par Chang et son équipe sont comprises entre 3.4 et $10 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ce qui est relativement lent. En revanche, ces sondes sont sélectives du peroxyde d'hydrogène et ne réagissent pas ou quasiment pas avec les autres FRO ou FRN testés (hydroperoxyde de *tert*-butyle, HO·, NO, ClO·, ...). Des tests *in cellula* ont montré que ces sondes sont perméables vis-à-vis de la paroi cellulaire des cellules HEK et des macrophages RAW264.7,

⁶⁰ M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392-15393.

⁶¹ A. E. Albers, B. C. Dickinson, E. W. Miller, C. J. Chang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5948-5950.

⁶² E. W. Miller, A. E. Albers, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16652-16659.

⁶³ T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.

et qu'elles permettaient la détection de peroxyde d'hydrogène après un ajout exogène de 20 équivalents de H₂O₂.

Pour s'affranchir de ces problèmes de réactivité, une deuxième génération de sondes fluorogéniques ne possédant plus qu'un seul groupement boronate dérivé de fluorescéine (**PG1**, **PF2**, **PF3**, **PE1**, **PY1**, et **PO1**) ou de résorufine (**PC1**) a été synthétisée (**Figure 16**).^{64,65}

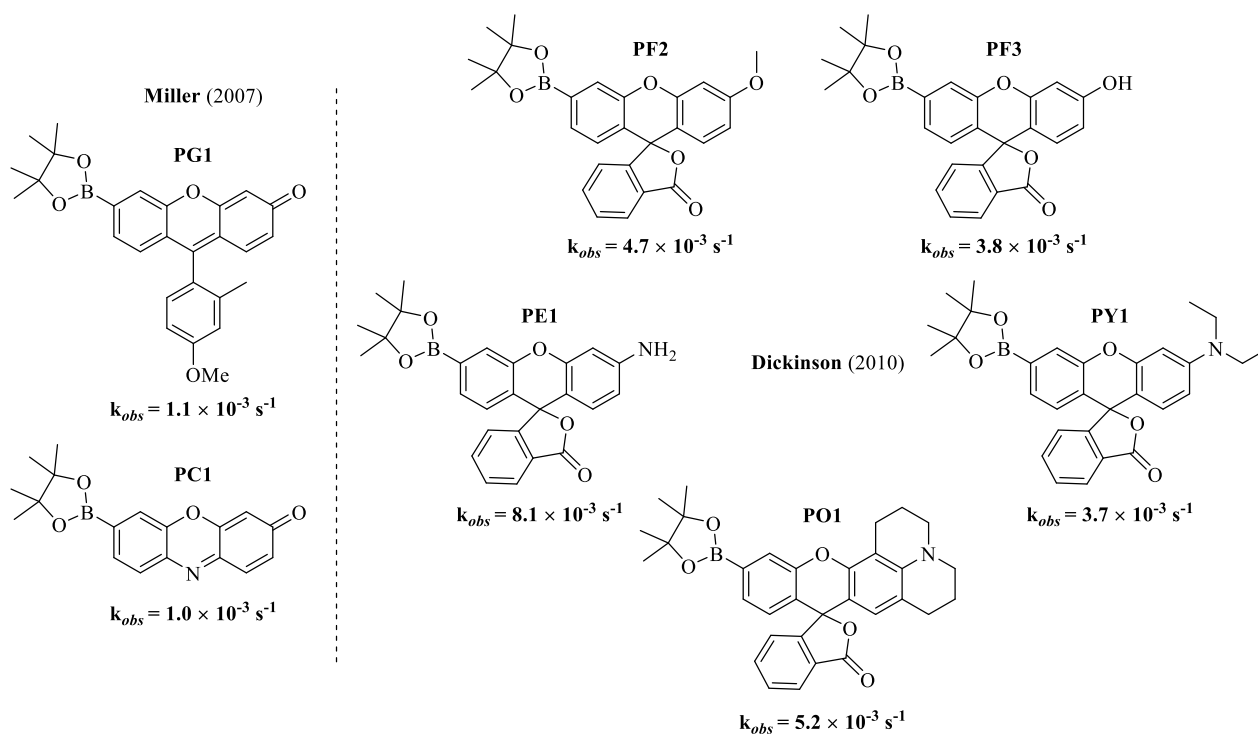


Figure 16 : Structures des sondes fluorogéniques **PG1**, **PF2**, **PF3**, **PE1**, **PY1**, **PO1** et **PC1** avec les constantes de vitesse de pseudo ordre 1 associées

Ces sondes se sont avérées posséder la même sélectivité vis-à-vis du H₂O₂ que les sondes diboronates, mais avec une réactivité légèrement supérieure ; les constantes de vitesse de pseudo ordre 1 mesurées sont comprises entre 1.0 et $8.2 \times 10^{-3} s^{-1}$. Comme les sondes diboronates, ces sondes ont permis de détecter du H₂O₂ exogène (2 à 10 équivalents) dans des cellules A431, et aussi du H₂O₂ endogène produit soit par des cellules RAW264.7 stimulées par l'ajout de PMA soit par des cellules A431 stimulées par l'EGF.

Depuis, d'autres groupes ont utilisé cette stratégie en élargissant à une gamme plus large de plateformes fluorescentes, comme par exemple la coumarine,⁶⁶ un naphthalimide,⁶⁷ un BODIPY,⁵⁵ le motif DCM,⁶⁸ ou encore une hémicyanine (**Figure 17**).⁶⁹ Celles-ci se sont avérées

⁶⁴ E. W. Miller, O. Tulyathan, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 263-267.

⁶⁵ B. C. Dickinson, C. Huynh, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5906-5915.

⁶⁶ L. Du, M. Li, S. Zheng, B. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3045-3048.

⁶⁷ B. Zhu, H. Jiang, B. Guo, C. Shao, H. Wu, B. Du, Q. Wei, *Sens. Actuator B-Chem.* **2013**, *186*, 681-686.

⁶⁸ H. Li, Q. Yao, J. Fan, J. Du, J. Wang, X. Peng, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 536-543.

⁶⁹ F. Xu, H. Li, Q. Yao, J. Fan, J. Wang, X. Peng, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 7363-7367.

posséder la même sélectivité et la même réactivité que les sondes développées par Chang. En fonction de leurs propriétés photophysiques et de leur solubilité en milieu biologique, ces sondes ont été utilisées pour la détection de H₂O₂ endogène dans les macrophages ou les cellules Hela.

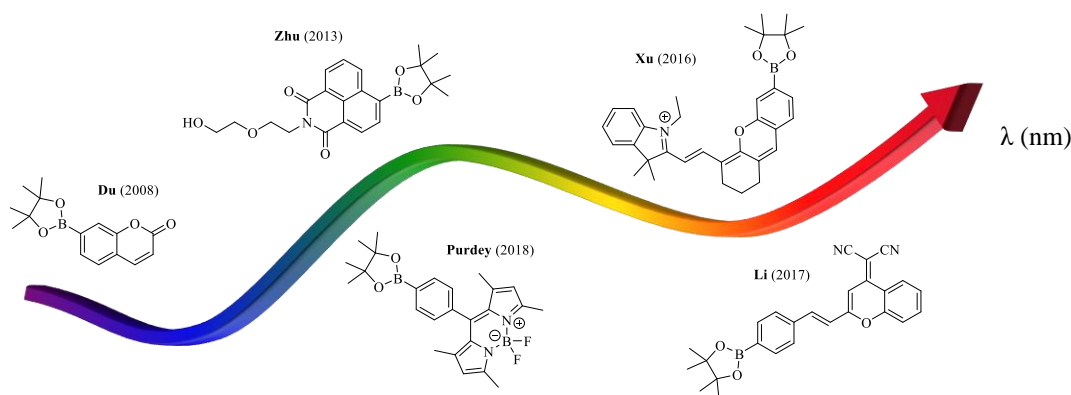


Figure 17 : Structures des différentes sondes basées sur l'amorce monoboronate pour détecter du H₂O₂

Pour une détection spatiale plus précise de la production de peroxyde d'hydrogène au niveau des différents compartiments de la cellule, une nouvelle sonde comportant un motif permettant de cibler une organelle, en l'occurrence les mitochondries, où une proportion importante des FRO sont produites, a été élaborée.⁷⁰ Pour cela, un groupement triphénylphosphonium a été couplé à un dérivé de fluorescéine en 4 étapes pour obtenir la sonde **MitoPY1** (Schéma 20).⁷¹ Ce groupement est largement utilisé pour le ciblage mitochondrial de par sa nature de cation lipophile. L'accumulation de cations TPP dans la mitochondrie est favorisée par le potentiel négatif de sa membrane.

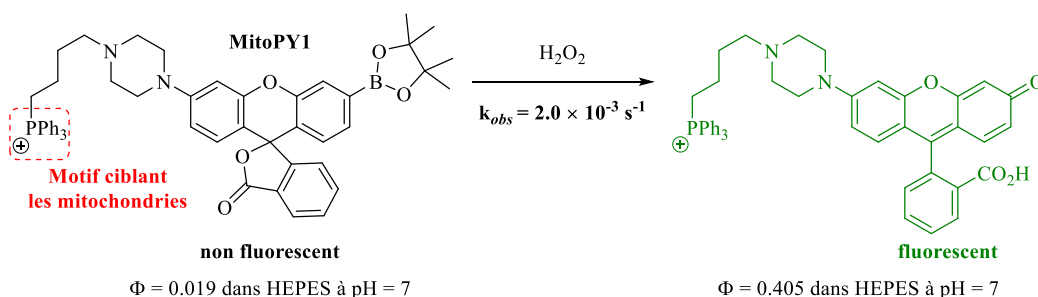


Schéma 20 : Détection du H₂O₂ par la sonde **MitoPY1**

L'ajout de ce groupement n'a pas eu d'influence sur la sélectivité ou la réactivité de cette sonde vis-à-vis du H₂O₂ par rapport aux sondes monoboronates. De plus, comme espéré, les auteurs ont pu montrer grâce à un agent de co-localisation que la sonde était spécifiquement adressée aux mitochondries. Enfin, la sonde **MitoPY1** a permis de visualiser la production

⁷⁰ J. F. Turrens, *J Physiol.* **2003**, 552, 335-344.

⁷¹ B. C. Dickinson, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9638-9639.

endogène de peroxyde d'hydrogène dans des cellules Hela en présence de paraquat (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium), herbicide produit dans les années 60 dont la toxicité aigüe induit une surproduction de FRO et notamment de H₂O₂ conduisant à la dégénérescence des cellules dans la maladie de Parkinson.⁷²

Compte-tenu de la toxicité du motif triphénylphosphonium,⁷³ ce dernier peut être remplacé par un motif pyridinium.⁷⁴ Depuis, plusieurs motifs permettant de cibler spécifiquement les différents sous-compartiments de la cellule ont été incorporés au squelette des sondes fluorogéniques : un motif morpholine pour un adressage au lysosome,⁷⁵ un sulfonamide pour le réticulum endoplasmique.⁷⁶ Enfin, le noyau a été ciblé par un dérivé aminé de fluorescéine (Figure 18).⁷⁷

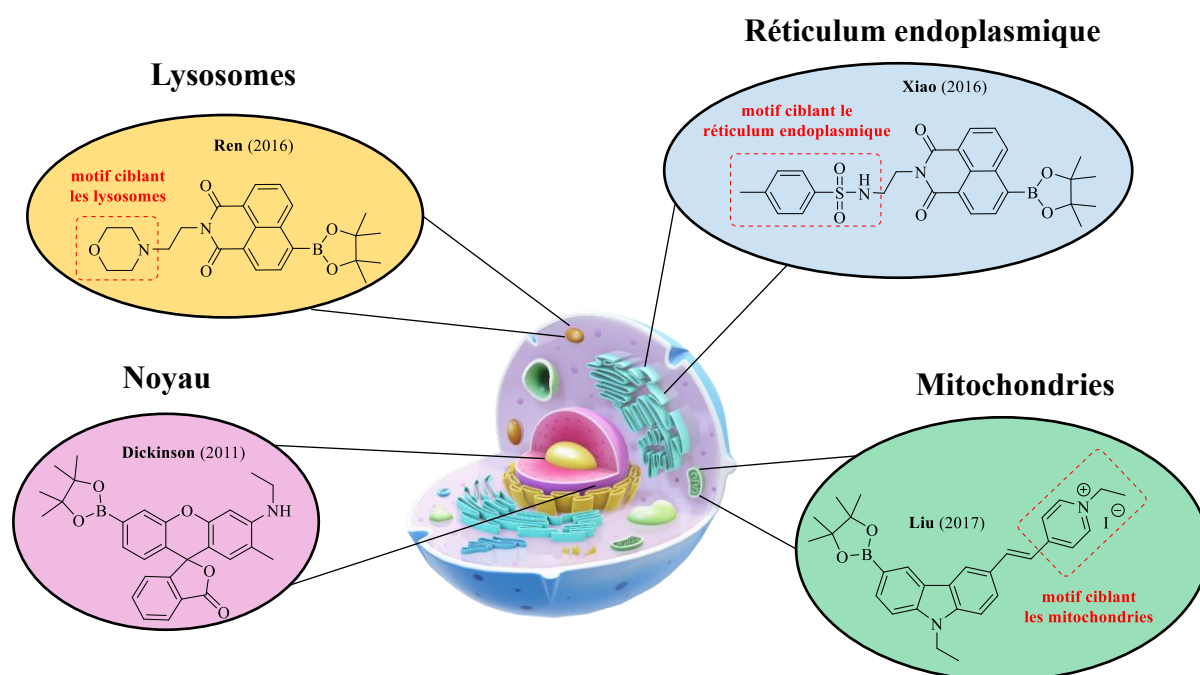


Figure 18 : Structures des différentes sondes fluorogéniques pour détecter du H₂O₂ ciblant des organelles

Enfin une dernière méthode de ciblage a été employée par Srikun *et al.* pour identifier une protéine d'intérêt grâce à la stratégie SNAP-tag.⁷⁸ Ainsi deux sondes **SPG1** et **SPG2** ont été synthétisées en 7 étapes à partir d'un dérivé de fluorescéine commercial, Tokyo Green (Figure 19).

⁷² P. R. Castello, D. A. Drechsel, M. Patel, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 14186-14193.

⁷³ L. F. Yousif, K. M. Stewart, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, 10, 1939-1950.

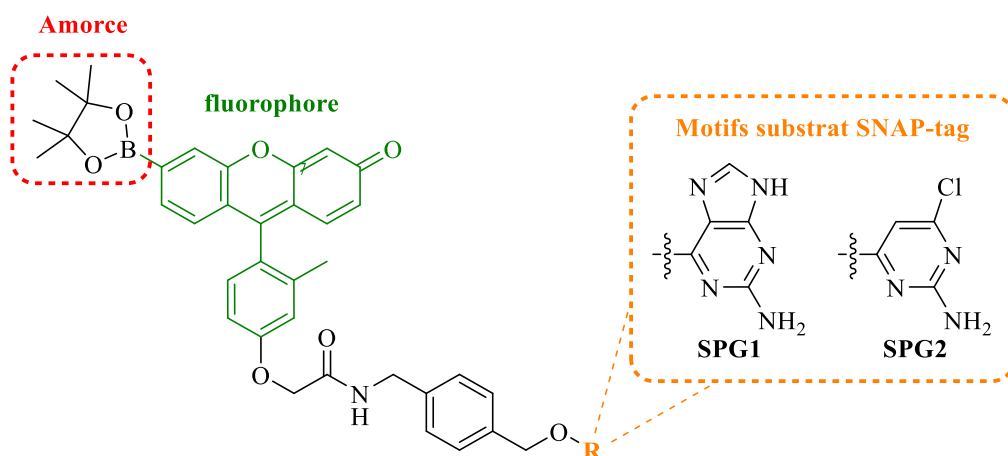
⁷⁴ Y. Liu, J. Niu, J. Nie, F. Meng, W. Lin, *New J. Chem.* **2017**, 41, 3320-3325.

⁷⁵ M. Ren, B. Deng, J. Y. Wang, X. Kong, Z. R. Liu, K. Zhou, L. He, W. Lin, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 79, 237-243.

⁷⁶ H. Xiao, P. Li, X. Hu, X. Shi, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 6153-6159.

⁷⁷ B. C. Dickinson, Y. Tang, Z. Chang, C. J. Chang, *Chem. Biol.* **2011**, 18, 943-948.

⁷⁸ D. Srikun, A. E. Albers, C. I. Nam, A. T. Iavarone, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4455-4465.



Composés	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_F	Exaltation de fluorescence	k (10^{-3} s^{-1})
SPG1	465	515	0.10	0.2	n.d.
SPG2	465	515	0.09	10	1.0
SNAP-SPG2	465	515	0.07	8	n.d.

Figure 19 : Structures, propriétés photophysiques et cinétiques des sondes SPG1 et SPG2

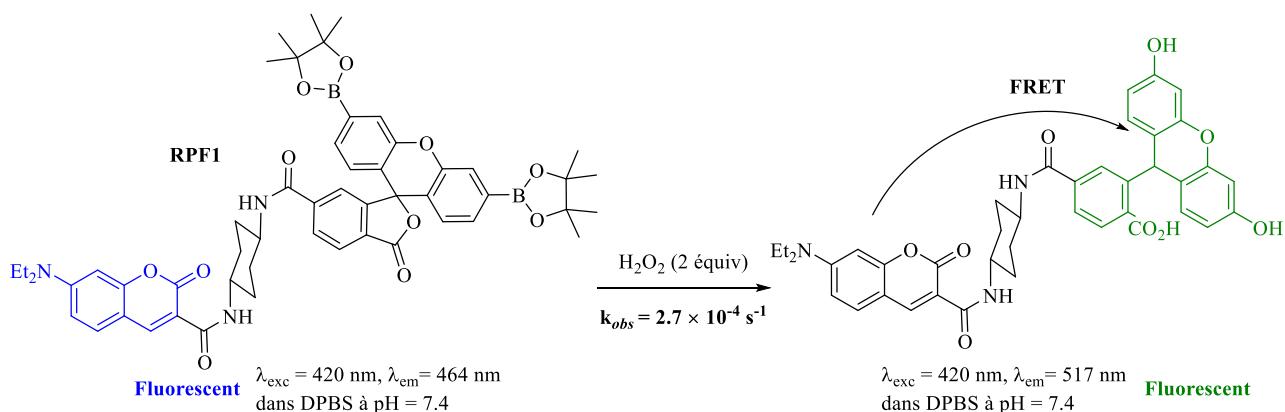
La sonde fluorogénique **SPG1** possède une exaltation de fluorescence beaucoup plus faible que la sonde **SPG2** probablement à cause de la présence du groupement guanine. Aussi, les auteurs se sont concentrés sur la sonde **SPG2**, pour laquelle l'exaltation de fluorescence est suffisante. La constante d'oxydation de pseudo ordre 1 a pu être mesurée et est du même ordre de grandeur que celles des autres sondes à amorce monoboronate précédemment décrites. Le greffage de la sonde **SPG2** sur la protéine d'intérêt en sonde **SNAP-SPG2**, induit de faibles modifications photophysiques des propriétés d'absorption et d'émission, de même que pour l'exaltation de fluorescence en présence de H_2O_2 .

Afin de valider l'utilisation de cette approche avec une sonde à amorce boronate, les auteurs ont utilisé diverses lignées cellulaires commerciales HEK293T exprimant la protéine SNAP-tag soit dans la membrane plasmique, soit sur la membrane des mitochondries ou encore sur le réticulum endoplasmique. La sonde **SNAP-SPG1** possédant une faible perméabilité cellulaire a servi à imager les membranes cellulaires. A l'inverse, la sonde **SNAP-SPG2**, grâce à sa bonne perméabilité cellulaire, a permis de visualiser la membrane interne des mitochondries ou du réticulum endoplasmique en présence de peroxyde d'hydrogène exogène.

Toutes les sondes fluorogéniques à amorce boronate présentées précédemment ont permis de visualiser des augmentations de concentration de peroxyde d'hydrogène en milieu biologique. Néanmoins, une quantification de ces variations n'est pas envisageable car de nombreux paramètres peuvent modifier l'intensité de fluorescence de ces pro-sondes : l'intensité lumineuse

d'excitation, l'épaisseur de l'échantillon testé, la concentration de la sonde fluorogénique employée, etc... Pour dépasser ces limitations, des sondes fluorogéniques, dites ratiométriques, ont été élaborées. Celles-ci permettent par exemple l'enregistrement simultané de deux signaux lumineux en absence ou en présence de l'analyte recherché, dans notre cas le peroxyde d'hydrogène.

Ainsi, en 2006 Chang et son équipe ont synthétisé une première sonde ratiométrique (**RPF1**) composée de deux motifs fluorescents : une coumarine reliée à une fluorescéine portant une amorce diboronate par un espaceur *trans*-1,4-cyclohexanediamide rigide non conjugué (**Schéma 21**).⁷⁹



En absence de peroxyde d'hydrogène, les amorces boronates inhibent la capacité d'émission de la fluorescéine. Aussi, seule la coumarine peut être excitée et émettre dans le bleu. En revanche en présence de H_2O_2 lorsque la coumarine (donneuse) est excitée, un processus photophysique de type FRET permet de transférer cette énergie à la fluorescéine (acceptrice) qui émet dans le vert. Le ratio de ces deux intensités d'émission de fluorescence bleue/verte permet de connaître les variations de concentrations de peroxyde d'hydrogène dans le milieu testé. Même si cette sonde fluorogénique possède une vitesse d'oxydation relativement lente ($2.7 \times 10^{-4} s^{-1}$), elle a permis de détecter la surproduction de peroxyde d'hydrogène dans des mitochondries stimulées par l'Antimycine A isolé de *Saccharomyces cerevisiae* (levures de bière).⁸⁰

⁷⁹ A. E. Albers, V. S. Okreglak, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9640-9641.

⁸⁰ H. Kim, L. Esser, M. B. Hossain, D. Xia, C.-A. Yu, J. Rizo, D. van der Helm, J. Deisenhofer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4902-4903.

Depuis Liang *et al.* et Xu *et al.* ont aussi utilisé cette stratégie en remplaçant le dérivé fluorescéine par un motif naphthalimide et en considérant deux bras espaceurs différents de type pipérazine **16** ou alcane **17** (Figure 20).^{81, 82}

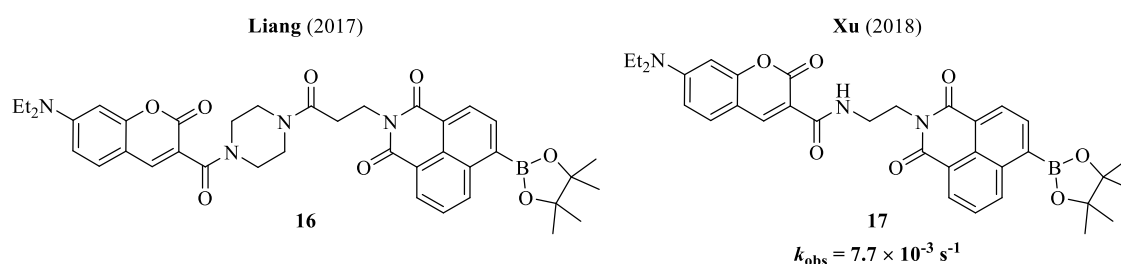


Figure 20 : Structures des sondes ratiométriques **16** et **17** pour détecter le H₂O₂

Par ailleurs, la spécificité et la réactivité de ces sondes monoboronates restent inchangées par rapport aux sondes précédemment décrites. La sonde **16** a notamment servi à détecter du H₂O₂ produit après stimulation par EGF dans des cellules A431. La sonde **17** quant à elle a permis de détecter le peroxyde d'hydrogène endogène de cellules Hela stimulées par le lipopolysaccharide (LPS), molécule stimulant la production de FRO par une cascade inflammatoire. Cette sonde s'est également révélée efficace pour la détection du H₂O₂ exogène dans des poisson-zèbres.⁸³

Des progrès conséquents ont donc été réalisés dans la conception des sondes à amorce boronate au cours des quinze dernières années. Tout d'abord, le remplacement des sondes comportant deux amorces boronates par celles comportant une unique amorce a permis d'améliorer la cinétique de libération de l'agent fluorescent de ces systèmes. L'ajout de groupements permettant le ciblage vers des organelles spécifiques a ensuite augmenté significativement la détection spatiale de la formation du peroxyde d'hydrogène *in cellula*. Enfin, les sondes ratiométriques permettant de quantifier les variations de concentration de H₂O₂ sont actuellement de plus en plus étudiées. Malgré ces réussites les sondes fluorogéniques basées sur des amorces boronates directement branchées à une plateforme pro-fluorescente peuvent nécessiter des efforts synthétiques importants, surtout lors de la montée en échelle, ce qui limite leur utilisation.

⁸¹ X. Liang, X. Xu, D. Qiao, Z. Yin, L. Shang, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 3187-3194.

⁸² K. Xu, L. He, X. Yang, Y. Yang, W. Lin, *Analyst* **2018**, *143*, 3555-3559.

⁸³ H. Y. Hsu, M. H. Wen, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22131-22139.

b) *Liaison via un bras auto-immolable* :

Le contrôle spatio-temporel du relargage d'une molécule donnée en milieu physiologique est un enjeu important en chimie, et plus particulièrement en chimie médicinale. Pour améliorer la précision du relargage de principes actifs, il a été envisagé de masquer temporairement l'activité biologique de ces molécules tant qu'elles n'avaient pas atteint leur cible. La présence d'un espaceur dit auto-immolable entre l'amorce et le composé actif est souvent nécessaire pour permettre un relargage efficace. Après activation de l'amorce, l'espaceur se décompose par une succession de réactions appelée processus d'auto-immolation, induisant la libération de l'effecteur (principe actif ou fluorophore) (**Figure 21**).

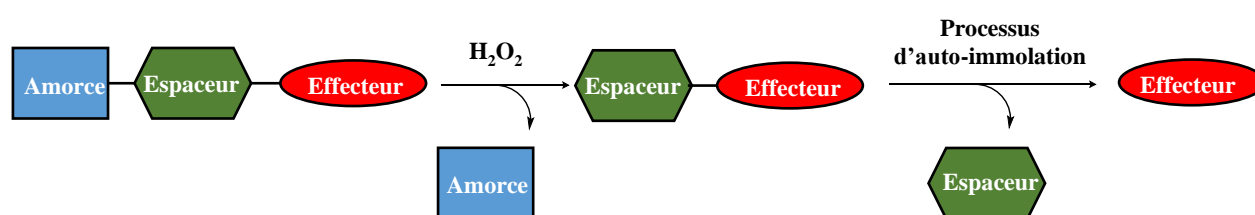


Figure 21 : Représentation schématique du principe d'auto-immolation permettant la libération d'un effecteur (principe actif ou fluorophore)

Cette stratégie a été décrite pour la première fois par Carl *et al.* en 1981 pour la détection d'une activité enzymatique.⁸⁴ Depuis, de nombreux groupes ont fait évoluer les structures des bras auto-immolables en améliorant leurs propriétés (solubilité, cinétique d'auto-immolation, ou accès à des structures multimodales pour les polythérapies).^{85, 86} Plusieurs groupes français comme l'équipe de J. Hasserodt,⁸⁷ de S. Papot,⁸⁸ de P.-Y. Renard,⁸⁹ ou encore celles de F. Schmidt et L. Jullien ont permis des avancées majeures dans ce domaine.^{90, 91} Par exemple, le groupe de P.-Y. Renard a développé de nouveaux processus d'auto-immolation basés sur des cyclisations intramoléculaires. Le groupe de L. Jullien a quant à lui, rationalisé les paramètres influençant les vitesses des processus d'auto-immolation d'alcools benzyliques (pH, variations autour du groupement aromatique).

⁸⁴ P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479-480.

⁸⁵ Pour une revue sur la relation structure-cinétique de relargage des bras auto-immolables : A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492-7509.

⁸⁶ Pour une revue sur les systèmes auto-immolables supramoléculaires en vue d'amplification de la détection : M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim, D. Shabat, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1309-1352.

⁸⁷ M. Prost, J. Hasserodt, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14896-14899.

⁸⁸ R. Barat, T. Legigan, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, E. Peraudeau, J. Clarhaut, P. Poinot, A. E. Fernandes, V. Aucagne, D. A. Leigh, S. Papot, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2608-2613.

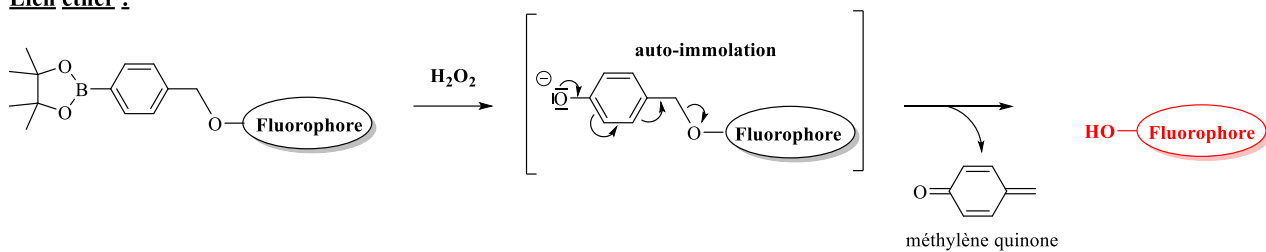
⁸⁹ Y. Meyer, J. A. Richard, B. Delest, P. Noack, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777-1780.

⁹⁰ R. Labruère, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9344-9347.

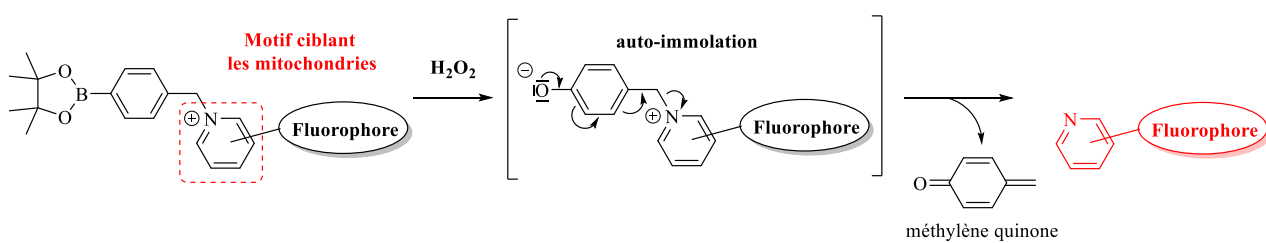
⁹¹ S. Serra, A. Alouane, T. Le Saux, S. Huvelle, R. Plasson, F. Schmidt, L. Jullien, R. Labruère, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6396-6399.

De manière analogue au développement des approches thérapeutiques, depuis une quinzaine d'années, cette stratégie a été appliquée à la conception de nouveaux systèmes fluorogéniques. Parmi toutes les espaceurs auto-immolables, quatre structures ont été privilégiées dans le cadre des sondes fluorogéniques à amorce boronate : les structures permettant des β -éliminations de type 1,6 via un lien éther, carbamate, carbonate, et dernièrement pyridinium (**Schéma 22**).

Lien éther :



Lien pyridinium :



Lien carbonate ou carbamate :

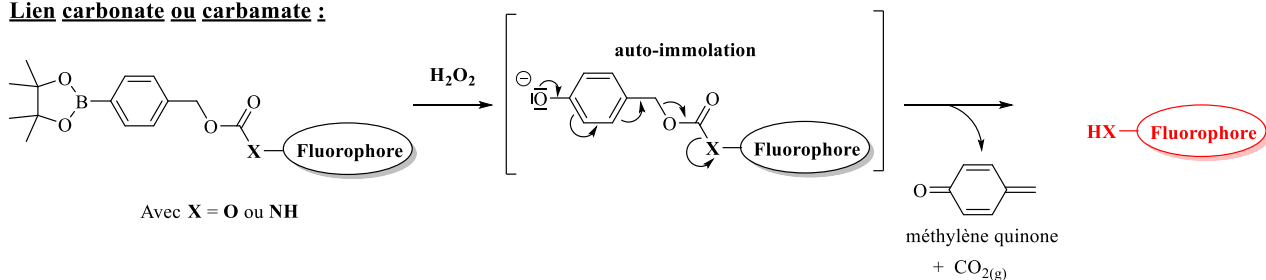


Schéma 22 : Représentation des processus d'auto-immolation de bras éther, carbonate, carbamate et pyridinium

Cette approche a pour principal avantage de faciliter l'accès synthétique de ces sondes fluorogéniques par rapport à celles dans lesquelles le fluorophore est directement lié à l'amorce. En effet, les fluorophores peuvent être couplés par de simples réactions d'éthérification, estérification et amidation à un ester boronique, le plus souvent disponible commercialement. En revanche, l'ajout d'un bras auto-immolable implique une étape supplémentaire pour rétablir la fluorescence du système ce qui impacte la cinétique du système.

Dans le cas des liens carbonates et carbamates, la décarboxylation est une étape additionnelle au processus d'auto-immolation. Celle-ci a lieu en quelques millisecondes en milieu faiblement basique à température ambiante pour les carbonates et à température physiologique pour les carbamates dans les mêmes conditions. Aussi pour ces conditions, seules l'oxydation et l'auto-

immolation proprement dites sont à prendre en compte d'un point de vue cinétique.⁹² De plus, la libération du CO_{2(g)} permet de déplacer l'équilibre réactionnel dans le sens de la libération du fluorophore. Pour établir une échelle de vitesse de réaction de ces trois systèmes auto-immolables, de nombreuses études cinétiques ont été menées. Par exemple, Lee *et al.* ont utilisé un modèle composé d'un groupement silylé (P) comme amorce, relié à la 7-hydroxycoumarine (GP) par différents bras auto-immolables. Comme l'amorce silylée réagit très rapidement avec les anions fluorures (100 équivalents de TBAF), elle leur a permis de déterminer les constantes relatives des différents processus d'auto-immolation grâce à la mesure des variations d'intensité de fluorescence.⁹³ Avec leurs résultats et ceux d'autres équipes (P= 4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle et GP = 7-amino-4-(trifluorométhyl)coumarine),⁹² il est possible de dresser une échelle relative des différents processus d'auto-immolation utilisés (**Figure 22**). Les carbamates sont les plus rapidement clivés et possèdent plusieurs ordres de grandeurs (>10³) de différence en matière de vitesse comparé aux bras auto-immolables de type éther ou carbonate.

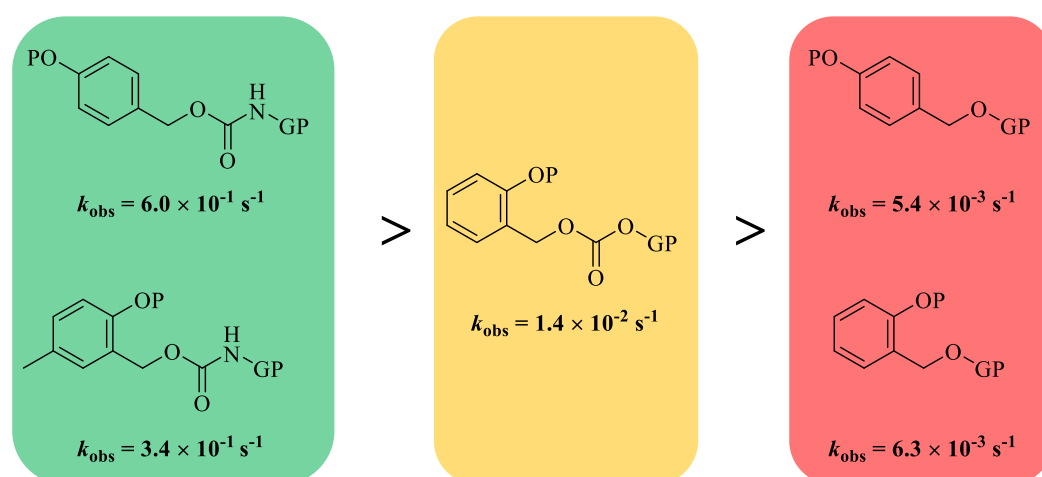


Figure 22 : Echelle de vitesse d'auto-immolation entre les bras éther, carbonate et carbamate. Constantes de vitesses issues de L. Jullien⁹² et de D. Lee⁹³ avec P = groupement protecteur ou amorce et GP = groupe partant

En milieu physiologique, la stabilité des carbonates est très faible ce qui limite leur utilisation. C'est pourquoi, nous détaillerons ci-dessous les sondes fluorogéniques possédant des bras auto-immolables de type éther, carbamate et pyridinium. En fonction des applications désirées les éthers (relargage plus lent) ou les carbamates (relargage rapide) peuvent être utilisés. Ces derniers possèdent, le plus souvent, les propriétés photophysiques les moins sensibles aux variations de pH car ils sont basés sur des fluorophores azotés. Actuellement, il n'existe pas

⁹² A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 1334-1340.

⁹³ H. Y. Lee, X. Jiang, D. Lee, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2065-2068.

d'études cinétique et de stabilité approfondies pour les bras pyridinium, leur utilisation dans la détection du peroxyde d'hydrogène sera néanmoins détaillée.

i. Lien éther :

L'utilisation d'un bras auto-immolable éther a permis la synthèse de très nombreuses sondes pour la détection du peroxyde d'hydrogène en milieu physiologique. En effet, sa faible cinétique d'activation est compensée par sa grande stabilité en milieu physiologique. Daniel *et al.* ont par exemple synthétisé une sonde fluorogénique **FBBBE** diboronate, équivalente à la sonde **PF1** de Chang *et al.* possédant deux espaceurs auto-immolables de type benzyle sur la fluorescéine (**Figure 23**).⁹⁴

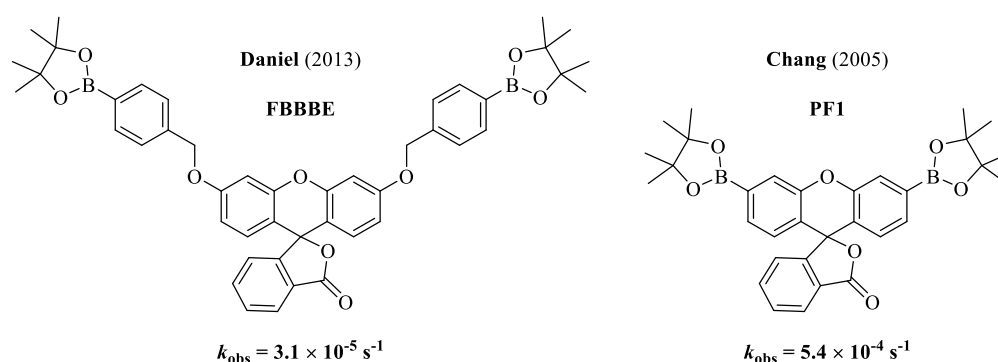


Figure 23 : Structure des sondes fluorogéniques **FBBBE** et **PF1** avec les constantes de vitesse de pseudo ordre1 associées

La constante de vitesse de pseudo ordre 1 obtenue pour **FBBBE** est plus faible que celle de **PF1** mais la sélectivité de la sonde vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène est conservée. De plus, les auteurs ont pu visualiser la production endogène de H₂O₂ dans des macrophages RAW264.7 stimulés par du LPS.

Cette faible réactivité est à nuancer car pour d'autres sondes monoboronates les constantes cinétiques sont plus élevées. Par exemple, La même équipe a aussi étudié une sonde fluorogénique monoboronate dérivée de la 7-hydroxycoumarine **CBE** dont la constante de pseudo ordre 1 est comparable à toutes les autres sondes monoboronates décrites précédemment (**Figure 24**).

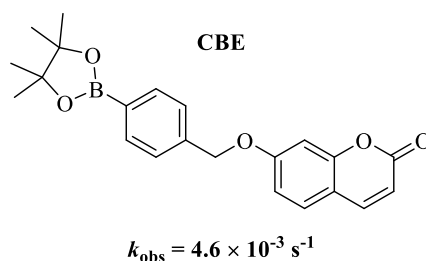


Figure 24 : Structure des sondes fluorogéniques **CBE** avec la constante de vitesse de pseudo ordre1 associée

⁹⁴ K. B. Daniel, A. Agrawal, M. Manchester, S. M. Cohen, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 593-598.

Ainsi, de nombreuses sondes à amorce boronate possédant un espaceur benzyléther ont été synthétisées pour détecter directement le peroxyde d'hydrogène produit *in cellula*. Ces sondes sont basées sur une très grande gamme de fluorophores, dont un motif coumarine,^{95, 94} naphthalimide,⁹⁶ DDAO,⁹⁷ DCM,⁹⁸ ou encore hémicyanine (**Figure 25**).⁹⁹

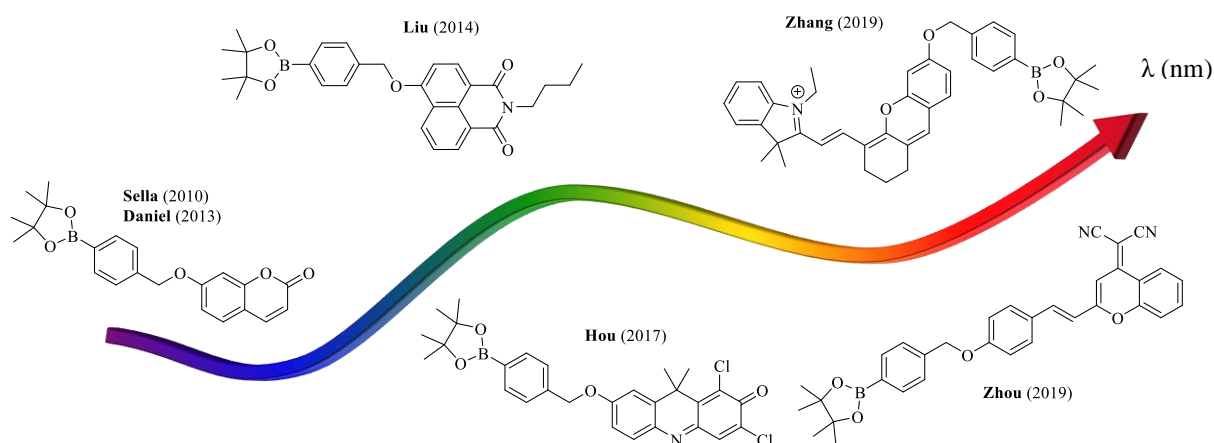


Figure 25 : Représentation des différentes sondes fluorogéniques à amorce boronate avec un bras auto-immolable de type éther

Comme avec les sondes dans lesquelles l'amorce boronate est directement liée à la plateforme fluorogénique, des éléments d'adressage spécifiques ont été incorporés.^{100, 101} De même des systèmes ratiométriques multimodaux pour la détection individuelle ou simultanée de H₂O₂ et NO ont été élaborés.¹⁰²

ii. Lien carbamate :

Comme indiqué précédemment, Lo *et al.* ont été les pionniers dans l'utilisation d'une amorce boronate. La sonde **18**, composée d'une amorce boronate reliée par un espaceur auto-immolable de type benzylcarbamate à la 7-amino-4-méthylcoumarine, a été synthétisée en 5 étapes. Le phénolate formé après oxydation par le peroxyde d'hydrogène est instable. L'immolation de celui-ci conduit à la formation d'une méthylène quinone et à la libération de CO₂ gazeux et du fluorophore, la 7-amino-4-méthylcoumarine (AMC) (**Schéma 23**).⁵⁸

⁹⁵ E. Sella, A. Lubelski, J. Klafter, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3945-3952.

⁹⁶ C. Liu, C. Shao, H. Wu, B. Guo, B. Zhu, X. Zhang, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16055.

⁹⁷ J. Hou, M. Qian, H. Zhao, Y. Li, Y. Liao, G. Han, Z. Xu, F. Wang, Y. Song, Y. Liu, *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1024*, 169-176.

⁹⁸ Z. Zhou, Y. Li, W. Su, B. Gu, H. Xu, C. Wu, P. Yin, H. Li, Y. Zhang, *Sens. Actuator B-Chem.* **2019**, *280*, 120-128.

⁹⁹ J. Zhang, L. Shi, Z. Li, D. Li, X. Tian, C. Zhang, *Analyst* **2019**, *144*, 3643-3648.

¹⁰⁰ J. Liu, S. Zhou, J. Ren, C. Wu, Y. Zhao, *Analyst* **2017**, *142*, 4522-4528.

¹⁰¹ L. Tang, M. Tian, H. Chen, X. Yan, K. Zhong, Y. Bian, *Dyes Pigm.* **2018**, *158*, 482-489.

¹⁰² L. Yuan, W. Lin, Y. Xie, B. Chen, S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1305-1315.

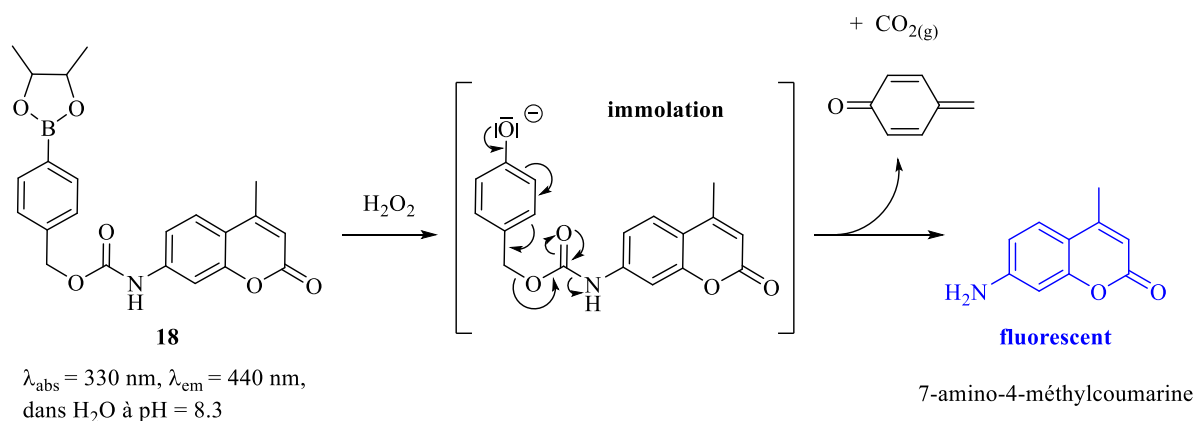


Schéma 23 : Détection du H_2O_2 par la sonde 18

Comme il s'agissait d'une étude préliminaire pour évaluer l'efficacité de l'amorce boronate pour la détection du H_2O_2 , les expériences réalisées se sont limitées à des mesures *in vitro* (absence de tests de sélectivité complets, et de mesures cinétiques, etc...).

Depuis, le groupe de Chang a utilisé cette approche pour synthétiser deux nouvelles sondes ratiométriques **PL1** et **PN1**.^{103, 104} Les groupes de Cho et Kim¹⁰⁵ ou encore celui de Li, ont synthétisé respectivement les sondes fluorogéniques **19** et **20** porteuses de groupements ciblant spécifiquement les mitochondries (**Figure 26**).¹⁰⁶

¹⁰³ D. Srikun, E. W. Miller, D. W. Domaille, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4596-4597.

¹⁰⁴ C. Chung, D. Srikun, C. S. Lim, C. J. Chang, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9618-9620.

¹⁰⁵ G. Masanta, C. H. Heo, C. S. Lim, S. K. Bae, B. R. Cho, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3518-3520.

¹⁰⁶ H. Chen, X. He, M. Su, W. Zhai, H. Zhang, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10157-10163.

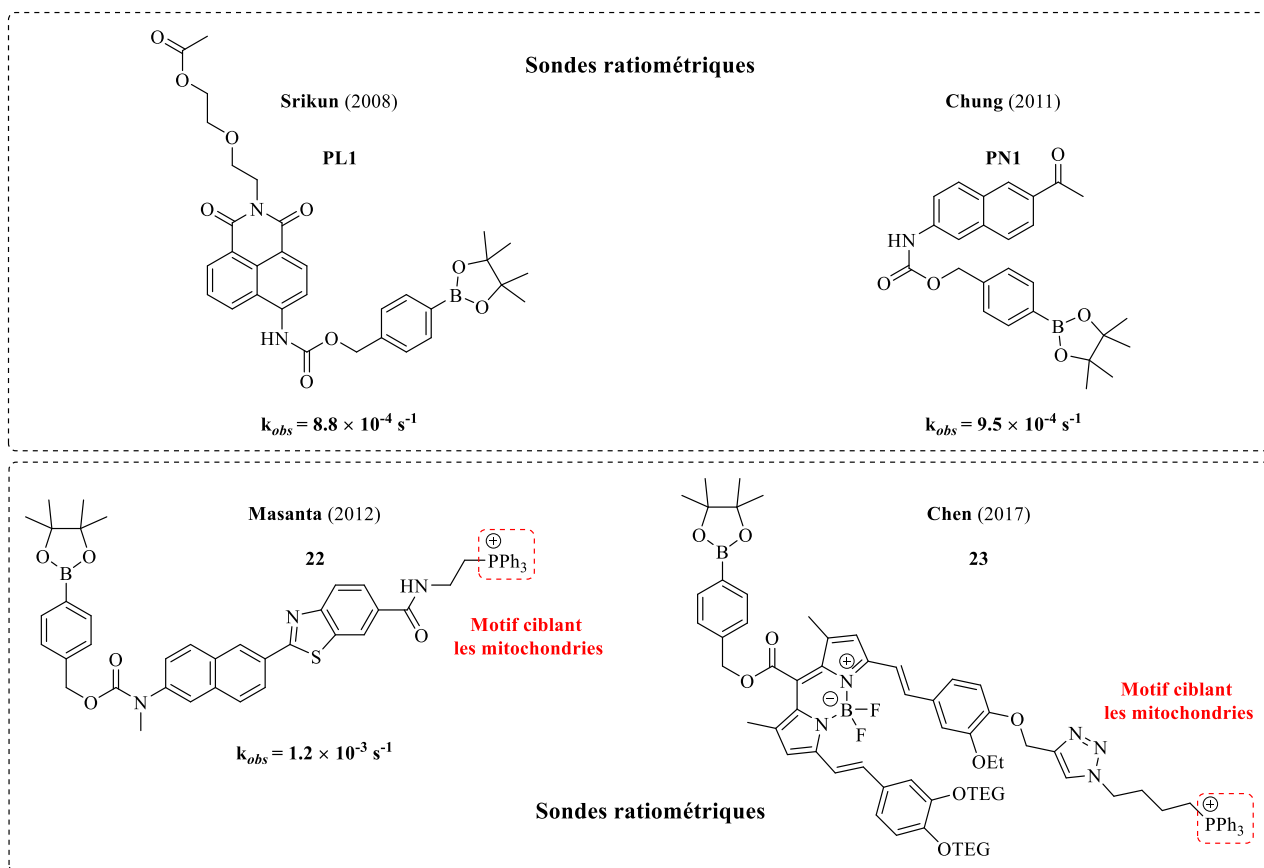


Figure 26 : Structures des sondes fluorogéniques à amorce boronate possédant un bras auto-immolable avec un lien carbamate

Les constantes de pseudo ordre 1 mesurées sont comprises entre 0.9 et $1.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, soit des valeurs légèrement inférieures à celle des sondes monoboronates dans lesquelles le fluorophore est directement lié à l'amorce qui sont comprises entre 1.0 à $8.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Sans surprise la spécificité de ces sondes est conservée. Elles ont été utilisées pour la détection du peroxyde d'hydrogène endogène produit par des cellules Hela ou des macrophages RAW264.7 stimulés par du PMA.

iii. Lien pyridinium :

Dernièrement, l'espaceur auto-immolable de type benzylpyridinium a été envisagé pour détecter le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, grâce à sa charge cationique permet de diriger des sondes fluorogéniques vers les mitochondries, et possède un processus d'auto-immolation similaire au bras éther mais conduisant à la libération d'un dérivé de type pyridine (**Figure 27**).

Pour le moment, le nombre d'études basées sur cette stratégie reste très limité. Par exemple, des sondes fluorogéniques dérivées d'un motif coumarine,¹⁰⁷ BODIPY,¹⁰⁸ rhodamine,¹⁰⁹ ou des systèmes fluorogéniques via l'agrégation d'un composé fluorescent en présence de H₂O₂ ont été décrits (**Figure 27**).¹¹⁰

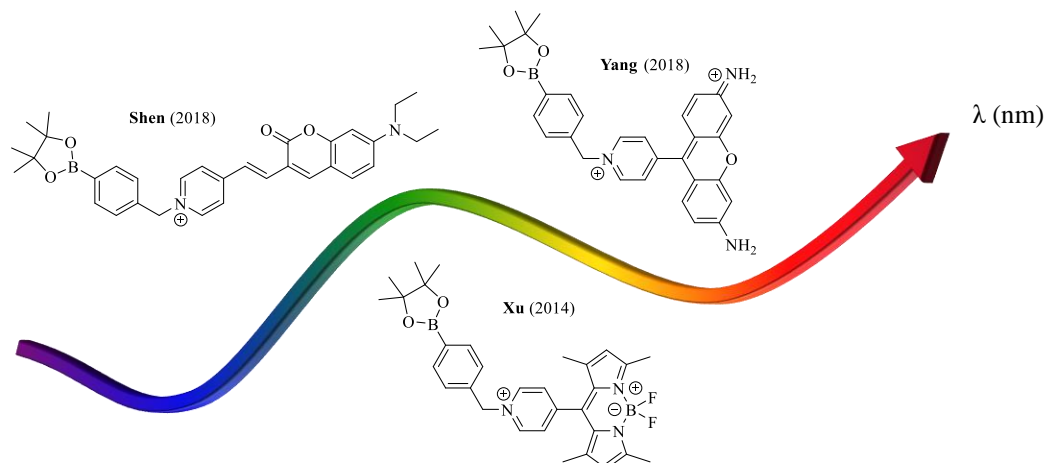


Figure 27 : Représentation schématique du processus d'auto-immolation 1,6 avec un bras pyridinium

L'introduction de cet espaceur n'a aucune influence sur la sélectivité de l'amorce boronate. En revanche, la réactivité de ces sondes fluorogéniques semblerait plus faible. En effet, les temps d'incubation employés pour visualiser les variations de peroxyde d'hydrogène exogène ou endogène *in cellula* sont compris entre 30 minutes et 80 minutes. Seule l'équipe de Gao *et al.* a mesuré la constante de vitesse relative à l'oxydation de 8.1 M⁻¹ s⁻¹ correspondant à $k_{obs} = 8.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (avec [H₂O₂] = 100 μM). Cette valeur est comparable à celles obtenues précédemment. Jusqu'à présent, cette sonde a uniquement été étudiée *in vitro*. D'autres études sont nécessaires pour évaluer précisément sa cinétique d'auto-immolation et ses capacités en imagerie cellulaire, avec des plateformes fluorescentes plus adaptées (émission dans le proche infrarouge, meilleure perméabilité cellulaire, etc..).

L'ensemble des sondes fluorogéniques basées sur les amorces boronates a connu de nombreuses évolutions au cours des quinze dernières années. Une première génération de sondes à amorces diboronates ont permis l'imagerie *in vitro* et du H₂O₂ exogène en cellules vivantes. Rapidement une deuxième génération de sondes fluorogéniques à amorces monoboronates plus réactives a permis l'imagerie cellulaire de la production endo ou exogène du H₂O₂. De nouvelles sondes ratiométriques et/ou dirigées ont ensuite développées pour permettre de visualiser les

¹⁰⁷ Y. Shen, X. Zhang, Y. Zhang, Y. Wu, C. Zhang, Y. Chen, J. Jin, H. Li, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, 255, 42-48.

¹⁰⁸ J. Xu, Q. Li, Y. Yue, Y. Guo, S. Shao, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 56, 58-63.

¹⁰⁹ L. Yang, J. Y. Niu, R. Sun, Y. J. Xu, J. F. Ge, *Analyst* **2018**, 143, 1813-1819.

¹¹⁰ C. Gao, M. K. Hossain, L. Li, M. A. Wahab, J. Xiong, W. Li, *J. Photochem. Photobiol. A* **2019**, 368, 97-103.

variations de la concentration cellulaire du H_2O_2 mais également pour localiser sa production dans des cellules vivantes. Parallèlement, l'ajout d'espaceurs auto-immolables a rendu possible l'imagerie *in vivo* via des sondes multimodales, ratiométriques ou encore l'imagerie en présence de peroxyde d'hydrogène.

6. Conclusions et remarques

Dans ce chapitre introductif, les enjeux de la détection du peroxyde d'hydrogène ont été explicités. Parmi tous les systèmes employés, ceux basés sur des sondes organiques comme systèmes fluorogéniques ont été détaillés. Ces sondes sont le plus souvent composées d'une amorce et d'une plateforme pro-fluorescente. Plusieurs types d'amorces ont été employés comme par exemple des amorces utilisant les propriétés d'oxydoréduction du H_2O_2 , ou les amorces basées sur les chalcogènes. Malheureusement celles-ci dépendent fortement de la structure de la sonde choisie. Ainsi, des amorces utilisant les propriétés chimiques du peroxyde d'hydrogène comme les amorces sulfonyle, dicétone, ou l'amorce boronate ont été développées. C'est cette dernière qui est, à ce jour, la plus exploitée.

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce particulièrement diffusive ; aussi malgré toutes les améliorations faites dans le choix des amorces ou la construction des sondes fluorogéniques, celles-ci sont le plus souvent limitées en matière de résolution spatio-temporelle. Cette notion peut être définie comme $R = \sqrt{Dt}$ avec D , le coefficient de diffusion de H_2O_2 ($D=10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) et t , le temps de demi-vie de réaction. Par exemple un temps de demi-vie de 30 minutes donne une résolution spatiale de 1 mm. Celle-ci est largement insuffisante, car dans ce cas, la sonde va être en compétition avec tous les autres composés capables de réagir avec le H_2O_2 . Ainsi la détection de H_2O_2 par toutes les sondes présentées jusqu'ici est sous-estimée, à cause de leur faible vitesse de réaction vis-à-vis de celui-ci. Pour atteindre une résolution cellulaire, un temps de demi-vie de 1 seconde soit une constante de vitesse de supérieure à $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ est nécessaire (**Figure 28**). C'est pourquoi une nouvelle génération d'amorces reste à développer pour atteindre cet objectif.

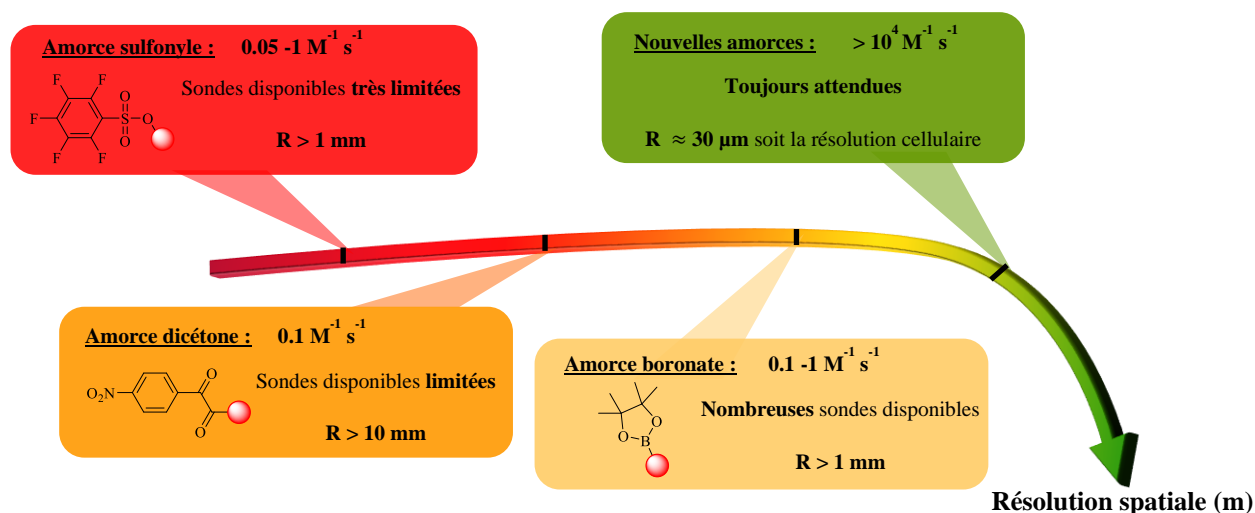


Figure 28 : Corrélation de la résolution spatiale avec les constantes cinétiques des différentes amorces

7. Description du projet de thèse

L'objectif de cette thèse a été d'élaborer de nouvelles sondes moléculaires fluorogéniques nettement plus réactives vis-à-vis du H₂O₂ que les esters boroniques existants qui permettraient ainsi une détection de cet analyte avec une meilleure résolution spatio-temporelle. Ces sondes fluorogéniques ont été conçues autour d'une nouvelle amorce, à base de bore, l'amorce borinique (Figure 29).

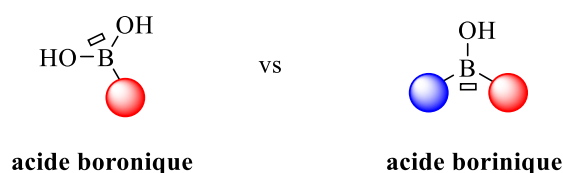


Figure 29 : Structures des amorces boronique et borinique

Les acides boriniques sont composés de deux liaisons carbone-bore et d'une liaison bore-oxygène alors que les acides boroniques sont composés d'une seule liaison carbone bore et de deux liaisons bore-oxygène. Ainsi les acides boriniques possèdent des propriétés électroniques et stériques très différentes des acides boroniques, qui les rendraient à priori plus réactifs vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. À ce jour, l'utilisation d'acide borinique comme amorce réactive a été étudiée une seule fois. En effet en 2017, Zhou *et al.* ont utilisé un acide borinique cyclique **21** précurseur de la tétraméthylrhodamine (TMR) pour la détection du peroxyde d'hydrogène (Schéma 24).¹¹¹

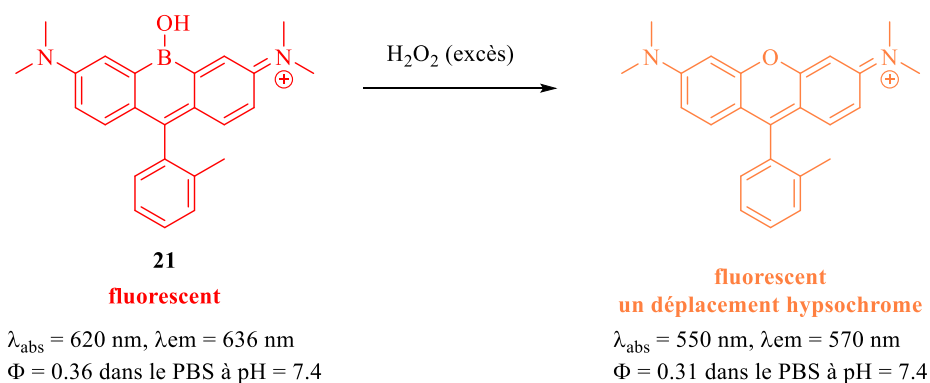


Schéma 24 : Détection du H₂O₂ par la sonde fluorogénique **21**

La libération de la TMR, l'entité fluorescente de la sonde **21** est basée sur un mécanisme complexe impliquant à la fois un acide borinique et un acide boronique intermédiaire (proposition de mécanisme dans le Schéma 25). En présence d'un excès de H₂O₂, la sonde **21** est rapidement oxydée (8.0 M⁻¹.s⁻¹) pour former un composé intermédiaire, non identifié par les auteurs (observé par spectroscopie UV-visible). Puis dans un second temps, celui-ci réagit plus lentement (0.15

¹¹¹ X. Zhou, L. Lesiak, R. Lai, J. R. Beck, J. Zhao, C. G. Elowsky, H. Li, C. I. Stains, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4197-4200.

$M^{-1}.s^{-1}$) pour former la tétraméthylrhodamine (TMR). La sonde **21** s'est avérée être sélective du peroxyde d'hydrogène, et celle-ci a permis de visualiser du H_2O_2 exogène et endogène dans des cellules HeLa.

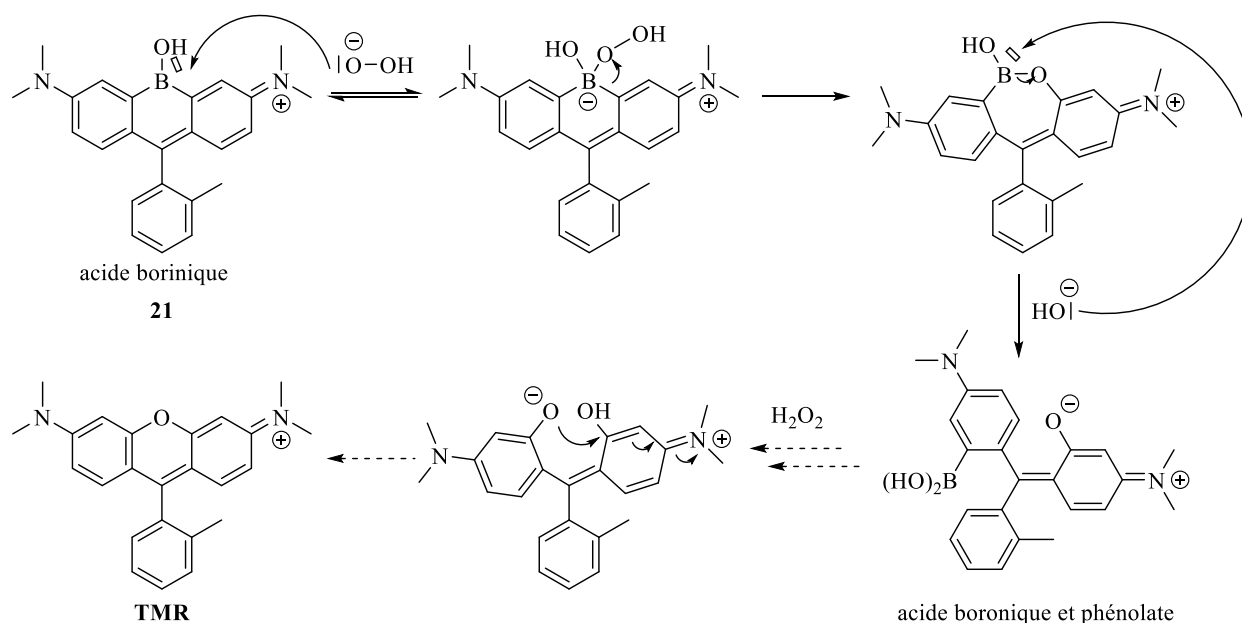


Schéma 25 : Mécanisme envisagé de l'oxydation de la sonde **21** par le H_2O_2

Ces résultats montrent que l'utilisation d'un tel acide borinique cyclique requiert deux équivalents de H_2O_2 pour libérer la TMR et la cinétique de libération de ce fluorophore dépendra à la fois de vitesse de réaction entre un acide borinique et le peroxyde d'hydrogène mais aussi de celle entre un acide boronique et le H_2O_2 . Ces travaux révèlent surtout que l'oxydation d'un acide borinique semblerait plus rapide que celle de son analogue boronique et confortent donc notre hypothèse d'utiliser des acides boriniques comme nouvelles amorces réactives du peroxyde d'hydrogène.

À ce jour, aucune étude n'a rapporté l'utilisation d'une amorce acide borinique pour la libération directe d'un effecteur. C'est cette stratégie qui a été adoptée dans ce manuscrit pour la détection du peroxyde d'hydrogène. Pour cela les sondes fluorogéniques développées devront être non cycliques.

Une première partie de ce manuscrit s'intéressera à l'étude d'une sonde fluorogénique modèle possédant une amorce borinique non cyclique. Cette partie comportera sa synthèse, les études cinétiques réalisées par RMN du proton et par spectroscopie de fluorescence, mais aussi l'évaluation de la sélectivité cette sonde vis-à-vis des autres FRO, ainsi qu'une étude préliminaire de sa cinétique *in cellula*. La seconde partie de ce manuscrit sera consacrée à l'optimisation de cette première sonde modèle. La régiosélectivité de la réaction d'oxydation de plusieurs acides

boriniques modèles vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène sera notamment discutée en s'appuyant sur un suivi par RMN du proton. Grâce à ces résultats, la synthèse et l'étude de la cinétique par RMN du proton de nouvelles sondes fluorogéniques possédant par exemple différents espaceurs auto-immolables seront abordées.

**CHAPITRE 2 : ÉLABORATION
D'UNE SONDE FLUOROGÉNIQUE
BASÉE SUR UNE AMORCE
BORINIQUE**

CHAPITRE 2 : ÉLABORATION D'UNE SONDE FLUOROGÉNIQUE BASÉE SUR UNE AMORCE BORINIQUE

Ce deuxième chapitre sera consacré à la mise au point d'une première sonde fluorogénique à amorce borinique pour la détection du peroxyde d'hydrogène. Avant d'aborder la synthèse et les différentes études réalisées sur cette sonde fluorogénique, la synthèse des acides boriniques et leurs applications seront décrites au travers de divers rappels bibliographiques.

I. Les acides arylboriniques : rappels bibliographiques

Les acides arylboriniques sont des composés borés possédant deux liaisons covalentes carbone-bore et une liaison covalente oxygène-bore. De par leur structure, ils peuvent être symétriques ou non (**Figure 30**). Les acides arylboriniques peuvent aussi être cycliques, mais ce type de structures n'est pas adapté pour une libération directe de fluorophore lors de la détection du H_2O_2 (voir description du projet de thèse), leurs synthèses ne seront pas détaillées dans ce manuscrit. La nomenclature des divers dérivés boriniques et boroniques décrits dans ce manuscrit est détaillée dans la **Figure 30**.

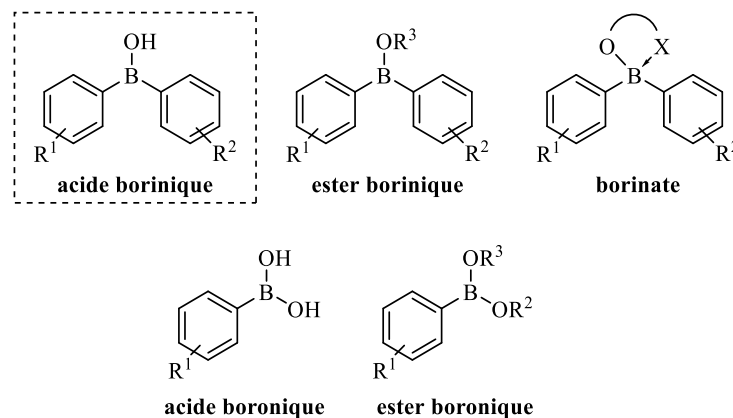


Figure 30 : Structure générale des acides arylboriniques et nomenclature de leurs dérivés

La synthèse et l'étude des acides arylboriniques sont relativement peu développées dans la littérature par rapport aux acides boroniques. Dans un premier temps, les différentes méthodes de synthèses des acides boriniques symétriques puis dissymétriques seront présentées. Dans un second temps, quelques applications de ce type de composés seront détaillées.

1. Synthèses des acides arylboroniques symétriques

Les acides arylboroniques symétriques sont généralement isolés en tant que sous-produits lors de la synthèse des acides arylboroniques, qui fait intervenir un dérivé organométallique (lithien ou magnésien) sur un tri(alkoxy)borane (**Schéma 26**).¹¹²

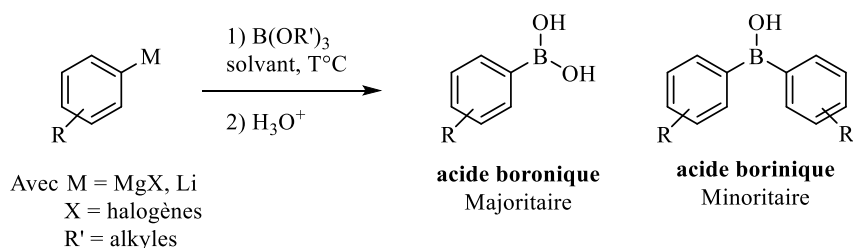
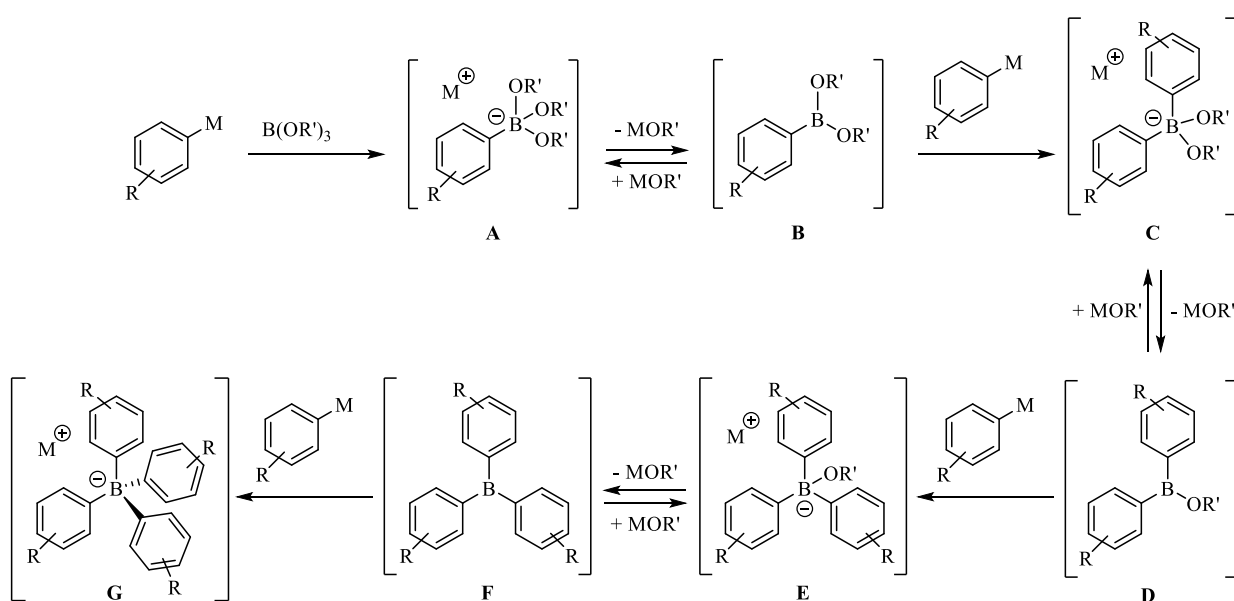


Schéma 26: Principe général de la synthèse des acides arylboroniques et arylboriniques utilisant un organométallique

Le mécanisme fait intervenir une première espèce, le borate **A** obtenu, après addition d'un équivalent d'organométallique. Néanmoins, l'existence d'un équilibre bore tétravalent/bore trivalent peut entraîner une addition excessive d'organométalliques, qui peut conduire aux dérivés boriniques **D**, aux triarylboranés **F** et enfin, aux tétraarylborates **G** (**Schéma 27**).



*Schéma 27: Mécanisme général de polyaddition d'organométalliques sur l'intermédiaire A proposé par Brown et al.*¹¹³

La proportion des acides boroniques et boriniques dépendent fortement des conditions expérimentales utilisées. Dans tous les cas, les acides boriniques doivent être isolés du mélange réactionnel.¹¹³

¹¹² N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.

¹¹³ H. C. Brown, T. E. Cole, M. Srebnik, *Organometallics* **1985**, 4, 1788-1792.

Depuis, Hofer *et al.* ont développé une méthode de synthèse plus efficace pour accéder à des acides boriniques symétriques purs, en faisant réagir un organolithien sur un trialkoxyborane encombré, limitant ainsi la troisième addition de l'organolithien (**Schéma 28**).¹¹⁴

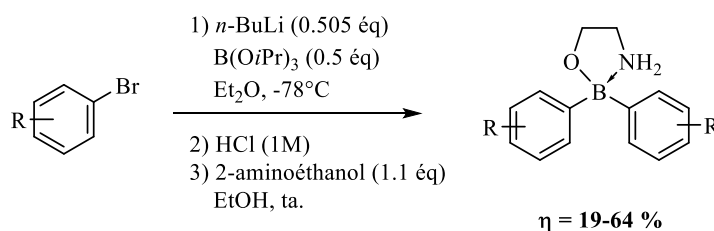


Schéma 28: Synthèse d'arylboration symétriques sous forme de complexe du 2-aminoéthanol

L'organolithien est généré par un échange halogène-métal avec le *n*-BuLi, puis le tri(isopropoxy)borane est ajouté. Après une hydrolyse acide, l'acide borinique est mis à réagir avec du 2-aminoéthanol pour donner les complexes correspondants isolés après précipitation, avec des rendements globaux de 19 à 64%.

De la même manière, Meudt *et al.* ont fait réagir un chlorure d'aryle avec du lithium en présence de tri(méthoxy)borane. Celle-ci permet d'obtenir directement l'acide borinique correspondant (**Schéma 29**).¹¹⁵

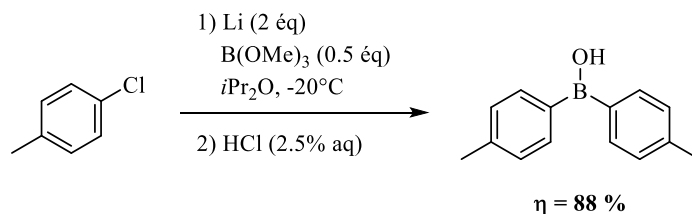


Schéma 29: Synthèse de l'acide di(tolyl)borinique

Le lithien dérivé du chlorure de tolyle est généré *in situ* par une addition lente (en 2h30) d'une solution de tri(méthoxy)borane et de chlorure de tolyle. Dans ces conditions, les risques de polyadditions sont minimisés et l'acide borinique dérivé du 4-chlorotoluène est isolé avec un rendement de 88%. Cependant, cette méthode n'est pas généralisable car seul ce composé a pu être isolé.

De manière similaire, Chen *et al.* ont montré qu'il était également possible d'utiliser des organomagnésiens comme espèces nucléophiles (**Schéma 30**).¹¹⁶

¹¹⁴ A. Hofer, G. Kovacs, A. Zappatini, M. Leuenberger, M. A. Hediger, M. Lochner, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3202-3213.

¹¹⁵ A. Meudt, M. Erbes, K. Forstinger, (Eds.: Clariant, G.m.b.H.), Germany, **2002**, p. 9.

¹¹⁶ X. Chen, H. Ke, Y. Chen, C. Guan, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7572-7578.

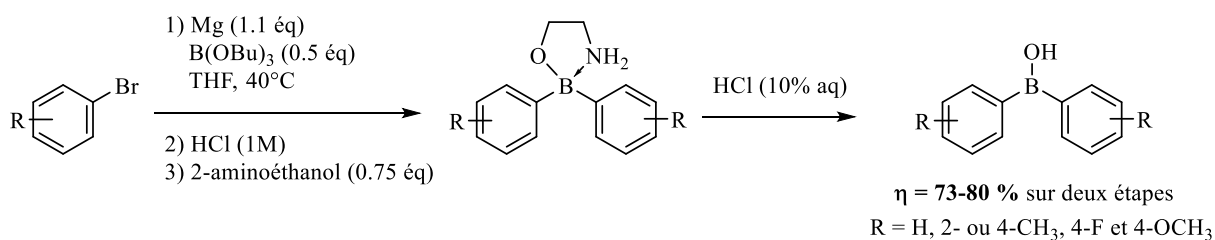


Schéma 30: Synthèse d'acides arylboriniques symétriques

Les organomagnésiens sont générés *in situ* à partir d'un dérivé du bromobenzène en présence de magnésium. Après une hydrolyse acide, l'acide borinique est mis à réagir avec le 2-aminoéthanol pour donner les complexes correspondants, avec des rendements variant de 73 à 80%. Les acides boriniques sont régénérés par un simple traitement acide de manière quantitative ou quasi-quantitative.

Plus récemment, Guan *et al.* ont remarqué que la présence de sels de magnésium résiduels pouvaient compliquer la purification des borinates sur grande échelle lors de cette séquence réactionnelle. En remplaçant l'hydrolyse acide par un simple traitement aqueux pour éliminer les sels de magnésium résiduels sous forme de Mg(OH)₂ par filtration, les différents borinates issus du 2-aminoéthanol, de la 2-hydroxyquinoline ou encore d'acide 2-picolinique ont été isolés avec des bons rendements et une pureté satisfaisante sur une échelle allant du gramme au kilogramme (Schéma 31).¹¹⁷

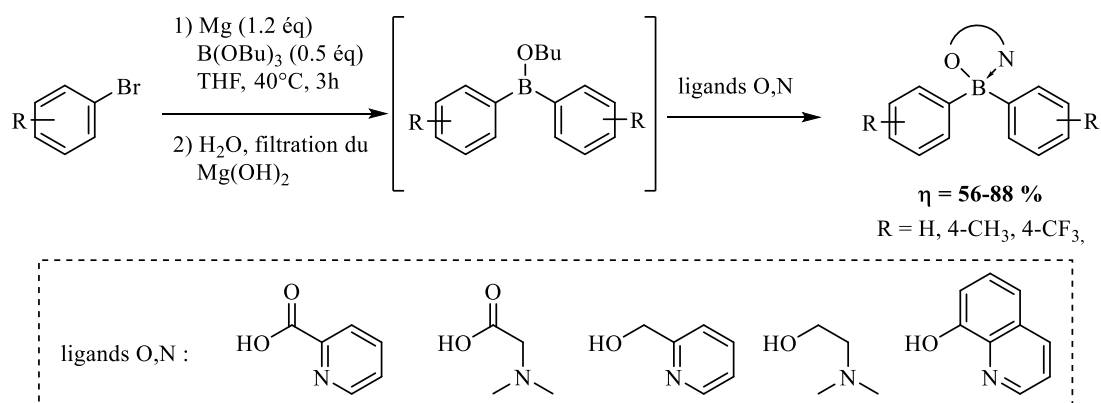


Schéma 31 : Synthèse de divers complexes d'acides arylboriniques symétriques

En 2015, Marciasini *et al.* ont développé une nouvelle méthode générale de synthèse d'acides arylboriniques en utilisant des dérivés organomagnésiens et le diisopropyl-aminoborane (DIPAB) ou le dicyclohexylaminoborane (DICAB) comme agent de borylation (Schéma 32).¹¹⁸ La chélation de l'amine sur la lacune du bore des aminohydroboranes DIPAB ou DICAB permet de diminuer la réactivité du bore. Ces agents de borylation sont des solides cristallins. Ils ne sont

¹¹⁷ C. Guan, L. Huang, C. Ren, G. Zou, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 824-828.

¹¹⁸ L. Marciasini, B. Cacciuttolo, M. Vaultier, M. Pucheault, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3532-3535.

pas sensibles à l'air, stables en milieu aqueux, peu onéreux ; ils représentent donc une alternative intéressante aux tri(alcoxy)boranes.

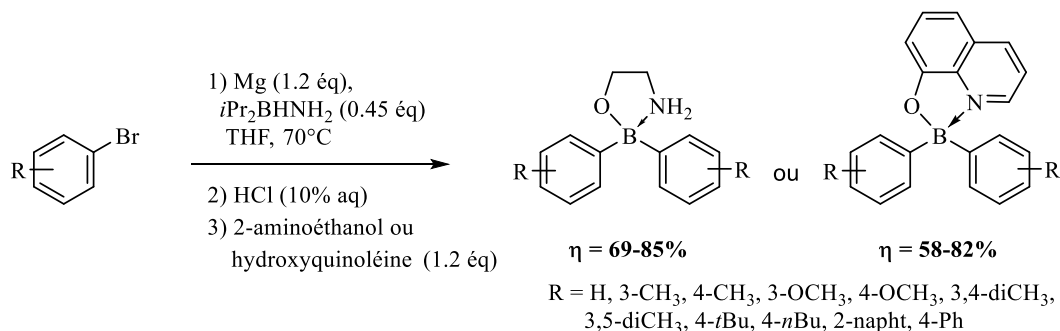


Schéma 32 : Synthèse de complexes 2-aminoéthanol arylboriniques avec du DIPAB

Le mécanisme proposé par les auteurs nécessite l'utilisation de trois équivalents de réactif de Grignard.

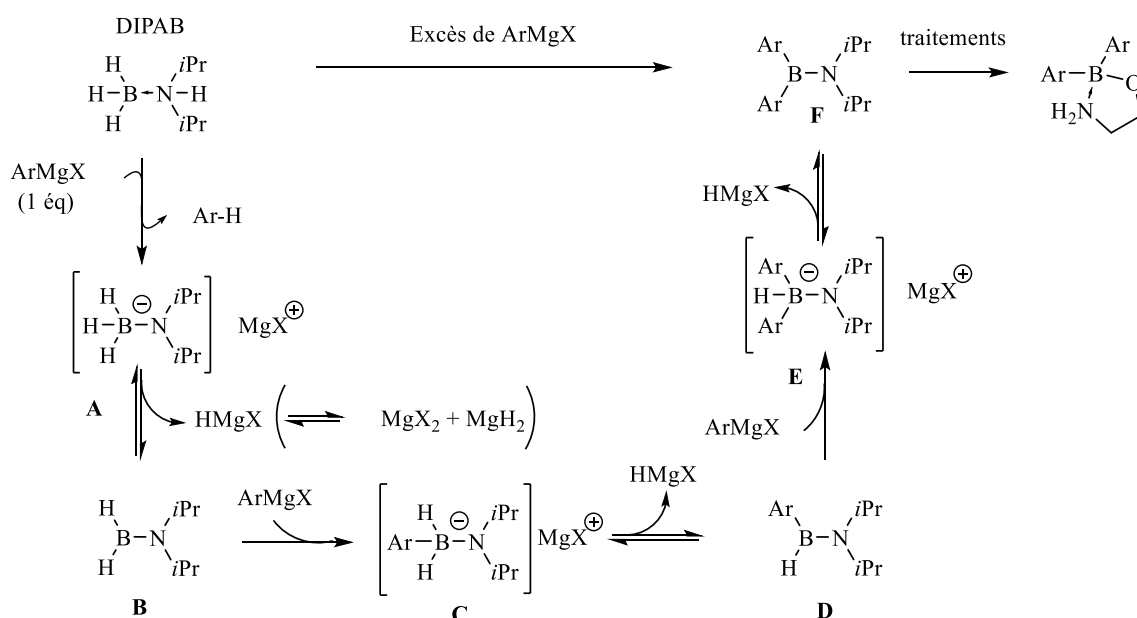


Schéma 33 : Mécanisme postulé de l'addition d'arylmagnésiens sur le DIPAB

Le réactif de Grignard, formé *in situ* dans les conditions de Barbier, réagit avec le DIPAB. Le premier permet de générer l'espèce réactive **B**, la force motrice de la réaction étant l'élimination de MgHBr. Puis, l'addition de deux autres équivalents d'organomagnésien conduit à la formation du composé diarylboraamine **F** (Schéma 33). En effet, cet intermédiaire est désactivé à la fois par l'encombrement stérique des deux groupements aryles et par la donation π de l'azote. Une hydrolyse acide suivie d'un traitement par du 2-aminoéthanol permet d'obtenir les complexes correspondants avec des rendements allant de 70 à 95%. Un traitement avec l'hydroxyquinoléine conduit aux borinates correspondants avec des rendements plus faibles compris entre 58% et 82%.

Depuis, pour générer l'espèce réactive **B** de la réaction, les auteurs ont pu montrer qu'une quantité catalytique d'organomagnésien était suffisante alors qu'un équivalent était nécessaire précédemment. L'espèce **B** résulterait d'une réaction de déhydrogénation autocatalysée de l'agent de borylation (**Schéma 34**).¹¹⁹

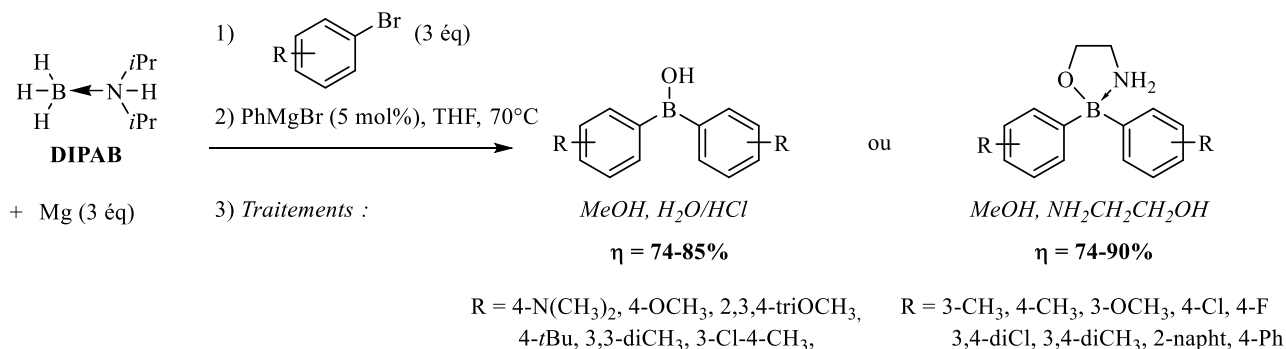


Schéma 34: Synthèse d'acides arylboriniques et de borinates issus du 2-aminoéthanol avec le DIPAB

Cette amélioration a aussi permis la synthèse d'acides arylboriniques purs ou sous forme de complexes 2-aminoéthanol avec des rendements similaires à ceux obtenus dans leur précédente étude. Toutefois, il n'est pas possible d'utiliser des substrats porteurs d'un groupement électroattracteur comme les groupements trifluorométhyle ou nitro. Dans ce cas l'intermédiaire **D** est désactivé (**Schéma 33**) et ne peut pas subir une seconde addition d'organomagnésien.

Les méthodes détaillées dans cette sous-partie possèdent toutefois plusieurs limitations. Les substrats utilisables ne doivent pas contenir des fonctions pouvant réagir avec un organomagnésien ou un organolithien et doivent se faire à basse température dans le cas de la méthode de Hofer. Aussi, la méthode de l'équipe de Pucheault représente un grand progrès dans la synthèse des acides arylboriniques symétriques, car cette méthode permet de s'affranchir des conditions cryogéniques et pourrait être généralisable à la synthèse d'acides boriniques plus complexes.

¹¹⁹ M. Pucheault, S. Pinet, J. Richard, M. Birepinte, J. Charbonnier, V. Liautard, *Synthesis* **2016**, 49, 736-744.

2. Synthèses des acides arylboroniques dissymétriques

Actuellement, il n'existe que deux approches décrivant la préparation d'acides arylboroniques non symétriques.

Ainsi la première approche développée par Hofer *et al.* repose sur la réaction entre un ester arylboronique néopentylique et un aryllithien. Les acides boroniques sont isolés sous forme de complexe avec le 2-aminoéthanol (**Schéma 35**).¹¹⁴

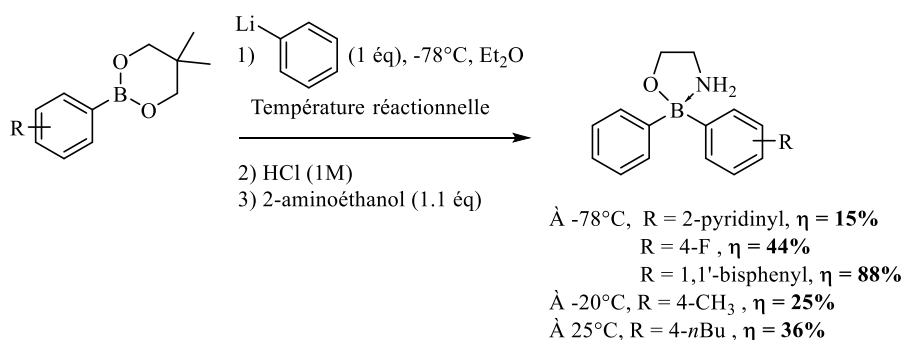


Schéma 35 : Synthèse de complexes 2-aminoéthanol arylboroniques non symétriques

Selon les substituants, les rendements varient de 15 à 88%. De plus, les auteurs utilisent des conditions opératoires adaptées à chaque substrat (température réactionnelle de -78 à 25°C), ce qui fait de cette approche une méthode fiable mais peu généralisable.

La deuxième approche, a été reportée par l'équipe de M. Pucheault. Ils ont décrit la synthèse monotopie d'acide arylboronique dissymétrique **22** en utilisant séquentiellement la méthode précédemment établie (**Schéma 36**).¹¹⁸

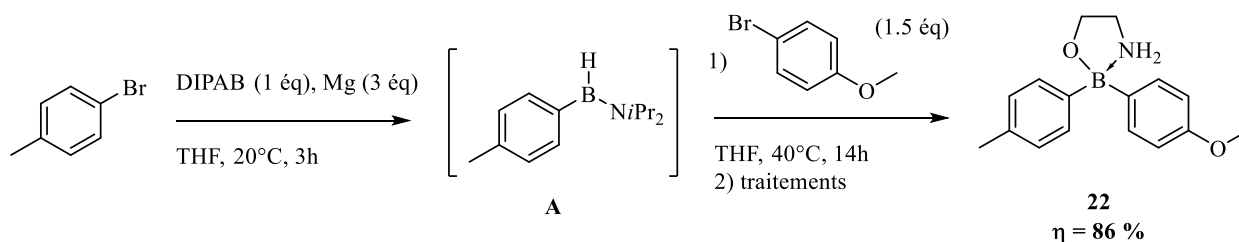


Schéma 36 : Synthèse de l'acide arylboronique dissymétrique **22** avec du DIPAB

Dans un premier temps, un seul équivalent d'organomagnésien dérivé du *p*-bromotoluène est formé en présence de DIPAB pour donner l'intermédiaire **A**. Puis le 4-bromoanisole est ajouté très lentement. Le mélange réactionnel est chauffé uniquement à 40°C favorisant ainsi la formation de l'organomagnésien du 4-bromoanisole plutôt que celle de l'arylamino borane correspondant. Ce nouvel organomagnésien ainsi formé réagit avec l'intermédiaire **A** pour conduire, après traitements à l'acide arylboronique non symétrique avec un rendement isolé de

86%. Néanmoins, les auteurs précisent que cette méthode est loin d'être généralisable et nécessite une optimisation pour chaque substrat envisagé.

La présentation de ces différentes approches montre que l'obtention des acides arylboriniques symétriques ou non est délicate. En effet, la purification par chromatographie sur colonne de silice n'est généralement pas utilisée car elle peut entraîner une chute de rendement due à la formation de produits secondaires résultant d'une réaction de protodéboronation.¹²⁰ Afin de remédier à ce problème, le passage par un traitement avec le 2-aminoéthanol ou l'hydroxyquinoléine permet d'obtenir des complexes facilement isolables par simple filtration avec une haute pureté. Enfin, l'hydrolyse acide de ces derniers fournit l'acide borinique pur.

¹²⁰ I. S. Robert L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2491-2494.

3. Applications des acides arylboriniques

Même si les méthodes d'obtention des acides arylboriniques sont peu nombreuses, de plus en plus d'études récentes décrivent leur utilisation ; le groupe de M. S. Taylor a été particulièrement actif dans ce domaine.

a) Catalyseurs acides

Une des principales caractéristiques des acides boriniques est leur forte acidité de Lewis, qui en fait de bons candidats pour être des nouveaux catalyseurs acides dans différentes réactions.¹²¹

i. Catalyseurs dans la réaction d'aldolisation

En 2001, Mori *et al.* ont développé une réaction d'aldolisation diastéréosélective de Mukaiyama catalysée par l'acide diphénylborinique dans l'eau, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'acide benzoïque en quantité catalytique (**Schéma 37**).^{122, 123}

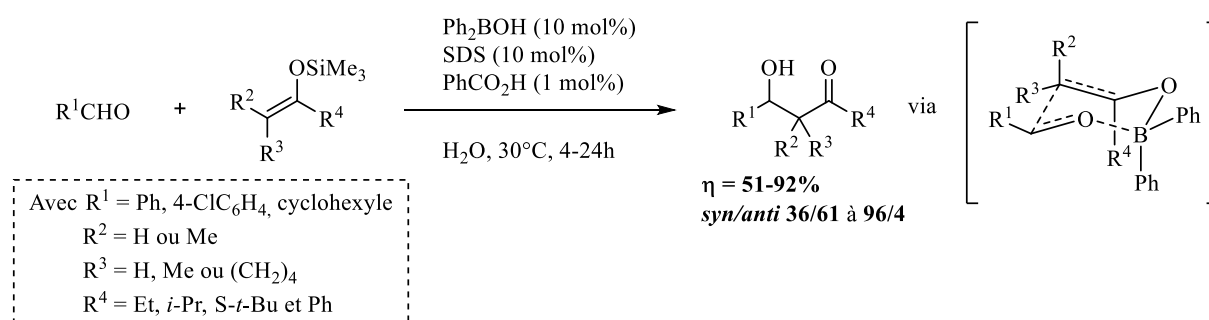


Schéma 37: Réaction d'aldolisation de type Mukaiyama catalysée par l'acide diphénylborinique

Contrairement aux réactions d'aldolisation mettant en jeu des énolates de bore (ou d'autres métaux) qui nécessitent un milieu anhydre car ces énolates sont hydrolysés en présence d'eau, cette synthèse est effectuée dans l'eau en présence de surfactant. Le principal avantage de cette méthode réside dans l'utilisation d'une quantité catalytique d'acide diphénylborinique. En effet, la plupart des réactions d'aldolisation de Mukaiyama, nécessitent des quantités stœchiométriques d'agent de borylation.

Les auteurs ont démontré que sans SDS ou sans acide borinique les rendements de la réaction étaient très faibles tout comme la diastéréosélectivité. La réaction tolère aussi bien des aldéhydes aromatiques que des aldéhydes aliphatiques et des éthers d'énol silylés diversement substitués (aryle, alkyle, thioéther).

¹²¹ K. Ishihara, H. Kurihara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 5664-5665.

¹²² Y. Mori, K. Manabe, S. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2815-2818.

¹²³ Y. Mori, J. Kobayashi, K. Manabe, S. Kobayashi, *Tetrahedron* **2002**, 58, 8263-8268.

Le mécanisme proposé est très proche de celui de la réaction de Mukaiyama. L'éther d'énol silylé **B** subit une transmétallation en présence d'acide borinique **A** pour donner l'énolate de bore correspondant **C** (**Schéma 38**).

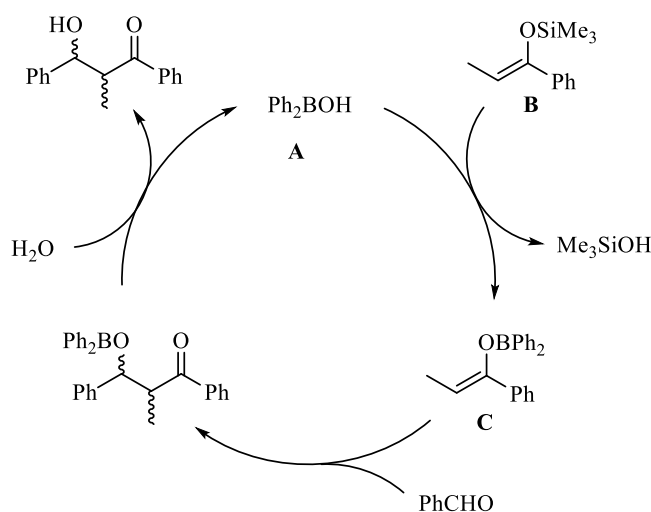


Schéma 38: Mécanisme proposé pour la réaction d'aldolisation de Mukaiyama catalysée par l'acide diphénylborinique

L'acide diphénylborinique s'est révélé être également un bon catalyseur pour la réaction d'aldolisation de l'acide pyruvique pour conduire aux hydroxy-lactones correspondantes (**Schéma 39**).¹²⁴

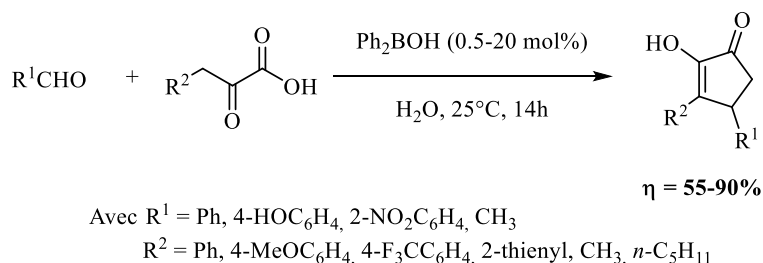


Schéma 39: Réaction d'aldolisation catalysée par l'acide diphénylborinique

Les auteurs ont montré que dans le cas de l'acide phénylpyruvique et du benzaldéhyde, l'utilisation d'acide phénylborinique est plus efficace que celle de l'acide phénylboronique. En effet dans le cas de l'acide borinique, l'hydroxy-lactone souhaitée est obtenue avec un rendement de 90% contre 19% dans le cas de l'acide boronique. L'intermédiaire clé de la réaction est un énolate de bore, une dioxoborolanone, résistant à l'hydrolyse aqueuse (**Schéma 40**). Cette résistance à l'eau est probablement due au fait que le bore est tétravalent et donc non sensible aux additions nucléophiles.

¹²⁴ D. Lee, S. G. Newman, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5486-5489.

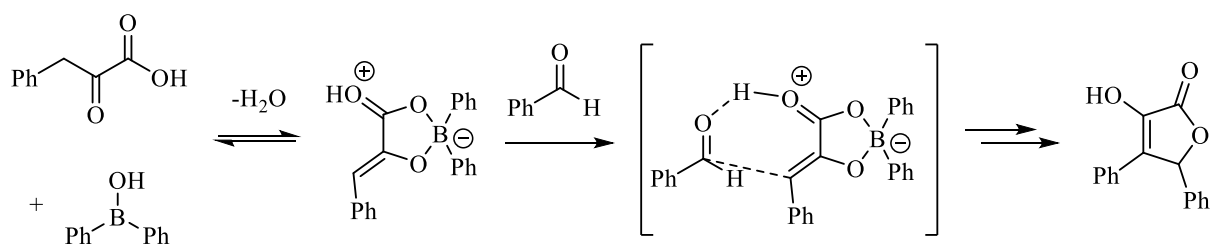
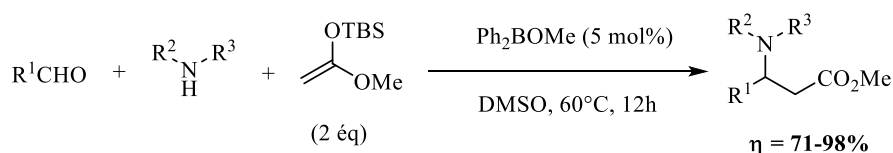


Schéma 40: Mécanisme proposé de formation de l'adduit dioxoborolanone

ii. Catalyseurs dans des réactions de type Mannich

En 2008, Suginome *et al.* ont développé une réaction de type Mannich entre un acétal de cétène silylé et un iminium, généré *in situ* par action d'une amine secondaire sur un dérivé carbonylé en présence d'une quantité catalytique de l'ester méthylique de l'acide phénylborinique (**Schéma 41**).¹²⁵



Avec $R^1 = \text{Ph}, 4\text{-MeOC}_6\text{H}_4, 4\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4, \dots$

$R^2 = R^3 = \text{Et}, \text{Bu}, \text{Bn}; \text{morpholine}, \text{piperidine}, \dots$

Schéma 41: Réaction de type Mannich catalysée par l'ester méthylique de l'acide phénylborinique

La première étape du mécanisme proposé par les auteurs est la formation de la liaison B-N entre l'amine secondaire et l'atome de bore pour former l'intermédiaire **B**. Celui-ci, s'additionne sur l'aldéhyde pour donner l'hémiacétal borate **C** puis l'intermédiaire **D**, intermédiaire clé de la réaction. Sa formation est immédiatement suivie de l'addition de l'acétal de cétène silylé pour donner le β-amino ester désiré avec des rendements globaux de 71 à 98 % et régénérer l'ester méthylique de l'acide phénylborinique (**Schéma 42**).

¹²⁵ M. Suginome, Y. Tanaka, T. Hasui, *Synlett* **2008**, 8, 1239-1242.

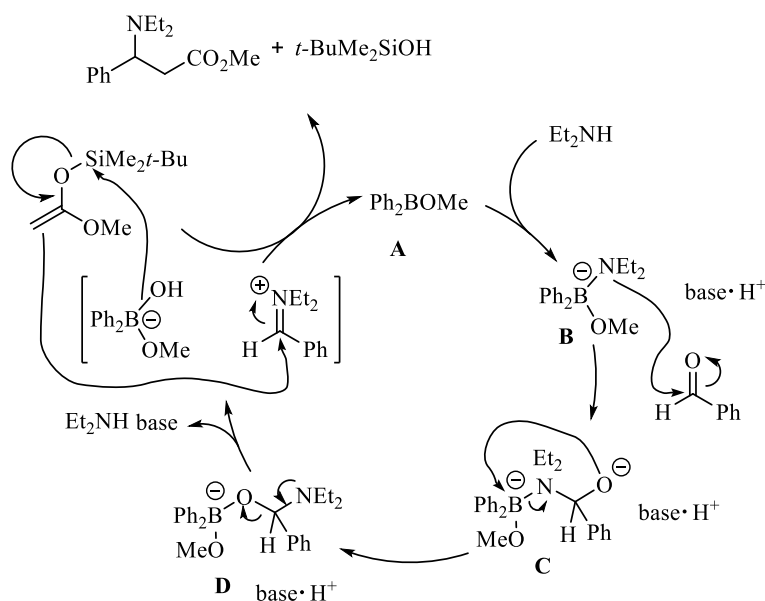


Schéma 42: Mécanisme proposé pour la réaction de Mannich catalysé par l'ester méthylique de l'acide phénylborinique

iii. Monofonctionnalisation régiosélective de diols 1,2 et 1,3

Une méthode classiquement utilisée pour les protections régiosélectives de diols 1,2 fait intervenir des dérivés d'étain.¹²⁶ Les composés borés comme les acides boroniques ou les acides boriniques constituent une alternative intéressante à l'utilisation de ces composés toxiques. Le groupe de M. S. Taylor a ainsi développé des réactions d'acylation, des sulfonations et d'alkylation régiosélectives de diols aliphatiques ou d'hydrates de carbone, en présence d'une quantité catalytique du complexe 2-aminoéthanol de diphénylborinique (2-APB) (Schéma 43).^{127, 128, 129}

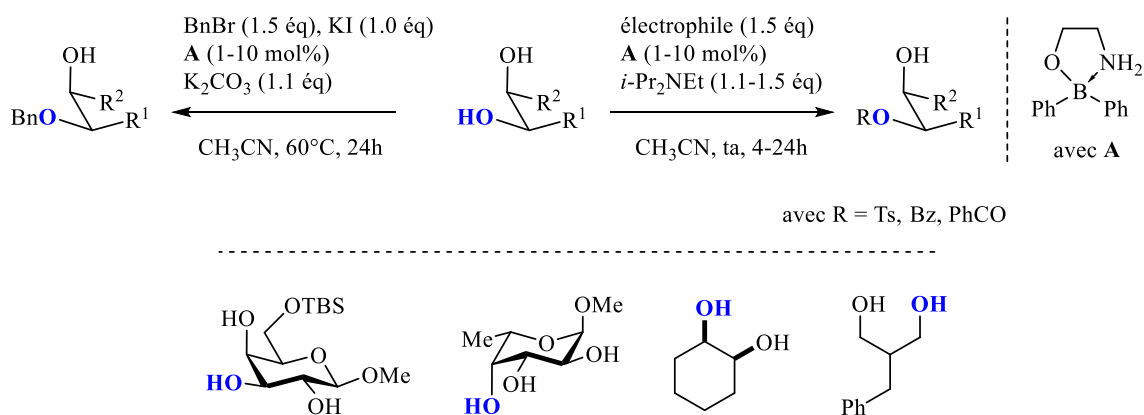


Schéma 43: Réactions d'acylation, sulfonation et alkylation régiosélectives de diols catalysées par le 2-APB

¹²⁶ Y. Demizu, Y. Kubo, H. Miyoshi, T. Maki, Y. Matsumura, N. Moriyama, O. Onomura, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5075-5077.

¹²⁷ L. Chan, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3090-3093.

¹²⁸ D. Lee, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3724-3727.

¹²⁹ D. Lee, C. L. Williamson, L. Chan, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8260-8267.

Ainsi, de nombreux substrats ont été monofonctionnalisés régiosélectivement, exclusivement sur les alcools en position équatoriale de dérivés du pyranose avec des rendements globaux de 72 à 99 % pour les réactions d'alkylation et de 63 à 99% pour les réactions de sulfonation et d'acylation.

Toutes ces réactions font intervenir un intermédiaire commun, un borinate tétracoordiné obtenu après transestérification du borinate 2-APB par le diol. Des calculs DFT ont montré que la présence de l'atome de bore chargé permettait d'augmenter la réactivité des diols.¹²⁸ Par exemple dans le cas de sulfonation les auteurs ont proposé le mécanisme ci-dessous (**Schéma 44**). La nucléophilie de l'alcool en position équatoriale est exacerbée dans le borinate tétracoordiné **B**. Il réagit avec l'électrophile, ici le chlorure de tosyloxy pour engendrer l'ester borinique **C**. L'intermédiaire **B** est régénéré par déplacement du motif borinate par une autre molécule de substrat.

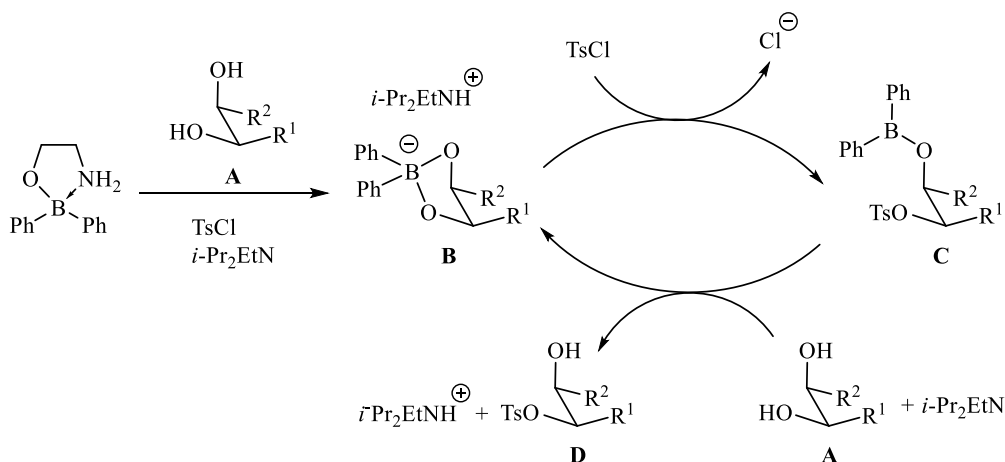


Schéma 44: Mécanisme de sulfonation proposé pour l'activation de diols 1,2 par le complexe 2-APB

iv. Activation d'accepteurs de glycosyle dans les réactions de glycosylation

L'utilisation du 2-APB s'est également révélée efficace dans l'activation de sucres accepteurs dans des réactions de glycosylation de Koenigs-Knorr régiosélectives.¹³⁰ En 2013, cette approche a été appliquée à la synthèse d'un glycol naturel complexe : la digitoxine. Celle-ci est utilisée dans le traitement de diverses affections cardiaques. Parmi les cinq fonctions alcools susceptibles d'être glycosylées, une seule a été glycosylée grâce à l'emploi du 2-APB. Grâce à cette méthodologie, de nouveaux analogues ont pu être synthétisés en utilisant comme donneurs de glycoside des dérivés du D-galactose, D-arabinose, L-fucose, lactose et de cellobiose (**Schéma 45**).¹³¹

¹³⁰ C. Gouliaras, D. Lee, L. Chan, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13926-13929.

¹³¹ T. M. Beale, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1358-1361.

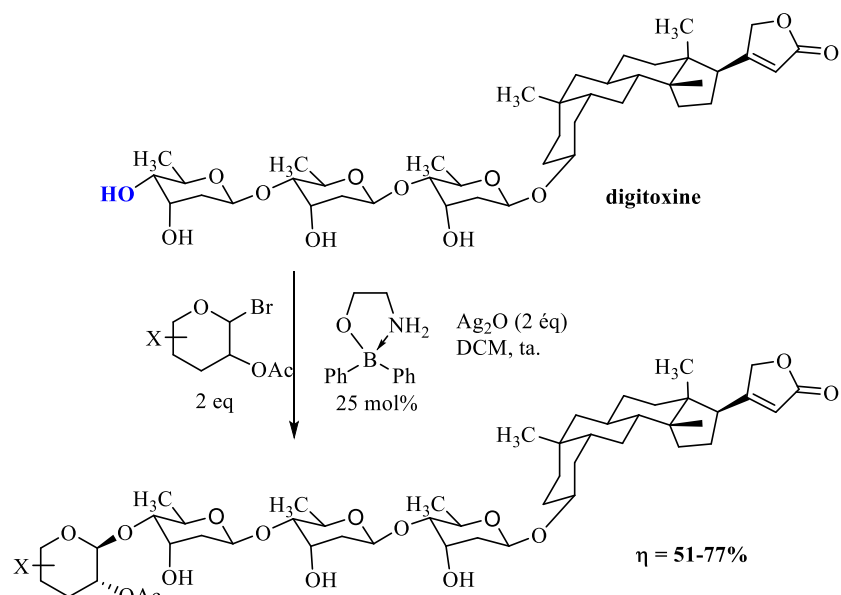


Schéma 45 : Réaction de glycosylation stéréosélective de la digitoxine en présence de 2-APB

En 2016, l'équipe de Toshima a reporté une réaction de glycosylation stéréosélective de type 1,2 *cis* impliquant un d'un donneur 1,2-anhydro-mannose et de différents accepteurs en présence d'une quantité catalytique d'acide bis(4-fluoro)phénylborinique.¹³² Ainsi, de nombreux β -mannosides ont été obtenus avec des rendements globaux variant de 64 à 99% (**Schéma 46**). Cette approche a été appliquée à la synthèse totale de l'acremomannolipine A, ou plus récemment pour synthétiser un intermédiaire clé commun à la synthèse de différents glycolipides dérivés du mannosylérythritol (MEL).¹³³

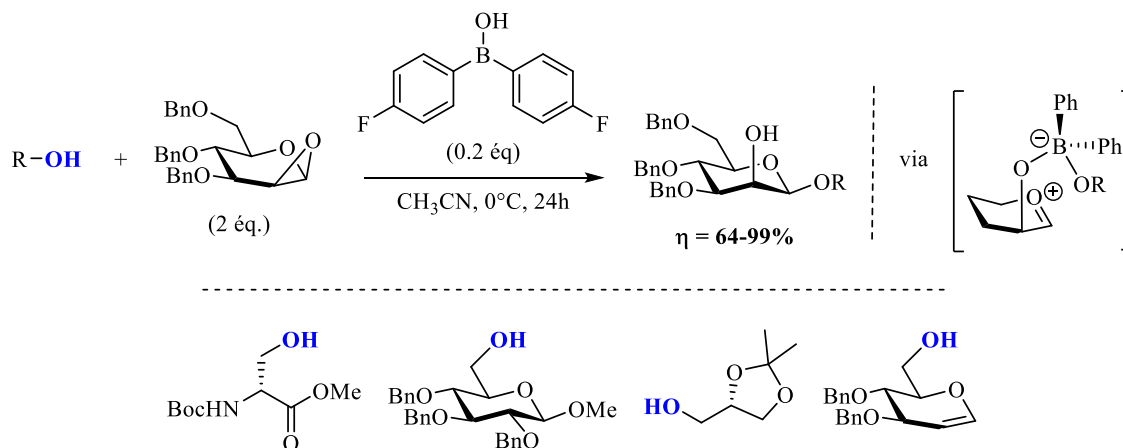


Schéma 46 : Réactions de glycosylation de type 1,2 *cis* stéréosélective catalysées par l'acide bis(4-fluoro)phénylborinique

¹³² M. Tanaka, J. Nashida, D. Takahashi, K. Toshima, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2288-2291.

¹³³ J. Nashida, N. Nishi, Y. Takahashi, C. Hayashi, M. Igarashi, D. Takahashi, K. Toshima, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7281-7289.

Ces conditions ont également été appliquées au 1,2-anhydro-glucose¹³⁴ pour la synthèse d' α -glycosphingolipides naturels, et au 1,2 anhydro-rhamnose lors de la synthèse de sérotypes de *S. pneumoniae* (ou pneumocoque).¹³⁵

v. Ouvertures régiosélectives d'époxydes

Les ouvertures régiosélectives d'époxydes α ou β -hydroxylés par divers nucléophiles comme des chlorures, anilines, thiols ou amines ont été également étudiées par le groupe de M.S. Taylor (**Schéma 47**).^{136, 137 et 138}

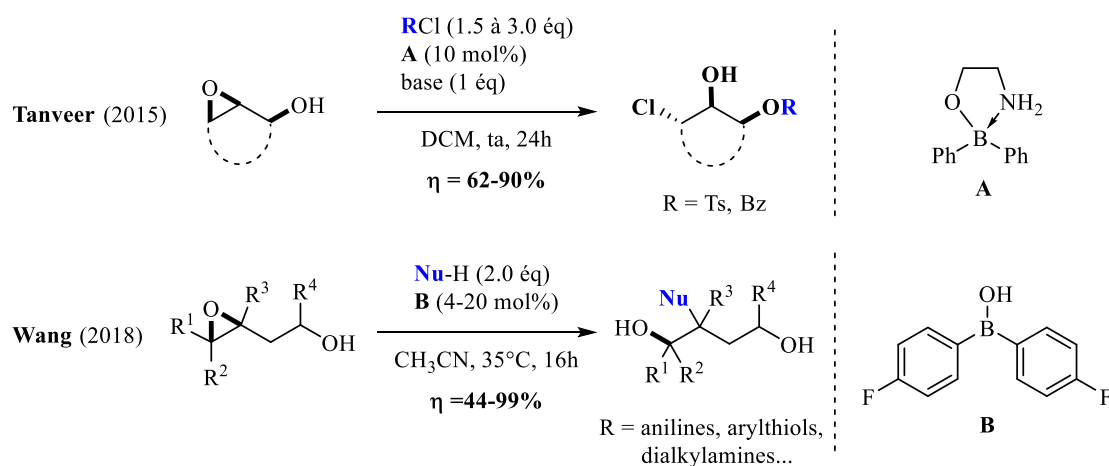


Schéma 47: Ouverture régiosélectives d' α -hydroxyépoxydes en présence de 2-APB, et ouvertures régiosélectives d' β -hydroxyépoxydes en présence de l'acide bis(4-fluorophényl)borinique

La régiosélectivité de la réaction résulte d'un mécanisme intramoléculaire dans lequel l'atome de bore interagit aussi bien avec l'espèce électrophile (époxyde) et l'espèce nucléophile (chlorure, aniline...).

b) Réductions

i. Réduction d'amide

L'acide bis(2-chlorophényl)borinique a été utilisé comme pré-catalyseur par Blanchet *et al.* dans des réactions de réduction d'amides (**Schéma 48**), d'oxydes de phosphine, de sulfoxydes et amine-oxydes.^{139, 140} En présence de ce catalyseur, l'espèce réductrice est le diarylhydroborane, résultant de la réaction de l'acide borinique avec le phénylsilane.

¹³⁴ M. Tanaka, D. Takahashi, K. Toshima, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5030-5033.

¹³⁵ N. Nishi, K. Sueoka, K. Iijima, R. Sawa, D. Takahashi, T. Toshima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13858-13862.

¹³⁶ K. Tanveer, K. Jarrah, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3482-3485.

¹³⁷ G. Wang, G. E. Garrett, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5375-5379.

¹³⁸ Pour une revue des travaux de l'équipe de M.S Taylor voir : M. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 295-305.

¹³⁹ T. Mohy El Dine, D. Evans, J. Rouden, J. Blanchet, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5894-5898.

¹⁴⁰ A. Chardon, O. Maubert, J. Rouden, J. Blanchet, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 4460-4464.

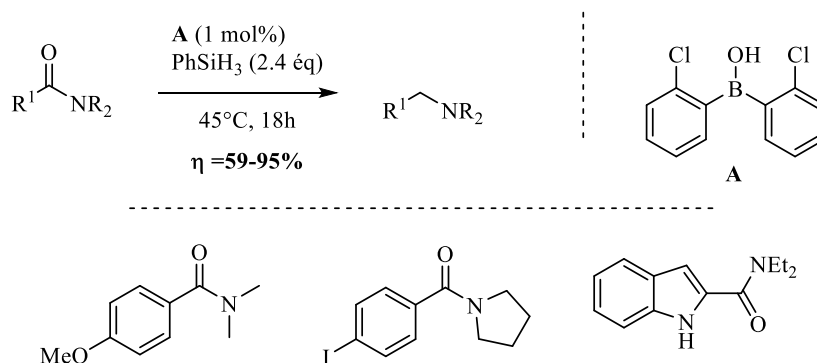


Schéma 48 : Réaction de réduction d'amides en présence de l'acide bis(2-chlorophényl)borinique)

ii. Hydrosilylation d'aldéhydes, cétones et imines

En 2019, le groupe de Blanchet a utilisé l'acide bis(2-chloro-4-fluorophényl)borinique comme pré-catalyseur dans des réactions d'hydrosilylation d'aldéhydes, de cétones ou encore d'imines (**Schéma 49**).¹⁴¹ Ces réactions reposent sur la formation d'un diarylhydroborane intermédiaire **A**.

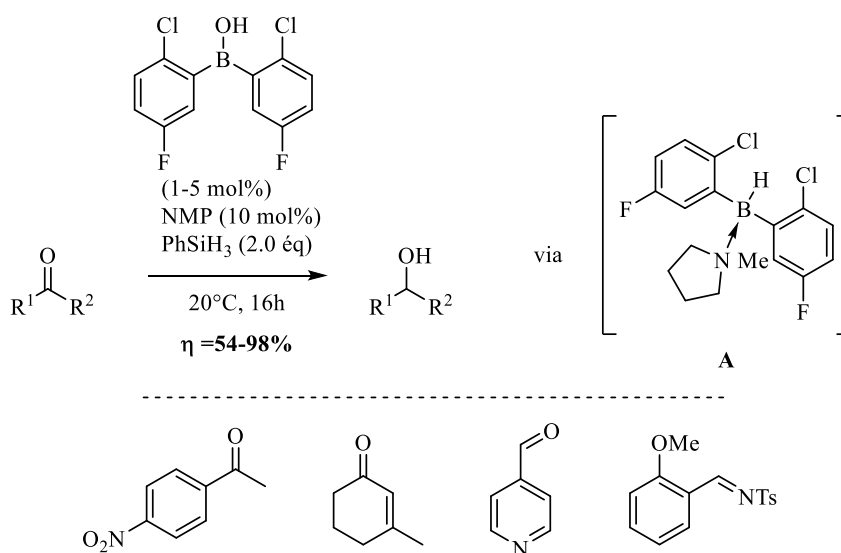


Schéma 49 : Réaction d'hydrosilylation d'aldéhydes, de cétones et d'imines en présence catalytique de l'acide bis(2-chloro-4-fluorophényl)borinique)

c) C-H activation:

En 2015, Hubrich *et al.* ont été les premiers à utiliser des acides boroniques pour développer des réactions de C-H activation. Tout d'abord, les conditions opératoires de la C-H activation d'anilide catalysée par un complexe de Ru(II) ont été optimisées en présence d'acides boroniques avant d'être étendues aux acides boroniques (**Schéma 50**).¹⁴²

¹⁴¹ A. Chardon, J. Rouden, J. Blanchet, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 2019, 995-998.

¹⁴² J. Hubrich, T. Himmler, L. Rodefeld, L. Ackermann, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 474-480.

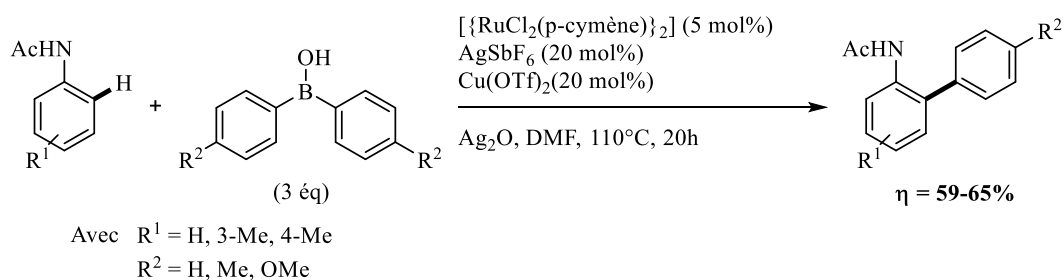


Schéma 50 : Réaction de C-H ortho-arylation d'anilides catalysée par un complexe de ruthénium en présence d'acides boriniques

L'acide phénylborinique a aussi été utilisé comme co-catalyseur dans des réactions stéréosélectives de C-H alkylation d'hydrates de carbone. Ainsi, très récemment, le groupe de M. S. Taylor a exploité la formation de borinates de sucres, résultant de la réaction de transestérification avec des diols 1,2 cis avec l'acide phénylborinique, pour accélérer un transfert d'atome d'hydrogène (HAT, *Hydrogen Atom Transfert*) avec la quinuclidine, permettant la génération d'un radical par catalyse photorédox. Ce radical s'additionne sur l'acrylate de méthyle pour conduire à la formation d'une liaison C-C avec une rétention totale de configuration et des rendements compris entre 54 et 70% (Schéma 51).¹⁴³

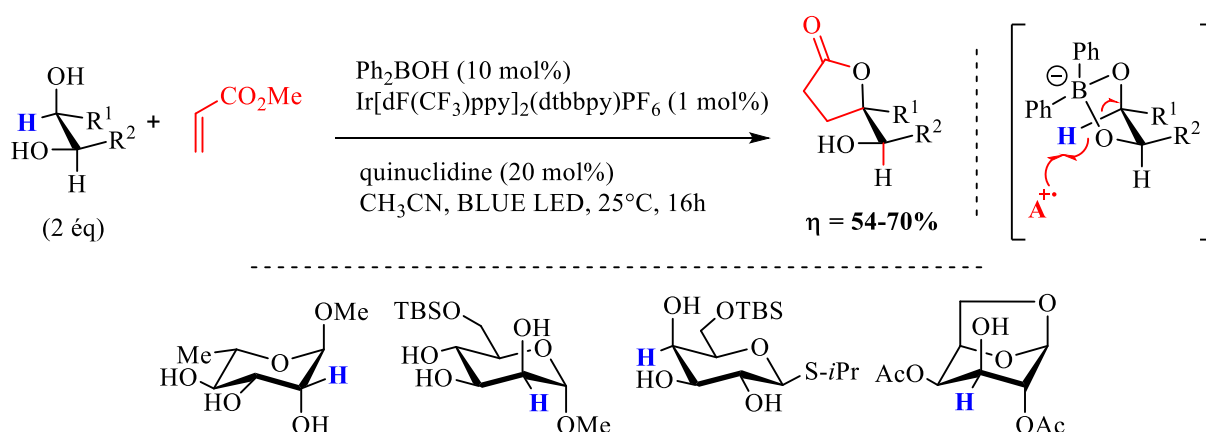


Schéma 51 : Alkylation sélective de sucres par catalyse photorédox combinée à l'action d'acide arylboriniques

Cette année, Kanai *et al.* ont élargi ce type de système photorédox à l' α -C-H alkylation d'alcools par le diéthylvinylphosphonate en présence d'une quantité catalytique du complexe 2-aminoéthanol de l'acide bis(4-trifluorométhyl)phénylborinique **A** avec des rendements compris entre 35 et 91% en fonction de l'alcool utilisé (Schéma 52).¹⁴⁴

¹⁴³ V. Dimakos, H. Y. Su, G. E. Garrett, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5149-5153.

¹⁴⁴ M. Kanai, K. Oisaki, K. Sakai, *Synthesis* **2020**, *52*, A-N. DOI: 10.1055/s-0040-1707114

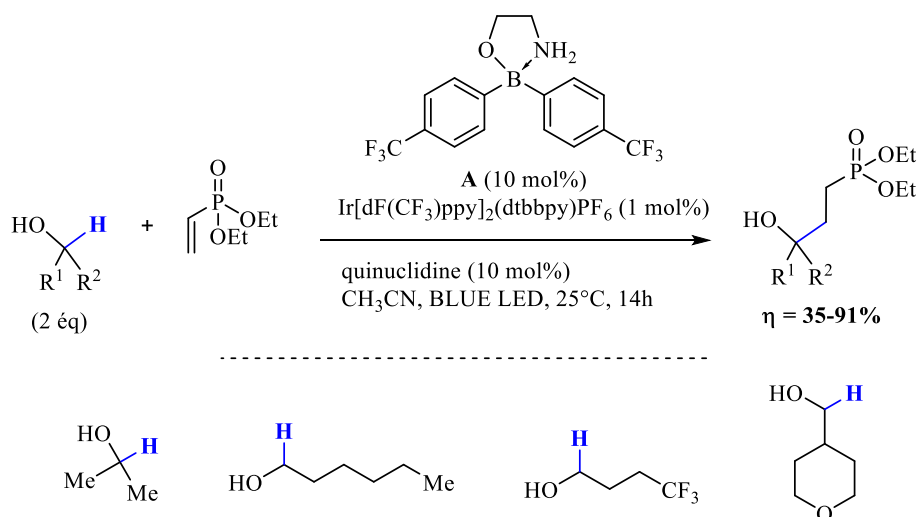


Schéma 52 : Alkylations sélective d'alcools par catalyse photorédox combinée à l'action du borinate A

d) Partenaires dans les réactions de couplages croisés

Depuis 1990, il est connu que les boranes et les acides boriniques peuvent être impliqués dans des réactions de couplage croisé. Cependant, peu d'équipes se sont intéressés à la réactivité de ces composés dans ce type réaction.¹⁴⁵

Winkle *et al.* ont réalisé avec succès un couplage croisé de Suzuki entre un acide arylborinique symétrique et un triflate vinylique (Schéma 53).¹⁴⁶

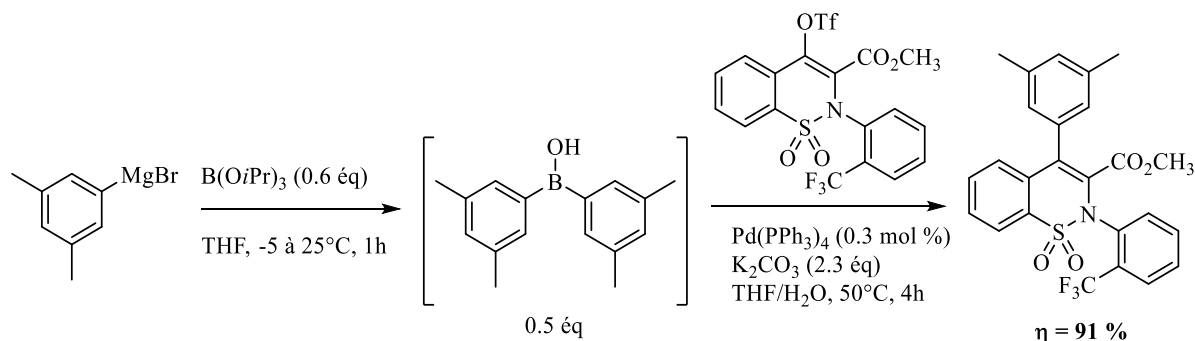


Schéma 53: Couplage de Suzuki-Miyaura entre un vinyle triflate et l'acide bis(3,5-diméthylphényl) borinique

Compte tenu de l'instabilité de l'acide borinique sur gel de silice, les auteurs ont réalisé la formation de l'acide borinique et la réaction de type Suzuki-Miyaura selon un processus monotope. Dans ces conditions le composé désiré a été isolé avec un rendement de 91% sur une échelle de 1.9 kg. Il est important de signaler que les deux groupements aryles de l'acide borinique sont transférés permettant ainsi une économie d'atomes.

¹⁴⁵ N. A. Bumagin, V. V. Bykov, *Tetrahedron* **1997**, 53, 14437-14450.

¹⁴⁶ D. D. Winkle, K. M. Schaab, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, 5, 450-451.

En 2012, Chen *et al.* ont mis au point une méthode de synthèse de biaryles non-symétriques utilisant un couplage de Suzuki-Miyaura entre un acide arylborinique symétrique et un halogénure d'aryle (**Schéma 54**).¹¹⁶

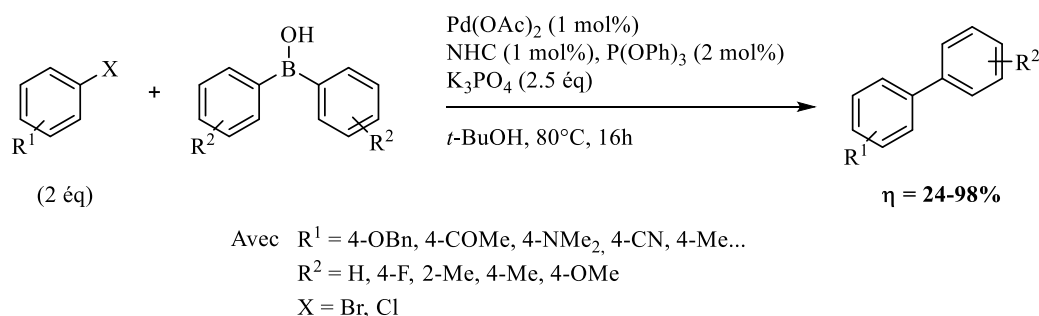


Schéma 54: Synthèse palladocatalysée de diaryles à partir d'acides arylboriniques

Dans cette approche, les auteurs utilisent une quantité catalytique de palladium en présence d'un carbène *N*-hétérocyclique (NHC) et de triphénylphosphite. Ces conditions permettent d'obtenir des biaryles avec de bons rendements même pour les chlorures d'aryles désactivés. Cependant les acides boriniques utilisés sont peu variés compte tenu des difficultés de synthèse et de purification.

Depuis le groupe de G. Zou a largement diversifié les méthodes de couplages croisés employant des acides arylboriniques symétriques comme substrat (**Figure 31**). Tout d'abord, des couplages de type Suzuki catalysé soit par du palladium soit par du nickel ont été étudiés pour accéder à nouveau à des biaryles non-symétriques,^{147, 148} et à des diarylcétones ou alkylarylcétones non symétriques.^{149, 150} Enfin, ils ont mis au point les conditions d'un couplage de Chan-Lam permettant des *N*-arylations de benzimidazoles ou d'amines primaires.¹⁵¹

¹¹⁶ X. Chen, H. Ke, Y. Chen, C. Guan, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7572-7578.

¹⁴⁷ H. Ke, X. Chen, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7132-7140.

¹⁴⁸ F. Wang, C. Wang, G. Sun, G. Zou, *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151491.

¹⁴⁹ X. Li, G. Zou, *J. Organomet. Chem.* **2015**, *794*, 136-145.

¹⁵⁰ S. Si, C. Wang, N. Zhang, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4364-4370.

¹⁵¹ C. Guan, Y. Feng, G. Zou, J. Tang, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 6906-6913.

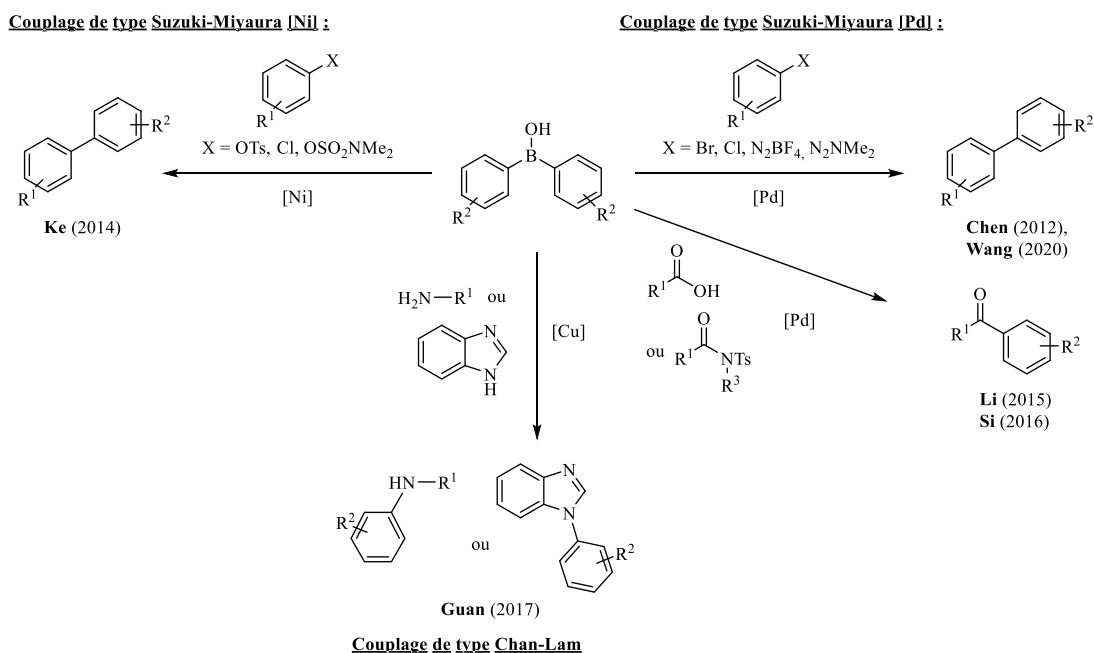


Figure 31 : Représentation des différents couplages croisés utilisant des acides arylboroniques mis au point par l'équipe de G. Zou

Par ailleurs, Zhang *et al.* ont montré qu'il était possible d'utiliser directement des borinates lors d'un couplage croisé catalysé par du palladium (**Schéma 55**).¹⁵² Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les borinates issus du 3-*N,N*-diméthylaminopropyle. Dans ces conditions, les rendements sont similaires à ceux obtenus avec les acides boriniques.

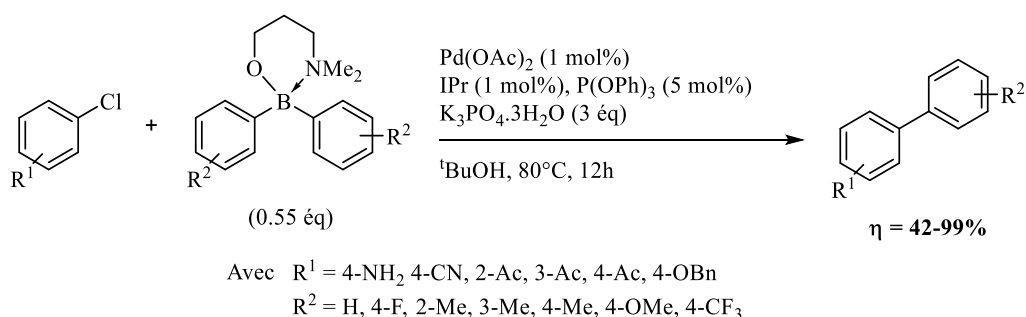


Schéma 55: Synthèse palladocatalysée de diaryls à partir d'arylborationates du 3-*N,N*-diméthylaminopropyle

e) Applications biologiques :

L'étude et le développement de molécules bioactives comportant un ou plusieurs atomes de bore a été souvent négligé par les chimistes médicaux.¹⁵³ Aussi, depuis une dizaine d'années leur utilisation s'accélère.¹⁵⁴ L'atome de bore possède plusieurs avantages : c'est un acide de Lewis, et il est électrophile grâce à son orbitale *p* vacante. Ainsi, il peut facilement

¹⁵² N. Zhang, C. Wang, G. Zou, J. Tang, *J. Organomet. Chem.* **2017**, 842, 54-58.

¹⁵³ S. J. Baker, C. Z. Ding, T. Akama, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, Y. Xia, *Future Medicinal Chemistry* **2009**, 1, 1275-1288.

¹⁵⁴ G. F. S. Fernandes, W. A. Denny, J. L. Dos Santos, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 179, 791-804.

former des liaisons datives avec des nucléophiles présents dans le milieu physiologique, comme des alcools et les amines présents dans les enzymes, les sucres ou les acides nucléiques. Enfin, l'hybridation autour de l'atome de bore peut être facilement convertie d'une hybridation sp^2 trigonale plan en sp^3 tétraédrique en conditions physiologiques, ce qui peut en faire un bon candidat inhibiteur d'enzyme en mimant l'état de transition tétraédrique. Néanmoins, l'incorporation de l'atome de bore sur des structures fonctionnalisées est difficile par les méthodes chimiques actuellement développées, limitant l'utilisation de ce type de molécule.

Certains acides alkylboroniques sont connus pour être des inhibiteurs réversibles d'enzymes telles que l'acétylcholine estérase depuis 1974.¹⁵⁵ Depuis, des esters boroniques se sont avérés être des inhibiteurs de méthyltransferases (CerM et MenH)¹⁵⁶ ou de thioestérases de protéines porteuses d'acyle (ATP, pour *acyl thioesterase protein*) (**Figure 32**).¹⁵⁷

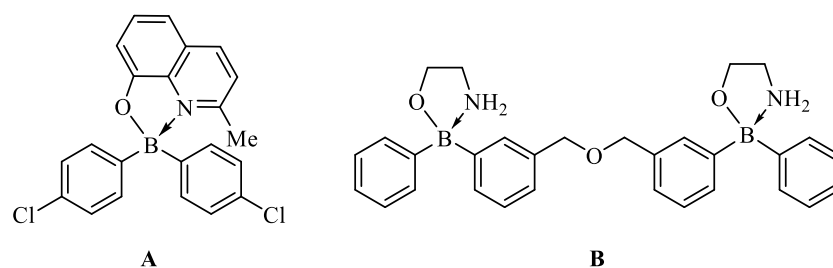


Figure 32 : Structures des borinates inhibiteurs de CerM et MenH (A) ou d'ATP (B)

Des inhibiteurs d'ATPase SERCA ont été également reportés.¹⁵⁸ Ils diffèrent principalement par la nature de leur ligand aminoéthanol **C**, soit des amino-acides **D** ou encore des oxazaborines **E**. Le composé **C** possède un IC_{50} de $5.4 \mu M$ sur TRPV6187,¹¹⁴ un canal à calcium surexprimé dans le cancer de la prostate. Le composé **D** est en phase 2 de test clinique pour le traitement de certaines inflammations dermatologiques (acné, dermatite atopique...)¹⁵⁹ et le composé **E** possède un IC_{50} de 574 nM sur l'inflammasome NLRP3 (complexe protéique impliqué dans l'immunité innée) (**Figure 33**).¹⁶⁰

¹⁵⁵ K. A. Koehler, G. P. Hess, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5345-5350.

¹⁵⁶ S. J. Benkovic, S. J. Baker, M. R. K. Alley, Y.-H. Woo, Y.-K. Zhang, T. Akama, W. Mao, J. Baboval, P. T. R. Rajagopalan, M. Wall, L. S. Kahng, A. Tavassoli, L. Shapiro, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7468-7476.

¹⁵⁷ T. J. Zimmermann, M. Bürger, E. Tashiro, Y. Kondoh, N. E. Martinez, K. Görmer, S. Rosin-Steiner, T. Shimizu, S. Ozaki, K. Mikoshiba, N. Watanabe, D. Hall, I. R. Vetter, H. Osada, C. Hedberg, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 115-122.

¹⁵⁸ J. M. Diver, S. O. Sage, J. A. Rosado, *Cell Calcium* **2001**, *30*, 323-329.

¹⁵⁹ S. J. Baker, T. Akama, Y. K. Zhang, V. Sauro, C. Pandit, R. Singh, M. Kully, J. Khan, J. J. Plattner, S. J. Benkovic, V. Lee, K. R. Maples, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5963-5967.

¹⁶⁰ A. G. Baldwin, J. Rivers-Auty, M. J. D. Daniels, C. S. White, C. H. Schwalbe, T. Schilling, H. Hammadi, P. Jaiyong, N. G. Spencer, H. England, N. M. Luheshi, M. Kadirvel, C. B. Lawrence, N. J. Rothwell, M. K. Harte, R. A. Bryce, S. M. Allan, C. Eder, S. Freeman, D. Brough, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1321-1335.

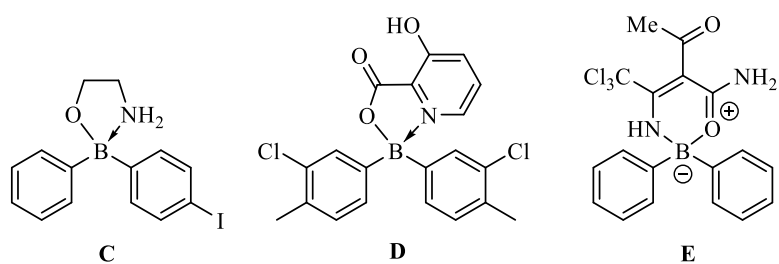


Figure 33: Structures des borinates possédant une activité biologique

On retrouve les acides boriniques et les borinates dans de nombreuses applications allant de la catalyse à la chimie médicinale et l'intérêt porté à cette famille de composés semble s'être accru durant cette dernière décennie. Comme il existe peu de méthodes pour synthétiser efficacement les acides arylboriniques, la plupart des études menées ont uniquement utilisé des acides arylboriniques simples. De même, la diversité structurale des borinates provient principalement de l'hétérogénéité des ligands complexés aux acides boriniques.

II. Synthèse d'une sonde à amorce borinique :

À ce jour, il n'existe pas d'études s'intéressant à la réaction d'oxydation d'acides boriniques non cycliques par le peroxyde d'hydrogène.

1. Étude préliminaire :

a) Étude de la réactivité de l'acide phénylborinique vis-à-vis du H₂O₂ :

Avant de concevoir une sonde fluorogénique basée sur une amorce borinique, une étude sur un acide arylborinique modèle, l'acide phénylborinique, a été réalisée pour examiner sa réactivité vis-à-vis du H₂O₂ et comparer sa cinétique d'oxydation à celle de l'acide phénylboronique. Pour cela, un suivi par RMN du proton des cinétiques d'oxydation de l'acide phénylborinique **23** et de l'acide phénylboronique commercialement disponible ont été réalisés.

L'acide phénylborinique **23** a été synthétisé en deux étapes. La première étape est une addition nucléophile du phényllithium sur l'ester phénylboronique de pinacol commercial suivie d'une hydrolyse acide puis d'un traitement par le 2-aminoéthanol permettant l'obtention du borinate **24** isolé par précipitation avec un rendement de 98%. Dans un second temps, une hydrolyse acide en présence d'une solution aqueuse de HCl (1M), conduit à l'acide phénylborinique **23** avec un rendement 68% (**Schéma 56**).

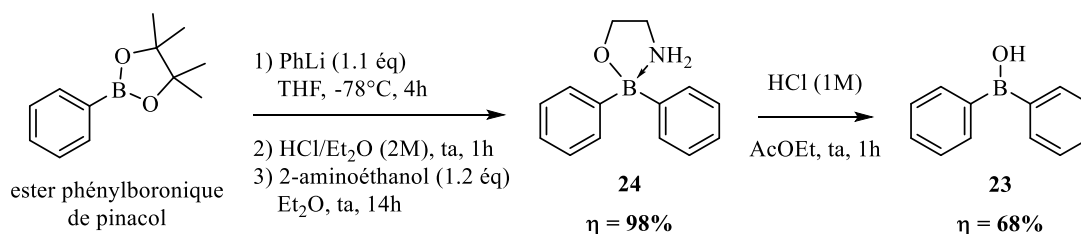


Schéma 56 : Synthèse de l'acide phénylborinique 23

Le suivi cinétique a été réalisé à l'aide d'un spectromètre 600 MHz disposant d'une cryosonde dans les conditions suivantes : tampon PBS, pH = 7.4 avec une concentration finale de produits de 2 mM. Ce type de spectromètre possède une sensibilité suffisamment importante pour observer les déplacements chimiques d'une molécule en milieu fortement dilué. L'acide borinique **23** et de l'acide phénylboronique ont été dissous dans un tampon PBS deutéré 1X (pH = 7.4, avec 5% de DMSO, v/v), à une concentration de 4 mM. Parallèlement, du peroxyde d'hydrogène complexé à de l'urée, a été utilisé pour préparer une solution de H₂O₂ à 4 mM dans le même tampon. Sous cette forme, le peroxyde d'hydrogène est solide, aussi la concentration de la solution utilisée sera plus précise que si une solution de peroxyde d'hydrogène commerciale dont le titre varie entre 29 et 32% avait été utilisée. Enfin, des solutions de l'acide borinique **23**,

l'acide phénylboronique et du phénol à 2 mM, toujours dans les mêmes conditions ont été également préparées pour faire office de référence.

Expérimentalement, une solution à 4 mM (250 μ L) de l'espèce testée a été mise en présence d'une quantité stœchiométrique de H_2O_2 (250 μ L de la solution à 4 mM pour un volume total de 500 μ L). Les expériences ont été réalisées en triplicata, et un enregistrement à différents temps a été réalisé pour chacune d'elles (2, 5, 10, 15 minutes, etc...) à 25°C et comparé au spectre de l'acide borinique de départ (**Figure 34**).

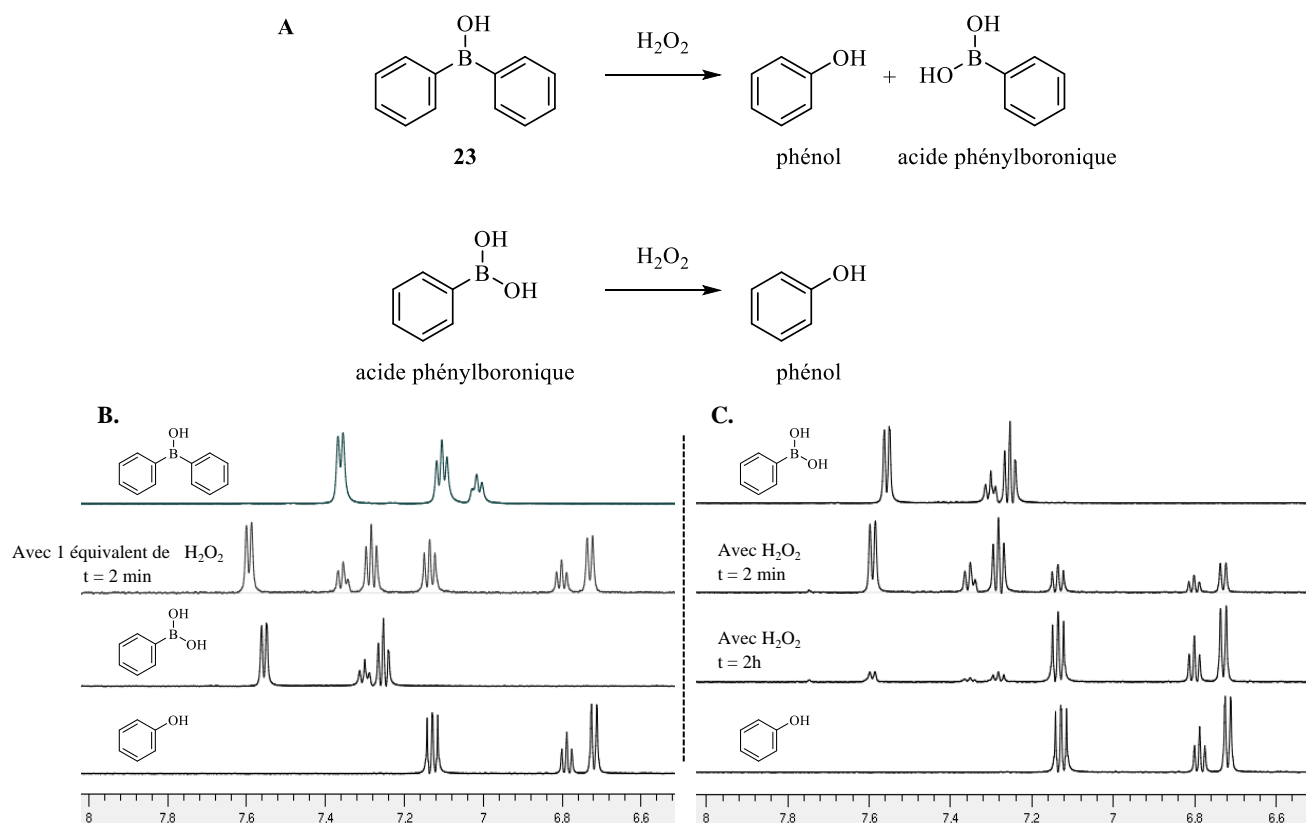


Figure 34 : Suivi par spectroscopie 1H RMN de l'oxydation de l'acide phénylborinique **23 et de l'acide phénylboronique en présence H_2O_2**

- A. Réaction d'oxydation de l'acide phénylborinique **23** et de l'acide phénylboronique vis-à-vis du H_2O_2
- B. Spectres 1H RMN de l'acide phénylborinique **23** (référence), de l'acide phénylborinique **23** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes, et des produits attendus : l'acide phénylboronique et le phénol.
- C. Spectres 1H RMN de l'acide phénylboronique (référence), de l'acide phénylboronique avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes et 2h, et du produit attendu : le phénol.

Après deux minutes de réaction entre l'acide borinique **23** et le peroxyde d'hydrogène, le spectre RMN du proton révèle la disparition du signal caractéristique de l'acide borinique **23** à 7.02 ppm traduisant la conversion totale de ce dernier en acide phénylboronique et en phénol. Alors que deux minutes sont nécessaires pour l'oxydation complète de l'acide borinique **23**, deux heures sont nécessaires pour que l'acide phénylboronique soit presque complètement oxydé en phénol en présence d'un seul équivalent de H_2O_2 . Ce suivi par RMN confirme que les acides

boriniques sont donc bien plus réactifs vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène que les acides boroniques correspondants.

b) Étude de la réactivité des esters boriniques :

Dans la littérature, les sondes utilisées pour la détection du H₂O₂ possèdent principalement une amorce de type ester boronique. De manière analogue, il a été envisagé d'évaluer si les esters boriniques (ou borinates) pouvaient aussi servir d'amorce chimique pour détecter le peroxyde d'hydrogène. En effet, ces composés sont plus facilement accessibles et plus stables que les acides boriniques. Pour cela, un suivi par spectroscopie ¹H RMN a aussi été effectué sur différents borinates issus de l'acide phénylboronique en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène.

Les borinates issus de l'acide phénylboronique ont été synthétisés de la même manière que le borinate **24** : addition nucléophile du phényllithium sur l'ester phénylboronique de pinacol à -78°C suivie d'une hydrolyse acide. Le résidu obtenu a été traité respectivement par le 2-(diméthylamino)éthanol, le 2-(diméthylamino)propanol, la 8-hydroxyquinoléine, le 2-méthanolpyridine, et la (S)-alanine pour conduire aux borinates **25** à **29** avec des rendements compris entre 71% et 80% (**Schéma 57**).

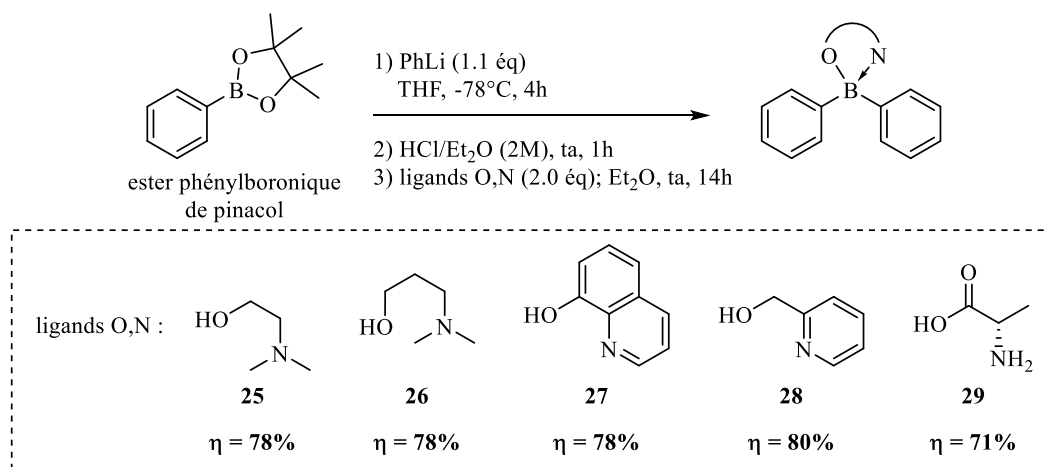


Schéma 57 : Synthèse des borinates 25 à 29

Le suivi cinétique par ¹H RMN de l'oxydation de tous les borinates a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment. Par exemple, en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène et après deux minutes, le borinate **24** est partiellement oxydé en acide phénylboronique et phénol (**Figure 35**). Aucune évolution supplémentaire n'est observée lors des expériences suivantes (de 5 minutes à 1h après ajout de H₂O₂).

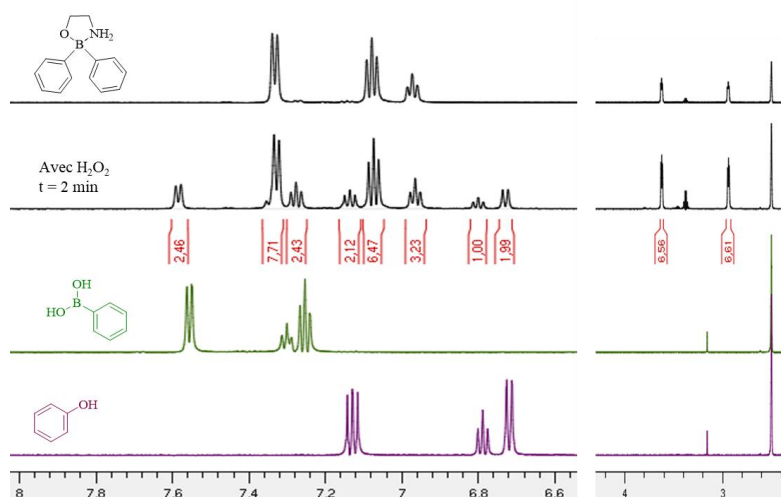


Figure 35 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation du borinate **24** en présence H_2O_2

A. Spectres ^1H RMN du borinate **24** (référence), du borinate **24** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes, et des produits attendus : l'acide phénylboronique et le phénol.

Grâce aux spectres de référence (l'acide phénylboronique en vert, et le phénol en violet), une conversion modérée de 40% est mesurée pour ce borinate. De manière surprenante, le phénol a été formé en quantité légèrement inférieure à l'acide phénylboronique (proportion **45** : **55**). Lors de l'oxydation de l'acide phénylborinique **23**, ces composés étaient formés dans les mêmes proportions.

Parmi tous les borinates testés, seuls ceux issus de dérivés d'aminoalcools ont été oxydés par un équivalent de peroxyde d'hydrogène, jusqu'à une conversion de 59% pour le borinate **25** issu du 2-diméthylamino)éthanol (**Figure 36**). Ces résultats peuvent s'expliquer par la nature des ligands. En effet, pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène, l'atome d'azote ne doit plus être chélaté à l'atome de bore (décoordination) or les borinates n'ayant pas réagi avec le peroxyde d'hydrogène sont ceux qui possèdent l'atome d'azote le plus basique (décoordination plus difficile).

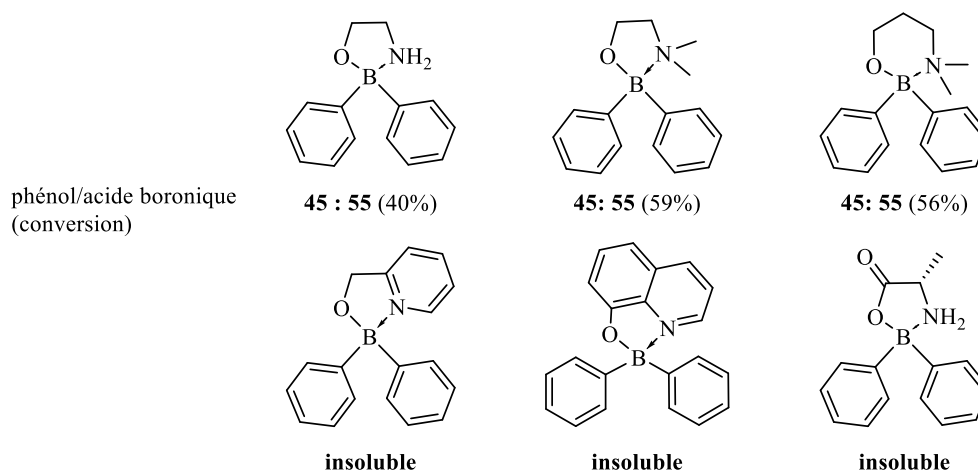


Figure 36 : Résumé de l'ensemble des conversions et des proportions des produits d'oxydation pour les borinates **24** à **29**

D'autres mesures devront être effectuées pour déterminer le nombre d'équivalents nécessaires pour oxyder complètement les borinates **24** à **26**. En effet, si l'obtention d'un acide borinique se révèle trop instable, l'utilisation d'un de ces borinates pourrait en effet être une alternative intéressante.

Cette première étude a révélé que la vitesse d'oxydation de l'acide borinique **23** est plus rapide que celle de l'acide phénylboronique. Malheureusement, la spectroscopie RMN n'a pas permis d'estimer la vitesse d'oxydation associée car le temps nécessaire à la première acquisition est supérieur à la vitesse de réaction d'oxydation de cet acide borinique. L'utilisation d'un acide borinique possédant une plateforme fluorescente devrait permettre de résoudre cette problématique, car les mesures d'intensité de fluorescence peuvent être bien plus rapides (jusqu'à dix mesures par seconde) et elles peuvent être réalisées en conditions plus diluées que celles en RMN.

2. Synthèse et études d'une sonde fluorogénique à amorce borinique symétrique

Pour résoudre les difficultés d'obtention des constantes cinétiques de l'oxydation des amorces à base d'acides boriniques, la 7-hydroxycoumarine a été choisie comme plateforme fluorescente pour l'élaboration d'une première sonde fluorogénique. Ce fluorophore possède des propriétés photophysiques intéressantes comme un large déplacement de Stokes, un rendement quantique correct et une grande photostabilité (**Figure 37**). Par ailleurs, comme elle est faiblement fonctionnalisée, cela devrait faciliter la synthèse de la sonde fluorogénique dont l'amorce est basée sur un motif acide borinique.

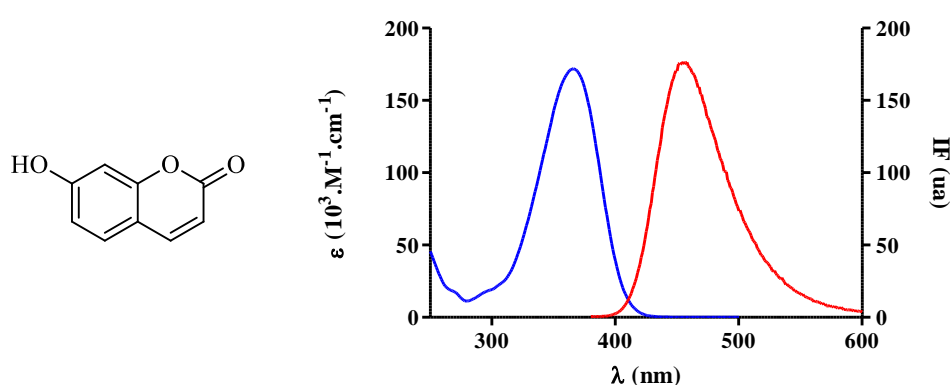


Figure 37: Structure et propriétés d'absorption et d'émission de la 7-hydroxycoumarine (pH = 9.7, λ_{exc} = 366 nm)

Dans un premier temps, l'élaboration d'une sonde fluorogénique à amorce arylborinique symétrique **30** a été envisagée. En effet, la symétrie de cette sonde devrait permettre uniquement la libération de la 7-hydroxycoumarine fluorescente dans le milieu. De plus, l'oxydation entraînerait également la libération d'une nouvelle sonde fluorogénique cette fois-ci à amorce borinique **30'**. Une seconde oxydation plus lente, devrait alors mener à la libération d'une seconde espèce fluorescente dans le milieu et l'acide borique. Bien que peu économe en atomes, cette stratégie en deux temps pourrait conduire à une libération totale de deux motifs fluorescents (**Schéma 58**).

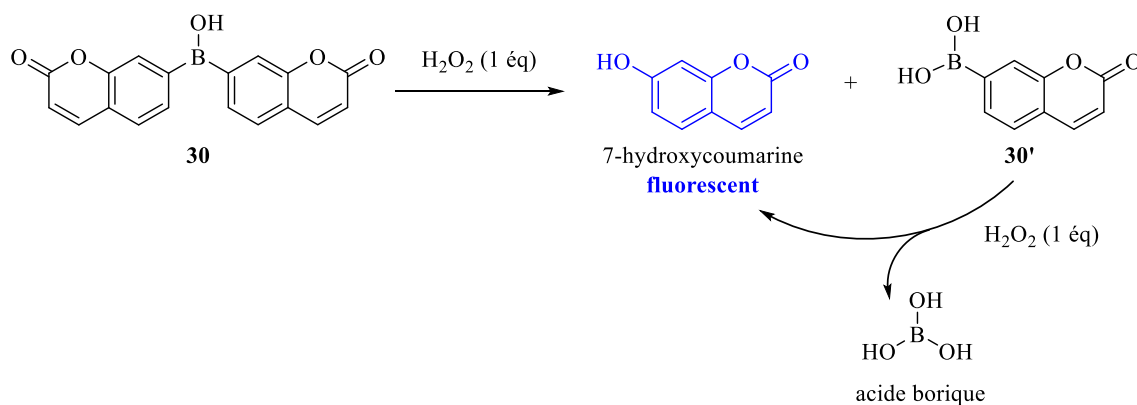


Schéma 58: Oxydation par le peroxyde d'hydrogène d'une sonde à amorce arylborinique symétrique **30**

Le motif acide borinique de la sonde fluorogénique **30** symétrique pourrait être obtenu selon deux approches reposant sur les voies de synthèse précédemment décrites : soit celle de Hofer *et al.* ou soit celle de l'équipe de Pucheault (**Schéma 59**). Dans la première approche (Hofer), l'acide borinique serait obtenu par addition d'un organolithien issu de la 7-bromocoumarine **31** sur un tri(alkoxy)borane et pour la deuxième approche (Pucheault), il serait toujours obtenu à partir de la 7-bromocoumarine **31**, mais cette fois en présence de DIPAB et de magnésium. La 7-bromocoumarine **31** serait quant à elle issue du 3-bromophénol commercial.

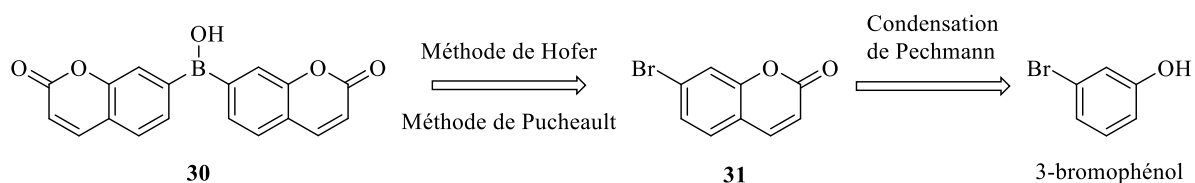


Schéma 59: Rétrosynthèse de la sonde symétrique **30**

La synthèse de la 7-bromocoumarine **31** a été réalisée par condensation de Pechmann entre l'acide malique et le 3-bromophénol, en présence d'un excès d'acide sulfurique concentré à 120°C pendant 6 heures avec des rendements modérés de 24 à 40%. À la fin de la réaction, le milieu réactionnel est plongé dans un bain d'eau glacée. Le meilleur rendement a été obtenu lorsque ce mélange a été traité via une extraction solide/liquide (ajout de K₂CO₃(s) jusqu'à formation d'une pâte) plutôt qu'une extraction liquide/liquide classique (**Schéma 60**).

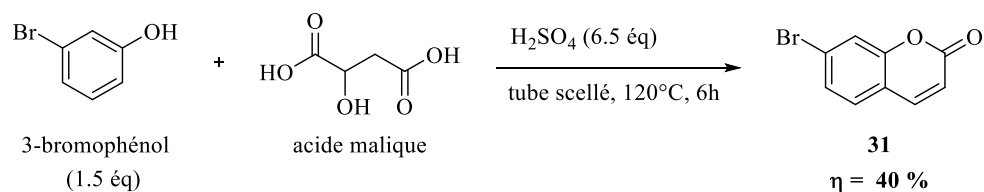


Schéma 60: Synthèse de la 7-bromocoumarine **31**

Ainsi, le dérivé bromé **31** a été mis en présence de *t*-butyllithium puis de B(OMe)₃ pendant 4 heures à -78°C (**Schéma 61**). La 7-bromocoumarine a été récupérée majoritairement en présence de produits secondaires minoritaires non identifiables ne correspondant pas à l'acide borinique **30**, aucun signal n'a été observé par RMN du bore pour ces produits.

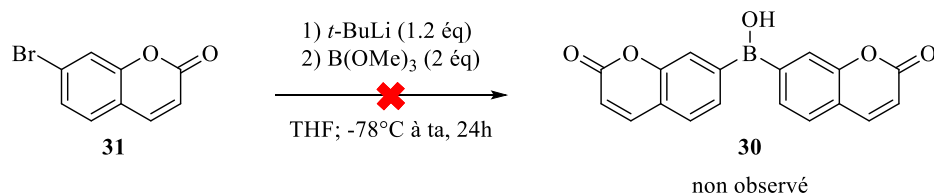


Schéma 61: Synthèse de la sonde fluorogénique symétrique **30** selon la méthode de Hofer

Avant de tester la méthode de Pucheault, différentes méthodes d'activation ont été testées pour vérifier la faisabilité du réactif de Grignard sur la 7-bromocoumarine **31**. Malheureusement, quelle que soit la méthode d'activation utilisée (1,2-dibromo éthane ou iode dans le THF) seul le

réactif bromé a été récupéré. Le magnésium ne semble pas pouvoir s'insérer dans la liaison carbone-halogène de la 7-bromocoumarine **31**. A ce jour, aucune étude n'a d'ailleurs décrit la synthèse ou l'utilisation de cet organomagnésien.

3. Synthèse et étude d'une sonde fluorogénique à amorce borinique dissymétrique

Face aux difficultés d'obtention de cette sonde fluorogénique symétrique **30**, il a été envisagé de synthétiser une sonde fluorogénique dissymétrique. Celle-ci devrait permettre de déterminer les constantes cinétiques de la réaction d'oxydation d'une amorce borinique vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène lors d'un suivi par spectroscopie de fluorescence.

a) Synthèse

Des travaux précédents réalisés au laboratoire se sont intéressés à la synthèse de la sonde fluorogénique dissymétrique **32**, elle aussi basée sur la 7-hydroxycoumarine.¹⁶¹

La sonde **32** avait été obtenue en trois étapes à partir de la 7-hydroxycoumarine commerciale avec un rendement global de 0,3% sur 3 étapes. L'étape limitante de cette synthèse était la formation du motif acide borinique. Celui-ci avait été obtenu après addition de phényllithium sur l'ester boronique de pinacol **33** (Schéma 62).

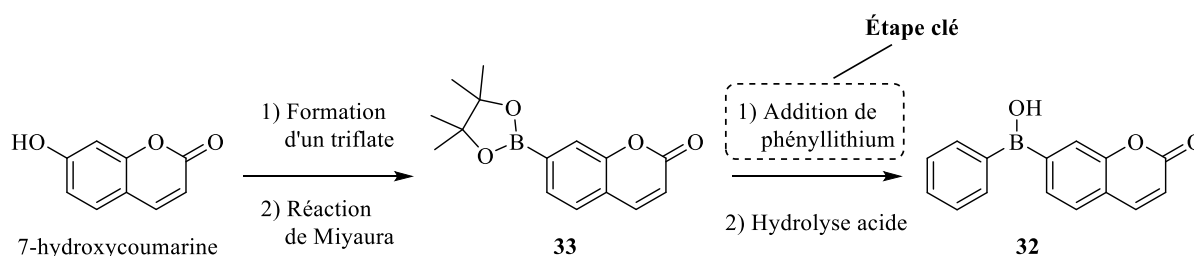


Schéma 62: Synthèse de la sonde dissymétrique **32**

Le produit de synthèse **32** ayant été obtenu en très faible quantité, il a été envisagé de reproduire cette synthèse en essayant d'améliorer le rendement. L'ester boronique **33** issu de la 7-hydroxycoumarine a été obtenu avec un rendement global de 76% sur les étapes de formation du triflate **34** et de la réaction de Miyaura. Ces rendements sont similaires à ceux obtenus dans la littérature.⁶⁶

L'étape clé a ensuite été étudiée. Une solution commerciale de phényllithium dans le dibutyléther a été additionnée à l'ester boronique **33** à -78°C . Le suivi par chromatographie sur couche mince s'est révélé difficile ; aussi la réaction a été agitée pendant 4 heures à -78°C de manière arbitraire. Après une hydrolyse acide par une solution HCl dans l'éther diéthylique, la RMN du proton du brut réactionnel nous a permis d'estimer une conversion de seulement 30% de l'ester boronique. L'acide borinique **32** attendu est observé par RMN du bore (≈ 45 ppm) en

¹⁶¹ Roxane Ottenwelter, Sondes pour la détection de formes actives de l'oxygène *in vivo*. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2017, Français.

mélange avec des produits de polyadditions et l'ester boronique **33** (≈ 30 ppm) n'ayant pas réagi. A ce stade ni l'ester borinique **32** ni les produits de polyadditions n'ont pu être isolés. Pour améliorer la conversion, plusieurs essais où la température réactionnelle a graduellement été laissée remonter à 0°C après l'addition du phényllithium -78°C ont été réalisés. Dans ce cas, seuls les produits de polyadditions ont été observés (**Schéma 63**).

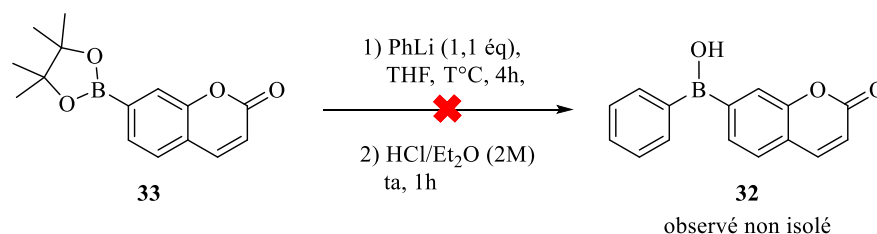


Schéma 63 : Synthèse de l'acide borinique 32

Bien que la réaction reste incomplète et compte-tenu de l'instabilité de l'acide borinique sur gel de silice, une étape d'estérification par la 8-hydroxyquinoléine a été ajoutée à la séquence réactionnelle. Après ajout de pentane froid un précipité vert est formé. Celui-ci contient majoritairement l'ester boronique **33**, minoritairement le borinate **36** désiré ainsi qu'un borinate **35** issu du produit de polyaddition (**Schéma 64**). Après une purification sur gel de silice le borinate **36** est isolé avec un très faible rendement de 4%. Le borinate **35**, résultant de la double addition de phényllithium sur la lactone de l'acide borinique **32**, est isolé avec un rendement de 10% et l'ester boronique **33** est récupéré à hauteur de 20%.

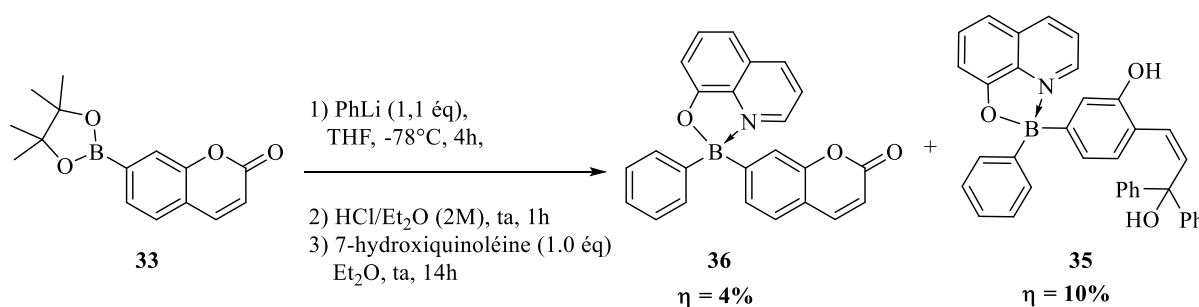


Schéma 64 : Synthèse du borinate 35

Face à ces difficultés d'obtention de l'acide borinique **32**, l'utilisation de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine a été envisagée comme une alternative intéressante pour obtenir une sonde à amorce borinique à motif coumarine. En effet, cette dernière possède des propriétés photophysiques très proches de celles de la 7-hydroxycoumarine.

La séquence réactionnelle précédemment établie a été appliquée à la 4-méthylumbelliférone pour accéder à l'ester boronique **37**. Ainsi, le dérivé triflate de la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine **38** a été obtenu après ajout d'anhydride trifluorométhanesulfonique en conditions basiques (pyridine), en 40 minutes, avec un rendement de 97%. Ce triflate a ensuite été engagé dans une réaction de Miyaura dans des conditions légèrement modifiées utilisant une quantité catalytique de Pd(dppf)Cl₂ complexé au dichlorométhane (10 mol%),⁶⁶ d'un léger excès de bis(pinacolato)diborane (1,2 équ) et de l'acétate de potassium (1,5 équ), dans du toluène à 110°C sous chauffage micro-ondes la réaction. Dans ces conditions, l'ester boronique **37** a été isolé avec un rendement de 65% (**Schéma 65**). Cette réaction a été réalisée à l'échelle du gramme sans perte de rendement.

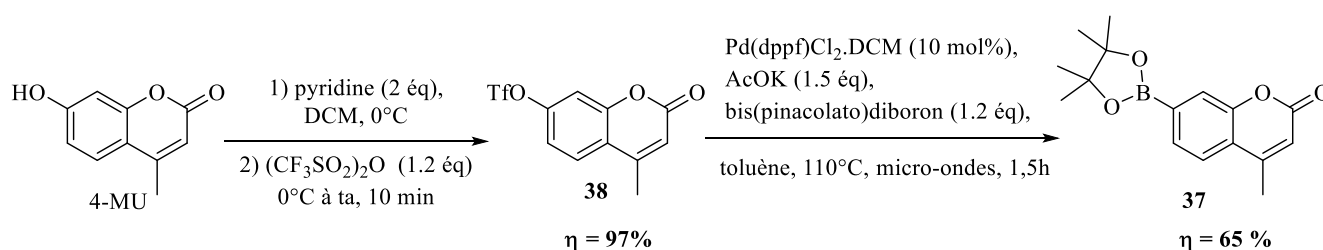


Schéma 65: Synthèse de l'ester boronique 37

Compte-tenu des résultats observés pour l'acide borinique **32**, il a été choisi de protéger directement sous forme d'esters boriniques (borinates) l'acide borinique formé de manière intermédiaire. De plus, les borinates ainsi formés précipitent en général dans l'éther diéthylique ce qui facilite leur isolation. Différents borinates ont donc été synthétisés. La réaction d'addition de l'organolithien (1,1 équ) sur l'ester boronique **37** a été réalisée à basse température (-78°C), pendant 4h. Après une hydrolyse acide, différents ligands ont été ajoutés : le 2-aminoéthanol, le 2-(diméthylamino)éthanol, le 3-(diméthylamino)propanol, le 2-pyridineméthanol, la 8-hydroxyquinoléine, et l'acide 2-picolinique. Les RMN du bore de tous les mélanges réactionnels ont révélé la formation des borinates correspondants (déplacements chimiques caractéristiques compris entre 5 et 12 ppm). Néanmoins seuls les borinates issus de la 8-hydroxyquinoléine, du 2-(diméthylamino)éthanol ou de l'acide 2-picolinique forment des précipités. Ainsi les borinates **38** à **40** ont été isolés après précipitation dans l'éther diéthylique avec des rendements de 26, 24 et 12% respectivement (**Schéma 66**).

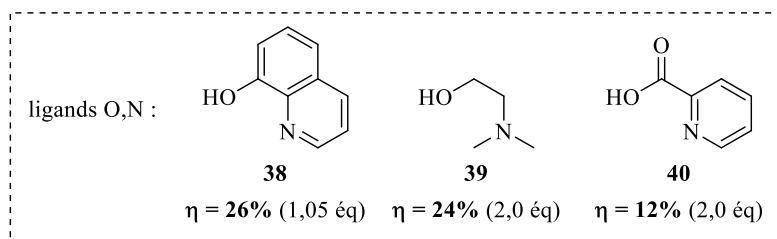
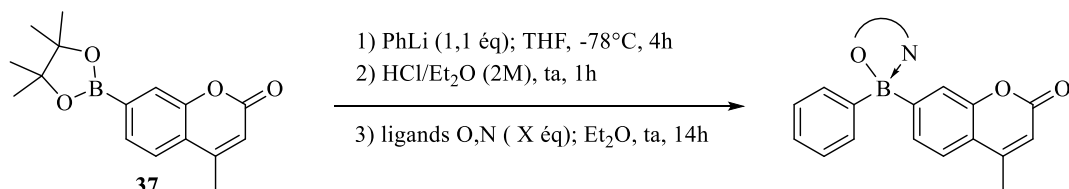


Schéma 66 : Synthèse des borinates 38 à 40

La déprotection de ces borinates a ensuite été étudiée. Une hydrolyse acide, en présence d'HCl aqueux a été réalisée pour les borinates **38** et **39** (**Schéma 67**).

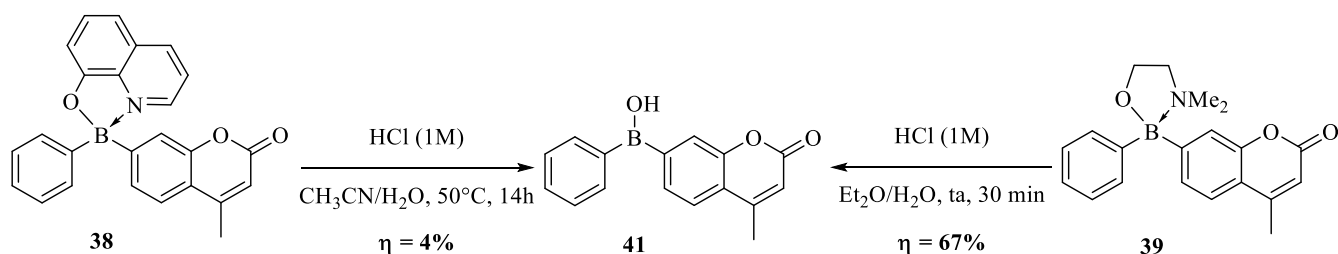


Schéma 67: Synthèse de l'acide borinique 41 à partir des borinates 38 et 39

Deux difficultés sont apparues lors de la déprotection du borinate **38**. Tout d'abord, la grande stabilité du borinate **38** conduit à une conversion modérée de 70%, même après 48h de réaction à 50°C. De plus, comme la réaction n'est pas totale, la purification s'est avérée complexe. Le produit a été obtenu après purification sur colonne SPE (extraction en phase solide) avec un rendement isolé très faible de 4%. D'autres méthodes de purification ont également été évaluées (gel de silice, HPLC) mais dans ces conditions, l'acide borinique **41** n'a jamais été isolé avec une pureté suffisante. La déprotection du borinate **39** s'est avérée beaucoup plus aisée. Une conversion totale a été observée en 30 minutes pour conduire à l'acide borinique **41** avec un rendement de 67%.

Enfin, la déprotection du borinate **40** a été réalisée en condition basique en présence de lithine hydratée. Ces conditions conduisent à une conversion partielle. Aussi, une purification sur gel de silice a été nécessaire pour isoler l'acide borinique **41**. Malheureusement l'acide borinique **41** se dégrade partiellement sur le gel de silice ce qui n'a pas permis, pour l'instant d'isoler le produit avec une pureté suffisante. Les conditions d'obtention de l'acide borinique **41** à partir du borinate **40** sont donc encore en cours d'optimisation (**Schéma 68**).

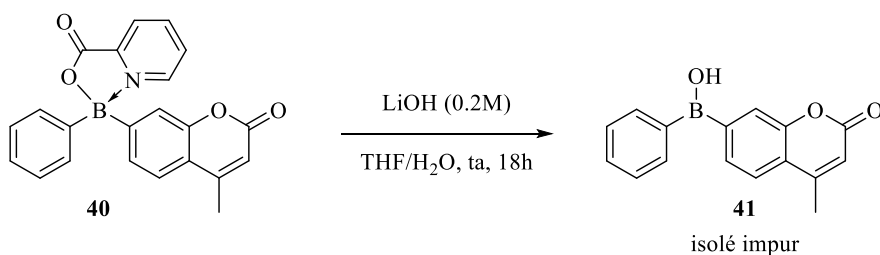


Schéma 68: Synthèse de l'acide borinique **41** à partir du borinate **40**

En conclusion, les conditions d'obtention du motif borinique ont été optimisées grâce à l'obtention du borinate **39** facilement isolable, et dont l'hydrolyse acide conduit facilement à la sonde fluorogénique **41**, avec un rendement global de 10% à partir de la 4-MU.

Afin de comparer les vitesses des réactions d'oxydation des sondes possédant une amorce acide borinique aux sondes à amorce acide boronique, l'acide boronique dérivé de la 4-méthylcoumarine **42** a été également synthétisé. Ce composé servira aussi de contrôle lors des tests d'oxydation ultérieurs puisqu'en présence de peroxyde d'hydrogène l'acide borinique **41** conduit à la libération de quatre produits, dont l'acide boronique **42**. Celui-ci est obtenu à partir de l'ester boronique **37** par une réaction d'estérification croisée, récemment décrite par Hinkes *et al.*¹⁶² Ainsi en présence de l'acide méthylboronique, l'acide boronique **42** a été obtenu avec un rendement de 87% (Schéma 69).

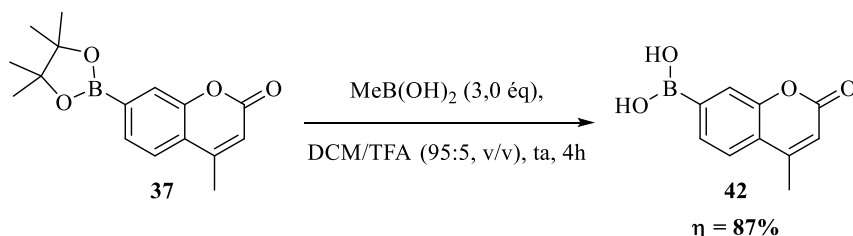


Schéma 69 : Synthèse de l'acide boronique **42** à partir de l'ester boronique **37**

b) Étude cinétique d'oxydation par H₂O₂ comparative des acides boriniques **41** et **42**

L'acide borinique **41** est dissymétrique aussi il conduit en présence de H₂O₂ soit à la libération de la 7-hydroxycoumarine et de l'acide phénylboronique, soit à la libération de phénol et de l'acide boronique **42** (non fluorescent) (Schéma 70).

¹⁶² S. P. A. Hinkes, C. D. P. Klein, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3048-3052.

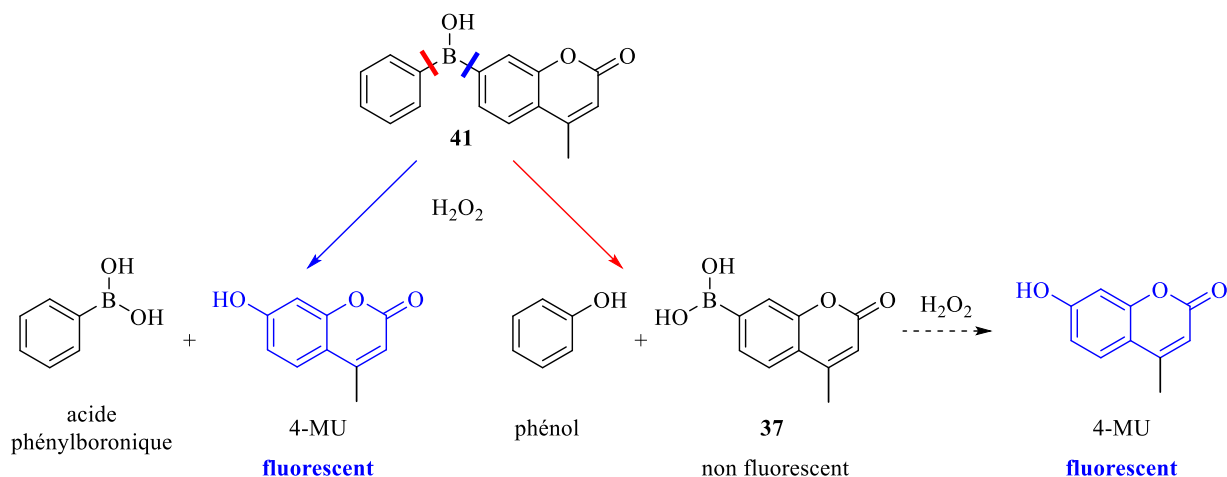


Schéma 70: Oxydation par H₂O₂ de la sonde fluorogénique 32 à amorce borinique

Le suivi cinétique de la réaction d'oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène des composés **41** et **42** a été réalisé par RMN dans les mêmes conditions que pour l'acide phénylborinique **23**. Ainsi, l'acide borinique **41** et l'acide borinique **42** ont été dissous dans un tampon PBS deutéré 1X (pH =7.4, avec 5% de DMSO, v/v), à 4 mM. Des échantillons des différents produits d'oxydation : le phénol, l'acide phénylboronique, la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (4-MU) et l'acide borinique **42** ont été dissous dans un tampon PBS deutéré 1X (pH =7.4, avec 5% de DMSO, v/v), à 2 mM. Grâce à ces spectres de références, les différentes proportions de produits ont pu être déterminées.

Après deux minutes, la disparition du signal correspondant au proton en α de la lactone de l'acide borinique **41** (rond noir) à 6,12 ppm montre que l'acide borinique **41** est entièrement oxydé (Figure 38).

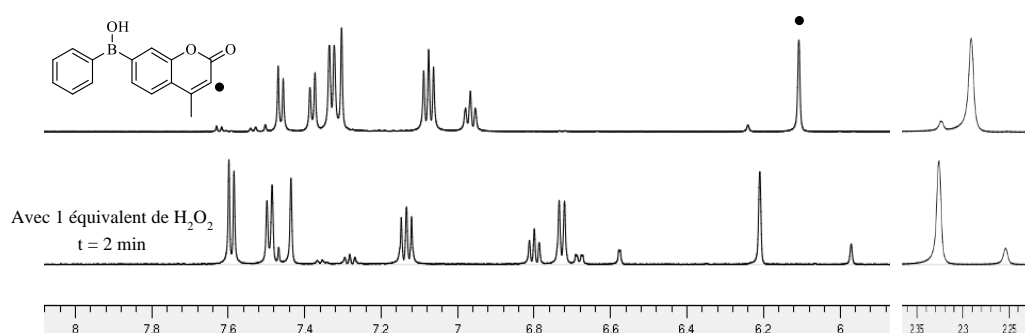


Figure 38: Suivi par spectroscopie ¹H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **41** en présence de H₂O₂
Spectres ¹H RMN de l'acide borinique **41** (référence), de l'acide borinique **41** avec H₂O₂ (1 éq) après 2 minutes

Par comparaison, l'oxydation de l'acide borinique en 4-MU est beaucoup plus longue. Après 2h30, environ 90% de l'acide borinique **42** est transformé en 4-MU caractérisé par l'apparition du signal correspondant au proton en α de lactone de la 4-MU (rond bleu) à 5.95

ppm. Il est intéressant de noter que plus aucune évolution n'est observée lors des expériences réalisées pour une durée plus grande (**Figure 39**).

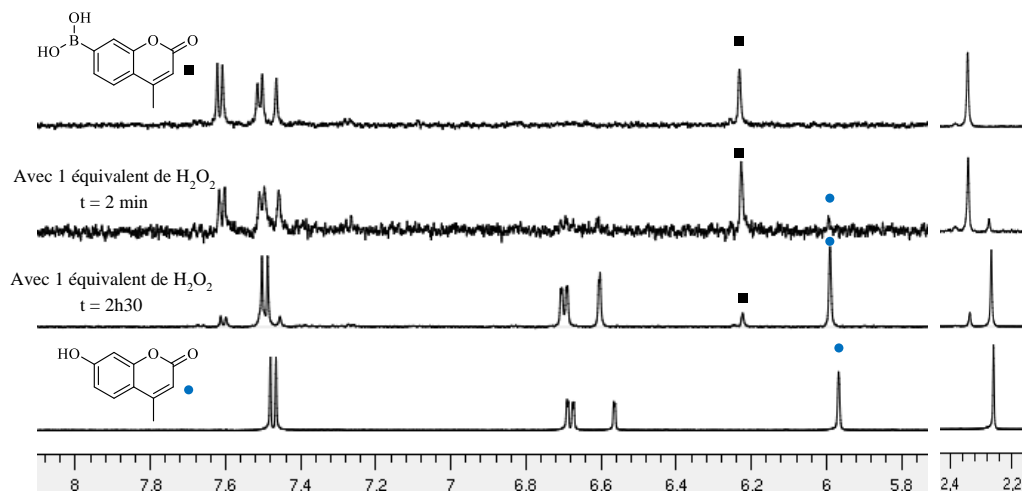


Figure 39 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **42** en présence de H_2O_2
Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **42** (référence), de l'acide borinique **42** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes, 2h30, et du produit attendu : la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine

Pour déterminer la régiosélectivité de la réaction d'oxydation de l'acide borinique **41** en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène, le spectre obtenu après deux minutes a été comparé à ceux des produits d'oxydation possibles : la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (en orange), l'acide phénylboronique (en vert), l'acide borinique **42** (en marron) et le phénol (en violet) (**Figure 40**). Le code couleur a été conservé pour les représentations des différents spectres RMN du proton des produits d'oxydation.

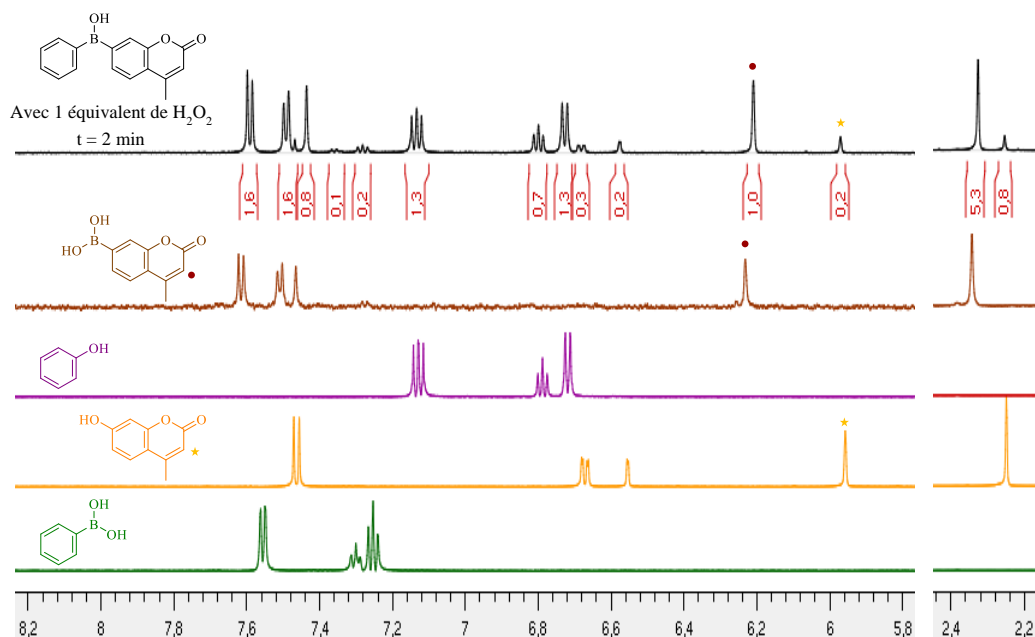
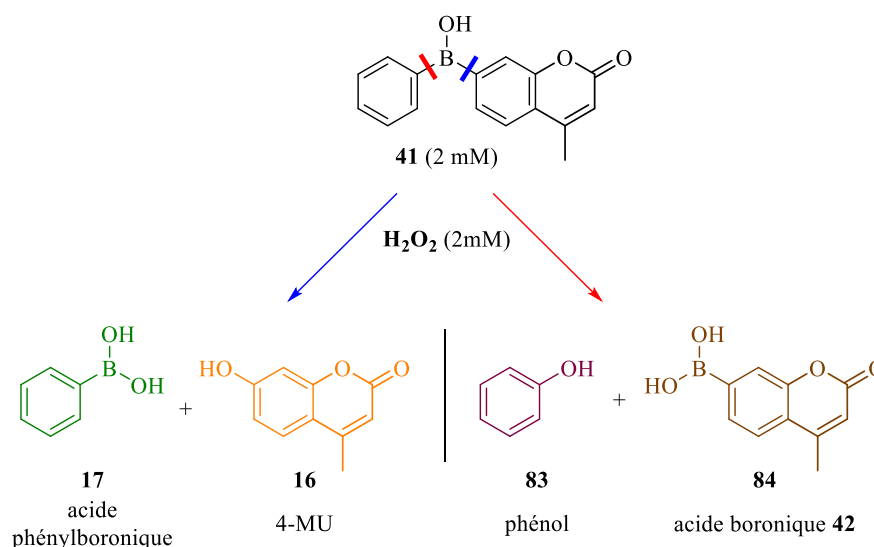


Figure 40 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **41** en présence de H_2O_2
Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **41** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes et du produit attendu : la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine, l'acide phénylboronique, le phénol et l'ester borinique **42**

Les différentes intégrations ont permis de calculer un rapport de **83 : 17** entre le phénol et l'acide phénylboronique et un rapport de **16 : 84** entre la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine et l'acide boronique **64** (Schéma 71).



*Schéma 71: Réaction d'oxydation de l'acide borinique **41** avec le H_2O_2 :
structures et proportions déterminées par ^1H RMN des différents produits d'oxydation possibles (en gras)*

Globalement, un peu moins de 20% de la réaction d'oxydation de l'acide borinique **41** par le peroxyde d'hydrogène conduit à la libération directe de la 4-MU. En présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène, l'acide boronique **42** conduira aussi à la formation de 4-MU. Les constantes de vitesse relatives de ces deux réactions ont pu être déterminées grâce à un suivi par spectroscopie de fluorescence. À nouveau, cette expérience montre que le motif borinique est oxydé bien plus rapidement que l'acide boronique correspondant.

*c) Détermination des constantes de vitesses relatives à l'oxydation de l'acide borinique **41** et de l'acide boronique **42** par H_2O_2*

Pour déterminer les constantes cinétiques relatives à l'oxydation de l'acide borinique **41** et de l'acide boronique **42**, par le peroxyde d'hydrogène, un modèle cinétique complet a été établi et testé en collaboration avec le Pr. Ludovic Jullien et le Dr. Thomas Le Saux, à l'ENS Ulm.

i. Détermination du pK_a

Pour se rapprocher des conditions physiologiques, les expériences ont été réalisées à $\text{pH} = 7,4$. L'acide borinique **41** et l'acide boronique **42** sont en équilibre entre leurs formes acides et basiques. Or seule la forme acide, dont la lacune électronique est libre, peut réagir avec le peroxyde d'hydrogène.

Les spectres d'absorption UV-visible des composés **41**, **42** et de la 4-MU dans du tampon Britton-Robinson 1X, pour une gamme de pH variant de 3 à 11, ont été enregistrés (**Figure 41**). Puis le logiciel *SPECFIT/32TM* a permis d'extraire les valeurs des pKa de ces espèces qui sont détaillées dans la **Figure 42**.

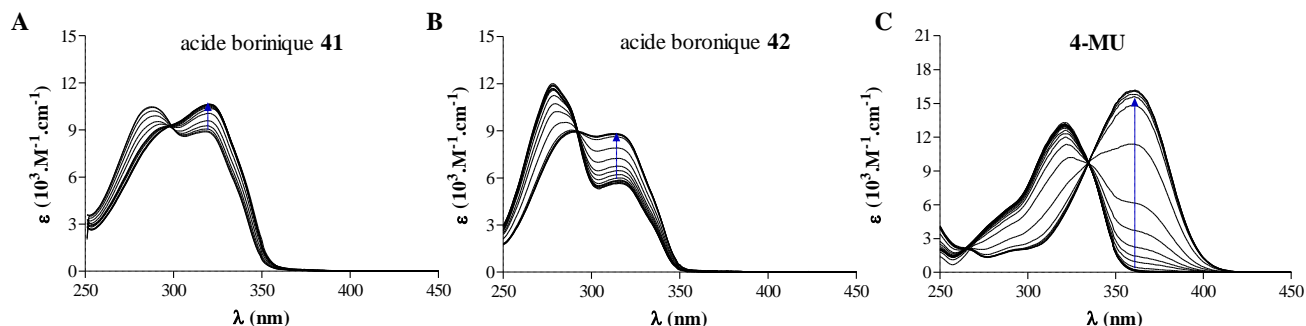


Figure 41 : Variations des spectres d'absorption de solutions à 20 µM en fonction du pH

pour l'acide borinique **41** (A; du plus acide au plus basique : pH = 2.92, 3.66, 4.29, 4.71, 5.16, 5.62, 6.17, 6.65, 7.00, 7.34, 7.92, 8.64, 9.06, 9.37), pour l'acide boronique **42** (B; du plus acide au plus basique: pH = 3.84, 4.25, 4.57, 4.82, 5.16, 5.56, 6.08, 6.50, 6.7, 7.03, 7.28, 7.63, 8.43, 8.88, 9.20, 9.55, 10.24), et pour la 4-MU (C; du plus acide au plus basique: pH = 2.87, 2.98, 3.15, 3.75, 4.16, 4.46, 4.68, 4.93, 5.22, 5.63, 6.17, 6.56, 6.80, 7.06, 7.31, 8.15, 8.78, 9.13, 9.36, 9.73, 10.15, 10.66). Dans du tampon Britton-Robinson 1X à 25°C.

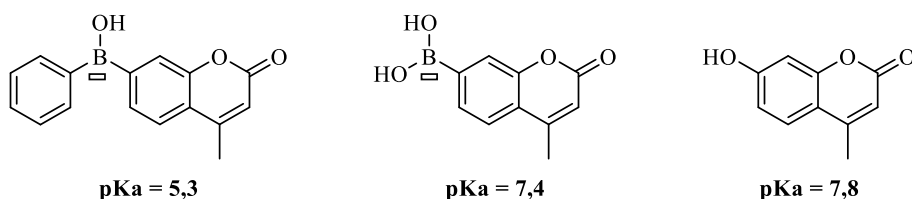


Figure 42 : Constantes de protonation associées aux composés **41**, **42** et 4-MU

L'acide borinique **41** est plus acide que l'acide boronique **42**, car il possède moins de groupements hydroxyles mésomères donneurs. Ainsi à pH physiologique, la proportion de la forme acide de l'acide borinique **41** étant très faible (1% environ), la réaction avec le peroxyde d'hydrogène est a priori défavorisée. Pour l'acide boronique **42** à pH physiologique, la moitié est sous forme acide susceptible de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (**Schéma 72**).

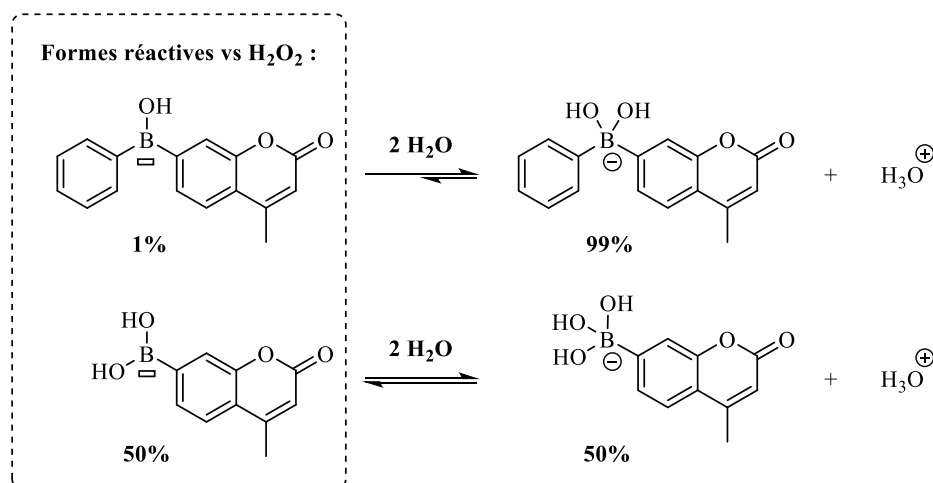


Schéma 72 : Proportions relatives des deux formes acido-basiques de l'acide borinique **41** et de l'acide boronique **42** à pH = 7,4

ii. *Mesure de l'intensité de fluorescence et détermination des constantes cinétiques*

Comme l'acide boronique **42** est l'un des produits d'oxydation de l'acide borinique **41** par le peroxyde d'hydrogène, et que son oxydation par H_2O_2 conduit uniquement à la libération de la 4-MU et de l'acide borique, un premier modèle cinétique a été établi pour son oxydation (**Schéma 73**).

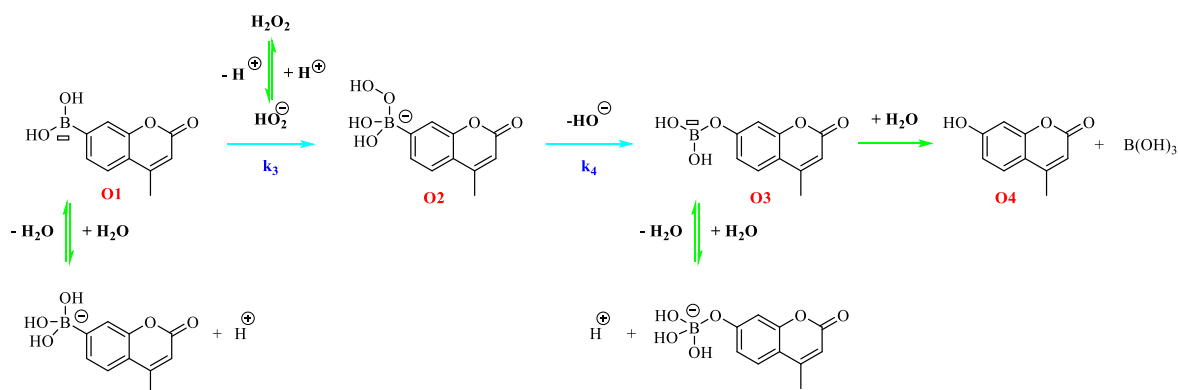


Schéma 73 : Mécanisme général d'oxydation par le H_2O_2 de l'acide borinique **64**

Les flèches bleues sont associées aux étapes lentes et les flèches vertes sont associées aux étapes rapides

Le mécanisme d'oxydation de l'acide boronique **42** est composé de trois étapes : *i*) l'addition nucléophile de l'ion peroxydate, la base conjuguée du peroxyde d'hydrogène, sur la lacune de l'acide boronique **42** (**O1**), *ii*) la migration du groupement carboné, ici la 4-méthylcoumarine pour former le borate (**O3**), et enfin, *iii*) la formation par hydrolyse de la 4-MU (**O4**) et de l'acide borique.

Les réactions acido-basiques (formation de l'ion peroxydate et équilibre entre les formes acide et basique de l'acide boronique **42**) et l'hydrolyse du borate **O3** sont très rapides à l'échelle des mesures.^{163,164} Il est donc possible de réduire le mécanisme d'oxydation de l'acide boronique **42** (**O1**), à deux étapes successives correspondant à l'attaque nucléophile de l'ion peroxydate, et à la formation du borate (**O3**) (**Schéma 74**). La vitesse de formation de la 4-MU (**O4**) peut être calculée à partir d'une équation de vitesse biexponentielle avec des constantes de vitesse k_3 et k_4 correspondantes aux constantes des deux étapes (voir Experimental Section : 3.1.1 Theoretical model, Eq (7)).

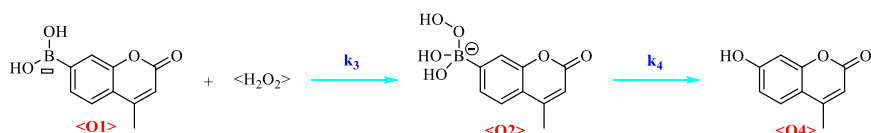


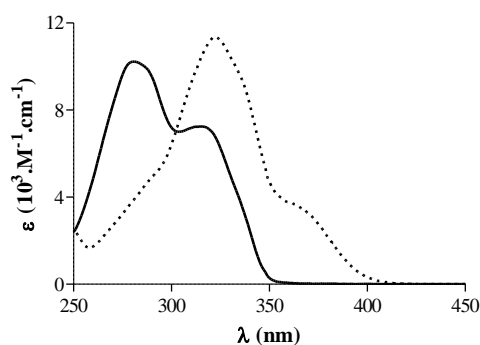
Schéma 74 : Mécanisme réduit d'oxydation par le H_2O_2 de l'acide borinique **42**

Les flèches bleues sont associées aux étapes lentes

¹⁶³ La constante de vitesse associée à la réaction entre l'acide borique et l'anion hydroxyle est d'environ $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Voir G. Waton, P. Mallo, S. J. Candau, *J. Phys. Chem.* **1984**, 3301-3305.

¹⁶⁴ H. Steinberg, D. L. Hunter, *Ind. Eng. Chem. Res* **1957**, 49, 174-181.

Expérimentalement, l'acide boronique **42** est dissous dans du tampon PBS 1X (pH =7,4, avec 0,2% de DMSO, en volume) à 5 μM . À ce pH, une lecture de l'intensité de fluorescence à $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ après une excitation à $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, correspondra uniquement à la fluorescence émise par la 4-MU libérée après oxydation de l'acide boronique **42** en présence de H_2O_2 car le composé **42** n'absorbe pas à cette longueur d'onde (**Figure 43**).



*Figure 43 : Spectre d'absorption de l'acide boronique **42** (trait plein) et de la 4-MU (pointillés)
Tampon PBS 1X à 25°C*

Dans ces conditions, deux séries de mesures de l'intensité de fluorescence d'une solution de l'acide boronique **42**, à 25°C et 37°C en présence de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (1 mM, 500 μM , 100 μM) ont été effectuées. L'intensité de fluorescence a été enregistrée à une fréquence de dix fois par seconde pendant 30 minutes à 8 heures en fonction de la concentration de H_2O_2 utilisée (**Figure 44**).

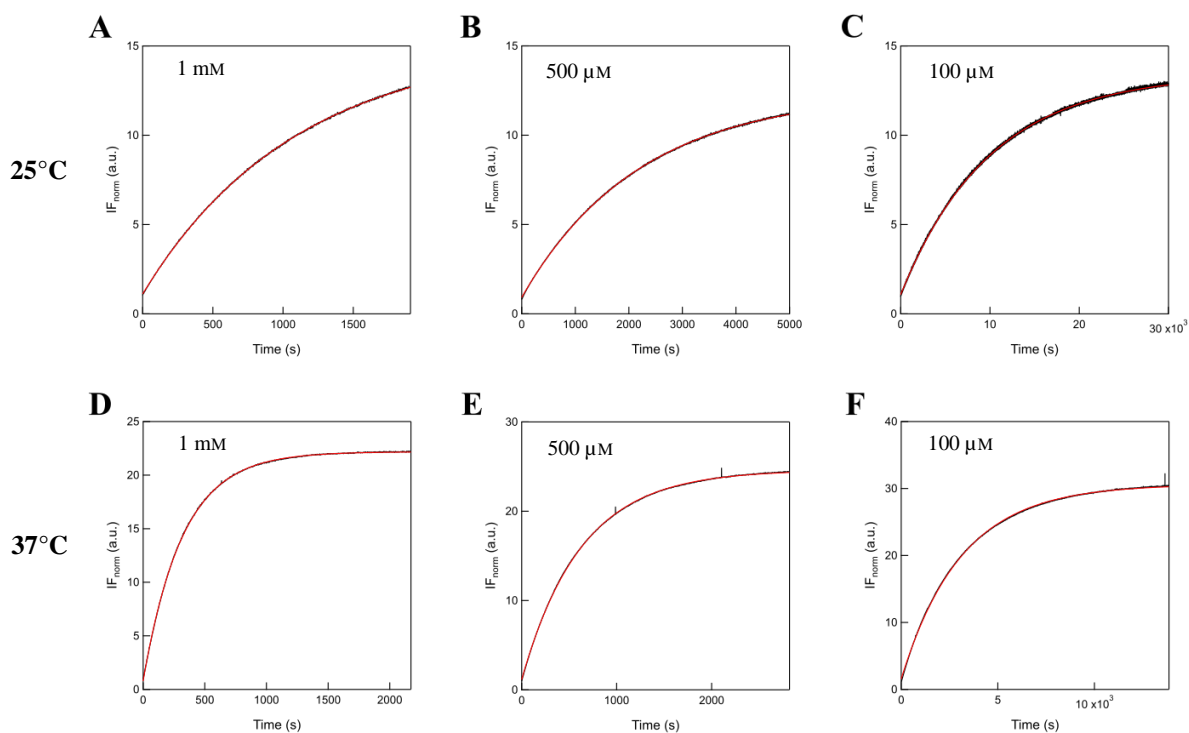


Figure 44 : Evolution temporelle de l'émission de fluorescence d'une solution de l'acide boronique **42** à $5.0 \mu\text{M}$ après addition de H_2O_2 à différentes concentrations à 25°C (A: 1 mM ; B: $500 \mu\text{M}$; C: $100 \mu\text{M}$) et 37°C (D: 1 mM ; E: $500 \mu\text{M}$; F: $100 \mu\text{M}$) à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$

Données brutes (trait noir) modélisation (trait rouge). Dans du tampon PBS IX ($\text{pH} = 7,4$)

À l'aide du logiciel *Igor 6.37*, il a été possible de faire correspondre les courbes expérimentales avec une équation de vitesse monoexponentielle (voir Experimental Section : 3.1.2 Experimental results, Eqs (10,11)). Des constantes de vitesse de pseudo-ordre 1 ont été obtenues pour chacune des conditions utilisées et reportées dans le graphique de la **Figure 45** en fonction de la concentration en H_2O_2 . Une évolution linéaire est observée. Aussi une régression linéaire a permis de déterminer la constante k_3 . Des constantes de vitesse d'oxydation de l'acide boronique **42** respectivement $k_3 = 1.85 \pm 0.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et de $k_3 = 6.26 \pm 0.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C ont ainsi été obtenues. Ces valeurs correspondent à celles rapportées dans littérature pour l'acide dérivé de la 4-méthylcoumarine.¹⁶⁵

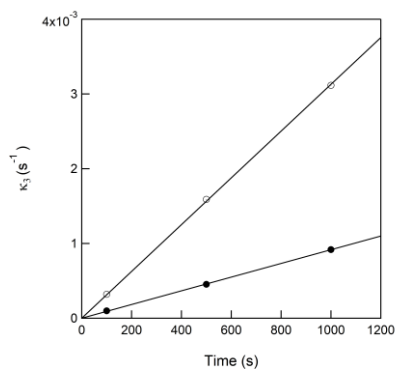


Figure 45 : Valeurs des constantes de vitesse d'oxydation de pseudo-ordre 1 en fonction de la concentration en H_2O_2 pour **42** Avec $T = 25^\circ\text{C}$ (ronds) ou 37°C (cercles). Dans du tampon PBS IX ($\text{pH} = 7,4$)

¹⁶⁵ J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 14210-14216. ($k = 1.5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Une fois ces constantes de vitesse obtenues, il a été possible de s'intéresser à celles relatives à l'oxydation de l'acide borinique **41**. Le modèle cinétique est beaucoup plus complexe car deux réarrangements oxydatifs peuvent se produire (**Schéma 75**).

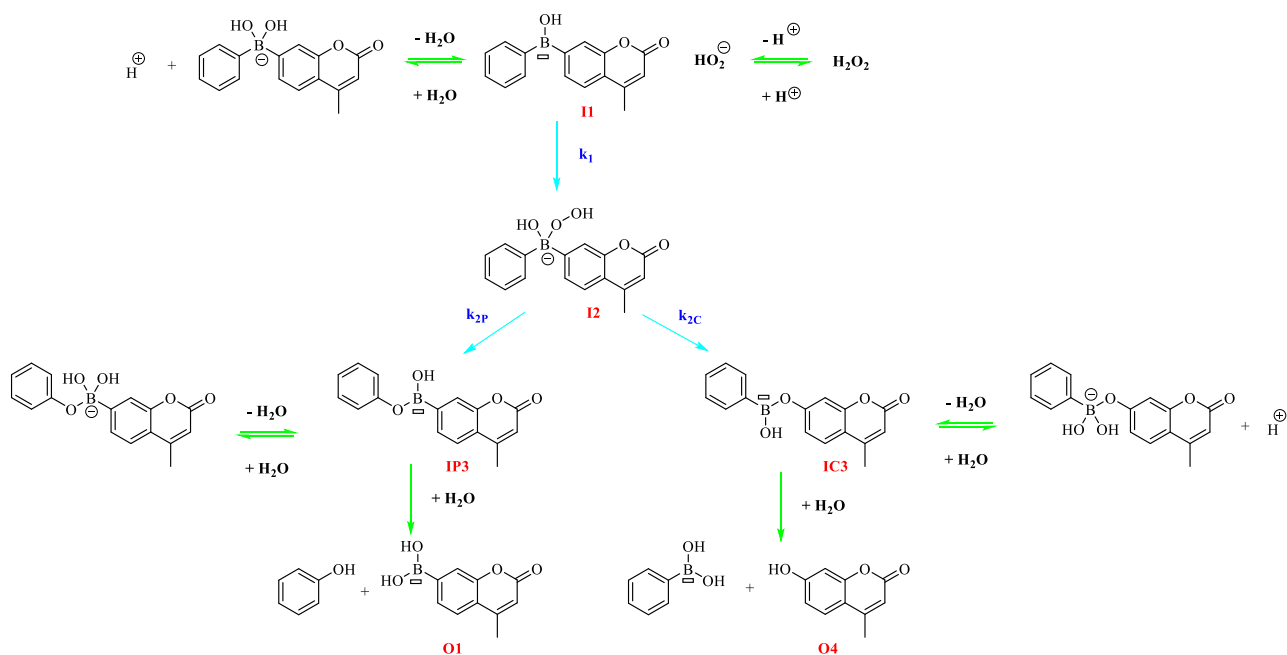


Schéma 75 : Mécanisme général d'oxydation par le H_2O_2 de l'acide borinique **41**

Les flèches bleues sont associées aux étapes lentes et les flèches vertes sont associées aux étapes rapides

Pour les mêmes raisons évoquées pour l'acide boronique **42**, certaines étapes sont très rapides par rapport aux autres, aussi il est possible de réduire ce mécanisme à l'addition de l'ion peroxydate pour former (**I2**) puis à de la migration d'un groupement aryle, soit le phényle (**IP3**) soit la 4-méthylcoumarine (**IC3**). Dans le premier cas le phénol et l'acide boronique **42** (**O1**) sont formés. Dans l'autre, c'est la **4-MU** et l'acide phénylboronique qui sont formés (**Schéma 76**).

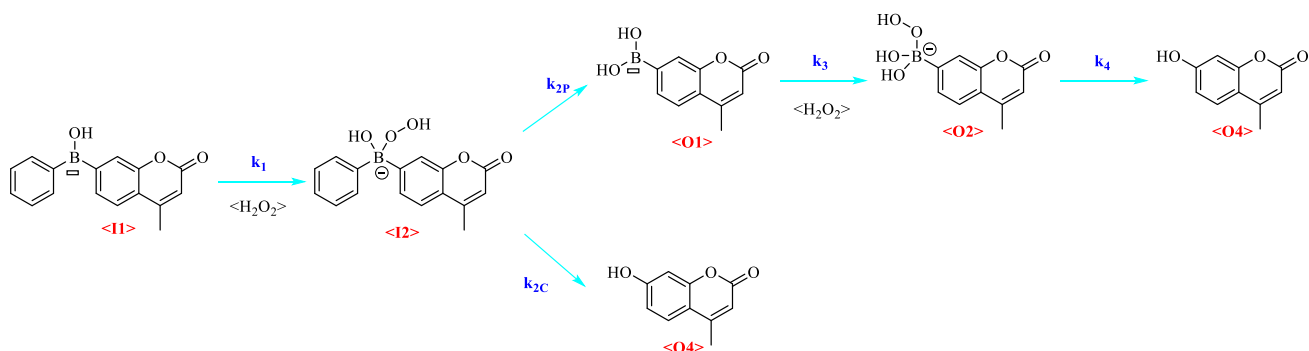


Schéma 76 : Mécanisme réduit d'oxydation par le H_2O_2 de l'acide borinique **41**

Les flèches bleues sont associées aux étapes lentes

La vitesse de formation de la 4-MU (**O4**) peut être calculée à partir d'une équation de vitesse tétraexponentielle avec des constantes de vitesse k_1 , k_{2P} , k_{2C} , k_3 et k_4 correspondant aux constantes des cinq étapes (voir Experimental Section : 3.2.1 Theoretical model, Eq (22)). Comme précédemment l'intensité de fluorescence a été mesurée à $\lambda_{em} = 450$ nm après une

excitation à $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, aussi la mesure correspondra uniquement à la 4-MU libérée après oxydation de l'acide borinique **41** ou de l'acide boronique **42** (Figure 46).

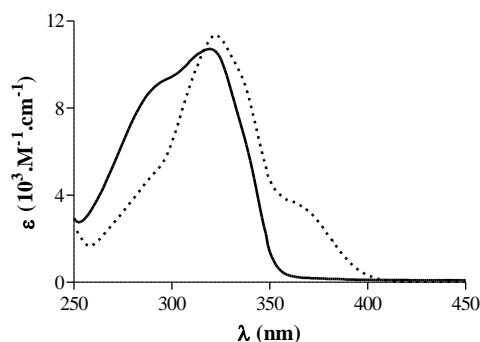


Figure 46: Spectre d'absorption de l'acide borinique **41** (trait plein) et de la 4-MU (pointillés) Tampon, PBS IX à 25°C

Dans ces conditions, deux séries de mesures de l'intensité de fluorescence de l'acide borinique **41**, à 25°C et 37°C en présence de différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (1 mM, 500 μM , 100 μM) ont été réalisées (Figure 47).

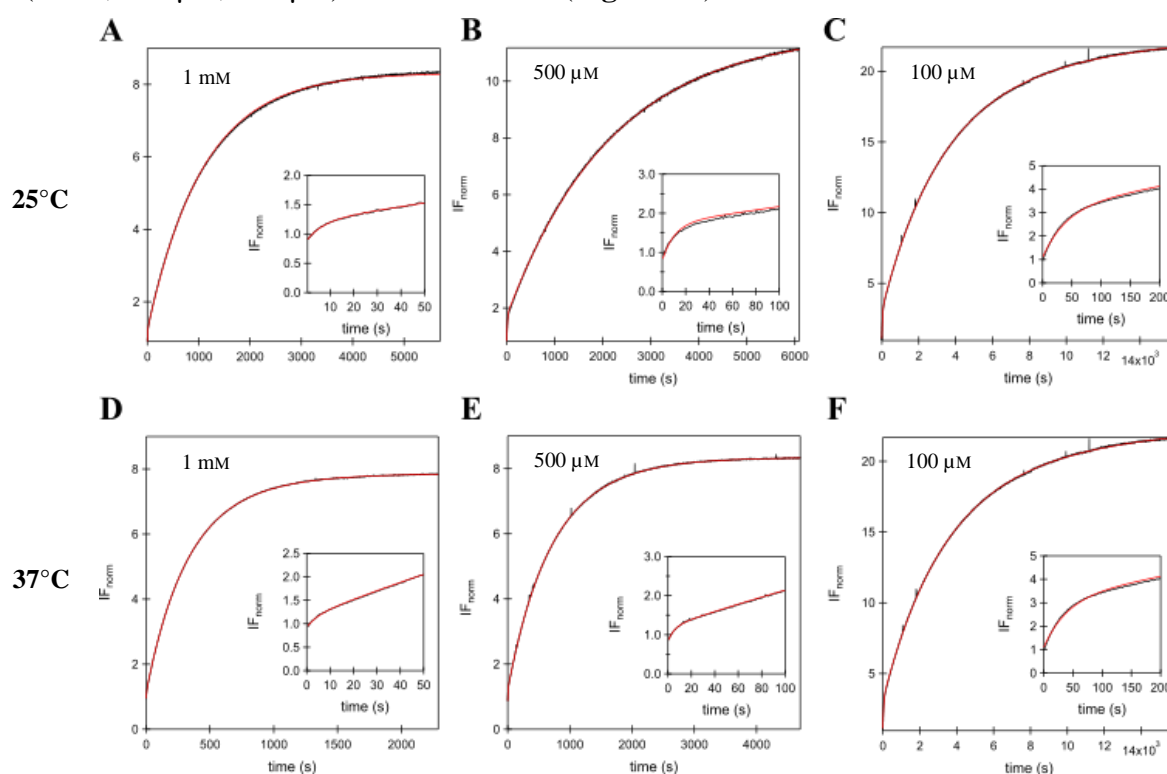
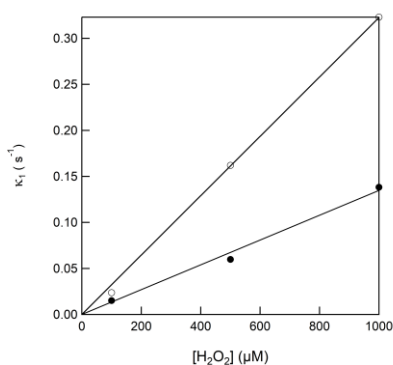


Figure 47: Evolution temporelle de l'émission de fluorescence d'une solution de l'acide borinique **41** à 5.0 μM après addition de H_2O_2 à différentes concentrations à 25°C (A: 1 mM; B: 500 μM ; C: 100 μM) et 37°C (D: 1 mM; E: 500 μM ; F: 100 μM) à $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$

Données brutes (trait noir) modélisation (trait rouge). Dans du tampon PBS IX (pH = 7,4)

Sur ces courbes, l'intensité de fluorescence d'une solution de l'acide borinique **41** évolue selon deux phases: une très rapide (de quelques dizaines à la centaine de secondes) et une autre plus lente (de quelques dizaines de minutes à quelques heures). À l'aide du logiciel *Igor 6.37*, il a été possible de faire correspondre les courbes expérimentales avec une équation de vitesse

biexponentielle (voir Experimental Section : 3.2.2 Experimental results, Eq (22) et Eqs (32)) et deux constantes de vitesse ont pu être déterminées : une rapide correspondant à l'oxydation de l'acide borinique et la seconde plus lente correspondant à l'oxydation de l'acide boronique **42**. Ainsi, pour chacune des conditions utilisées la constante de vitesse correspondant à l'étape rapide a pu être calculée (A à F sur la **Figure 47**). Une évolution linéaire en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène est observée. Il a donc été possible grâce à une régression linéaire d'extraire la constante k_1 (**Figure 48**). Des constantes cinétiques $k_1 = (1.94 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C et $k_1 = (4.17 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37°C ont ainsi été obtenues.



*Figure 48: Valeurs des constantes de vitesse de pseudo-ordre 1 en fonction de la concentration en H₂O₂ pour **41**
Avec T = 25°C (ronds) ou 37°C (cercles). Dans du tampon PBS 1X (pH = 7,4)*

La constante de vitesse d'oxydation de l'acide borinique **41** est donc environ 10000 fois plus grande que celle de l'acide boronique **42**. Cette étude cinétique confirme donc la tendance observée lors des résultats préliminaires obtenus par spectroscopie en RMN du proton.

La constante de vitesse relative à l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène de l'acide borinique **41** a pu être déterminée et comparée à celle de l'acide boronique **42**. Ces résultats renforcent l'hypothèse émise lors de la conception initiale du projet, à savoir que les amorces boriniques seraient plus réactives vis-à-vis du H₂O₂ que les amorces acides boroniques, à cause de la nature chimique de ces structures. Compte-tenu de sa forte réactivité, la sonde fluorogénique **41** a été évaluée pour son aptitude à détecter le peroxyde d'hydrogène produit en milieu cellulaire.

d) *Tests de sélectivité des acides boriniques 41 et 42 vis-à-vis d'autres FRO*

En milieu physiologique plusieurs formes réactives de l'oxygène (FRO) peuvent coexister ou être formées de manière concomitante. Aussi, la sélectivité de l'amorce d'une sonde fluorogénique est primordiale. Une amorce idéale doit réagir uniquement avec l'analyte ciblé.

Nous avons donc entrepris une étude afin d'examiner la sélectivité relative de la sonde à base d'amorce borinique par rapport à celle à base d'amorce boronique en présence de plusieurs FRO générées dans différentes conditions.

i. *Étude de la sélectivité sous conditions classiques*

Dans la littérature, les différentes FRO sont générées soit par dissolution d'un sel ou dilution d'une solution, soit par réaction entre différentes espèces. Le principal défaut de cette méthode réside dans la difficulté à accéder à une détermination exacte des concentrations des FRO qui dépendent de la stabilité de ces espèces.

Dans un premier temps, les conditions reportées dans la littérature pour engendrer les différentes FRO ont été reproduites. Ainsi la solution de peroxyde d'hydrogène a été obtenue par dissolution de H₂O₂ complexé sur de l'urée. La solution d'anion superoxyde a été obtenue par dilution d'une solution de KO₂ obtenue en présence d'éther 18-couronne-6. La solution d'hydroperoxyde de *tert*-butyle (TBHP) a été obtenue par dissolution d'une solution commerciale titrée à 70%. Enfin les solutions de radical hydroxyle et de radical de *tert*-butoxyle ont été obtenues par la réaction de Fenton en présence d'ion fer (II) et de respectivement H₂O₂ et TBHP (**Schéma 77**).



Schéma 77 : Réaction de Fenton pour le H₂O₂ ou le TBHP

La sonde dissymétrique **41** et l'acide borinique **42** dissous dans du tampon PBS 1X (pH = 7.4, avec 0.2% de DMSO en volume) à 5 µM ont été mis en présence des 20 équivalents (soit 100 µM) des différentes FRO. L'intensité de fluorescence a été mesurée en fonction du temps à λ_{em} = 450 nm (λ_{ex} = 360 nm) à 25°C (**Figure 49**).

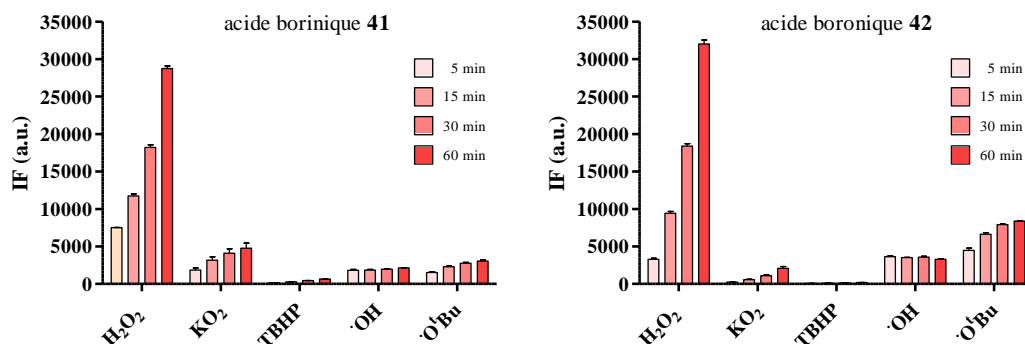


Figure 49 : Sélectivité de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42 en présence de différentes formes réactives de l'oxygène.

Intensité de fluorescence d'une solution d'acide borinique 41 ou d'acide borinique 42 (5 μM) en présence de divers FRO (100 μM) dans du tampon PBS 1X (pH 7.4) à 25°C. Les barres représentent l'intensité de fluorescence à 5, 15, 30 et 60 minutes après addition de chaque FRO.

Les intensités de fluorescence sont enregistrées à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

Les histogrammes obtenus montrent que les deux espèces testées possèdent plus ou moins la même sélectivité : elles sont plus réactives vis-à-vis du H_2O_2 que les autres FRO. Il est important de noter que la sélectivité obtenue pour l'acide borinique 42 est en accord avec celle des amorces boronates précédemment décrites.⁶⁶

Cependant, la fluorescence observée à des temps longs dans le cas du composé 41 devrait correspondre en partie au signal issu de l'oxydation de l'acide borinique 42 intermédiairement formé, car celui-ci est le produit majoritaire de la réaction d'oxydation. Afin d'estimer la sélectivité du motif borinique du composé 41 il faut donc regarder les valeurs d'intensité de la fluorescence à des temps plus courts (Figure 50).

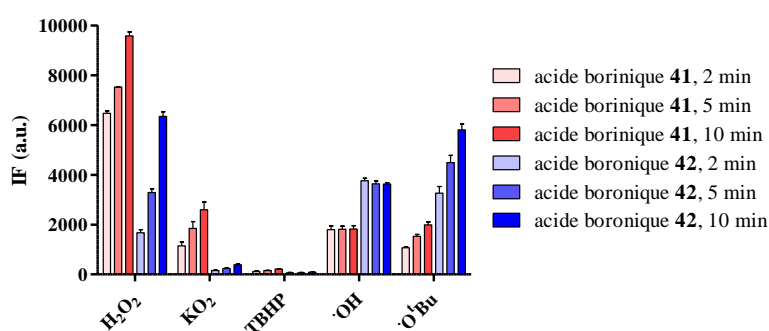


Figure 50 : Sélectivité de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42 en présence de différentes formes réactives de l'oxygène.

Intensité de fluorescence d'une solution d'acide borinique 41 ou d'acide borinique 42 (5 μM) en présence de divers FRO (100 μM) dans du tampon PBS 1X (pH 7.4) à 25°C. Les barres représentent l'intensité de fluorescence à 2, 5 et 10 minutes après addition de chaque FRO.

Les intensités de fluorescence sont enregistrées à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

Ces mesures révèlent des différences significatives entre l'acide borinique 41 (en rouge) et l'acide borinique 42 (en bleu) avec une intensité de fluorescence accrue pour l'acide borinique 41 vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Globalement, le motif borinique semble donc être aussi sélectif vis-à-vis du H_2O_2 .

Par ailleurs, les acides **41** et **42**, ont été mis en présence d'une solution d'hypochlorite. Une forte augmentation de la fluorescence a été observée pour ces deux composés. Ces résultats contradictoires avec ceux de la littérature, devront être confirmés.^{60, 66}

ii. Étude de sélectivité sous rayonnement gamma γ

Afin d'engendrer avec une meilleure précision la quantité de FRO utilisée lors d'un test, il a été envisagé de former *in situ* certaines FRO grâce à la radiolyse de l'eau induite par un rayonnement gamma γ . Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr. Marie Erard à l'Institut de Chimie-Physique (ICP) de l'Université Paris-Saclay.

Pour effectuer la radiolyse de l'eau, la source de rayonnement gamma utilisée est la source ^{60}Co (1.17-1.33 MeV) disponible à l'ICP. L'interaction de ce type de rayonnement hautement énergétique avec une molécule d'eau conduit à son ionisation et à l'éjection simultanée d'un électron (**Schéma 78**). La formation de l'ion $\text{H}_2\text{O}^{*\cdot+}$ est un processus extrêmement rapide qui a lieu en 10^{-16} seconde (la durée d'une transition électronique).¹⁶⁶

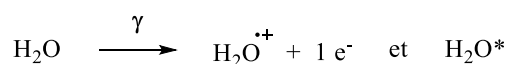


Schéma 78: Radiolyse de l'eau par un rayonnement gamma

La formation de ce radical est suivie d'une série de réactions détaillées dans le **Schéma 79**. Les différents produits sont formés puis diffusent dans l'ensemble de la solution en 10^{-7} s. Autrement dit les cinétiques de formation des FRO par rayonnement γ n'interviendront pas dans les cinétiques étudiées (bien plus lentes).

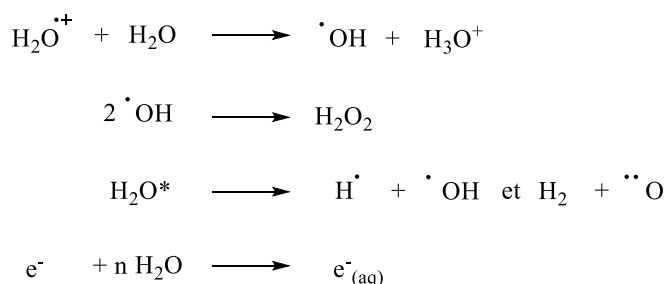


Schéma 79 : Différentes transformations concomitantes à la formation du radical $\text{H}_2\text{O}^{\cdot+}$*

Globalement, la radiolyse de l'eau par un rayonnement γ conduit à la formation d'électrons solvatés ($\text{e}^-_{(\text{aq})}$), de radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), de dihydrogène (H_2), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'ions oxonium (H_3O^+). On définit G comme le rendement chimique de radiation (en

¹⁶⁶ R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine: Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*, Oxford University Press, **1993**.

$\mu\text{mol}\cdot\text{J}^{-1}$). Le rendement des différents produits de radiolyse de l'eau est résumé dans **Schéma 80**.

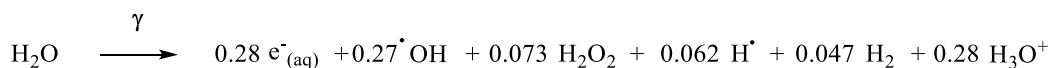


Schéma 80 : Rendement chimique de radiation de la radiolyse de l'eau

En fonction des conditions opératoires il est possible d'obtenir sélectivement une FRO plutôt qu'une autre. Par exemple, lorsque le milieu aqueux est saturé par du protoxyde d'azote, le radical hydroxyle est obtenu avec un rendement de 0.55 G (**Schéma 81, A**). En présence d'ions formiate dans un milieu saturé en dioxygène, c'est l'anion superoxyde qui est formé sélectivement avec le même rendement de 0.55 G (**Schéma 81, B**).

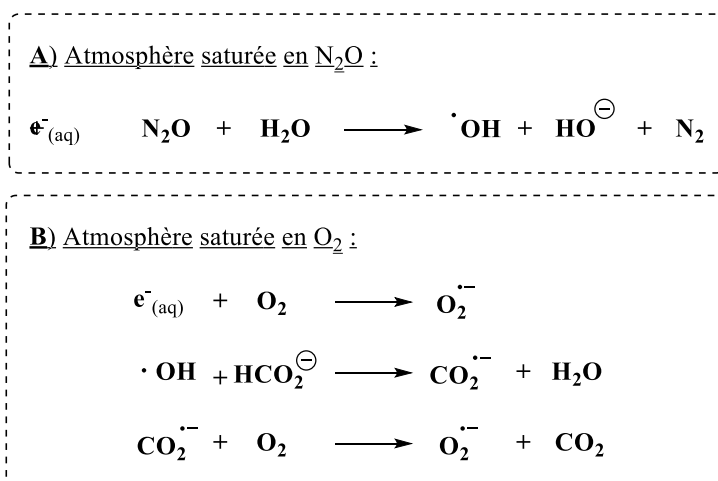


Schéma 81 : Différentes espèces formées par radiolyse de l'eau en fonction de l'atmosphère

À l'air, donc en présence d'oxygène et sans piègeur de radicaux spécifique, le radical hydroxyle et l'anion superoxyde sont tous les deux produits avec un rendement respectif de 0.28 et 0.31 G.¹⁶⁷

Comme la dose reçue par l'échantillon dépend de sa position par rapport à la source, une courbe de dosimétrie a été réalisée avec une solution de Fricke (solution acide de sulfate de fer FeSO_4), pour déterminer l'emplacement permettant de recevoir une dose donnée. Deux séries de mesures ont été effectuées, une irradiation rapide (10 minutes) et une plus lente (30 minutes) avec une dose de rayonnement délivrée identique. Ainsi les mêmes quantités d'anion superoxyde et de radical seraient produites et devraient correspondre à 20 équivalents par rapport au sondes (soit une concentration de 100 μM) lors des deux mesures.

Expérimentalement, l'acide borinique **41** et l'acide boronique **42** sont dissous dans du tampon PBS 1X (pH = 7,4, avec 0,2% de DMSO, en volume) à 5 μM ; la solution n'est pas

¹⁶⁷ O. Mozziconacci, J. Mirkowski, F. Rusconi, P. Pernot, K. Bobrowski, C. Houée-Levin, *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 229-240.

dégazée (conditions sous atmosphère d'air). Après irradiation, l'intensité de fluorescence des solutions est mesurée de la même manière que pour les tests de sélectivité, à l'aide d'un lecteur de plaque à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$) et à 25°C (**Figure 51**).

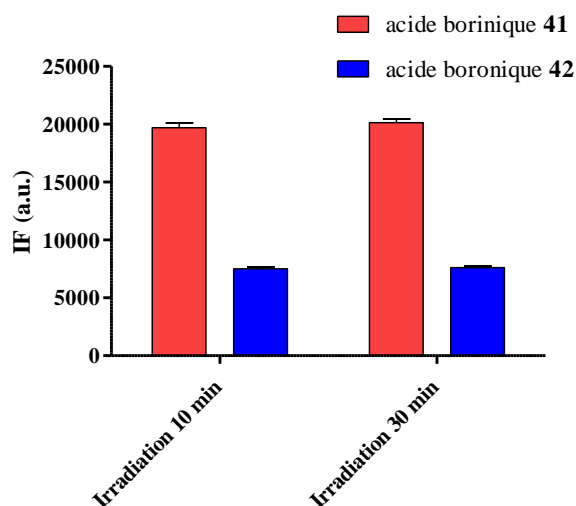


Figure 51: Mesure de l'intensité de fluorescence de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42 de formes réactives de l'oxygène obtenues par radiolyse de l'eau

Intensité de fluorescence de l'acide borinique 41 ou de l'acide borinique 42 ($5 \mu\text{M}$) en présence de diverses FRO ($100 \mu\text{M}$) dans du tampon PBS IX (pH 7.4) à 25°C . Les intensités de fluorescence sont enregistrées à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

Les valeurs mesurées pour 10 minutes ou 30 minutes d'irradiation sont équivalentes, ce qui est cohérent avec le fait que la même quantité de FRO est formée ($100 \mu\text{M}$). L'acide borinique **41** semble être plus réactif que l'acide borinique **42** vis-à-vis des produits de la radiolyse de l'eau. Cependant, ces valeurs sont à nuancer car dans ces conditions opératoires environ 0.07 G de peroxyde d'hydrogène sont formés (**Schéma 80**). Or d'après les résultats obtenus pour l'étude de la sélectivité selon les conditions reportées de la littérature, l'essentiel de l'intensité de fluorescence mesurée pour les solutions de l'acide borinique **41** et de l'acide borinique **42** pourrait correspondre à leur réponse vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences complémentaires ont été effectuées en présence de catalase, l'enzyme permettant la dismutation du peroxyde d'hydrogène, et qui permettrait de décomposer le H_2O_2 formé par radiolyse de l'eau. Les concentrations de catalase utilisées ont été relativement élevées ($0,5$ à $2,0 \mu\text{M}$) pour palier à l'éventuelle dégradation de l'activité enzymatique de la catalase sous rayonnement gamma (**Figure 52**).

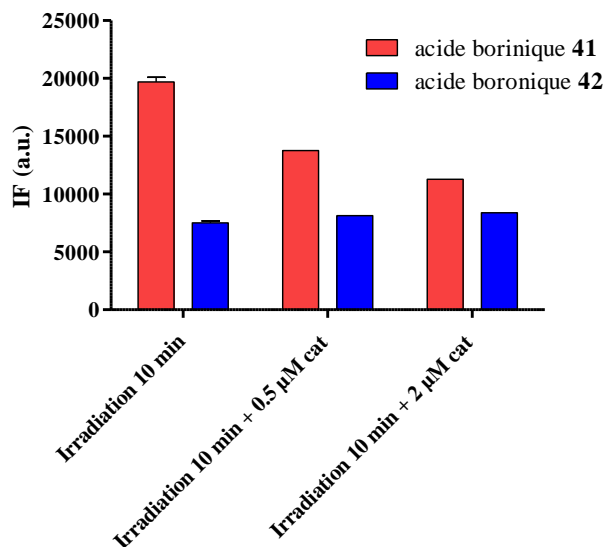


Figure 52 : Mesure de l'intensité de fluorescence de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42 en présence de formes réactives de l'oxygène obtenues par radiolyse de l'eau en présence de catalase
Intensité de fluorescence de l'acide borinique 41 ou de l'acide borinique 42 (5 μM) en présence de diverses FRO (100 μM) dans du tampon PBS 1X (pH 7.4) à 25°C. Les intensités de fluorescence sont enregistrées à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

L'utilisation de la catalase a eu pour effet de diminuer l'intensité de fluorescence mesurée pour l'acide borinique **41**. En revanche, presque aucun effet n'a été observé pour les mesures relatives à l'acide borinique **42**. Des mesures d'intensité de fluorescence après irradiation avec des rayonnements gamma de solution sous atmosphère soit de $\text{N}_2\text{O}_{(g)}$ et $\text{O}_2_{(g)}$ sont encore en cours d'optimisation.

Bien qu'il ne soit pas possible de conclure sur la sélectivité des composés **41** et **42** à partir des résultats obtenus grâce aux expériences réalisés sous rayonnement γ , ces résultats préliminaires vont dans le même sens que ceux déjà obtenus précédemment. Même si ces manipulations sont plus complexes à mettre en œuvre, elles devraient à terme s'avérer beaucoup plus précises et donc plus fiables que le type de manipulations actuellement décrites dans la littérature.

e) Évaluation des sondes 41 et 42 in cellula

Les sondes fluorogéniques permettant la détection de la production endogène de peroxyde d'hydrogène sont habituellement évaluées sur ces deux types de modèles cellulaires : les cellules cancéreuses ou les macrophages.

Les cellules cancéreuses humaines ont l'avantage d'être très accessibles, grâce à leur capacité de division infinie. Parmi celles-ci, les lignées cellulaires HeLa et A431 sont les plus utilisées dans ce type d'études. Pour former du peroxyde d'hydrogène, les cellules Hela peuvent

être stimulées soit par le lipopolysaccharide (LPS) soit du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Les cellules A431 peuvent quant à elle être stimulées par l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) qui active la NADPH oxydase (Nox) de ces cellules générant l'anion superoxyde qui se dismute spontanément en peroxyde d'hydrogène.

Les macrophages sont quant à eux des cellules du système immunitaire responsables de la destruction d'agents pathogènes. L'élimination de l'agent pathogène se produit grâce à l'action du peroxyde d'hydrogène produit à l'intérieur des macrophages. Ces cellules sont capables d'accumuler une forte concentration de H₂O₂. En présence de PMA, ces cellules se mettent à produire de l'anion superoxyde qui se dismute spontanément en peroxyde d'hydrogène.

Tous ces modèles cellulaires nécessitent un certain temps d'activation, pour que les machineries cellulaires enclenchent la production directe ou indirecte de peroxyde d'hydrogène. Pour s'affranchir de ce temps d'activation et pouvoir à nouveau comparer uniquement les cinétiques d'activation d'une sonde avec une amorce acide boronique ou une amorce acide borinique, il a été envisagé d'utiliser un modèle cellulaire produisant en continu de l'anion superoxyde et donc indirectement du peroxyde d'hydrogène. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr. Marie Erard à l'ICP.

iii. Modèle cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé repose sur la reconstitution synchronisée du complexe multi-protéique constitutif de la NADPH oxydase : pour cela, des cellules COS7^{gp91-p22}, exprimant de façon stable les deux sous-unités membranaires de la NADPH oxydase sont transfectées par un plasmide exprimant une protéine chimérique composée de tous les domaines nécessaires à l'activation du complexe protéique membranaire de la NADPH oxydase (voir Experimental Section : V. Cellular assays).¹⁶⁸ Dès que les cellules COS7^{gp91-p22} sont transfectées, elles se mettent à produire de l'anion superoxyde en continu qui se dismute au fur à mesure en peroxyde d'hydrogène. Les sondes **41** et **42** ont donc été évaluées sur ces modèles cellulaires en les incubant un jour après la transfection. L'intensité de fluorescence de ces échantillons en présence de 10 µM de l'acide borinique **41** ou de l'acide boronique **42** est mesurée en continu à $\lambda_{em} = 450$ nm ($\lambda_{ex} = 405$ nm, pH = 7.4 dans du tampon PBS, avec 0,02% de DMSO en volume) sur un lecteur de plaque avec une mesure par minute pendant 45 minutes. Les mesures ont été effectuées en triplicata puis les valeurs obtenues moyennées (**Figure 53**). Des contrôles négatifs ont été

¹⁶⁸ R. Masoud, X. Serfaty, M. Erard, P. Machillot, G. Karimi, E. Hudik, F. Wien, L. Baciou, C. Houée-Levin, T. Bizouarn, *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113*, 470-477.

réalisés dans des cellules COS7^{gp91-p22} non transfectées, autrement dit dans des cellules n'ayant pas d'activité NADPH oxydase.

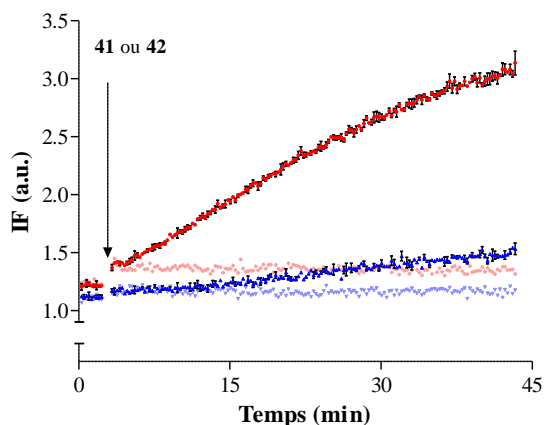


Figure 53 : Evolution temporelle de l'émission de fluorescence à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$) d'une solution de l'acide borinique **41** et d'acide boronique **42** à $10 \mu\text{M}$ in cellula

$10 \mu\text{M}$ d'acide borinique **41** (courbe rouge) et $10 \mu\text{M}$ d'acide boronique **42** (courbe bleue) dans des cellules COS7^{gp91/p22} transfectées. Contrôles négatifs réalisées dans des cellules COS7^{gp91/p22} non-transfectées pour l'acide borinique **41** (courbe rouge clair) et l'acide boronique **42** (courbe bleu clair). Mesures réalisées dans du tampon PBS IX (pH 7.4, 0.02% DMSO) à 37°C.

Dans ces conditions, et en comparant avec les contrôles négatifs dans lesquels les cellules ne produisent pas de peroxyde d'hydrogène, une augmentation de fluorescence est visible dès les premières minutes de l'expérience pour l'acide borinique **41** traduisant une cinétique de libération de la 4-MU plus rapide pour l'amorce acide borinique que pour l'amorce acide boronique.

Par ailleurs, un ratio de vitesse de 10 a été calculé entre les pentes des courbes des intensités de fluorescence relatives aux solutions de l'acide borinique **41** et de l'acide boronique **42**. Selon le modèle cinétique défini et tenant compte de la régiosélectivité de la réaction d'oxydation de l'acide borinique **41** déterminée par RMN du proton (ratio arrondi à 80:20) pour l'acide borinique **41**, il a été possible de calculer un ratio de vitesse théorique de 16 (pour le détail du calcul voir SI : 3.2.3 Kinetic analysis of the cell experiments). Cette valeur est du même ordre de grandeur que la valeur expérimentale. Ce rapport est toutefois inférieur à celui trouvé expérimentalement lors de notre étude cinétique qui révélait que l'acide borinique était 10 000 fois plus réactif que son analogue boronique. Ce résultat s'explique par la différence de pKa entre les deux espèces.

Il est également important de souligner, que pour tests *in cellula*, la concentration de peroxyde d'hydrogène est plus faible que la concentration des sondes fluorogéniques contrairement aux études cinétiques réalisées précédemment. En effet, les COS7^{gp91-p22} transfectées produiraient environ $19.4 \pm 1.1 \text{ nmol}$ d'anion superoxyde pour 10^7 cellules par minutes.¹⁶⁸ Dans les conditions utilisées, entre 10 et 100 nmol d'anion superoxyde seraient produites. Néanmoins, pour estimer la quantité d'anion superoxyde produite par les COS7^{gp91-p22}

et donc celle du peroxyde d'hydrogène ayant réagi avec les sondes fluorogéniques, il faudrait maintenant faire une courbe de calibration de la 4-MU pour connaître la proportion de l'acide borinique **41** ayant réagi avec le peroxyde d'hydrogène.

Afin de vérifier la sélectivité de la sonde fluorogénique **41** *in cellula*, les mêmes expériences ont été réalisées en ajoutant soit du chlorure de diphénylèneiodonium (DPI), un inhibiteur de la NADPH oxydase, soit de la catalase, une enzyme catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène. Dans les deux cas, aucune augmentation de fluorescence n'est observée après l'additions de ces entités. Ces résultats semblent donc confirmer que la sonde borinique **41** est bien sélective du peroxyde d'hydrogène (**Figure 54**).

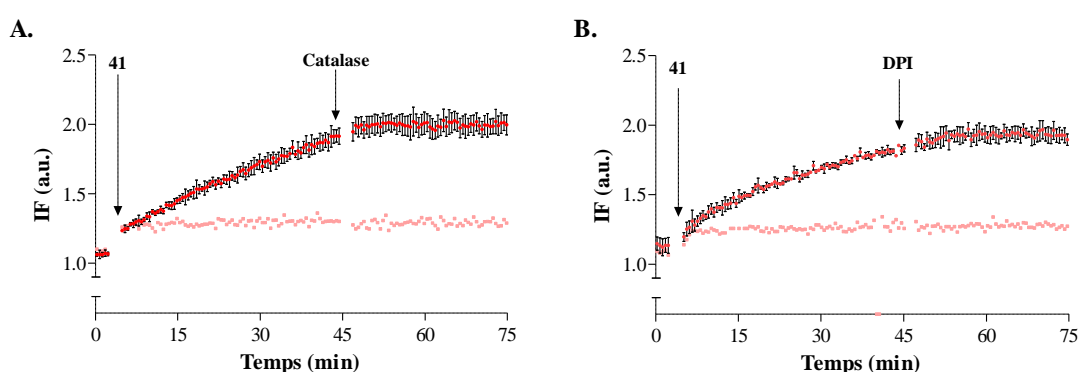


Figure 54 : Evolution temporelle de l'émission de fluorescence à $\lambda_{em}= 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{exc}= 360 \text{ nm}$) d'une solution d'acide borinique **41** à $10 \mu\text{M}$ *in cellula*

$10 \mu\text{M}$ d'acide borinique **41** dans des cellules $\text{COS7}^{gp91/p22}$ transfectées puis ajout de catalase (courbe rouge, A) ou de DPI (courbe rouge B) 40 minutes après l'ajout de **41**. Contrôles négatifs réalisées dans des cellules $\text{COS7}^{gp91/p22}$ non-transfectées pour l'acide borinique **41** (courbe rouge clair A et B) Mesures réalisées dans du tampon PBS 1X (pH 7.4, 0.02% DMSO) à 37°C .

Ces expériences complémentaires montrent également que l'acide borinique **41** peut être un outil de détection efficace pour le peroxyde d'hydrogène produit de manière endogène par les cellules $\text{COS7}^{gp91-p22}$ transfectées. À notre connaissance il s'agit du premier exemple d'utilisation d'une amorce acide borinique pour la détection de peroxyde d'hydrogène *in cellula*.

Dans ce chapitre, il a été démontré que les acides boriniques réagissaient bien plus rapidement que les acides boroniques vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Grâce aux sondes fluorogéniques **41** et **42** basées respectivement sur une amorce borinique ou boronique, il a été possible de déterminer les valeurs des constantes de vitesse associées à ces réactions d'oxydation. La sélectivité vis-à-vis d'autres FRO des sondes **41** et **42** a ensuite été évaluée. L'acide borinique **41** s'est avérée posséder la même sélectivité que l'acide boronique **42**. Enfin une étude préliminaire *in cellula* utilisant des cellules $\text{COS7}^{gp91-p22}$ a montré que la sonde **41** permettait de détecter du peroxyde d'hydrogène produit de manière endogène plus rapidement que l'acide boronique **42**.

La sonde **41** étant dissymétrique, quatre produits sont formés en présence de peroxyde d'hydrogène. La régiosélectivité de la coupure qui a été déterminée par RMN du proton, a montré que la 4-MU est libérée directement à hauteur de 20%, ce qui constitue un aspect à améliorer. Dans le chapitre suivant, une étude de la régiosélectivité d'oxydation d'acides boriniques modèle sera réalisée pour comprendre les facteurs l'influençant et favoriser ainsi la libération exclusive de la 4-MU.

**CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA
RÉGIOSÉLECTIVITÉ DES
AMORCES BORINIQUES ET
APPLICATION À LA SYNTHÈSE
DE NOUVELLES SONDÉS
FLUOROGÉNIQUES**

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA RÉGIOSÉLECTIVITÉ DES AMORCES BORINIQUES ET APPLICATION À LA SYNTHÈSE DE NOUVELLES SONDES FLUOROGÉNIQUES

Dans ce troisième chapitre, une première partie sera consacré à la synthèse et l'étude de la régiosélectivité de la réaction d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène d'une librairie d'acides boriniques dissymétriques modèles. Le substituant sur le groupement phényle conduisant à une coupure la plus univoque possible a ensuite été employé pour synthétiser de nouvelles sondes fluorogéniques à amorce borinique.

I. Études et synthèses d'acides arylboriniques dissymétriques modèles

1. Synthèse d'acides arylboriniques dissymétriques modèles

Comme cela a été présenté dans le chapitre 2, actuellement, il existe une seule méthode générale pour accéder aux acides boriniques dissymétriques, la méthode de Hofer (voir 2. Synthèses des acides arylboriniques dissymétriques p70). Par ailleurs, les acides boriniques sont parfois instables. Afin d'optimiser la régiosélectivité de la réaction d'oxydation, la synthèse d'une librairie d'acides arylboriniques dissymétriques modèles possédant divers groupements avec des propriétés stériques et électroniques différentes a donc été envisagée. Les acides boriniques résulteraient de l'addition nucléophile de phenyllithium sur un ester arylboronique. Si les produits ne sont isolables à ce stade, car parfois instables, alors la formation de borinate (ester borinique) issus de l'aminoéthanol ou de l'hydroxyquinoléine sera effectuée. Dans ce cas, une hydrolyse acide des borinates permettra l'obtention des acides boriniques souhaités (**Schéma 82**).

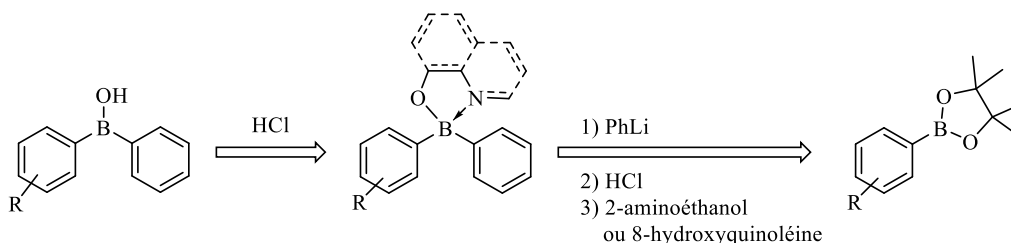


Schéma 82 : Rétrosynthèse des acides arylboriniques dissymétriques

Ainsi les synthèses de huit acides diarylboriniques **43** à **50** ont été réalisées : issus respectivement de divers esters d'arylboroniques substitués par un groupement méthoxyle, trifluorométhyle, méthyle ou nitro (en position para ou ortho) (**Figure 55**). Ces composés ont été

choisis car ils permettront d'étudier l'influence des effets électroniques (donneurs ou attracteurs) et stériques sur la cinétique d'oxydation des acides diarylboroniques dissymétriques.

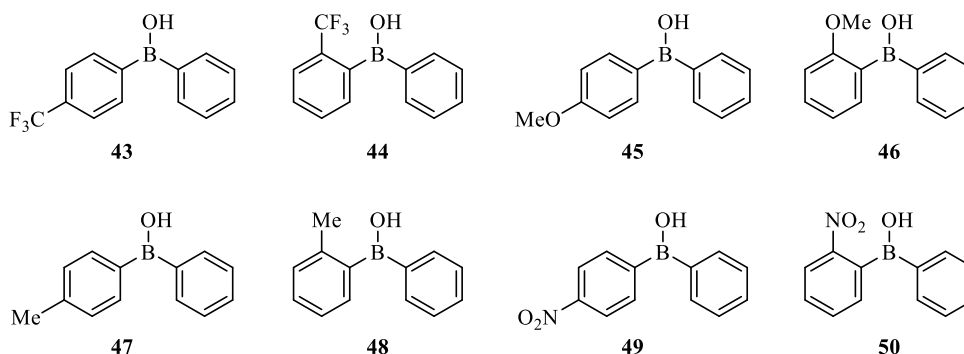


Figure 55: Structures d'acides arylboroniques 43 à 50

a) Synthèse des acides arylboroniques dissymétriques 43 à 50 :

Les conditions opératoires décrites par Hofer requièrent, pour chaque substrat, une optimisation notamment concernant la température réactionnelle à laquelle le phényllithium a été additionné. Pour la synthèse de cette librairie, il a été choisi de se placer à -78°C pour réaliser cette étape.

Ainsi, le composé **43** a été obtenu après l'addition du phényllithium sur l'ester 4-trifluorométhylphénylboronique de pinacol pendant 4 heures dans de l'éther diéthylique. Après hydrolyse acide, un précipité contenant 15% de pinacol et l'acide borinique **43** a été récupéré. L'acide borinique **43** est obtenu après une trituration de ce précipité dans le pentane avec un rendement de 42% sous forme d'une huile jaune pâle (Schéma 83).

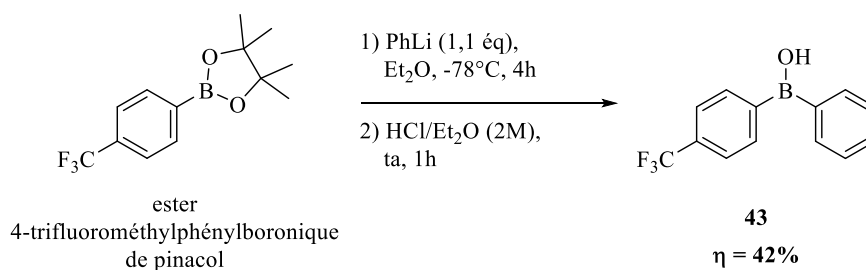


Schéma 83: Synthèse de l'acide borinique 43

D'autres méthodes de purifications douces ont aussi été utilisées dans l'espoir d'améliorer le rendement mais elles n'ont pas permis d'isoler l'acide borinique **43** pur.

Pour les acides boroniques **44** à **48**, aucune précipitation n'est observée après hydrolyse acide. Aussi, ils ont été isolés sous forme de borinates après addition d'un excès de 2-aminoéthanol dans l'éther diéthylique. Les composés **51** à **55** ont été obtenus, après précipitation, avec des rendements compris entre 55 et 94% (Schéma 84).

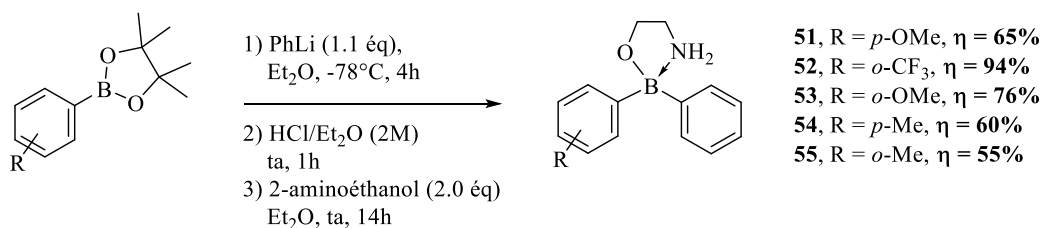


Schéma 84 : Synthèse des différents borinates 51 à 55

Puis ces borinates ont été déprotégés en présence d'une solution aqueuse de HCl (1M), pour donner les acides boriniques **44** à **48** avec des rendements compris entre 39 et 91% (Schéma 85).

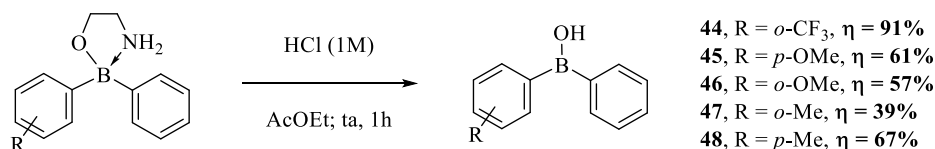


Schéma 85 : Synthèse des différents acides boriniques 44 à 48

Lors de l'hydrolyse acide, les composés possédant un groupement méthoxy ont été isolés en présence d'acides boroniques (issus de réactions de protodéboration), à hauteur de 10 à 30% selon les essais. Il a donc été nécessaire de les purifier sur gel de silice, ce qui a conduit à une chute du rendement. De plus, ces acides boriniques se sont avérés moins stables que leurs analogues borinates même lorsqu'ils étaient stockés à -30°C sous atmosphère inerte. Aussi, ils ont été directement utilisés après leur synthèse pour effectuer les tests de régiosélectivité.

Pour essayer de palier ces pertes de matière lors de la déprotection et/ou lors des purifications pour les composés possédant un groupement méthoxy, la synthèse du composé **43** a été réalisée sans protection par le 2-aminoéthanol. Ainsi, l'acide borinique **43** a été directement purifié sur gel de silice et a été isolé avec un rendement de 52% (Schéma 86), ce qui constitue une amélioration par rapport au rendement global des deux étapes nécessaires lors du passage par le borinate (40% contre 52%).

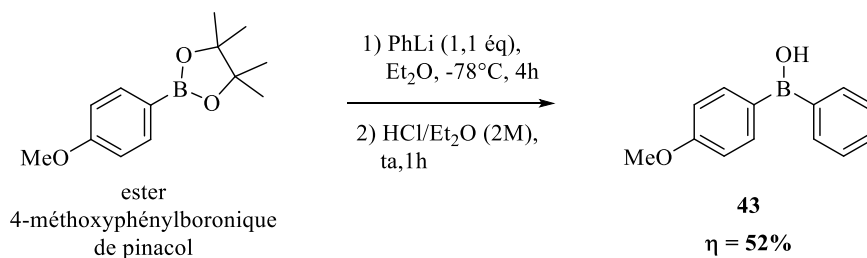


Schéma 86 : Synthèse de l'acide borinique 43

Les synthèses d'acides boriniques possédant un substituant nitro se sont révélées moins performantes. En effet, aucune précipitation n'est observée après l'addition du 2-aminoéthanol dans le cas de l'ester 4-nitrophénylboronique de pinacol. Finalement, l'acide borinique a été isolé sous forme de borinate **56** après l'action de la 8-hydroxyquinoléine avec un très faible rendement de 10% (**Schéma 87**).

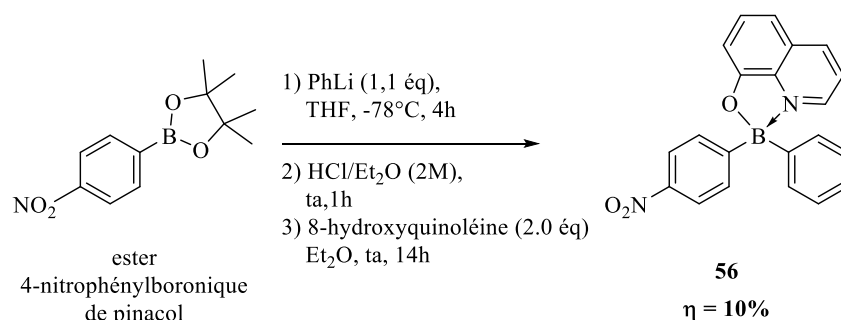


Schéma 87 : Synthèse du borinate 56

L'hydrolyse acide du borinate **56** pour obtenir l'acide borinique **49** est actuellement en cours d'optimisation (**Schéma 88**).

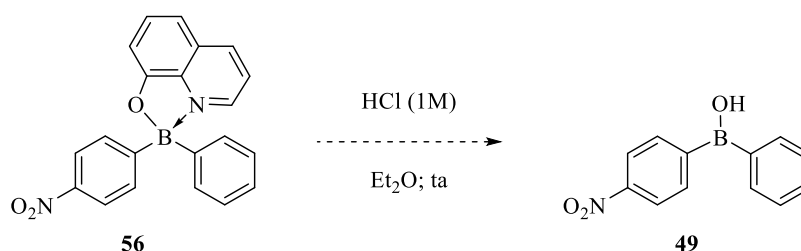


Schéma 88 : Synthèse de l'acide borinique 49

En revanche, aucun produit n'a été observé lors de l'addition du phényllithium sur l'ester 2-nitrophénylboronique de pinacol quel que soit le ligand utilisé. En RMN du bore, seul un déplacement correspondant à un acide ou ester boronique est observé (déplacement chimique vers 30 ppm) (**Schéma 89**).

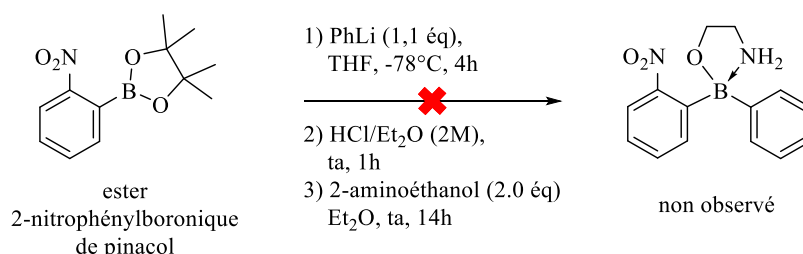


Schéma 89 : Synthèse du borinate 57

b) Synthèse des acides arylboroniques dissymétriques **58** et **59** :

Les esters arylboroniques de pinacol n'étant pas tous commercialement disponibles, une voie de synthèse alternative reposant sur l'addition d'un aryllithien substitué sur l'ester phénylboronique de pinacol commercial a été envisagée.

Ainsi deux autres acides arylboroniques **58** et **59** ont été synthétisés, issus respectivement du 2 ou 4-isopropylbromobenzène (**Figure 56**).

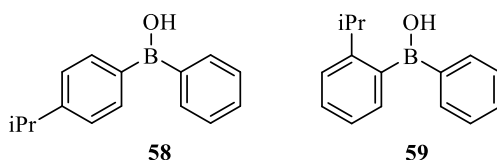


Figure 56: Structures des acides arylboroniques **58** et **59**

L'aryllithien est engendré par l'action du *sec*-BuLi sur le composé bromé diversement substitué. Comme précédemment, les acides boroniques sont directement protégés par l'action du 2-aminoéthanol pour conduire aux borinates correspondants isolés par précipitation. Ainsi, les borinates **52** et **60** sont obtenus avec des rendements compris entre 40% et 48% (**Schéma 90**). À titre de comparaison, le borinate **52** obtenu à partir du 2-bromotrifluorométhylbenzène a été isolé avec un rendement moyen de 40%, rendement inférieur à celui obtenu selon l'autre voie de synthèse.

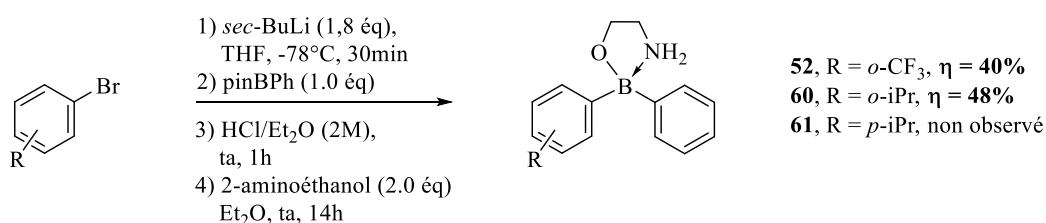


Schéma 90: Synthèse des différents borinates **52**, **60** et **61**

De manière surprenante, aucune réaction n'a été observée avec l'aryllithien issu du 4-isopropyl(bromophényl), la voie de synthèse précédente a été réalisée.

Pour cela, l'ester de pinacol du 4-isopropylphénylboronique **62** a été synthétisé par estérification de l'acide boronique commercial par du pinacol avec un rendement de 72%. L'addition de phényllithium suivie d'une hydrolyse et l'action du 2-aminoéthanol a conduit au borinate **61** avec un rendement de 67% (**Schéma 91**).

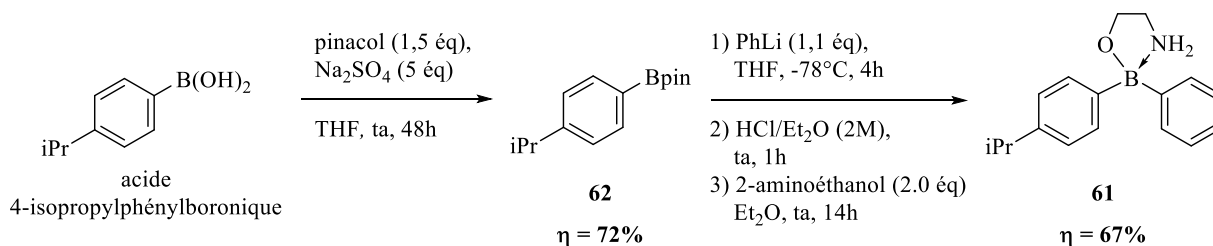


Schéma 91 : Synthèse du borinate **61** à partir de l'acide 4-isopropylphénylboronique commercial

Le borinate **60** a été déprotégé en présence d'une solution aqueuse de HCl (1M), pour donner l'acide borinique **59** avec un rendement de 48%. La déprotection du borinate **61** dans les mêmes conditions est actuellement en cours d'optimisation au laboratoire (Schéma 92).

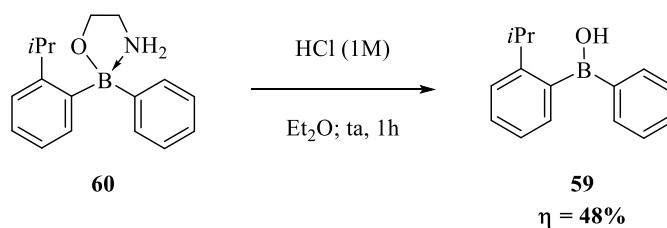


Schéma 92: Synthèse de l'acide borinique **59**

En conclusion, sept acides boriniques ont pu être obtenus avec des rendements globaux allant de 23% (R = *o*-Me) à 86% (R = *o*-CF₃). Six d'entre eux n'avaient jamais été synthétisés auparavant. Pour la plupart de ces composés, les rendements obtenus ont été améliorés par rapport à la littérature et des conditions opératoires reproductibles ont été mises au point.

Il est intéressant de noter que les rendements d'hydrolyse des borinates possédant un groupement phényle substitué par des groupements électrodonneurs sont plus faibles que ceux obtenus avec les borinates possédant un groupement phényle substitué par des groupements électroattracteurs et ce malgré une conversion totale des borinates de départ. Ces résultats peuvent être expliqués par leur différence de stabilité. En effet, il a été reporté dans la littérature que les acides boriniques possédant des groupements électroattracteurs sont stables en conditions acides.¹²¹ Il est probable que des processus de protodéboration dans le cas des acides arylboroniques possédant des substituants électrodonneurs puissent se produire lors de l'étape de l'hydrolyse ou lors des purifications.

Avec ces produits en main, une étude de la régiosélectivité de la réaction d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène a été effectuée.

2. Étude de la réactivité des acides arylboriniques dissymétrique vis-à-vis du H₂O₂

Dans le cas des acides arylboriniques dissymétriques, l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation de quatre espèces différentes (**Schéma 93**). La proportion relative de chacune d'elles devrait permettre de déterminer le site de coupure préférentiel, en fonction des effets électroniques et des effets stériques des différents groupements R (donneurs ou attracteurs), et de leur position (*ortho* ou *para*).

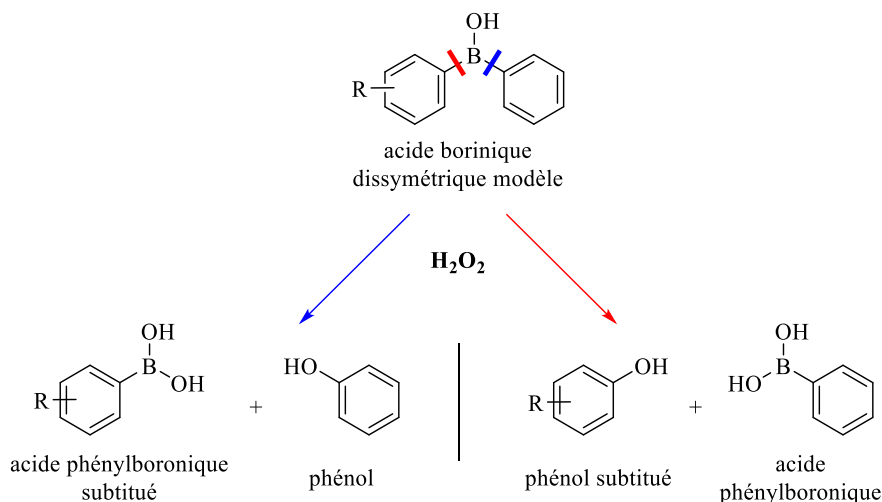


Schéma 93: Oxydation par H₂O₂ d'un acide arylborinique dissymétrique substitué

Le but principal de cette étude est d'essayer de déterminer les effets principaux orientant la régiosélectivité de la coupure tout en s'assurant que la cinétique d'oxydation de l'amorce borinique soit toujours plus rapide que l'amorce boronique. Ainsi, chacun des acides boriniques synthétisés possédant un motif aryle substitué correspondant aux acides boriniques **43** à **48** et **58** (R = -OMe, -CF₃, -Me, et -*i*Pr) a été étudié vis-à-vis de l'oxydation par le peroxyde d'hydrogène.

Le suivi cinétique a été effectué par RMN du proton dans les conditions opératoires précédemment établies. Les acides boriniques synthétisés **43** à **48** et **58** mais aussi tous les acides arylboriniques substitués correspondants commerciaux ont été dissous dans un tampon PBS deutéré 1X (pH = 7.4, avec 5% de DMSO, *v/v*), à 4 mM. Les expériences ont été réalisées en duplicata ou triplicata, et un enregistrement à différents temps a été réalisé pour chacune d'elles (2, 5, 10, 15 minutes, etc...) à température ambiante. Les différents produits d'oxydation (phénol, acide phénylboronique, phénol substitué et acide arylborinique) issus de chacun des acides boriniques testés ont été dissous dans un tampon PBS deutéré 1X (pH = 7.4, avec 5% de DMSO, *v/v*), à 2 mM. Grâce à ces spectres de référence les différentes proportions de produits ont pu être déterminées par intégration des signaux ¹H RMN.

À titre d'exemple quatre produits d'oxydation sont possibles pour l'acide borinique **46** : le 2-méthoxyphénol (en orange), l'acide phénylboronique (en vert), l'acide 2-méthoxyphénylboronique (en marron) et le phénol (en violet) (**Figure 57**). Après addition du peroxyde d'hydrogène, l'acide borinique **46** est entièrement transformé au bout de deux minutes, comme le montre par exemple la disparition du signal du groupement méthoxy de l'acide borinique **46** à 3,58 ppm.

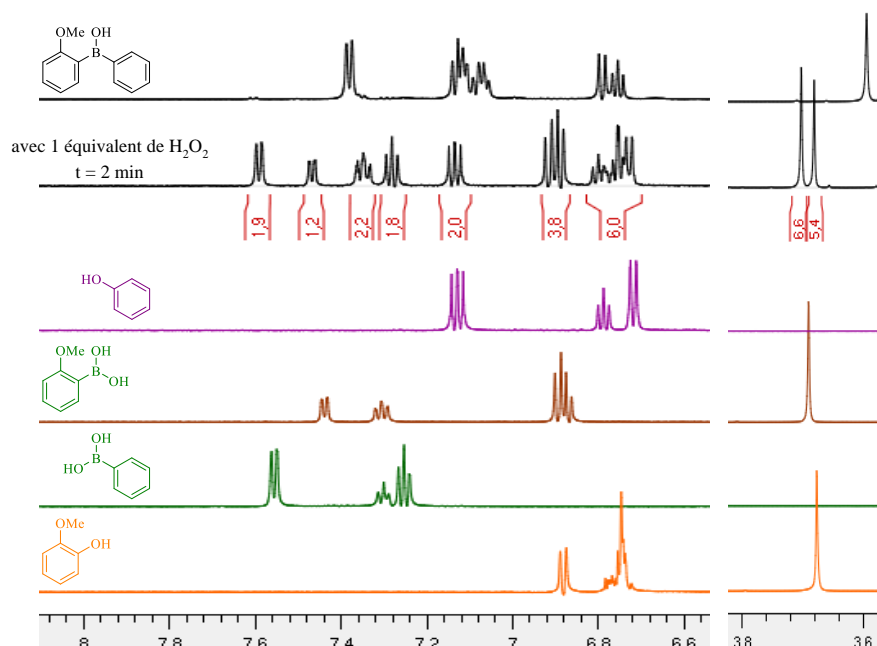


Figure 57 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **46** en présence de H_2O_2
Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **46** (référence), de l'acide borinique **46** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes, et des produits attendus : l'acide phénylboronique, le phénol, 2-méthoxyphénol et l'acide 2-méthoxyphénylboronique

Les différentes intégrations des quatre produits d'oxydation ont permis de calculer un rapport de **54** : **46** entre les deux coupures possibles (**Schéma 94**). Le groupement méthoxy en position *ortho* ne semble donc pas influencer la régiosélectivité du réarrangement oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène.

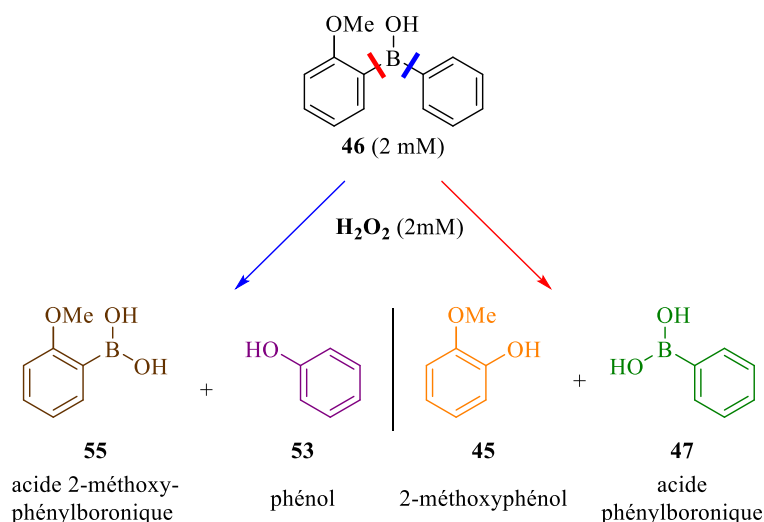


Schéma 94 : Oxydation de l'acide borinique 46 par un équivalent H_2O_2 ; structures des différents produits d'oxydation possibles

Par comparaison, l'acide 2-méthoxyphénylboronique en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène est oxydé en 45 minutes, comme l'indique la disparition des signaux aromatiques à 7,45 et 7,3 ppm de l'acide 2-méthoxyphénylboronique (**Figure 58**).

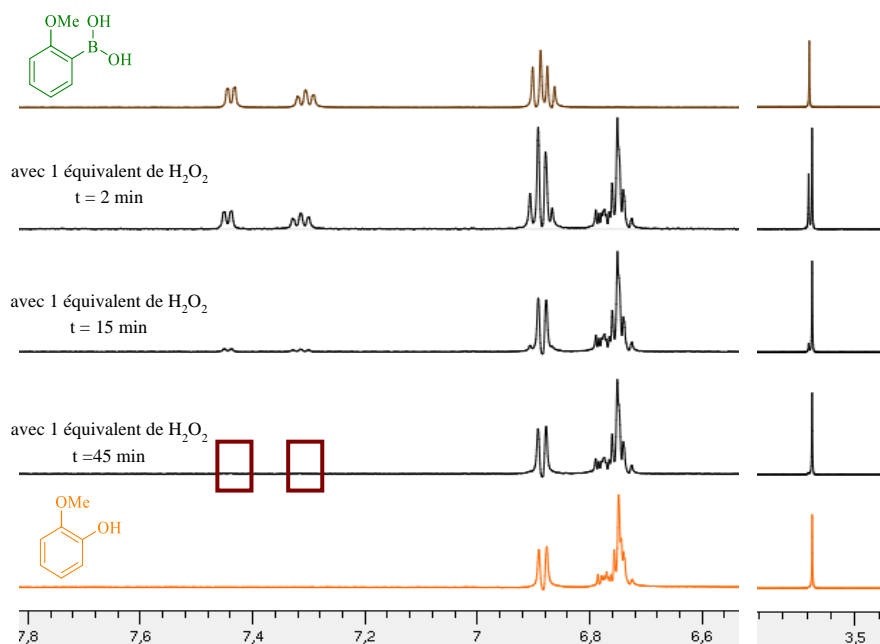


Figure 58: Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide 2-méthoxyphénylboronique en présence de H_2O_2 . Spectres ^1H RMN de l'acide 2-méthoxyphénylboronique (référence), de l'acide 2-méthoxyphénylboronique avec H_2O_2 (1 éq) après 2, 15 et 45 minutes, et du produit attendu le 2-méthoxyphénol

En procédant de manière similaire pour tous les acides boriniques, il a été possible de déterminer l'orientation de la régiosélectivité en fonction des groupements substituants présents sur la partie aryle des différents acides arylboriniques (**Figure 59**).

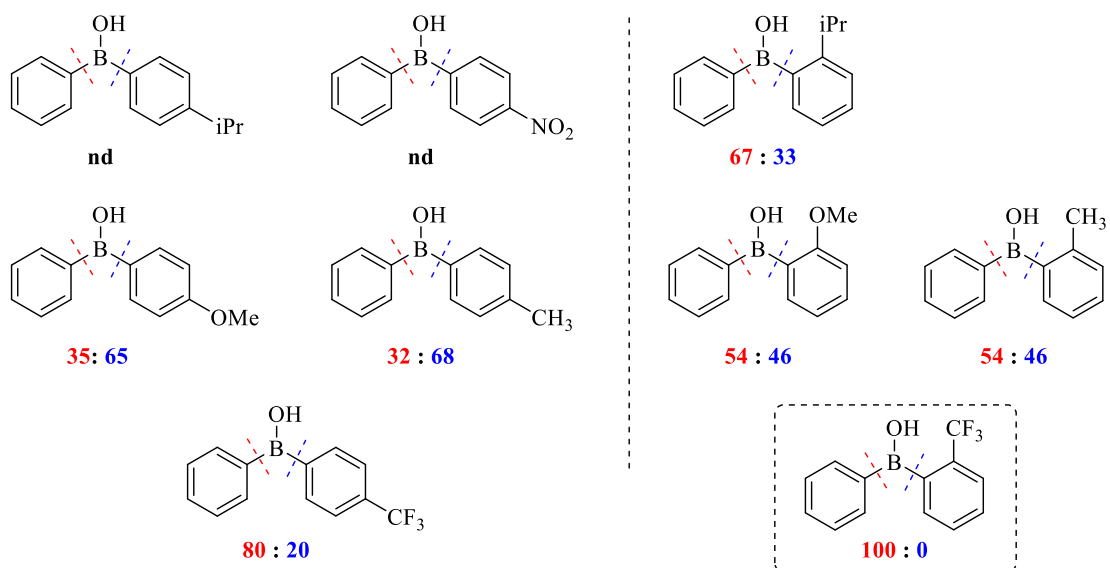


Figure 59 : Résumé des régiosélectivités observées pour les différents acides boroniques
(nd = non déterminé)

Quelle que soit la nature des substituants présents sur l'acide borinique testé, ils sont tous entièrement oxydés en présence d'un seul équivalent de peroxyde d'hydrogène en deux minutes (soit le temps nécessaire pour faire une acquisition : temps de mélange, et acquisition du spectre à proprement dit) (voir Experimental Section : II. b) Asymmetric borinic acids). De manière générale, les acides boroniques correspondants, ont été entièrement oxydés en une quarantaine de minutes pour les plus rapides (voir Experimental Section : II. b) Asymmetric borinic acids). Ces résultats montrent à nouveau que la vitesse d'oxydation des acides boriniques est plus rapide que celle des acides boroniques correspondants.

En ce qui concerne les acides boriniques *parasubstitués*, cette étude montre que la présence de groupements électroattracteurs comme le groupement trifluorométhyle défavorisent l'oxydation du côté de l'aryle portant ces groupements. Cette observation semble conforter les résultats obtenus lors de l'oxydation de la sonde fluorogénique **41**. En effet, lors de cette réaction, le réarrangement oxydatif permettant la formation de la 4-MU, molécule possédant une lactone comme fonction électroattractrice, était défavorisé. L'effet inverse est observé pour les groupements électrodonneurs comme le groupement méthoxy. Dans ce cas, le réarrangement oxydatif conduisant à la formation majoritaire du couple phénol substitué/acide phénylboronique est favorisé.

Pour essayer d'estimer les effets stériques, en comparant un acide borinique *parasubstitué* avec l'acide borinique *orthosubstitué* par le même groupement, il semble qu'un groupement en position *ortho* défavorise l'oxydation du côté de l'aryle possédant ce groupement. Ainsi, il est

intéressant de noter que l'oxydation de l'acide borinique **44** portant d'un groupement 2-trifluorométhyle conduit exclusivement à la libération du couple phénol/acide 2-trifluorométhylphénylboronique.

Des calculs de modélisation DFT sont actuellement en cours dans le laboratoire pour modéliser le mécanisme d'oxydation des acides boroniques et des acides boroniques par le peroxyde d'hydrogène.¹⁶⁹ A terme, ce modèle devrait permettre de rationaliser les phénomènes intervenant dans la régiosélectivité de la coupure des acides boroniques dissymétriques. Cette étude devra donc être poursuivie ; cependant, les résultats avec le groupement 2-trifluorométhyle permettent d'envisager la synthèse de nouvelles sondes fluorogéniques plus performantes que celle déjà synthétisée dans ce manuscrit.

¹⁶⁹ Calculs réalisés par S. Norsikian à l'ICSN

II. Synthèse des nouvelles sondes possédant un groupement *o*-CF₃Ph

Compte-tenu des résultats précédents, la synthèse de nouvelles sondes fluorogéniques dissymétriques possédant un groupement 2-trifluorométhylphényle a été envisagée. Ce groupement devrait orienter plus favorablement la sélectivité de la coupure oxydante par le peroxyde d'hydrogène vers la libération du fluorophore. Deux approches pour lier le fluorophore à l'amorce ont été envisagées : une dans laquelle le fluorophore est directement lié à l'amorce et une autre dans laquelle le fluorophore est lié à l'amorce par l'intermédiaire d'un espaceur auto-immolable.

1. Lien direct

Cette approche devrait permettre de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus lors de l'étude sur la régiosélectivité de la réaction d'oxydation sur les acides boriniques dissymétriques modèles.

a) Synthèse

Pour cela, le 2-trifluorométhylphényllithium a été formé *in situ* à partir du 2-(trifluorométhyl)bromobenzène en présence de *sec*-BuLi. Celui-ci a été ensuite transféré par canule sur l'ester borinique **37**. Après 4 heures d'agitation à -78°C, l'hydrolyse acide est suivie d'un traitement avec le 2-(*N,N*-diméthylamino)éthanol ont été réalisés. Dans ce cas, aucune précipitation n'a été observée. Une purification sur gel de silice a été réalisée mais aucun produit identifiable a été isolé. Aussi, la synthèse a été reproduite, en remplaçant l'aminoéthanol par l'acide 2-picolinique. Contrairement aux esters boriniques dérivés de l'aminoéthanol, l'ester borinique dérivé de l'acide 2-picolinique **63** a pu être purifié par chromatographie sur gel de silice et isolé avec un bon rendement de 76% (**Schéma 95**).

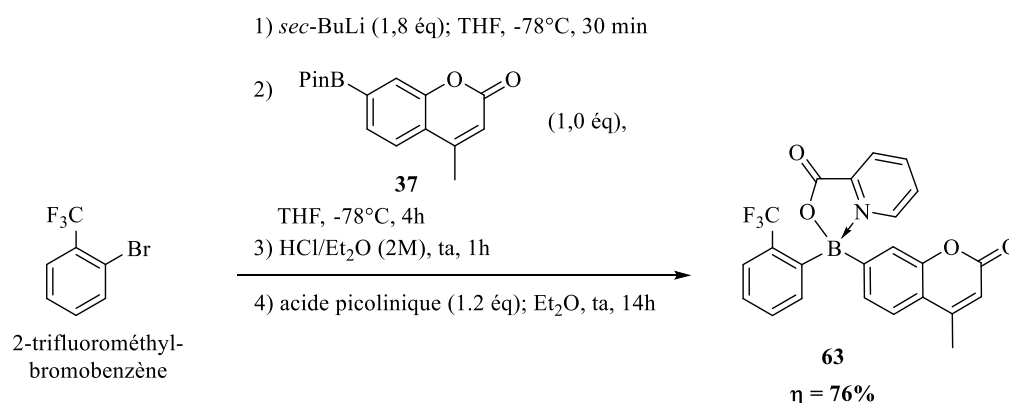
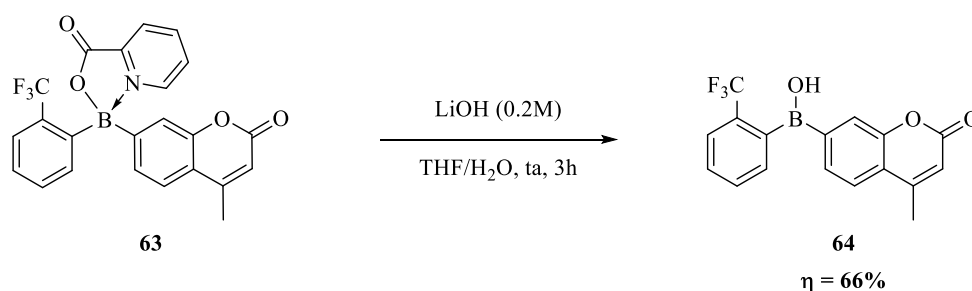


Schéma 95 : Synthèse du borinate **63**

La déprotection de ce ligand peut être promue dans des conditions douces par des acides de Lewis tels l'acétate de zinc(II) ou l'acétate de cuivre(II).¹⁷⁰ Malheureusement, des premiers essais réalisés en présence de Cu(OAc)₂ se sont révélés infructueux. Le borinate **63** a été déprotégé en conditions basiques dans un mélange d'une solution aqueuse de LiOH (0.2 M) dans du THF à température ambiante pendant 3 heures. Une conversion partielle est observée par CCM. L'acide borinique **64** est séparé du borinate n'ayant pas réagi par purification sur gel de silice. L'acide borinique **64** s'est révélé stable sur gel de silice et a été isolé avec un rendement de 66%. Le borinate **63** a été récupéré à hauteur de 31% (**Schéma 96**). Il est important de noter que ces conditions basiques n'ont pas affectées la lactone.



*Schéma 96: Synthèse de l'acide borinique **64** à partir du borinate **63***

*b) Étude de la régiosélectivité de l'acide borinique **64** :*

L'étude de la régiosélectivité de réaction d'oxydation de l'acide borinique **64** a été réalisée par spectroscopie RMN dans les mêmes conditions opératoires que celles utilisées pour les acides boriniques modèles. Cependant, cet acide borinique **64** s'est avéré très peu soluble, dans le tampon PBS deutéré 1X contenant 5% de DMSO, ce qui explique que le spectre de référence soit mal résolu (**Figure 60**). Après ajout d'un seul équivalent de peroxyde d'hydrogène, le spectre devient résolu. Expérimentalement, la solution opaque de l'acide borinique **64** devient limpide lors de l'ajout de la solution de peroxyde d'hydrogène. Au bout de deux minutes de réaction avec le peroxyde d'hydrogène, le spectre du milieu réactionnel n'évolue plus. Celui a ensuite été comparé à ceux des produits d'oxydation possibles : la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (en orange), l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique (en vert), l'acide borinique **64** (en marron) et le 2-trifluorométhylphénol (en violet) (**Figure 60**).

¹⁷⁰ J. Y. Baek, Y.-J. Shin, H. B. Jeon, K. S. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 5143-5147.

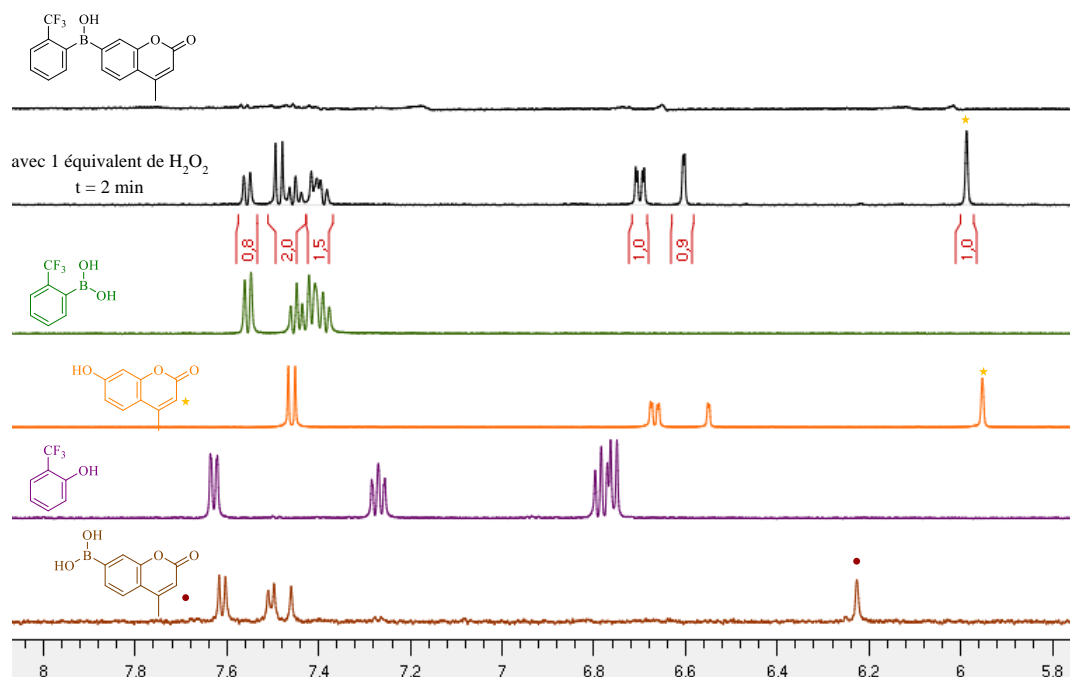


Figure 60 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **64 en présence de H_2O_2**
 Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **64** (référence), de l'acide borinique **64** avec H_2O_2 (1 éq) après 2 minutes et des produits attendus : la 4-MU, l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique, du 2-trifluorométhylphénol et l'ester borinique **62**

La comparaison des différents spectres RMN ont permis de confirmer que la présence d'un groupement trifluorométhyle permet d'orienter sélectivement le réarrangement oxydatif en faveur de la formation exclusive du fluorophore, la 4-MU. En effet, seuls la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine et l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique ont été formés en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène. Malheureusement, les difficultés liées à la solubilisation de ce produit pourraient complexifier les études de cinétiques plus précises.

Comme la sonde fluorogénique **41**, l'acide borinique **64** est oxydé beaucoup plus rapidement que l'acide boronique **42**. De plus, le groupement trifluorométhyle a permis de contourner le problème de régiosélectivité observé pour l'acide borinique **41**. En revanche, des difficultés de solubilisation ont été observées pour l'acide borinique **64**. Aussi, la recherche de groupements alternatifs, permettant d'augmenter la solubilité des sondes doit être envisagée. Pour cela, d'autres acides arylboroniques substitués par des groupements électroattracteurs comme des groupements fluor pourraient être envisagés. Enfin, l'ajout de groupements sur le groupe 2-trifluorométhylphényle permettant d'augmenter la solubilité des sondes peut être une seconde possibilité, à condition que la sélectivité soit conservée.

c) Tests de sélectivité de l'acide borinique **64**

Avant d'évaluer la sélectivité de l'acide borinique **64** vis-à-vis d'autres FRO dans les mêmes conditions que celles reportées dans la littérature (voir ii. Étude de la sélectivité sous conditions classiques p112), le composé **64** (5 μM) a été mis en présence de peroxyde d'hydrogène exogène (20 équivalents soit 100 μM). Une expérience de contrôle effectuée sans l'addition de peroxyde d'hydrogène a été menée en parallèle. En présence de peroxyde d'hydrogène, l'intensité de fluorescence atteint son maximum au bout de 18 minutes. De manière surprenante, l'expérience de contrôle sans peroxyde d'hydrogène conduit au même plateau de fluorescence en un temps un peu plus long (**Figure 61**). Afin d'expliquer ces résultats, nous pouvons émettre une hypothèse. Comme la résorufine avec l'Amplex Red[®], une fois excité l'acide borinique **64** pourrait servir de photocatalyseur et induire une photooxydation entraînant la libération de 4-MU dans le milieu. D'autres analyses sont actuellement en cours pour essayer de rationaliser ces résultats. Au-delà de ces questionnements, s'ajoute le manque de solubilité de l'acide borinique **64** qui empêche de déterminer la quantité précise de **64** réellement testée.

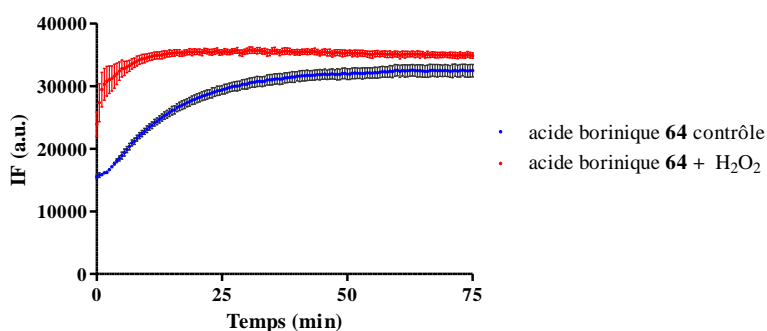


Figure 61 : Suivi cinétique de l'intensité de fluorescence d'une solution d'acide borinique **64** en présence de H₂O₂
Intensité de fluorescence d'une solution d'acide borinique **64** (5 μM) en présence de H₂O₂ (100 μM)
dans du tampon PBS IX (pH 7.4) à 25°C.

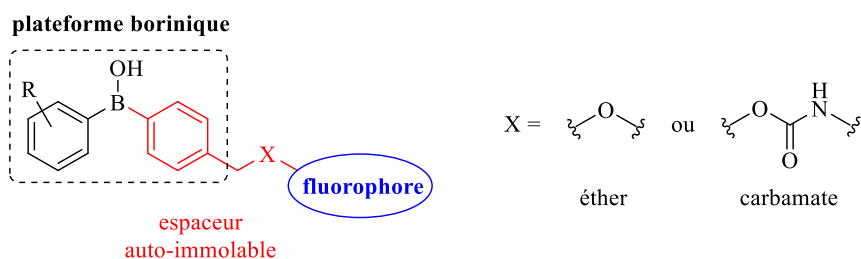
Les intensités de fluorescence sont enregistrées toutes les 30 secondes pendant 75 minutes à $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

Cette expérience montre à nouveau la nécessité de poursuivre la recherche d'un groupement permettant d'orienter la sélectivité du réarrangement oxydatif tout en permettant une bonne solubilité dans les milieux physiologiques. Aussi, pour le moment la détermination par spectroscopie de fluorescence des constantes de vitesse relatives à la réaction d'oxydation de l'acide borinique **64** vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, dont la coupure est sélective, n'a pas encore été effectuée tant que les problèmes de solubilité de ce composé n'ont pas été résolus.

2. Synthèse de sondes possédant un bras auto-immolable

L'obtention d'acides boriniques directement liés à une plateforme fluorogénique s'est révélée relativement complexe en terme de synthèse même pour un fluorophore « simple » comme la 4-MU. Les rendements de synthèse des sondes fluorogéniques basés sur ce type d'amorce sont restés faibles (10% pour **41**, de 32% pour **64**). Pour améliorer les rendements globaux d'obtention de sondes fluorogéniques, il a été envisagé d'introduire un espaceur auto-immolable entre l'amorce borinique et la plateforme fluorescente.

L'avantage de cette approche réside principalement dans l'obtention d'une plateforme borinique dont la synthèse pourrait être optimisée dans un premier temps et sur laquelle un fluorophore pourra être greffé dans un second temps. Ainsi, différents fluorophores pourraient être facilement greffés sans être obligé d'optimiser la synthèse de l'acide borinique dérivé de chacun d'entre eux. Par ailleurs, plusieurs types d'espacesurs auto-immolables peuvent être envisagés comme des liens éther ou carbamate (**Figure 62**).



Pour chaque espaceur, la synthèse de sondes possédant un groupement phényle et o-trifluorométhylphényle ont été envisagées. Aussi, une fois la sonde synthétisée, le suivi par RMN du proton sera réalisé pour évaluer la régiosélectivité de la réaction par le peroxyde d'hydrogène et estimer la durée de la réaction et donc vérifier que le bénéfice cinétique apporté par l'emploi d'une amorce borinique est bien conservée.

a) Synthèses et études de sondes possédant un espaceur auto-immolable éther :

Même si l'approche d'une plateforme borinique dont la synthèse serait optimisée avant l'addition du fluorophore est une approche intéressante, il a été envisagé dans un premier temps d'utiliser la même voie de synthèse développée pour les sondes **41** et **64** qui se s'est révélée reproductible et sûre (**Schéma 97**).

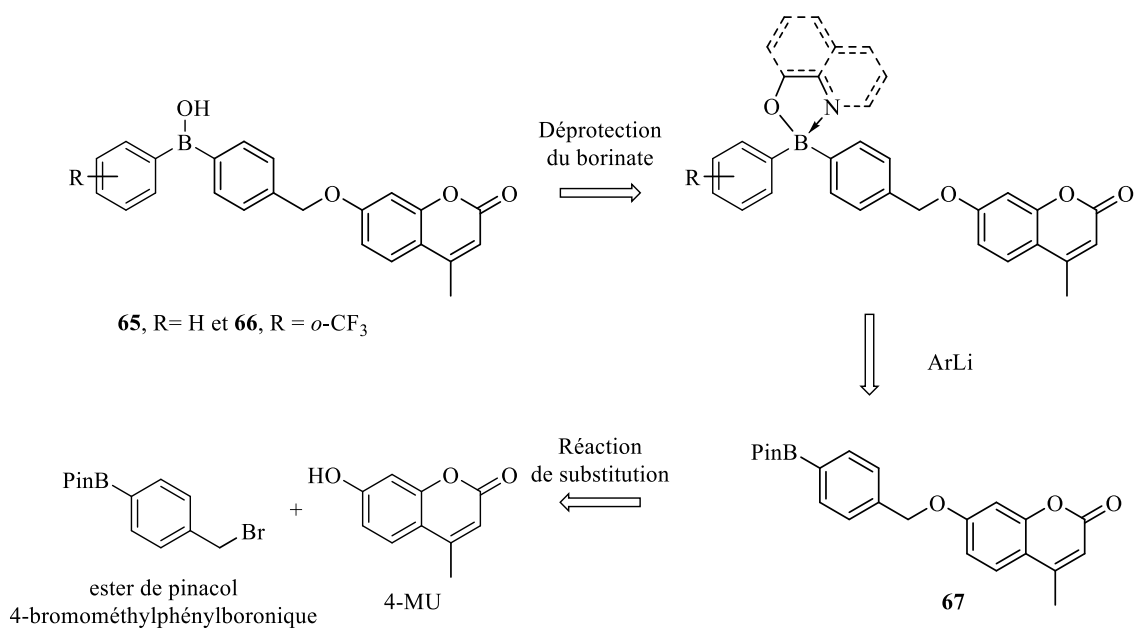


Schéma 97 : Rétrosynthèse des sondes fluorogéniques 65 et 66

Les sondes fluorogéniques **65** et **66** pourront être obtenues en trois étapes. Les acides boriniques résulteraient d'une hydrolyse acide des borinates correspondants. Ces derniers seraient obtenus par addition d'un aryllitien sur l'ester boronique de pinacol **67**. Cet ester boronique pourrait être facilement accessible via une réaction de substitution nucléophile de la 4-MU sur le bromure de l'ester 4-bromométhylphénylboronique de pinacol, tous deux commercialement disponibles.

i. Synthèses des sondes fluorogéniques 65 et 66:

L'ester boronique **67** a été obtenu par substitution du bromure de l'ester 4-bromométhylphénylboronique de pinacol commercial par la 4-MU commerciale en 4 heures à 70°C avec un rendement de 90% (Schéma 98).

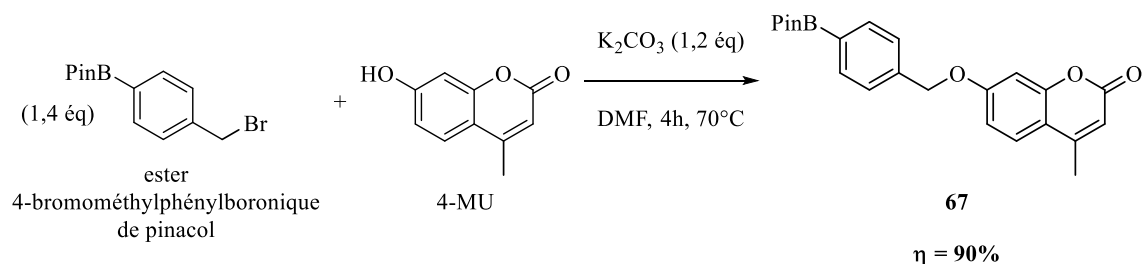


Schéma 98 : Synthèse de l'ester boronique 67

L'ester boronique **67** a ensuite été soumis aux conditions précédemment développées pour la synthèse de l'acide borinique **41** : addition de phényllithium suivie d'une hydrolyse acide, puis action du 2-aminoéthanol. Malheureusement, aucun précipité n'a été observé avec ce ligand. Il a donc été remplacé par la 8-hydroxyquinoléine. La formation d'un précipité, contenant le borinate

désiré et l'ester boronique de pinacol **67** n'ayant pas réagi, a été observée. Le borinate **68** a été purifié par chromatographie sur gel de silice pour éliminer l'ester boronique **67** n'ayant pas réagi, mais il a été obtenu en présence de pinacol (environ 20%) avec un rendement corrigé de 28% (**Schéma 99**).

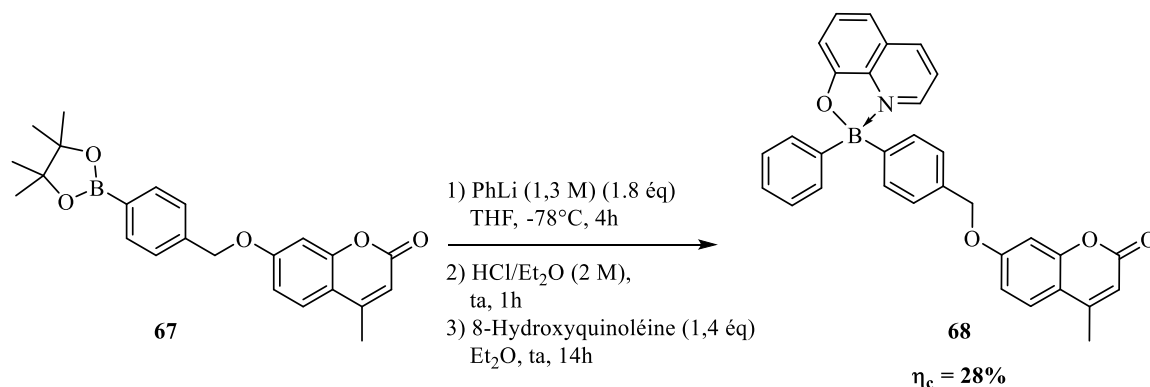


Schéma 99 : Synthèse du borinate 68

Compte-tenu des difficultés rencontrées lors de la déprotection du borinate **38**, lui aussi protégé avec la 8-hydroxyquinoléine et de la faible quantité de produit obtenu, la déprotection du borinate **68** n'a pas été encore réalisée.

En parallèle, la synthèse des dérivés boriniques possédant un groupement 2-trifluorométhylphényle, permettant a priori d'orienter sélectivement le réarrangement oxydatif, a été effectuée.

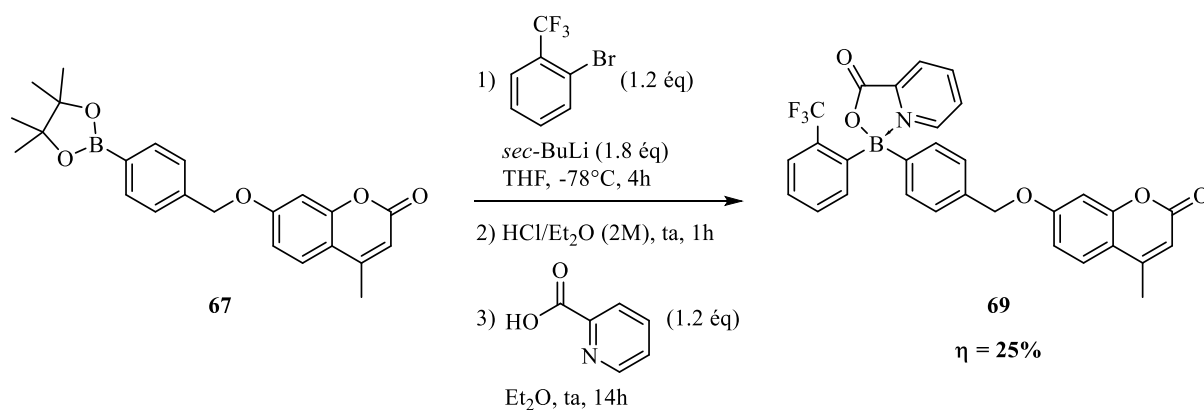


Schéma 100 : Synthèse du borinate 69

Le lithien dérivé du bromure de 2-trifluorométhylphényle, résultant de l'échange halogène métal avec le *sec*-butyllithium, a été additionné à une solution d'ester boronique **67**. Une hydrolyse acide suivie d'une protection par l'acide 2-picolinique a permis d'isoler le composé **69** après une purification sur gel de silice, avec un rendement modéré de 25% (**Schéma 100**). Il est à noter que le suivi par CCM de la conversion de l'ester boronique **67** lors de l'addition de cet aryllithien ou de phényllithium est possible, ce qui n'était pas le cas pour les acides boriniques **41** et **63**.

En présence de LiOH (2M), le borinate **69** est déprotégé en acide borinique **66**, qui est isolé sous la forme d'un solide amorphe vert avec un rendement de 66% (**Schéma 101**).

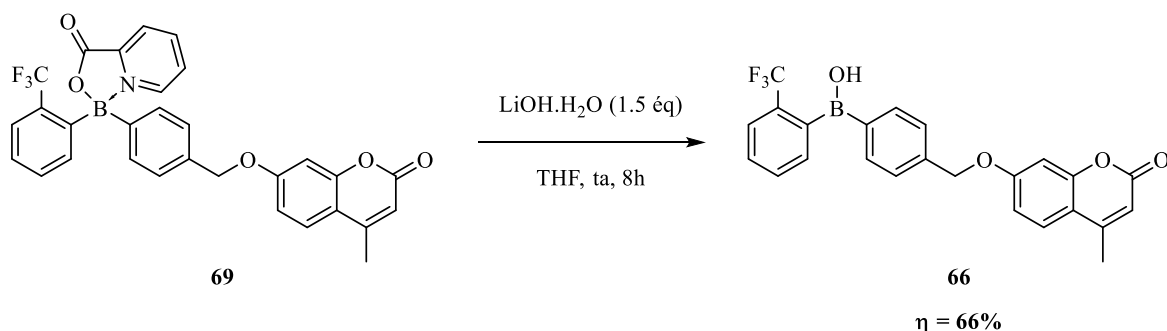


Schéma 102 : Synthèse de l'acide borinique 67

Plusieurs produits peuvent être engendrés lors de la réaction de l'acide borinique **66** avec le peroxyde d'hydrogène : le 2-trifluorométhylphénol, l'acide 2-trifluorométhyl-phénylboronique, l'acide boronique issu de l'acide boronique **70** mais aussi l'alcool correspondant **71**, qui libère la 4-MU selon une réaction d'élimination 1,6 (**Schéma 104**).

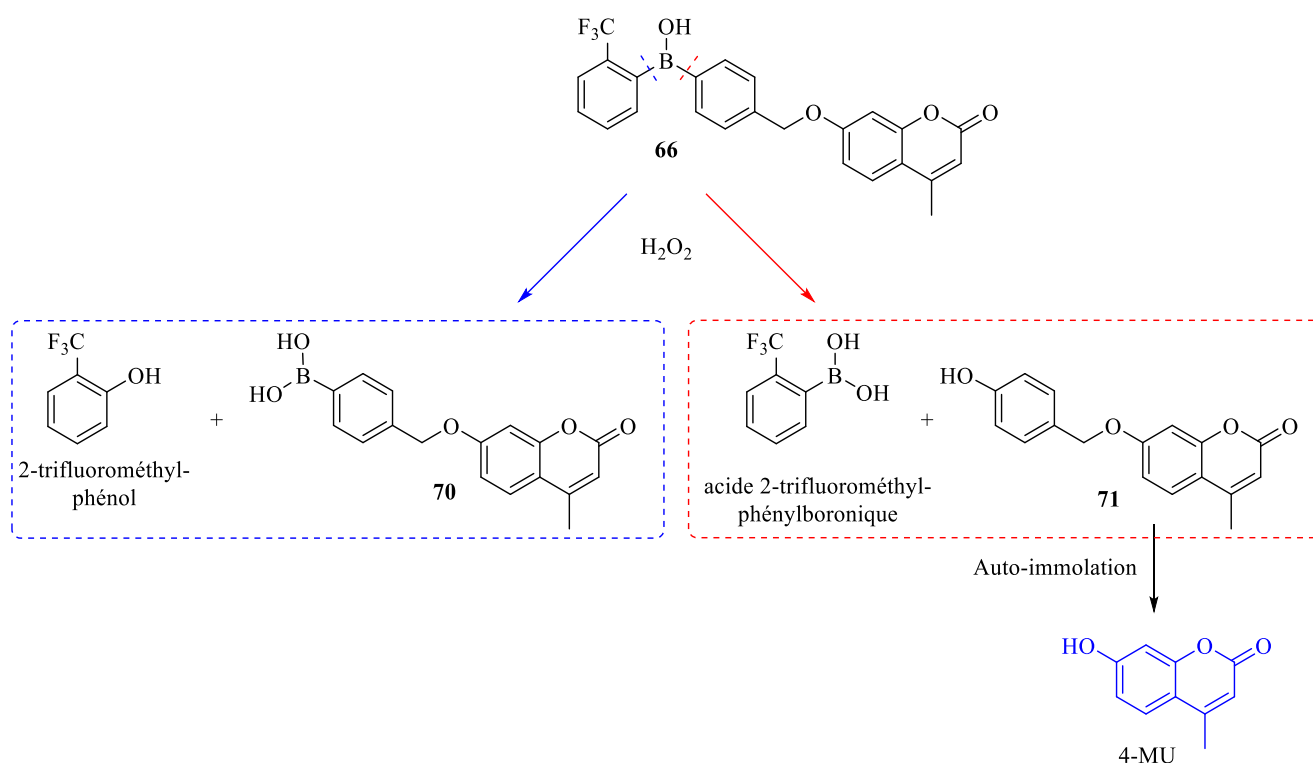


Schéma 101 : Oxydation par H₂O₂ de la sonde fluorogénique 66 avec un bras éther

Afin de comparer les spectres RMN, la synthèse de ces produits a été initiée. L'acide boronique **70** a été synthétisé par une réaction d'estérification croisée de l'acide boronique **67** en présence de l'acide méthylboronique, avec un rendement de 62% (**Schéma 103**).

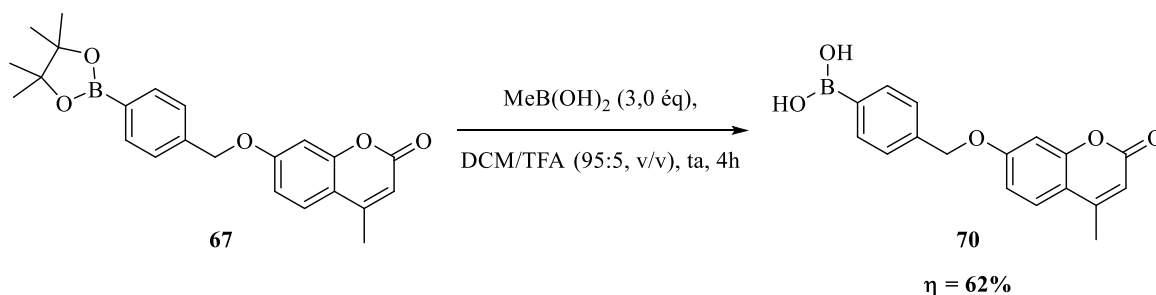


Schéma 103 : Synthèse de l'acide boronique 70

Faute de temps, la synthèse de l'alcool **71** n'a pas pu être effectuée. Cependant, celui-ci pourrait être obtenu en quatre étapes à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde en s'inspirant d'une voie de synthèse réalisée par l'équipe de Min pour synthétiser un alcool analogue issu la 7-hydroxycoumarine.¹⁷¹ L'alcool **71** pourrait résulter d'un couplage de type Mitsunobu entre la 4-méthylumbelliférone et un dérivé d'alcool benzylique judicieusement protégé. L'alcool benzylique protégé **72** serait issu de la réduction du benzaldéhyde protégé **73**, lui-même issu de la protection sous forme d'éther silylé du 4-hydroxybenzaldéhyde commercial (Schéma 105). La synthèse de cet alcool est en cours de réalisation au laboratoire.

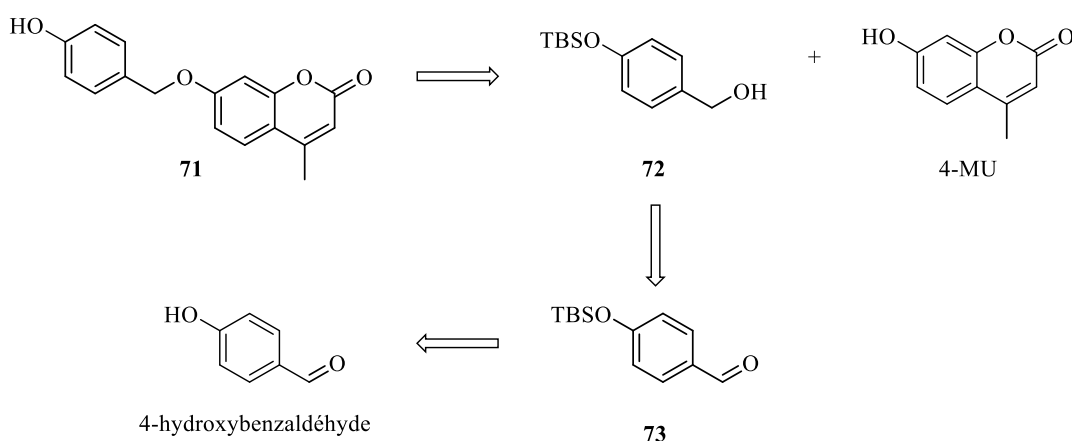


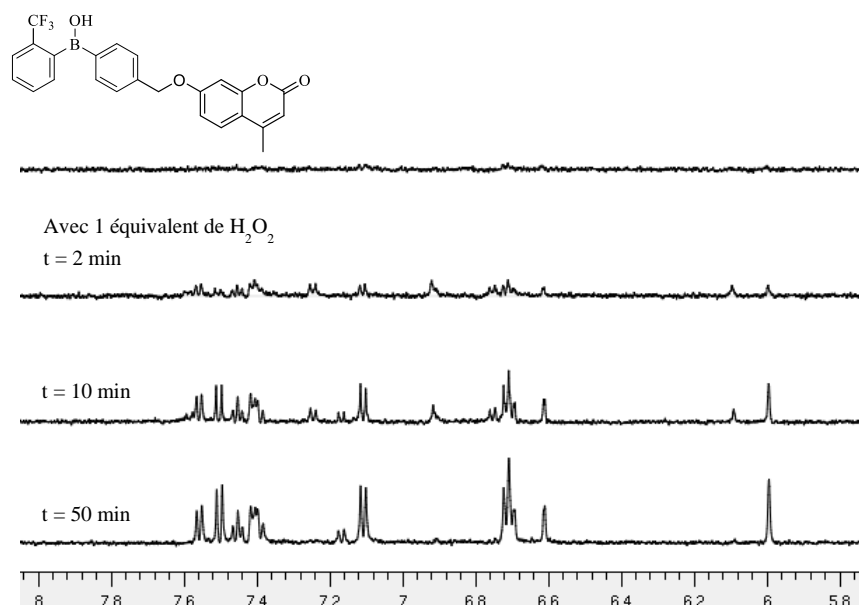
Schéma 105 : Rétrosynthèse envisagée pour l'alcool 71

ii. Tests d'oxydation de l'acide borinique **66** par H_2O_2

La réaction d'oxydation de la sonde fluorogénique **66** par le peroxyde d'hydrogène a été étudiée par spectroscopie 1H RMN dans les mêmes conditions que celles décrites pour les acides boriniques modèles ou les autres sondes fluorogéniques. L'acide borinique **70** et l'alcool **71** n'ayant pas encore été synthétisés au moment des expériences, ils n'ont pas pu être testés dans ces conditions. Néanmoins grâce aux différents spectres de références déjà enregistré, il a été possible de déterminer la régiosélectivité de la réaction d'oxydation de l'acide borinique **66**.

¹⁷¹ J. Kim, Y. Kim, A. Z. Abdelazem, H. J. Kim, H. Choo, H. S. Kim, J. O. Kim, Y.-J. Park, S.-J. Min, *Bioorg. Chem.* **2020**, *94*, 103405-103418.

Comme pour l'acide borinique **64**, la sonde fluorogénique **66** s'est avérée non soluble dans les conditions de réactions rendant le spectre de référence très peu résolue et compliquant l'analyse par un suivi RMN. Néanmoins deux informations peuvent être estimées grâce à cette analyse : la durée et la régiosélectivité de la réaction d'oxydation de la sonde **66** par le peroxyde d'hydrogène. Les résultats sont présentés dans la **Figure 63**.



*Figure 63 : Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **66** en présence de H_2O_2
Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **66** (référence), de l'acide borinique **66** avec H_2O_2 (1 éq) après 2, 10 et 50 minutes*

Après deux minutes en présence de peroxyde d'hydrogène, des signaux apparaissent et leurs proportions continuent à évoluer jusqu'à 50 minutes. Au bout de ce temps, seul le signal correspondant au proton en α de la lactone de la 4-MU à 5,95 ppm est observé (carré orange, **Figure 64**) traduisant la fin de la réaction d'oxydation. Cette cinétique d'activation est plus lente que celle observée pour l'acide borinique **64** (2 minutes) et peut-être expliquée par la présence de l'espaceur qui ajoute une étape d'auto-immolation supplémentaire à la cinétique de libération de l'entité fluorescente.

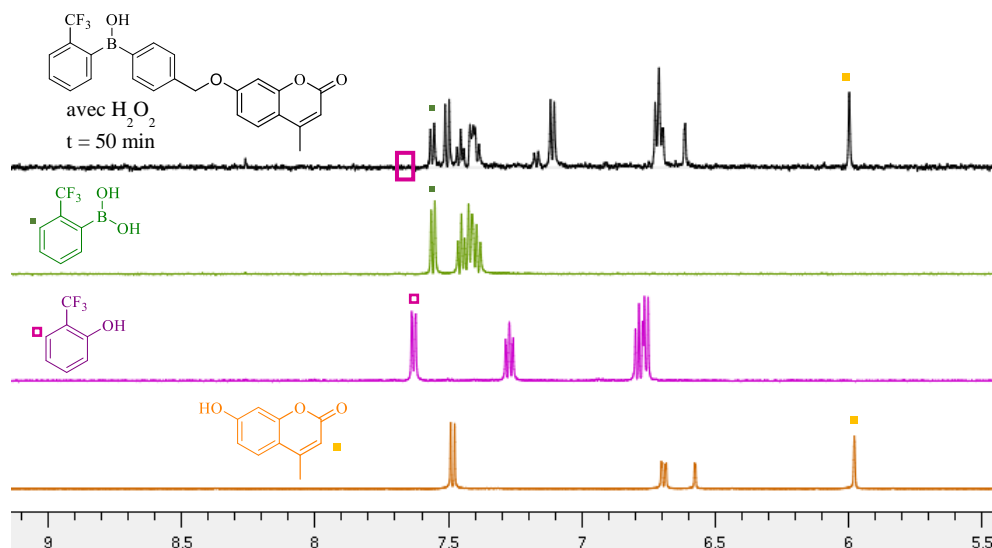


Figure 64: Suivi par spectroscopie ^1H RMN de l'oxydation de l'acide borinique **66** en présence de H_2O_2
Spectres ^1H RMN de l'acide borinique **66** avec H_2O_2 (1 éq) après 50 minutes et des produits attendus : la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine, l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique, le 2-trifluorométhyl phénol

La seconde information concerne la régiosélectivité de la réaction. Même s'il manque deux références, l'acide boronique **70** et l'alcool **71**, en s'intéressant uniquement aux signaux de l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique (en vert) et du 2-trifluorométhylphénol (en violet), il a été possible de déterminer la régiosélectivité de la réaction d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène (**Figure 64**). Sur le spectre à 50 minutes seul l'acide 2-trifluorométhylphénylboronique a été observé comme le révèlent les signaux correspondant aux protons en α du groupement trifluorométhyle à 7,55 et 7,58 ppm (carrés vert et violet). Donc la régiosélectivité induite par le groupement 2-trifluorométhylphényle est conservée et ce malgré l'ajout d'un bras auto-immolable de type éther entre l'amorce borinique et le fluorophore.

Ces résultats préliminaires sont encourageants, car l'utilisation d'un bras auto-immolable ne change pas la régiosélectivité induite par le groupement 2-trifluorométhylphényle. Si de meilleures conditions opératoires sont obtenues pour solubiliser **66**, alors une détermination précise des constantes de vitesse relatives à l'oxydation et d'auto-immolation des composés **66** et **71** pourra être effectuée par des mesures de fluorescence. Ainsi, l'effet d'un espaceur auto-immolable de type éther pour une amorce borinique pourra être évalué. De même dans un second temps, des tests de sélectivité vis-à-vis d'autres FRO pourront être envisagés.

b) Synthèse de sondes possédant un espaceur auto-immolable carbamate :

Pour améliorer la cinétique de la réaction d'oxydation vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène pour les sondes fluorogéniques possédant un espaceur auto-immolable, il a été envisagé de synthétiser des sondes fluorogéniques possédant des espaceurs auto-immolables dont la vitesse d'auto-immolation est supérieure à celle des éthers. Un espaceur auto-immolable de type carbamate semble le plus adapté en termes de vitesse. En effet, la vitesse d'auto-immolation des espaceurs éther dépend fortement du pKa de l'alcool (ou fluorophore oxygéné) libéré. En présence d'un espaceur de type carbamate, cette vitesse devrait être plus rapide grâce à la libération de CO₂ qui est la force motrice de la réaction. Par analogie aux sondes précédemment synthétisées, il a donc été envisagé d'utiliser la 7-amino-4-méthylcoumarine comme fluorophore dont les propriétés photophysiques sont proches de celles de la 4-MU.

L'approche rétrosynthétique envisagée repose cette fois-ci sur l'optimisation d'une plateforme borinique sur laquelle sera greffée le fluorophore lors des dernières étapes de synthèse. Les sondes fluorogéniques **72** et **73** pourraient être obtenues par formation d'une fonction carbamate entre un borinate possédant un alcool benzylique et la 7-amino-4-méthylcoumarine commerciale. Le borinate résultera quant-à-lui de l'addition d'un aryllithien sur l'ester boronique **74**, ce dernier provenant d'une réaction de Miyaura impliquant un alcool 4-bromophénylméthanol **75** dont la fonction alcool aurait été judicieusement protégée (**Schéma 106**).

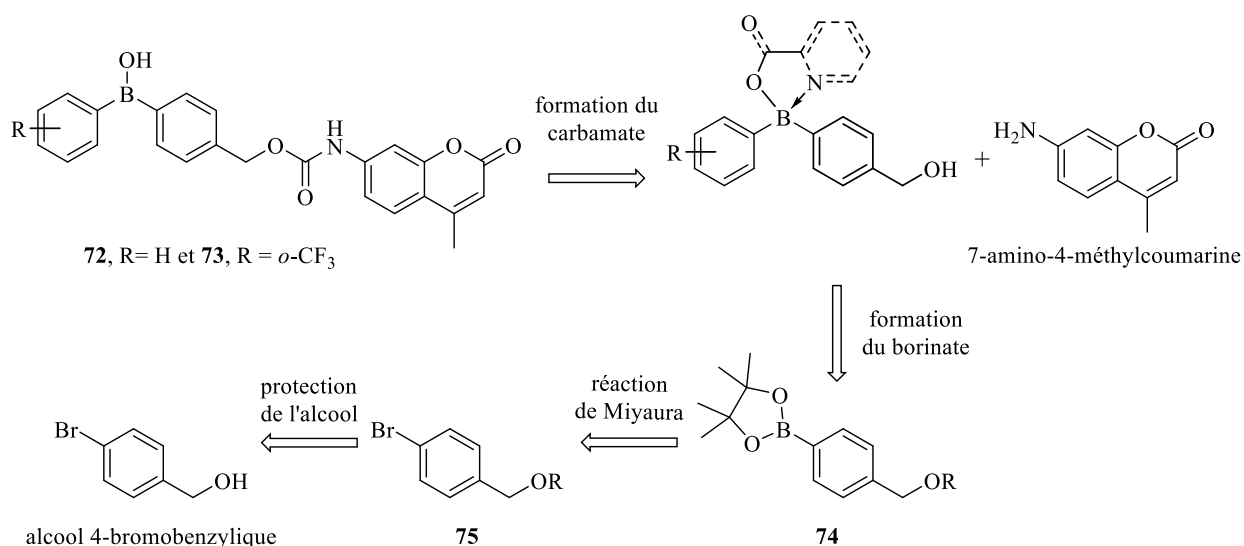


Schéma 106 : Rétrosynthèse des sondes fluorogéniques **72** et **73**

i. Synthèse de la plateforme borinique:

La fonction alcool de l'alcool 4-bromobenzyle a été protégée sous forme d'acétal. En effet, cet acétal pourra être déprotégé en conditions acides lors du traitement de la réaction de

couplage entre l'ester boronique de pinacol et l'aryllithien. L'alcool 4-bromophénylméthanol disponible commercialement a été mis à réagir avec le dihydropyrane (DHP) en présence d'une quantité catalytique d'acide camphorsulfonique (CSA) (1 mol%). Une chromatographie sur gel de silice a permis d'isoler l'acétal **75** un rendement de 95% (**Schéma 107**).

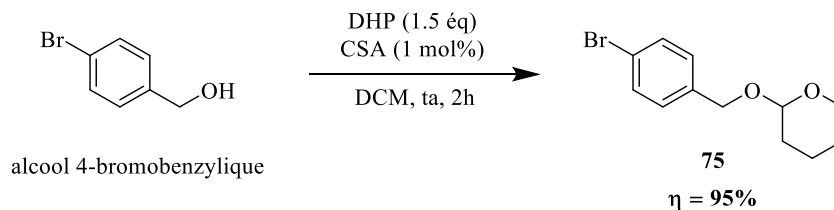


Schéma 107: Synthèse du composé 75

Une fois le composé **75** obtenu, celui-ci a été engagé dans une réaction palladocatalysée de type Miyaura. Ainsi, en présence d'une quantité catalytique de palladium (10 mol%), d'acétate de potassium (3 équ), et de bis(pinacolato)diborane (1.1 équ) dans du dioxane à 85°C, l'ester boronique **74** désiré a été obtenu avec un rendement isolé de 79% (**Schéma 108**).

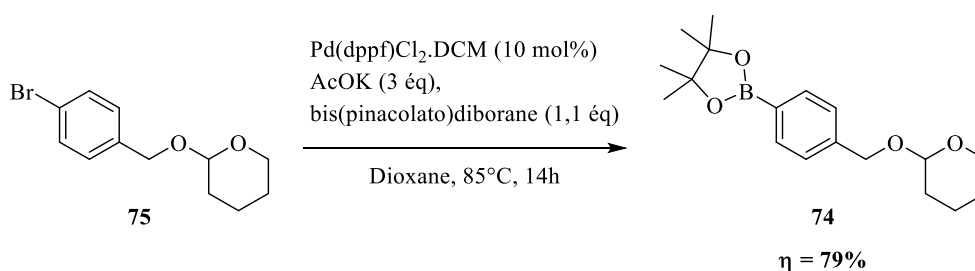


Schéma 108: Synthèse de l'ester boronique 74

Pour accéder plus rapidement à l'ester boronique **74**, il a été envisagé de protéger directement l'ester 4-méthanolphénylboronique de pinacol disponible commercialement sous forme d'acétal, en utilisant les mêmes conditions décrites pour la formation de l'acétal **75**. Après, une chromatographie sur gel de silice, l'acétal **74** a été obtenu en présence d'un produit secondaire **76** avec un rendement corrigé de 97% (**Schéma 109**).

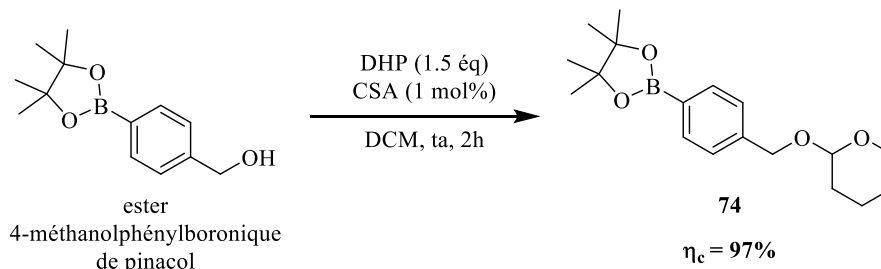


Schéma 109: Synthèse du composé 74 à partir de l'ester 4-méthanolphénylboronique

Comme le sous-produit **76** possède un rapport frontal très proche de l'ester boronique **74**, tous les essais qui ont été réalisés sur l'ester 4-méthanolphénylboronique de pinacol ont été contaminé par le composé **76**. Ce produit secondaire a été identifié par des expériences de RMN

(^1H , ^{13}C) et par spectrométrie de masse (HRMS) et correspond à l'hémiacétal **76** (Figure 65). Pour éliminer cette impureté ou la séparer du produit désiré, plusieurs stratégies ont été adoptées comme un traitement en milieu basique ou une réaction d'acétylation mais elles se sont révélées infructueuses. Aussi l'ester boronique **74** a été obtenu préférentiellement à partir de l'alcool 4-bromophénylméthanol en deux étapes.

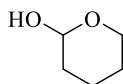


Figure 65 : Structure du produit secondaire **76**

L'ester boronique **74** a ensuite été soumis à l'action d'une solution phényllithium (1,1 éq), pour accéder au borinate correspondant. Malgré l'utilisation de conditions drastiques (temps prolongé d'hydrolyse, augmentation de la température jusqu'à 50°C), la déprotection de l'acétal est incomplète. Le mélange réactionnel a tout de même été traité par différents ligands dans le but de déterminer quel ligand était le plus adapté pour ce produit : le 2-aminoéthanol, le 2-(diméthylamino)éthanol, le 3-(diméthylamino)propanol, le 2-pyridineméthanol, la 8-hydroquinoléine, et l'acide 2-picolinique. La RMN ^{11}B des tous les milieux réactionnels ont révélé des déplacements chimiques caractéristiques de borinates compris entre 6 et 12 ppm. Néanmoins seuls les borinates issus de la 8-hydroquinoléine ou de l'acide 2-picolinique ont été obtenus sous la forme d'un précipité dans l'éther diéthylique. Pour ces deux borinates l'hydrolyse de l'acétal s'est révélée incomplète. Aussi, une purification a été nécessaire pour séparer les borinates **77** et **78** (respectivement issus de la 8-hydroquinoléine et de l'acide 2-picolinique) dont la fonction alcool est libre, des borinates **79** et **80** (respectivement issus de la 8-hydroquinoline et l'acide 2-picolinique) possédants l'alcool benzylique protégé sous forme d'acétal. Les borinates **77** et **78** ont été isolés avec des rendements respectifs de 65 et 52% et les borinates **79** et **80** avec des rendements respectifs de 23 et 19% (Schéma 110).

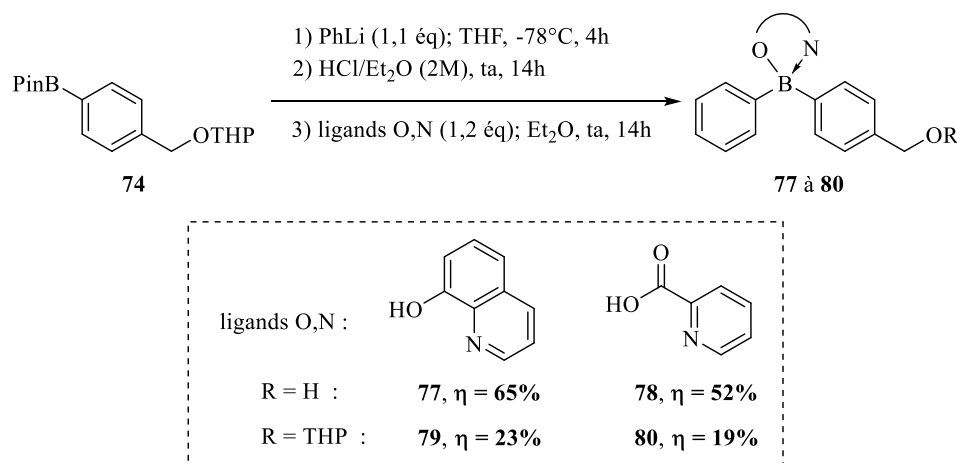


Schéma 110 : Synthèses des borinates **77** à **80**

Parallèlement, ces conditions opératoires ont été reproduites cette fois en présence de l'aryllithien dérivé du bromure de 2-trifluorométhylphényle. Seuls deux ligands ont été considérés : le 2-(diméthylamino)éthanol et de l'acide 2-picolinique. Seul le borinate provenant de l'action de l'acide 2-picolinique forme un précipité dans l'éther diéthylique. Après purification sur gel de silice, le borinate **81** déprotégé et le borinate **82** dont l'alcool benzylique est encore protégé sous forme d'acétal ont été isolés avec des rendements respectifs de 51 et 31% (**Schéma 111**).

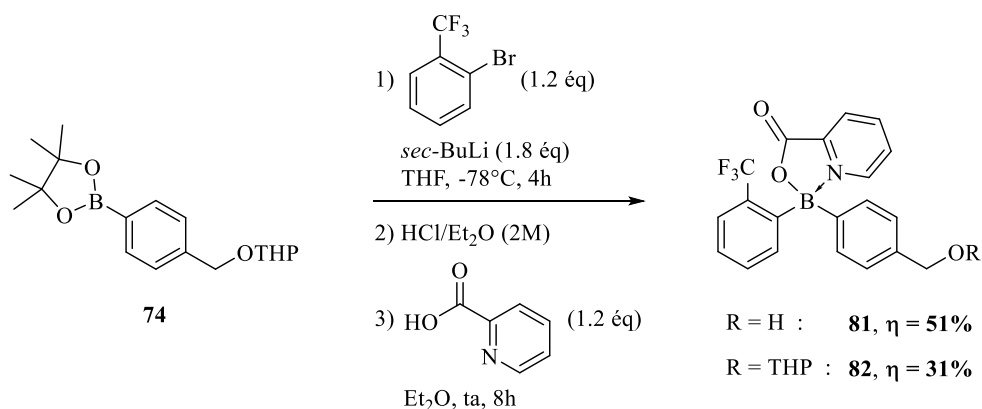


Schéma 111 : Synthèses des borinates 81 et 82

Lors de la synthèse des borinates **77** à **81**, toutes les étapes réactionnelles (conversion de l'ester boronique **74** lors de l'addition de l'aryllithien et l'hydrolyse) ont pu être suivies par chromatographie sur couche mince. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la déprotection du groupement acétal lors de l'hydrolyse acide et ainsi améliorer les rendements d'obtention des borinates dont la fonction alcool est déprotégée. Quoiqu'il en soit, les rendements d'addition des aryllithiens sur les esters boroniques sont plutôt élevés comparés à ceux obtenus lors de la synthèse des sondes fluorogéniques dans lesquelles le fluorophore est directement lié à l'atome de bore.

ii. Synthèse de l'ester boronique **83** et obtention de la fonction carbamate

Avant de former la fonction carbamate sur les borinates **77**, **78** ou **81**, la synthèse a été optimisée pour la formation d'un composé modèle l'ester boronique de pinacol **83** (**Schéma 112**).

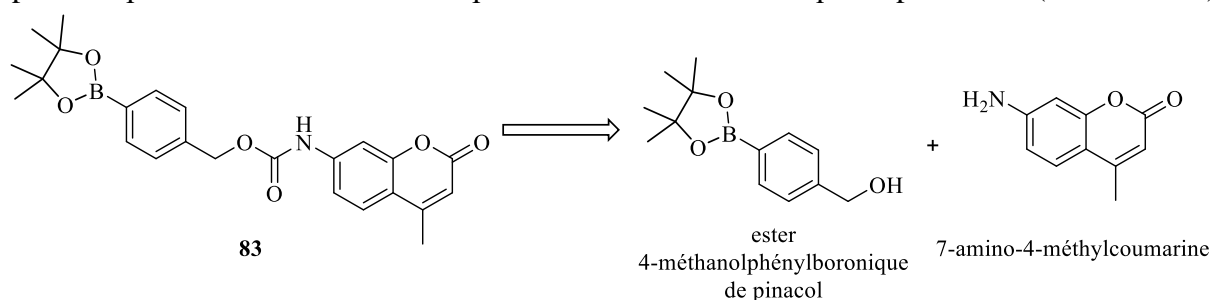
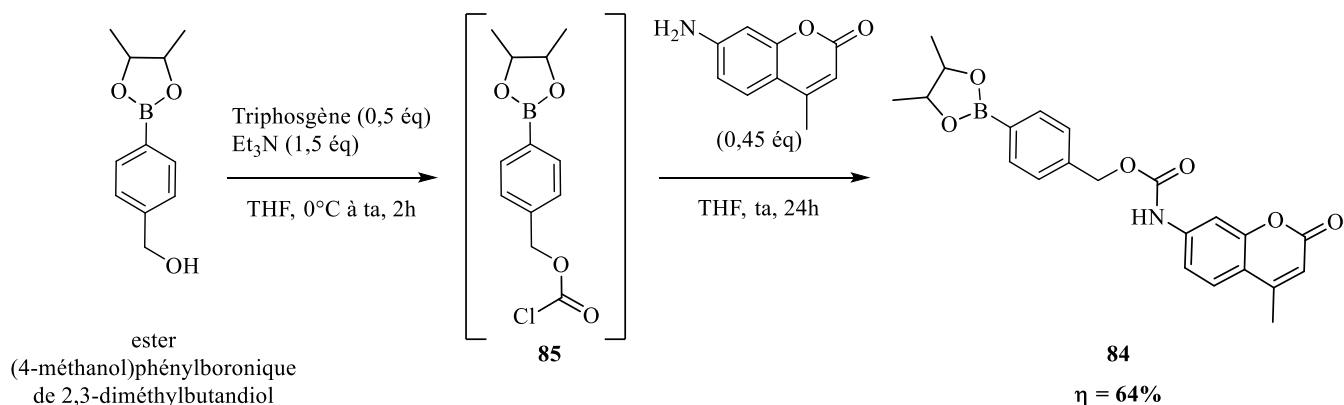


Schéma 112 : Rétrosynthèse de l'ester boronique 86

En 2003, Lo *et al.* ont décrit la synthèse d'un ester boronique dérivé de la 7-amino-4-méthylcoumarine **84**.⁵⁸ Ce composé a été obtenu par activation de la fonction alcool sous forme de chloroformiate **85** par l'action du triphosgène (**Schéma 113**). Sa formation a d'ailleurs été confirmée par spectroscopie RMN du proton. Ce composé été mis en présence de la 7-amino-4-méthylcoumarine et l'ester boronique **84** a été obtenu avec un rendement de 64%.



*Schéma 113 : Synthèse de l'ester boronique 84 selon la procédure de Lo et al.*⁵⁸

Ces conditions ont donc été reproduites avec l'ester (4-méthanol)phénylboronique de pinacol commercial. Malheureusement dans ces conditions aucune conversion de l'alcool n'a été observée lors des différents essais réalisés (**Schéma 114**). Dans tous les essais, les RMN du proton du brut réactionnel n'ont pas révélé la présence de ce chloroformiate.

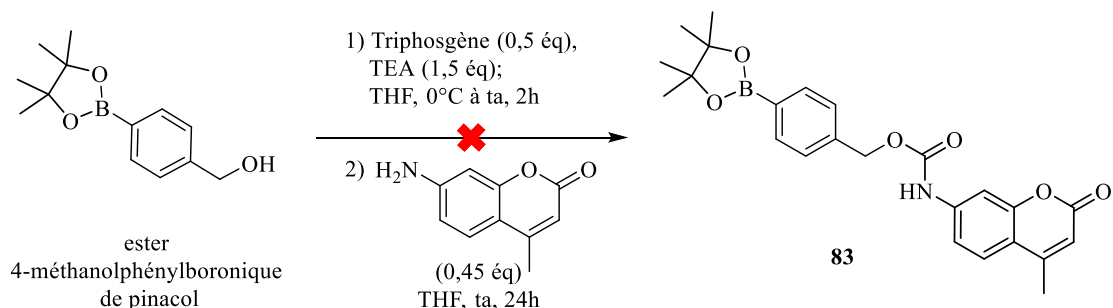


Schéma 114 : Synthèse de l'ester boronique 86

D'autres méthodes d'activation d'alcool ont été testées. Ainsi l'ester (4-méthanol)phénylboronique de pinacol a été activé sous forme de carbonate. Tout d'abord, en présence de carbonate de di(*N*-succinimidyle) (DSC), le carbonate **85** correspondant a été obtenu après purification sur gel de silice avec un rendement de 74%. Puis, en présence de 4-nitrophénylchloroformiate, le carbonate **86** a été isolé avec un bon rendement de 88% (**Schéma 115**).

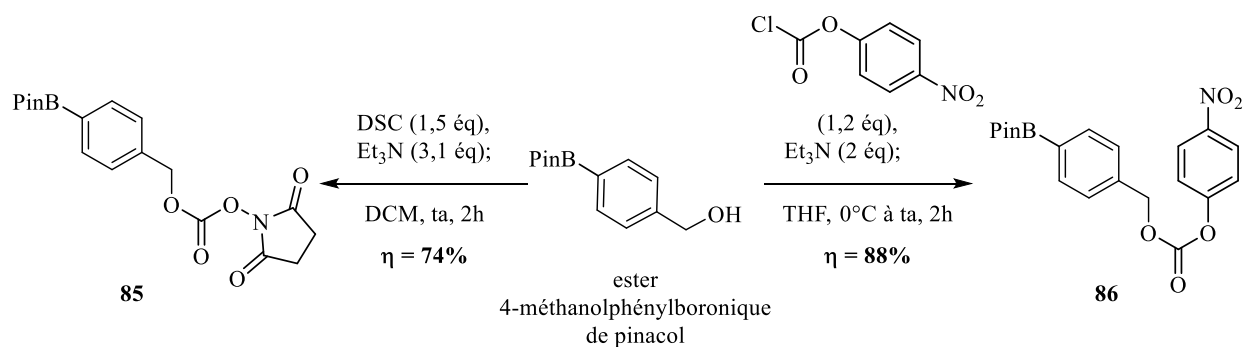


Schéma 115 : Synthèse des carbonates **85** et **86**

Les carbonates activés **85** et **86** ont été engagés dans la réaction de formation du carbamate **83** en présence de la 7-amino-4-méthylcoumarine et de triéthylamine. Aucune conversion n'a été observée, même après 4 jours à 50°C (pour le carbonate **86**) (Schéma 116).

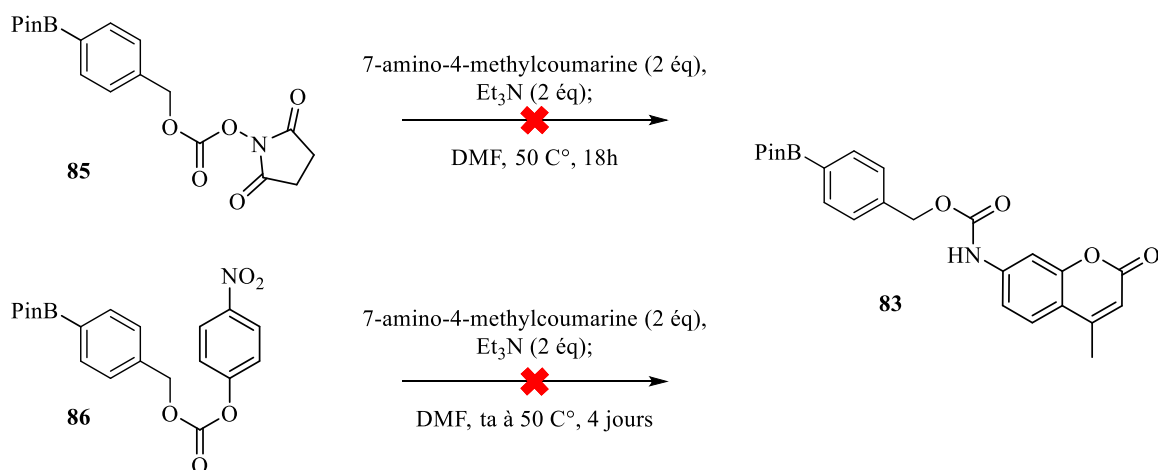


Schéma 116 : Synthèse du carbamate **83** à partir du carbonate **85** ou du carbonate **86**

Pour contourner ces limitations, il a été envisagé de synthétiser ce composé après une activation de la 7-amino-4-méthylcoumarine sous forme d'isocyanate. Cet isocyanate **87**, a été formé par réaction entre la 7-amino-4-méthylcoumarine et le triphosgène. Cette molécule a pu être caractérisée par RMN du proton et du carbone avant d'être directement engagée dans la réaction de formation du carbamate **83** en présence d'un organoétain (10 mol%) (DBTDL, dilaurate de dibutylétain). Le carbamate a été isolé après une purification sur gel de silice avec un rendement de 58% (Schéma 117).

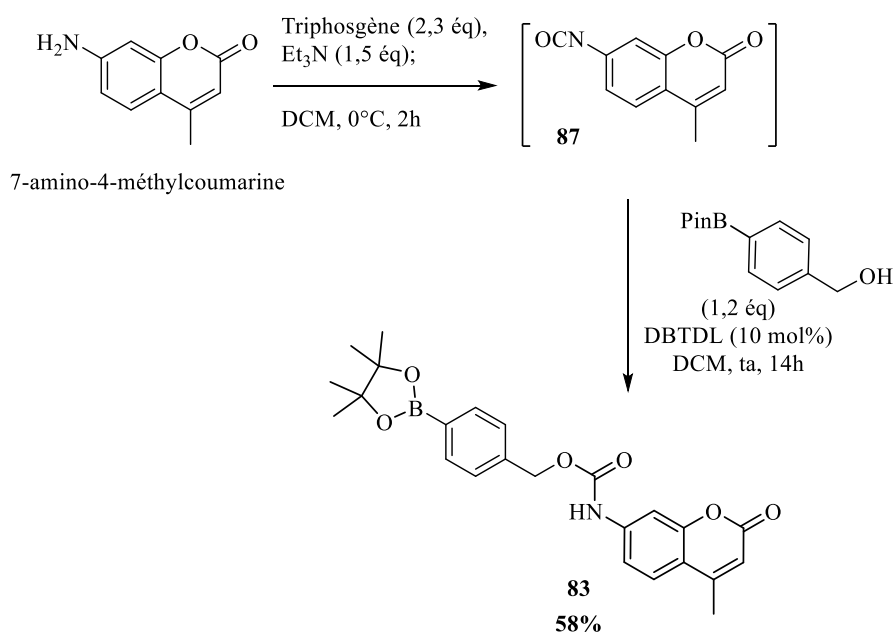


Schéma 117 : Synthèse du carbamate 83 à partir de l'isocyanate 87

Ces conditions ont été appliquées aux plateformes borinates précédemment formées à savoir **77**, **78** et **81**. Un premier couplage a été réalisé entre l'isocyanate **87** et le borinate **77** en présence de DBTDL (10 mol%). Après une purification sur gel de silice, le carbamate **88** a été obtenu avec un rendement modéré de 25% (**Schéma 118**).

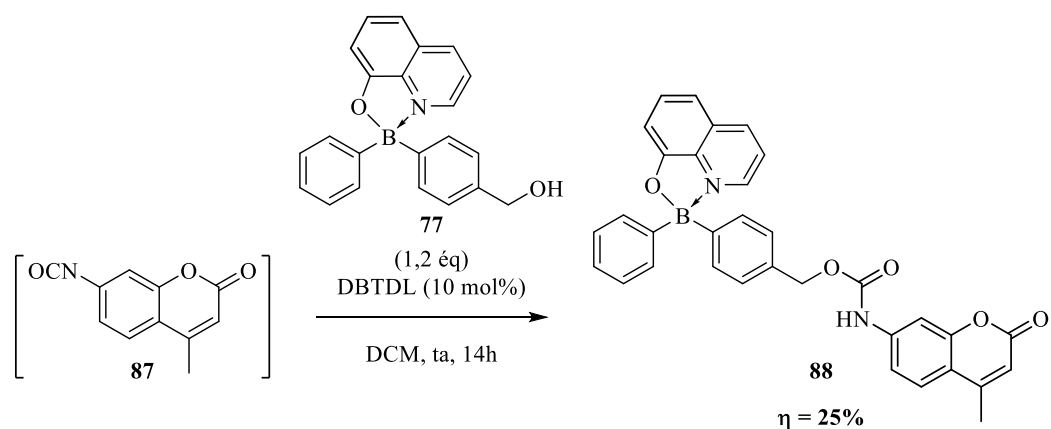


Schéma 118 : Synthèse du carbamate 88

Néanmoins, ce résultat reste très encourageant, et les synthèses des autres carbamates issus respectivement des borinates **78** ou **81** sont actuellement en cours d'évaluation (**Schéma 119**).

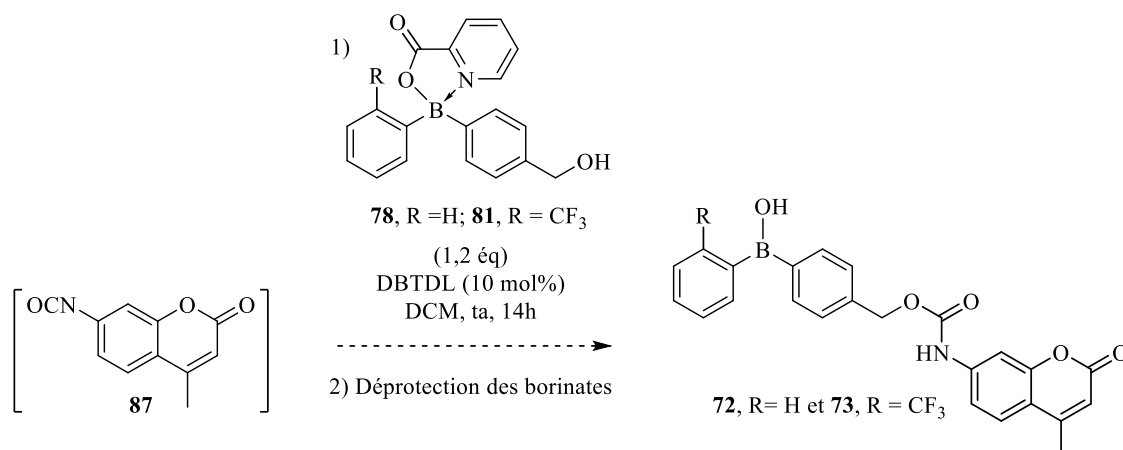


Schéma 119 : Synthèse envisagée pour former les sondes fluorogéniques 72 et 73

En conclusion, les borinates **77**, **78** et **81** ont été obtenus avec des rendements globaux de respectivement 49, 39 et 38%. L'obtention de la fonction carbamate a ensuite été optimisée sur un substrat modèle, l'ester 4-méthanolphénylboronique de pinacol. L'utilisation de l'isocyanate de la 7-amino-4-méthylcoumarine **87** a permis d'obtenir le carbamate **83** avec un rendement de 58%. Ces conditions ont été ensuite utilisées pour synthétiser un premier borinate **88** possédant un bras carbamate avec un rendement de 25%. Ces résultats sont prometteurs pour l'obtention des sondes fluorogéniques **72** et **73**.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les formes réactives de l'oxygène (FRO) sont impliquées dans de nombreux processus biologiques. Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , forme la plus stable des FRO, joue un rôle important comme molécule de signalisation dans la régulation de nombreux processus biologiques. Cependant, une production excessive ou une accumulation de cette espèce peut conduire à une situation pathologique responsable du stress oxydant responsable à terme de certaines maladies neurodégénératives, diabète ou cancers.

De nombreuses méthodes de détection du peroxyde d'hydrogène ont donc été développées et sont actuellement employées pour comprendre son rôle dans les mécanismes physiologiques et pathologiques. Les méthodes basées sur l'utilisation de sondes organiques ont été popularisées ces dernières années par le développement des sondes fluorogéniques basées sur une amorce boronate. Une très grande variété de sondes fluorogéniques basées sur cette amorce a été étudiée (sondes ratiométriques, sondes ciblant des compartiments cellulaires, sondes multimodales...). Néanmoins, cette amorce possède une cinétique d'oxydation vis-à-vis du H_2O_2 relativement lente (0.1 à 1 $M.s^{-1}$). Le peroxyde d'hydrogène, étant une espèce qui diffuse rapidement dans les milieux biologiques, la résolution spatio-temporelle de ces sondes risque d'être limitée. Il est donc nécessaire de poursuivre le développement et la recherche de nouvelles amorces réagissant beaucoup plus rapidement avec le H_2O_2 .

L'objectif de cette thèse a été de développer une nouvelle amorce basée sur un motif borinique et de comparer sa réactivité vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène par rapport à celle d'un motif boronique (**Figure 66**).

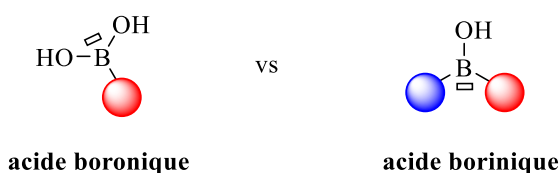


Figure 66 : Rappel de la structure des motifs boronique et borinique

La première partie de ce travail a consisté à s'assurer que les acides boriniques réagissaient plus rapidement que les acides boroniques avec le H_2O_2 . Ce concept a été validé en comparant, par spectroscopie RMN du proton, la vitesse d'oxydation de l'acide diphenylborinique à celle de l'acide phenylboronique. Ainsi, l'acide diphenylborinique est complètement oxydé en moins de deux minutes par le peroxyde d'hydrogène alors que plus de deux heures sont nécessaires pour oxyder l'acide phenylboronique.

Pour déterminer précisément les constantes de vitesse relatives à cette réaction d'oxydation, la synthèse d'une sonde fluorogénique dissymétrique **41** possédant la 4-méthylcoumarine comme plateforme pro-fluorescente a été synthétisée en 4 étapes à partir de la 4-méthylumbellifère avec un rendement global de 10%. La synthèse de ce type de sonde a nécessité une protection intermédiaire de l'acide borinique sous forme d'ester boronique dérivé d'aminoéthanol afin de pouvoir l'isoler par précipitation. (**Figure 67**).

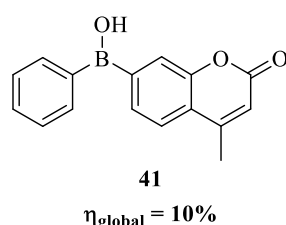


Figure 67 : Structures des sondes fluorogéniques à amorce borinique 30, 32 et 41 étudiées

La réactivité de la sonde dissymétrique **41** vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène a ensuite été comparée à celle de l'acide boronique **42** correspondant. En collaboration avec Pr. L. Jullien et le Dr. T. Le Saux à l'ENS Ulm, les constantes cinétiques de ces réactions ont été calculées. L'acide borinique **41** possède une constante de vitesse d'oxydation environ 10 000 plus rapide à celle de l'acide borinique correspondant **42** ($1.9 \times 10^4 \text{ M.s}^{-1}$ par rapport à 1.85 M.s^{-1} à 25°C) (**Schéma 120**). Compte-tenu de la structure des acides boriniques dissymétriques, deux couples de produits alcool/acide boronique peuvent se former en présence d'un équivalent de peroxyde d'hydrogène. Grâce à un suivi par RMN du proton, la régiosélectivité de la réaction a pu être déterminée : seulement 20% du réarrangement oxydatif conduit à la libération directe de la 4-méthylumbellifère.

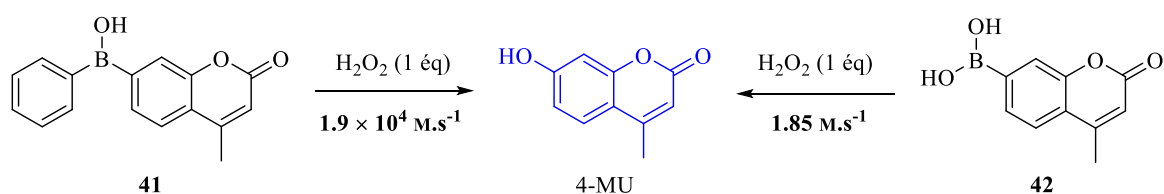
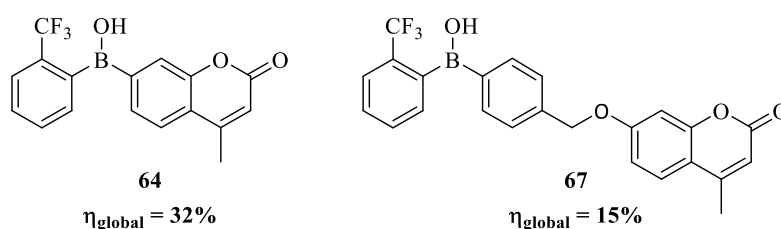


Schéma 120 : Résumé des constantes d'oxydation de l'acide borinique 41 et de l'acide borinique 42

Des tests de sélectivité de l'acide borinique **41** vis-à-vis d'autres FRO ont ensuite été réalisés. Tout comme l'acide borinique **42**, la sonde **41**, s'est avérée être plus réactive vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène que des autres FRO testées. Avec tous ces résultats prometteurs, des expériences *in cellula* ont été réalisés en collaboration avec le Pr. M. Erard à l'ICP. Ces tests ont montré que l'acide borinique **41** permettait de détecter plus rapidement le peroxyde d'hydrogène produit par des cellules COS7^{gp91-p22}.

Dans une deuxième partie, une librairie d'acides boroniques modèles a été synthétisée pour étudier la sélectivité de la réaction d'oxydation et donc d'augmenter la libération directe du fluorophore. L'étude des réactions d'oxydation de ces produits a permis d'identifier un substituant, le 2-trifluorométhylphényle orientant sélectivement la réaction d'oxydation d'acides boroniques dissymétriques par le peroxyde d'hydrogène vers la libération d'un seul couple de produits. Deux nouvelles sondes fluorogéniques **64** et **67** possédants ce substituant sur l'atome de bore ont été synthétisées avec des rendements globaux de 32 et 15% à partir de la 4-MU ou du 4-méthanolbromobenzène (**Figure 68**). La réaction d'oxydation de ces sondes a conduit uniquement à la formation de 4-MU. En revanche, la faible solubilité de ces composés constitue une limitation importante. Il faudrait donc trouver un substituant alternatif permettant toujours d'orienter la sélectivité de la réaction d'oxydation tout en augmentant la solubilité des sondes fluorogéniques. A défaut, de nouvelles fonctions hydrosolubles pourraient être incorporées au motif 2-trifluorométhylphényle. L'obtention de ces nouvelles sondes permettrait de déterminer précisément leur cinétique d'oxydation par spectroscopie de fluorescence.



*Figure 68 : Structures des sondes fluorogéniques à amorce borinique **64** et **67***

L'étape limitante de la synthèse des acides boroniques est l'addition d'un aryllithien sur un ester boronique. Afin d'optimiser ces synthèses, l'utilisation de plateformes boroniques sur lesquelles seraient greffées un fluorophore via un espaceur auto-immolable ont été envisagées. Ainsi, trois borinates **77**, **78** et **81** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 49, 39 et 38%. Ces plateformes devraient permettre à terme d'augmenter la diversité des fluorophores accessibles pour former des sondes fluorogéniques possédant une amorce borinique. Avant d'entreprendre la synthèse d'une sonde fluorogénique possédant un espaceur auto-immolable de type de carbamate, deux séquences réactionnelles ont été réalisées sur un substrat modèle. Cette étude nous a permis de déterminer la voie de synthèse la plus performante qui repose sur la formation d'un isocyanate dérivé de la 7-amino-4-méthylcoumarine. Le carbamate modèle a été obtenu rendement de 58%. Cette séquence réactionnelle a ensuite été appliquée à une des plateformes synthétisées pour conduire à l'ester borinique **88** avec un rendement de 51% (**Figure 69**).

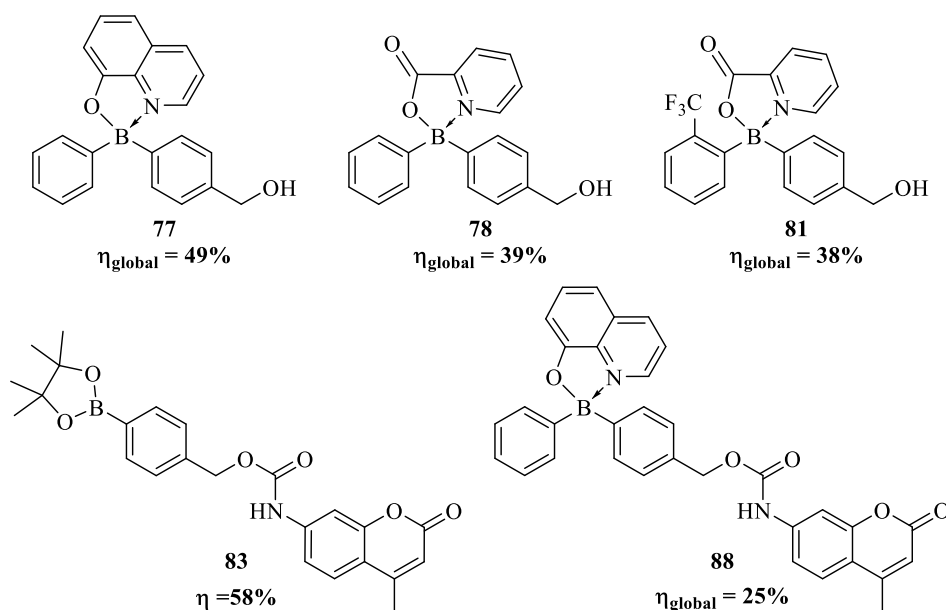


Figure 69 : Structures des plateformes boriniques 77, 78, 81 et des carbamates 83 et 88

En perspective, la synthèse de l'acide borinique possédant le groupement 2-trifluorométhylphényle et dans lequel la 7-amino-4-méthylcoumarine serait liée à l'atome de bore via un espaceur de type carbamate devra être achevée. Ainsi, les cinétiques de trois types de sondes fluorogéniques, sondes dans lesquelles l'amorce borinique est soit directement liée à l'agent fluorescent soit par l'intermédiaire d'un espaceur auto-immolable de type éther ou carbamate pourront être comparées. Cette étude permettra de déterminer les meilleures structures pour une application biologique.

De plus, il serait intéressant d'étendre l'utilisation de l'amorce acide borinique à l'élaboration de sondes fluorogéniques possédant des fluorophores plus adaptés comme des BODIPY ou des dérivés de fluorescéine pour l'imagerie cellulaire.

Enfin, l'élaboration de pro-drogues dite théranostiques pourra être envisagée. Cette approche consiste à combiner un outil d'imagerie (un agent fluorescent) à un principe actif et permet alors de s'assurer que ce dernier atteint sa cible thérapeutique. Par exemple, l'utilisation d'une plateforme borinique possédant un espaceur auto-immolable de type carbamate pourra être utilisée pour relier à un principe actif fluorescent comme par exemple la doxorubicine ($\lambda_{em} = 595$ nm pour $\lambda_{ex} = 470$ nm) pour former la pro-drogue **89** (Schéma 121).¹⁷²

¹⁷² S. Shah, A. Chandra, A. Kaur, N. Sabnis, A. Lacko, Z. Gryczynski, R. Fudala, I. Gryczynski, *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *170*, 65-69.

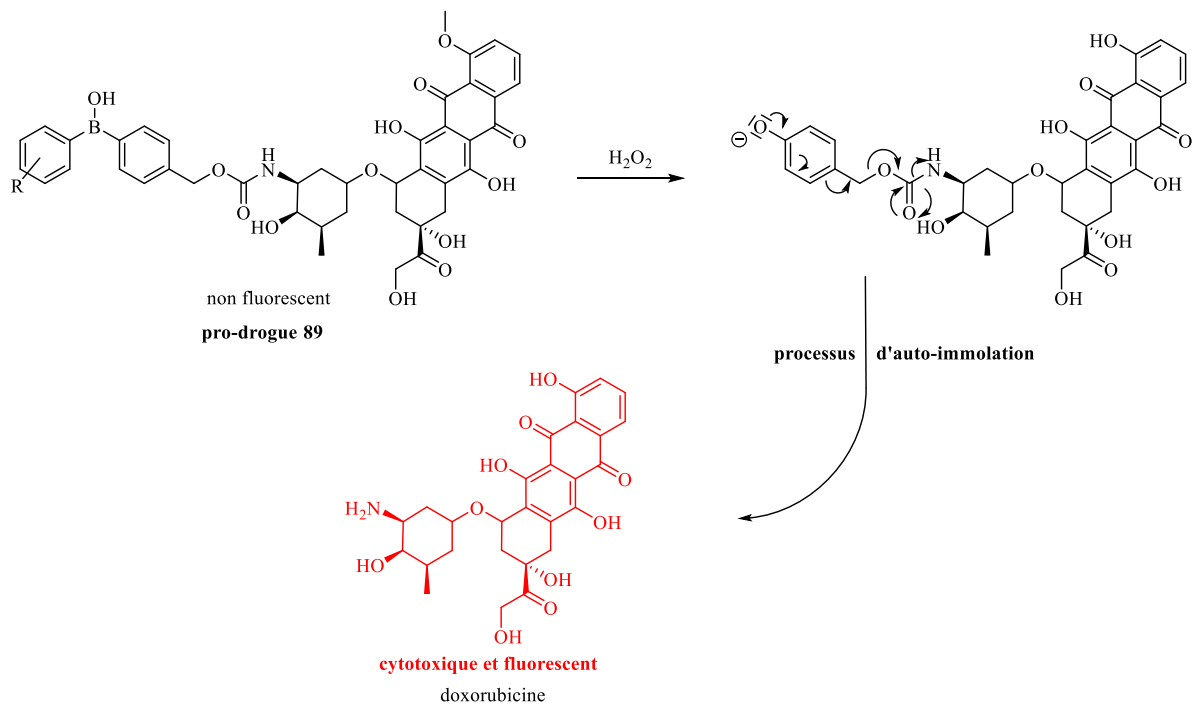


Schéma 121 : Oxydation de la pro-drogue 89 par le peroxyde d'hydrogène

EXPERIMENTAL SECTION

EXPERIMENTAL SECTION

I. Synthesis

Unless noted otherwise, all reactions were performed in flame-dried glassware under a positive pressure of argon. All chemical reagents were purchased from chemical suppliers and used without further purifications. 2-aminoethanol was distilled before use. Dry dichloromethane was obtained using Glass Technology GT S100 device. Tetrahydrofuran (THF) and diethyl ether (Et₂O) were distilled from Na/benzophenone prior to use.

The reactions were monitored by NMR spectroscopy or analytical thin-layer chromatography (TLC). Thin layer chromatography was performed over Merck 60 F254 with detection by UV light ($\lambda = 254$ and 354 nm), and/or by charring with sulfuric acid, KMnO₄, phosphomolybdic acid or vanillin solutions. Silica gel 60 (40-63 μm) was used for flash column chromatography.

NMR spectra were recorded on Bruker AV300 and AV360 NMR spectrometers using the residual protonated solvent as internal standard at room temperature unless otherwise stated. For ¹¹B experiments, chemical shifts are given in ppm relative to BF₃.Et₂O (0 ppm) as an external standard. ¹³C signals belonging to boron-carbon bound were generally not observed due to quadrupolar relaxation. Chemical shifts (δ) are given in *parts per million* (ppm), were determined relative to residual non-deuterated solvent as an internal reference respectively CDCl₃, CD₂Cl₂, CD₃CN, (CD₃)₂SO (¹³C NMR: $\delta = 77.2$; 53.8 ; 118.3 ; 39.5 ppm; ¹H NMR: $\delta = 7.26$; 5.32 ; 1.94 ; 2.50 ppm). Coupling constant(s) in Hertz (Hz) were measured from one-dimensional spectra. Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (br s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), sextet (sext), heptet (hept), doublet of doublet (dd). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a MicroTOFq Mass Spectrometer equipped with an electrospray interface (ESI positive or negative mode) by the analytical services of our Institute.

1. Arylborinic acids

General Procedure A: borinic acids synthesis

To a solution of commercially available aryl(pinacolato)borane (1.0 equiv) in dry THF (c 0.15M), cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, was added a 1.9M solution of phenyl lithium in *n*-Bu₂O (1.1 equiv) dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ before quenching with a 2M HCl solution in Et₂O (9 equiv). The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for further 1 hour. The mixture was then diluted with Et₂O and water. The aqueous layer was extracted twice with Et₂O. All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The collected residue afforded pure borinic acid derivatives or was purified by flash chromatography on silica gel to afford pure borinic acid derivatives.

General Procedure B: borinate synthesis

To a solution of commercially available aryl(pinacolato)borane (1.0 equiv) in dry THF (c 0.15M), cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, was added a 1.9M solution of phenyl lithium in *n*-Bu₂O (1.1 equiv) dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ before quenching with a 2M HCl solution in Et₂O (9 equiv). The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for further 1 hour. The mixture was then diluted with Et₂O and water. The aqueous layer was extracted twice with Et₂O. All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (10.0 mL per 1.0 mmol) and 2-aminoethanol, *N,N*-dimethylaminoethanol, *N,N*-dimethylaminopropanol, 2-(methanol)pyridine, *S*-alanine or 8-hydroxyquinoline (1.2 equiv) was added. Precipitation appeared immediately and the suspension was stirred at room temperature overnight. The solid was then filtered off, washed with ice-cold pentane and dried under vacuum to afford pure borinate derivatives.

General Procedure C: borinate synthesis

To a solution of commercially available arylbromide (1.2 equiv) in dry THF (c 0.3M), cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, was added a 1.4M solution of *sec*-BuLi (1.8 equiv) dropwise. The mixture was stirred for 30 minutes at the same temperature. Then a solution of phenylboronic acid pinacol ester (1.0 equiv) in THF (c 0.15M) was added dropwise with a cannula. The resulting mixture was stirred for additional 4h at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ before quenching with a 2M HCl solution in Et₂O (9 equiv). The reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for further 1 hour. The mixture was then diluted with Et₂O and water. The aqueous layer was extracted twice with Et₂O. All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (10.0 mL per 1.0 mmol) and 2-aminoethanol (2.0 equiv) was

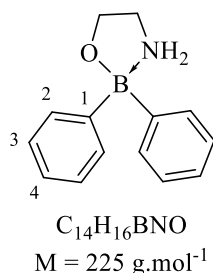
added. Precipitation appeared immediately and the suspension was stirred at room temperature overnight. The solid was then filtered off, washed with ice-cold pentane, dried under vacuum to afford pure borinate derivatives.

General Procedure D: hydrolysis of borinate derivatives

To a solution of 2-aminoethyl or 8-hydroxyquinoline borinate in Et₂O (for 2-aminoethanol and 2,2-dimethylaminoethanol derivatives) or CH₃CN (for 8-hydroxyquinoline derivatives) (c 0.35M) was added a 2M aqueous HCl solution (3.0 mL per 1.0 mmol). The mixture was vigorously stirred at room temperature until the disappearance of the starting material. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×5 mL). The combined organic layers were washed with brine solution (10 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to give pure borinic acid.

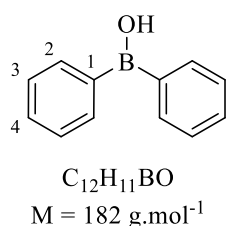
a) Symmetrical borinates and borinic acids

2'-Aminoethyl phenylborinate **24**¹¹⁴



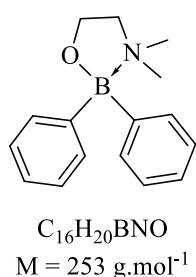
Prepared from pinacol phenylboronate (316 mg, 1.55 mmol) according to the general procedure B. The desired borinate was isolated (343 mg, 1.52 mmol, $\eta = 98\%$) as an amorphous white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.33; 1H NMR (CD_3OD , 300 MHz): δ 7.41 (d, 4H, $J = 7.3$ Hz, H-2), 7.19 (t, 4H, $J = 7.3$ Hz, H-3), 7.10 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-4), 3.95 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, CH_2-O), 3.01 (t, 2H, $J = 6.5$ Hz, CH_2-N); ^{13}C NMR (CD_3OD , 90 MHz): δ 133.1 (C-2), 128.2 (C-3), 126.9 (C-4), 64.1 (CH_2-O), 42.7 (CH_2-N); ^{11}B NMR (CD_3OD , 96 MHz): δ 4.9 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{14}H_{15}BNO$ [M-H]: 224.1255, found: 224.1252. In accordance with the literature.¹¹⁸

Phenyl borinic acid **23**¹¹⁴



Prepared from (2'-aminoethyl)diphenylborinate (339 mg, 1.51 mmol) according to the general procedure D. The pure borinic acid was isolated (187 mg, 1.03 mmol, $\eta = 68\%$) as a colorless oil, which spontaneously crystallized as an amorphous white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.35; 1H NMR ($CDCl_3$, 360 MHz): δ 7.82 (d, 4H, $J = 7.9$ Hz, H-2), 7.56-7.41 (m, 6H, H-3 and H-4), 5.83 (br s, 1H, OH); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 136.0 (C-1), 134.9 (C-2), 131.3 (C-4), 128.1 (C-3); ^{11}B NMR ($CDCl_3$, 96 MHz): δ 45.9 (s). The 1H , ^{13}C and ^{11}B data were consistent with those reported in the literature.¹⁷³

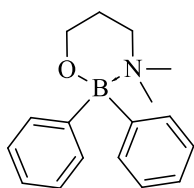
2-(*N,N*-Dimethylamino)ethyl phenylborinate **25**¹¹⁴



Prepared from pinacol phenylboronate (125 mg, 0.613 mmol) according to the general procedure B. The desired borinate was isolated (121 mg, 0.478 mmol, $\eta = 78\%$) as a grey/white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.68; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.62 (d, 4H, $J = 7.0$ Hz, H-Ar), 7.14 (t, 4H, $J = 7.0$ Hz, H-Ar), 7.05 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz, H-Ar), 4.14 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, CH_2-O), 2.415 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, CH_2-N); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 132.8, 127.5, 126.5 (C-Ar), 60.8 (CH_2-O and CH_2-N), 47.4 (CH_3-N); ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$): δ 8.8 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{16}H_{21}BNO$ [M+H]⁺: 254.1714 found: 254.1704. In accordance with the literature.¹⁵²

¹⁷³ T. M. El Dine, J. Rouden, J. Blanchet, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 16084-16087.

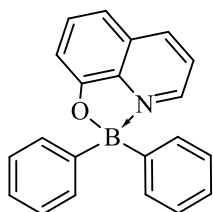
2-(*N,N*-Dimethylamino)propyl phenylborinate 26¹¹⁴



$C_{17}H_{22}BNO$
 $M = 267 \text{ g.mol}^{-1}$

Prepared from phenylboronic acid pinacol ester (125 mg, 0.613 mmol) according to the general procedure B. The desired borinate was isolated (128 mg, 0.479 mmol, $\eta = 78\%$) as a grey/white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.72; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (d, 4H, $J = 7.3$ Hz, H-Ar), 7.19-7.33 (m, 6H, H-Ar), 3.86 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2-O), 3.21 (t, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2-N), 2.61 (s, 6H, CH_3-N), 1.90 (q, 2H, $J = 5.8$ Hz, CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 134.4, 127.2, 126.6 (C-Ar), 60.9 (CH_2-O), 59.9 (CH_2-N), 47.9 (CH_3-N), 25.4 (CH_2); ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$): δ 12.3 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{17}H_{23}BNO$ $[M+H]^+$: 268.1870 found: 268.1859. In accordance with the literature.¹⁵²

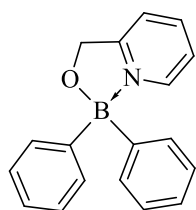
8-Hydroxyquinoline phenylborinate 27¹⁷⁴



$C_{21}H_{16}BNO$
 $M = 309 \text{ g.mol}^{-1}$

Prepared from phenylboronic acid pinacol ester (125 mg, 0.613 mmol) according to the general procedure B. The desired borinate was isolated (147 mg, 0.476 mmol, $\eta = 78\%$) as a yellow solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.60; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.60 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H-Ar), 8.40 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H-Ar), 7.69 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.62 (dd, 1H, $J = 8.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, H-Ar), 7.50 (dd, 4H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, H-Ar), 7.26-7.35 (m, 6H, H-Ar), 7.26 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.20 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 159.0 (CO), 139.5, 138.9, 137.8, 133.1, 132.2, 128.6, 127.8, 127.2, 122.9, 112.4, 109.9 (C-Ar). ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$): δ 11.8 (s). In accordance with the literature.¹⁷³

2-Methanolpyridine phenylborinate 28¹¹⁴



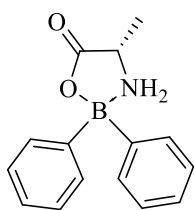
$C_{18}H_{16}BNO$
 $M = 273 \text{ g.mol}^{-1}$

Prepared from phenylboronic acid pinacol ester (125 mg, 0.613 mmol) according to the general procedure B. The desired borinate was isolated (134 mg, 0.491 mmol, $\eta = 80\%$) as a white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.65; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.44 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz, H-Ar), 7.99 (td, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H-Ar), 7.55 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-Ar), 7.49 (dd, 1H, $J = 7.8$, $J = 5.8$ Hz, H-Ar), 7.44 (dd, 4H, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.2$ Hz, H-Ar), 7.20-7.33 (m, 6H, H-Ar), 5.34 (s, 2H, CH_2-O); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 159.8 (CO), 141.4, 140.7, 132.8, 127.5, 126.6, 124.0, 120.2 (C-Ar), 69.1 (CH_2); ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$):

¹⁷⁴ J. Douglass, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 1312-1313.

δ 10.3 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_{18}H_{16}BNaNO$ $[M+Na]^+$: 296.1220 found: 296.1213. In accordance with the literature.¹¹⁹

2-(S)-Alanine phenylborinate **29**¹⁷⁵



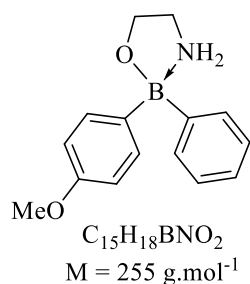
$C_{15}H_{16}BNO_2$
 $M = 253 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Prepared from phenylboronic acid pinacol ester (125 mg, 0.613 mmol) according to the general procedure B. The borinate was isolated (110 mg, 0.435 mmol, $\eta = 71\%$) as a grey/white solid. This compound is insoluble in most organic solvents (CH_3CN , DCM, $CHCl_3$, MeOH) and in water. **1H NMR** (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.38 (m, 4H, H-Ar), 7.21 (m, 4H, H-Ar), 7.14 (m, 2H, H-Ar), 3.55 (m, 1H, CH-N), 1.27 (d, 3H, $J = 7.5$ Hz, CH_3); **^{13}C NMR** (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ 175.3 (CO_2H) 131.3, 127.6, 126.4 (C-Ar), 51.2 (CH), 15.7 (CH_3); **^{11}B NMR** (96 MHz, $DMSO-d_6$): δ 4.7 (s).

¹⁷⁵ P. W. Gravelle, S. G. Bott, *J. Chem. Crystallogr.* **1995**, 25, 521-524.

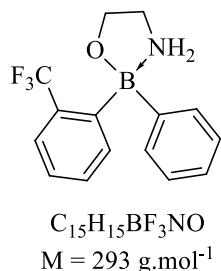
b) Unsymmetrical arylborinates

2-Aminoethyl (4-methoxyphenyl)(phenyl)borinate 51



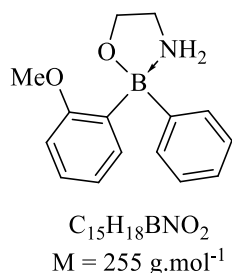
Prepared from 4-methoxyphenyl(pinacolato)borane (250 mg, 1.07 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (191 mg, 0.749 mmol, $\eta = 70\%$) as an amorphous grey/white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.65; 1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.37 (d, 2H, $J = 7.0$ Hz, H-Ar), 7.32-7.22 (m, 4H, H-Ar), 7.22 (t, 1H, $J = 7.0$ Hz, H-Ar), 6.81 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 4.23 (br s, 2H, NH_2), 3.82 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, CH_2-O), 3.76 (s, 3H, CH_3-O), 2.86 (m, 2H, CH_2-N); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 158.9 (CO), 133.3, 132.0, 127.8, 126.5, 113.4 (C-Ar), 63.6 (CH_2-O), 55.3 (CH_3-O), 42.9 (CH_2-N); ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$): δ 6.4 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{15}H_{19}BNO_2$ $[M+H]^+$: 256.1506, found: 256.1501.

2-Aminoethyl (phenyl)(2-trifluoromethylphenyl)borinate 52



Prepared from 2-trifluoromethylphenyl(pinacolato)borane (302 mg, 1.11 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (307 mg, 1.05 mmol, $\eta = 94\%$) as a grey/white solid; Obtained according to the general procedure C from 2-bromobenzotrifluoride (270 mg, 1.20 mmol). The desired product was isolated (116 mg, 0.396 mmol, $\eta = 40\%$) as an amorphous white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.80; 1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 7.96 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-Ar), 7.58 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-Ar), 7.52 (dd, 1H, $J = 7.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H-Ar), 7.34 (dd, 1H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H-Ar), 7.20-7.05 (m, 5H, H-Ar), 5.03 (br s, 2H, NH_2), 3.78 (m, 2H, CH_2-O), 3.02 (m, 2H, CH_2-N); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN): δ 135.2, 132.6, 131.6, 127.8, 127.3 (C-Ar), 127.0 (q, $^1J_{C-F} = 273$ Hz, CF_3), 126.6 (C-Ar), 63.3 (CH_2-O), 43.3 (CH_2-N); ^{11}B NMR (96 MHz, CD_3CN): δ 5.1 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{15}H_{16}BF_3NO$ $[M+H]^+$: 294.1274, found: 294.1267.

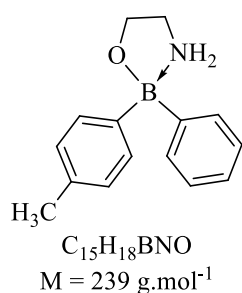
2-Aminoethyl (2-methoxyphenyl)(phenyl)borinate 53



Prepared from 2-methoxyphenyl(pinacolato)borane (250 mg, 1.07 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (208 mg, 0.816 mmol, $\eta = 76\%$) as an amorphous grey/white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.70; 1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.41 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-Ar), 7.34 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-Ar), 7.24-7.10 (m, 4H, H-Ar), 6.88 (dd, 1H, $J = 7.1$, $J = 7.3$ Hz, H-Ar), 6.85 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-Ar),

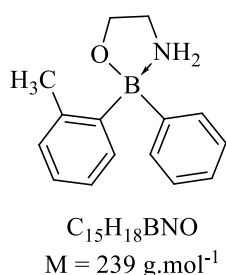
3.92-3.85 (m, 2H, CH₂-O), 3.83 (s, 3H, CH₃-O), 2.95 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz, CH₂-N); ¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ 161.8 (CO), 134.0, 131.9, 127.8, 127.6, 126.5, 121.4, 109.5 (C-Ar), 63.1 (CH₂-O), 55.2 (CH₃-O), 41.8 (CH₂-N); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂): δ 5.9 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₅H₁₉BNO₂ [M+H]⁺: 256.1506, found: 256.1517.

2-Aminoethyl (4-methylphenyl)(phenyl)borinate 54¹¹⁴



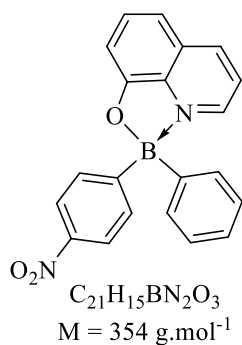
Prepared from 4-methylphenyl(pinacolato)borane (250 mg, 1.15 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (160 mg, 0.669 mmol, η = 58%) as an amorphous white solid. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.75; ¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.34 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, H-Ar), 7.13-7.29 (m, 5H, H-Ar), 7.07 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, H-Ar), 4.25 (br s, 2H, NH₂), 3.76 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz, CH₂-O), 2.78 (m, 2H, CH₂-N), 2.30 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ 135.7 (C^{IV}), 131.7 (2C), 128.2, 127.4, 126.2 (C-Ar), 63.1 (CH₂-O), 42.5 (CH₂-N), 20.9 (CH₃); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂): δ 6.6 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₅H₁₈BNNaO [M+Na]⁺: 262.1376, found: 262.1369.

2-Aminoethyl (2-methylphenyl)(phenyl)borinate 55¹¹⁴



Prepared from 2-methylphenyl(pinacolato)borane (235 mg, 1.08 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (142 mg, 0.594 mmol, η = 55%) as an amorphous white solid. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.65. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.42 (d, 1H, *J* = 5.3 Hz, H-Ar), 7.20 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz, H-Ar), 6.89-7.11 (m, 6H, H-Ar), 3.92 (bs, 2H, CH₂-O), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂-N), 2.13 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD): δ 142.0 (C^{IV}), 133.3, 132.2, 130.7, 128.0, 127.0, 126.8, 75.3 (C-Ar), 63.8 (CH₂-O), 43.0 (CH₂-N), 22.7 (CH₃); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₃OD): δ 7.9 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₅H₁₈BNNaO [M+Na]⁺: 262.1376, found: 262.1370..

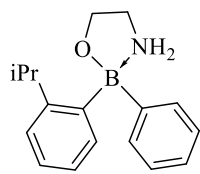
8-Hydroxyquinoline (4-nitrophenyl)(phenyl)borinate 56



Prepared from 4-nitrophenyl(pinacolato)borane (300 mg, 1.20 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (42 mg, 0.119 mmol, η = 10%) as an amorphous yellow solid. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.48; ¹H NMR (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.66 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz, H-Ar), 8.54 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H-Ar), 8.12 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-Ar), 7.74 (dd, 2H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 5.8 Hz, H-Ar), 7.68 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H-Ar), 7.42-7.37 (m, 3H, H-Ar), 7.34-7.26 (m, 3H, H-Ar), 7.24 (d, 1H,

$J = 7.8$ Hz, H-Ar); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_2Cl_2): δ 158.2, 147.3, 138.7, 139.6, 137.4, 132.9, 132.6, 131.7, 128.6, 127.7, 127.3, 123.2, 122.2, 112.9, 109.7 (C-Ar); ^{11}B NMR (96 MHz, CD_2Cl_2): δ 11.2 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BNO}_3$ [M-(hydroxyquinoline)-H] $^-$: 226.0683, found: 226.0678.

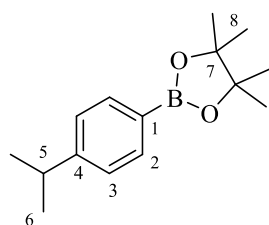
2-Aminoethyl (2-isopropyl)(phenyl)borinate **60**



$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{BNO}$
 $M = 267 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Prepared from 2-isopropylbromobenzene (201 mg, 1.01 mmol) according to the general procedure C. The desired product was isolated (108 mg, 0.405 mmol, $\eta = 48\%$) as an amorphous white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.70; ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 7.43 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-Ar), 7.29 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-Ar), 7.04-7.22 (m, 6H, H-Ar), 4.87 (br s, 2H, NH_2), 3.86 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.30 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H, $\text{CH-(CH}_3)_2$), 3.01 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $\text{CH-(CH}_3)_2$); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3CN): δ 153.4 (C^{IV}), 132.8, 132.0, 127.9, 127.2, 126.5, 125.9, 125.3 (C-Ar), 63.7 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 41.7 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 31.9 (CH), 24.9 (CH_3); ^{11}B NMR (96 MHz, CD_3CN): δ 6.8 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{BNO}$ [M+H] $^+$: 268.1870, found: 268.1865.

4-iso-Propylphenylpinacolboronate **62**¹⁷⁶



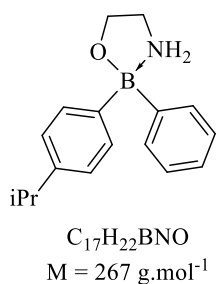
$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{BO}_2$
 $M = 246 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

A suspension of commercial 4-isopropylphenylboronic acid (500 mg, 3.05 mmol) and pinacol (540 mg, 4.58 mmol, 1.5 equiv) in THF (5.7 mL) was stirred at room temperature until complete dissolution of the solids. Na_2SO_4 (2.17 g, 15.3 mmol, 5 equiv) was then added. The mixture was stirred at room temperature for 2 days. The mixture was then filtered, and the solvents was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash-column chromatography on silica gel (petroleum ether/EtOAc, 95:5) to afford the expected product (537 mg, 2.18 mmol, $\eta = 72\%$) as an amorphous white solid. R_f (petroleum ether/EtOAc, 95:5): 0.88; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.77 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-Ar), 7.26 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-Ar), 2.93 (hept, 1H, $J = 6.9$ Hz, H-5), 1.35 (s, 12H, H-8), 1.27 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 152.3 (C-4), 135.0 (C-Ar), 125.9 (C-Ar), 83.6 (C-7), 34.4 (C-5), 29.4 (C-8), 23.9 (C-6); ^{11}B NMR (96 MHz, CDCl_3): δ 31.2 (s). In accordance with the literature.¹⁷⁷

¹⁷⁶ J.-Y. Cho, C. N. Iverson, M. R. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12868-12869.

¹⁷⁷ T. Dombay, C. G. Werncke, S. Jiang, M. Grellier, L. Vendier, S. Bontemps, J.-B. Sortais, S. Sabo-Etienne, C. Darcel, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4062-4065.

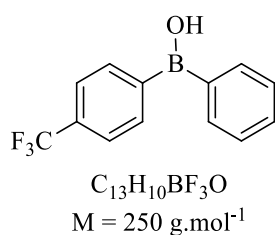
2-Aminoethyl (4-iso-propylphenyl)borinate **61**



Prepared from 4-isopropylphenylpinacolboronate (201 mg, 0.817 mmol) according to the general procedure B. The desired product was isolated (146 mg, 0.547 mmol, $\eta = 67\%$) as an amorphous white solid. R_f (petroleum ether/EtOAc, 95:5): 0.60; 1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.41 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-Ar), 7.32 (d, 2H, $J = 7.3$ Hz, H-Ar), 7.10-7.21 (m, 3H, H-Ar), 4.21 (br s, 2H, NH_2), 3.85-3.92 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH_2-O), 2.95 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz, CH_2-N), 2.85 (hept, $J = 6.9$ Hz, 1H, $CH-(CH_3)_2$), 1.22 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H, $CH-(CH_3)_2$); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 147.2 (C^{IV}), 132.2, 132.1, 127.8, 126.5, 125.9 (C-Ar), 63.5 (CH_2-O), 42.9 (CH_2-N), 34.2 (CH), 24.3 (CH_3); ^{11}B NMR (96 MHz, CD_2Cl_2): δ 6.1 (s). HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{17}H_{22}BNNaO [M+Na]^+$: 290.1690, found: 290.1681.

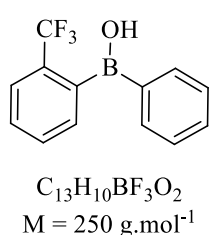
c) *Unsymmetrical arylborinic acids*

*B,B-(Phenyl)(4-trifluoromethylphenyl)borinic acid 43*¹¹⁴



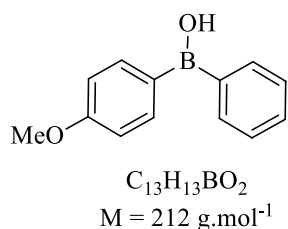
Prepared from 4-trifluoromethylphenyl(pinacolato)borane (300 mg, 1.10 mmol) according to the general procedure A gave the expected product as an amorphous solid which was washed with pentane to remove pinacol contaminant (10% in average) affording the expected product as a pale-yellow oil (117 mg, 0.468 mmol, $\eta = 42\%$). **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.30; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.89 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-Ar), 7.74 (d, 2H, $J = 7.5$ Hz, H-Ar), 7.67 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H-Ar), 7.53 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-Ar), 7.45 (dd, 2H, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-Ar), 6.04 (br s, 1H, OH); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 135.1, 134.8, 132.5, 131.7, 128.4, 124.8 (C-Ar), 124.2 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 270$ Hz, CF₃); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 46.0 (s); **¹⁹F NMR** (CDCl₃, 282 MHz): δ -63.0; **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₃H₉BF₃O [M-H]⁻: 249.0699, found: 249.0703.

B,B-(Phenyl)(2-trifluoromethylphenyl)borinic acid 44



Prepared from 2-aminoethyl (phenyl)(2-trifluorophenyl)borinate (200 mg, 0.682 mmol) according to the general procedure D. The desired product was isolated (156 mg, 0.624 mmol, $\eta = 91\%$) as a red oil. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.80. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, 3H, $J = 7.6$ Hz, H-Ar), 7.49-7.65 (m, 4H, H-Ar), 7.42 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, H-Ar), 5.97 (br s, 1H, OH); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 135.6, 132.1, 131.9, 130.8, 128.9, 127.8 (C-Ar), 124.1 (q, $^1J_{\text{C,F}} = 275$ Hz, CF₃); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 46.1 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₃H₁₀BF₃NaO [M+Na]⁺: 273.0671, found: 273.0660.

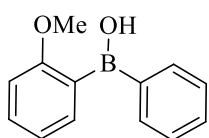
B,B-(4-Methoxyphenyl)(phenyl)borinic acid 45



Prepared from 4-methoxyphenyl(pinacolato)borane (250 mg, 1.07 mmol) according to the general procedure A. The desired product was isolated (117 mg, 0.552 mmol, $\eta = 52\%$) as yellow oil. Obtained according to the general procedure D from 2-aminoethyl (4-methoxyphenyl)(phenyl)borinate (43 mg, 0.169 mmol), the desired product was isolated (22 mg, 0.104 mmol, $\eta = 61\%$) as a pale-yellow oil. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.70; **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.83 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, H-Ar), 7.80 (dd, 2H, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.3$ Hz, H-Ar), 7.42-7.56 (m, 3H, H-Ar), 6.99-7.03 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, H-Ar), 5.92 (br s, 1H, OH), 3.89 (s, 3H, CH₃-O); **¹³C NMR** (150 MHz, CD₂Cl₂): δ 162.7

(CO), 137.5, 134.7, 131.0, 128.3, 113.8 (C-Ar), 55.0 (CH₃-O); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂) : δ 45.4 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₃H₁₃BNaO₂ [M+Na]⁺: 235.0903, found: 235.0900.

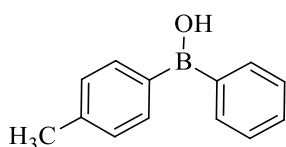
B,B-(2-Methoxyphenyl)(phenyl)borinic acid 46



C₁₃H₁₃BO₂
M = 212 g.mol⁻¹

Prepared from 2-aminoethyl (2-methoxyphenyl)(phenyl)borinate (42 mg, 0.165 mmol) according to the general procedure D. The expected product was obtained (20 mg, 94.3 μmol, η = 57%) as a pale-yellow oil. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.70. ¹H NMR (360 MHz, CD₂Cl₂) : δ 7.78 (dd, 2H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, H-Ar), 7.67 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.9 Hz, H-Ar), 7.40-7.52 (m, 4H, H-Ar), 7.05-7.00 (m, 2H, H-Ar), 3.96 (s, 3H, CH₃-O); ¹³C NMR (150 MHz, CD₂Cl₂) : δ 165.5 (CO), 140.0, 134.6, 133.1, 130.3, 127.8, 121.2, 110.6 (C-Ar), 55.8 (CH₃-O); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂) : δ 45.5 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₁₃H₁₃BNaO₂ [M+Na]⁺: 235.0903, found: 235.0898.

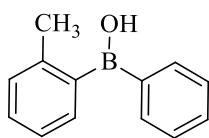
B,B-(4-Methylphenyl)(phenyl)borinic acid 47



C₁₃H₁₃BO
M = 196 g.mol⁻¹

According to the general procedure D from (4-methylphenyl)(phenyl)borinate (100 mg, 0.418 mmol), the desired product (55 mg, 0.281 mmol, η = 67%) was isolated as a pale-yellow oil. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.75. ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) : δ 7.79 (dd, 2H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, H-Ar), 7.71 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-Ar), 7.47-7.53 (m, 1H, H-Ar), 7.40-7.46 (m, 2H, H-Ar), 7.26 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-Ar), 5.82 (br s, 1H, OH), 2.41 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 141.6, 135.2, 134.8, 131.1, 129.0, 128.1 (C-Ar), 21.9 (CH₃); ¹¹B NMR (96 MHz, CDCl₃) : δ 45.9 (s).

B,B-(2-Methylphenyl)(phenyl)borinic acid 48

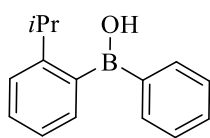


C₁₃H₁₃BO
M = 196 g.mol⁻¹

Prepared from 2-aminoethyl (phenyl)(2-methylphenyl)borinate (102 mg, 0.427 mmol) according to the general procedure D. After flash chromatography on silica gel (gradient of Cyclohexane/EtOAc from 9:1 to 1:1), the desired product was isolated (33 mg, 0.168 mmol, η = 39%) as a colourless oil. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3 v/v): 0.65; ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) : δ 7.80 (dd, 2H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-Ar), 7.53 (tt, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-Ar), 7.40-7.46 (m, 3H, H-Ar), 7.37 (td, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.4 Hz, H-Ar), 7.26 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, H-Ar), 5.86 (br s, 1H, OH), 2.39 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 140.8, 135.7,

132.6, 131.9, 129.9, 129.6, 128.1, 125.1 (C-Ar), 22.8 (CH₃); ¹¹B NMR (96 MHz, CDCl₃) : δ 47.6 (s).

B,B-(2-iso-Propylphenyl)(phenyl)borinic acid **59**

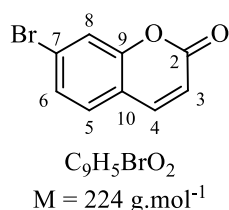


C₁₅H₁₇BO
M = 224 g.mol⁻¹

Prepared from 2-aminoethyl (2-iso-propylphenyl)(phenyl)borinate (50 mg, 0.187 mmol) according to the general procedure D. The desired product was isolated (16 mg, 71.4 μmol, η = 38%) as a colourless oil. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.65; ¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂) : δ 7.81 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H-Ar), 7.55 (t, 1H, J = 7.4 Hz, H-Ar), 7.41-7.49 (m, 4H, H-Ar), 7.38 (d, 2H, J = 7.3 Hz, H-Ar), 7.28 (t, 1H, J = 7.3 Hz, H-Ar); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂) : δ 47.8 (s).

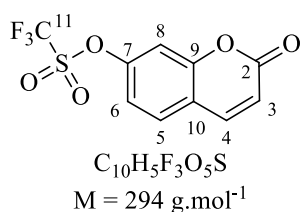
2. Coumarins

7-Bromocoumarin **31**¹⁷⁸



To an ice-cold mixture of 3-bromophenol (4.80 g, 27.7 mmol, 1.5 equiv) and malic acid (2.50 g, 18.7 mmol, 1 equiv), a 96% H_2SO_4 solution (6.5 mL, 122 mmol, 6.5 equiv) was added dropwise. The mixture was heated at $120^\circ C$ overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature and the mixture was poured into an ice water. No precipitation occurred, K_2CO_3 was added until the mixture formed a toothpaste. The solid was extracted with EtOAc (5×50mL). The organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. After purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 9:1 to 7:3), the expected product was obtained as a white solid (1.69 g, 7.54 mmol, $\eta = 40\%$). **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.40; **¹H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.69 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.52 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H-8), 7.24 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 1.6$ Hz, H-6), 7.20 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H-5), 6.45 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3); **¹³C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 160.1 (C-2), 154.5 (C-9), 143.0 (C-4), 129.0 (C-5), 128.1 (C-6), 126.0 (C-7), 120.4 (C-8), 118.0 (C-10), 117.1 (C-3); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_9H_5BrO_2$ $[M+H]^+$: 224.9551 found: 224.9545. In accordance with the literature.¹⁷⁹

7-(Trifluoromethanesulfonyloxy)coumarin **34**¹⁸⁰



To an ice-cold suspension of 7-hydroxycoumarin (1.00 g, 6.17 mmol, 1.0 equiv) in dry DCM (10 mL) and pyridine (1.2 mL, 12.4 mmol, 2 equiv), trifluoromethanesulfonic anhydride (1.2 mL, 7.15 mmol, 1.2 equiv) was added dropwise. The yellow clear solution was stirred 10 minutes at room temperature. The organic layer was successively washed with a 1M aqueous HCl solution (20 mL) and an aqueous saturated solution of $NaHCO_3$, dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was evaporated under vacuum to give the expected triflate derivative (1.775 g, 6.04 mmol, $\eta = 97\%$) as a pale-yellow solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.70; **¹H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.71 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.58 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-5), 7.24 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-8), 7.20 (dd, 1H, $J = 8.6$ Hz, $J = 2.2$ Hz, H-6), 6.46 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-3); **¹³C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 159.5 (C-2), 154.8 (C-9),

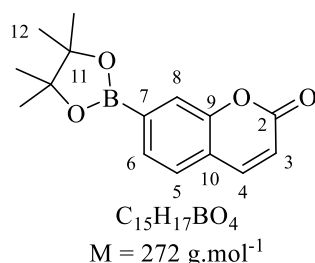
¹⁷⁸ N. V. Subba Rao, V. Sundaramurthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. India A* **1961**, 54, 105-108.

¹⁷⁹ Z. Feng, Y. Yu, X. Yang, D. Zhong, D. Song, H. Yang, X. Chen, G. Zhou, Z. Wu, *Inorg. Chem.* **2019**, 58, 7393-7408.

¹⁸⁰ S. Cacchi, P. G. Ciattini, E. Morera, G. Ortar, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5541-5544.

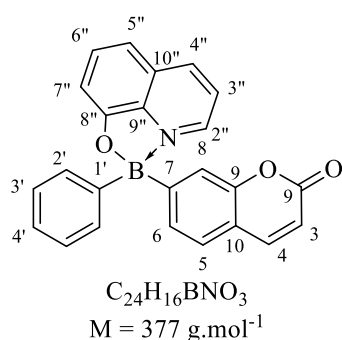
151.0 (C-7), 142.3 (C-4), 129.6 (C-5), 119.0 (C-10), 118.8 (C-11, $^1J_{C,F} = 318$ Hz), 118.0 (C-3 and C-6), 110.8 (C-8); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_{10}H_6F_3O_5S$ $[M+H]^+$: 294.9888 found: 294.9890. In accordance with the literature.¹⁸¹

Coumarin-7-pinacolboronate **33**¹⁸²



A mixture of [1-1'-bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II)•DCM complex (561 mg, 20 mol%), bis(pinacolato)diboron (1.04 g, 4.10 mmol, 1.2 equiv), dry potassium acetate (0.50 g, 5.10 mmol, 1.5 equiv) and 7-(trifluoromethanesulfonyloxy)coumarin (1.00 g, 3.40 mmol, 1 equiv) were dissolved in dry and degazed toluene (12 mL). The resulting mixture was irradiated at 120°C for 3 hours using a microwave reactor. The solvent was then removed under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 85:15 to 6:4) to afford the expected product, which is contaminated with pinacol (range from 10 to 30%). Recrystallization in DCM gave the pure product (720 mg, 2.65 mmol, $\eta = 78\%$) as colorless crystals. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.30. **¹H NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7.72 (s, 1H, H-8), 7.69 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.66 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-5), 7.47 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-6), 6.44 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3) 1.34 (s, 12H, H-12); **¹³C NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ 161.1 (C-2), 153.6 (C-9), 143.4 (C-4), 130.4, 127.3 (C-5 and C-6), 123.0 (C-8), 121.0 (C-10), 117.9 (C-3), 84.7 (C-13), 25.1 (C-12); **¹¹B NMR** (96 MHz, $CDCl_3$): δ 30.8 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_{15}H_{17}BNaO_4$ $[M+Na]^+$: 295.1115 found: 295.1119. In accordance with the literature.⁶⁶

8''-Hydroxyquinoline (7-coumaniryl)(phenyl)borinate **36**



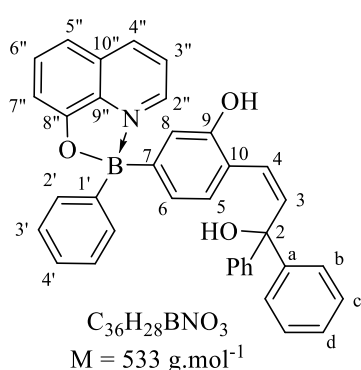
To a suspension of coumarin-7-pinacolboronate (500 mg, 1.84 mmol, 1.0 equiv) in dry Et_2O (7 mL, c 0.26M) cooled to -78 °C, was added dropwise a 1.9M solution of phenyl lithium in Bu_2O (1.00 mL, 1.84 mmol, 1.0 equiv). The reaction mixture was stirred at -78 °C for 4 hours then quenched with a 2M aqueous solution of HCl (7 mL) at -78 °C. The mixture was stirred for 1 hour at room temperature. Then the organic layer was collected, and the aqueous layer was extracted three times with Et_2O (3×7 mL). All organic layers were combined, dried

¹⁸¹ M. Chtchigrovsky, A. Primo, P. Gonzalez, K. Molvinger, M. Robitzer, F. Quignard, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5916-5920.

¹⁸² T. Ishiyama, Y. Itoh, T. Kitano, N. Miyaura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447-3450.

over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under vacuum. The crude product was dissolved in Et₂O (7 mL) and 8-hydroxyquinoline (267 mg, 1.84 mmol, 1.0 equiv) was added. The reaction was stirred overnight at room temperature. Pentane (12 mL) was added until the appearance of a green solid, which was filtered off, washed with cold pentane and dried under vacuum. The liquid phase contains mainly the starting material and the 8-hydroxyquinoline. The solid residue was purified by flash chromatography on silica gel (Heptane/EtOAc: gradient from 8:2 to 0:1) to furnish a portion of the remaining starting material (98 mg, 0.360 mmol, η = 20%), the by-product **46** (102 mg, 0.191 mmol, η = 10%) and the expected product (27 mg, 71.6 μ mol, η = 4%) as a yellow-orange solid. *R_f* (Heptane/EtOAc, 6:4): 0.23; ¹H NMR (CD₃CN, 300 MHz): δ 8.81 (1H, dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 0.9 Hz, H-2''), 8.61 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 0.9 Hz, H-4''), 7.79 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.78 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 5.1 Hz, H-3''), 7.69 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.7 Hz, H-6''), 7.46 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-6), 7.38 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 0.6 Hz, H-5''), 7.37 (dd, 2H, *J* = 7.9 Hz, *J* = 1.6 Hz, H-2'), 7.34 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, H-8), 7.29-7.20 (m, 3H, H-3' and H-4'), 7.16 (dd, 1H, *J* = 7.7 Hz, *J* = 0.6 Hz, H-7''), 6.28 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3); ¹³C NMR (CD₃CN, 75MHz): δ 162.2 (C-2), 159.3 (C-8''), 155.1 (C-9), 145.2 (C-4), 142.1 (C-2''), 141.4 (C-4''), 138.4 (C-9''), 133.9 (C-6''), 133.0 (C-2'), 130.0 (C-10''), 129.1 (C-3'), 129.0 (C-6), 128.5 (C-4'), 128.4 (C-5), 125.2 (C-3''), 120.2 (C-8), 119.0 (C-10), 116.9 (C-3), 114.6 (C-5''), 110.4 (C-7''); ¹¹B NMR (CD₃CN, 96 MHz): δ 11.5 (s); HRMS (ESI)⁺ *m/z* calculated for C₁₆H₁₂BO₅ [M-(hydroxyquinoline) F+ HCOOH-H]⁺ : 295.0783 found 295.0770.

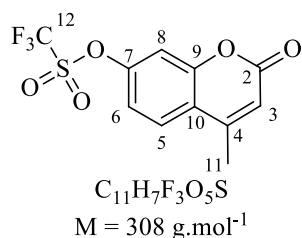
Compound 35



R_f (Heptane/EtOAc, 6:4): 0.32; ¹H NMR (360 MHz, CD₃CN): δ 8.64 (dd, 1H, *J* = 5.1 Hz, *J* = 1.0 Hz, H-2''), 8.59 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, H-4''), 7.77 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 5.2 Hz, H-3''), 7.70 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, *J* = 8.1 Hz, H-6''), 7.41-7.46 (m, 4H, H-b), 7.37 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-5''), 7.31-7.35 (m, 2H, H-2'), 7.18-7.29 (m, 7H, H-4', H-3' and H-c), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H-7''), 6.89 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.72 (d, 1H, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.67 (d, 1H, *J* = 12.4 Hz, H-4), 6.63 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.0, H-6), 6.42 (d, 1H, *J* = 12.4, H-3); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃CN): δ 158.3 (C-8''), 152.6 (C-9), 148.0 (C-a), 140.4 (C-2''), 139.6 (C-4''), 137.0 (C-3), 132.5 (C-6''), 131.8 (C-2'), 129.7 (C-5), 128.6 (C^{IV}), 127.8 (C-c), 127.4 (C-3' or C-d), 126.7 (C-4'), 126.5 (C-3' or C-d), 126.2 (C-4), 126.1 (C-b), 123.6 (C-3''), 122.8 (C-6), 122.5 (C^{IV}), 118.5 (C-8), 112.8 (C-5''), 108.7 (C-7''), 78.1 (C-2); ¹¹B NMR (96

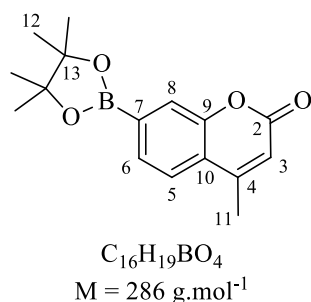
MHz, CDCl₃): δ 10.9 (s); **HRMS** (ESI)⁺ m/z calculated for C₂₇H₂₃BNaO₃ [M-hydroxyquinoline+Na]⁺: 429.1637 found 429.1621.

7-(Trifluoromethanesulfonyloxy) 4-methylcoumarin **38**¹⁸³



To an ice-cold solution of 7-hydroxy-4-methylcoumarin (1.00 g, 5.68 mmol, 1.0 equiv) in dry DCM (10 mL) and pyridine (1.0 mL, 12.4 mmol, 2.2 equiv), trifluoromethanesulfonic anhydride (1.2 mL, 7.15 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The brown clear solution was stirred 2 hours at room temperature. The organic layer was successively washed with a 1M aqueous HCl solution (20 mL) and a saturated solution of NaHCO₃, dried over Na₂SO₄ and filtered. The solvent was evaporated under vacuum to give the expected triflate (1.71 g, 5.55 mmol, η = 98%) as a brown solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.40; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.74 (d, 1H, J = 8.7 Hz, H-5), 7.31 (d, 1H, J = 2.4 Hz, H-8), 7.28 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz, H-6), 6.39 (d, 1H, J = 1.1 Hz, H-3), 2.50 (d, 3H, J = 1.1 Hz, H-11); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 159.7 (C-2), 154.3 (C-9), 151.4 (C-7), 151.0 (C-4), 126.6 (C-5), 120.3 (C-10), 118.8 (q, ¹J_{C,F} = 325 Hz, C-12), 117.6 (C-6), 116.2 (C-3), 110.7 (C-8), 19.0 (C-11); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₁H₇F₃NaO₅S [M+Na]⁺: 330.9858 found: 330.9856. In accordance with the literature.¹⁸⁴

4-Methylcoumarin-7-pinacolboronate **37**⁶⁶



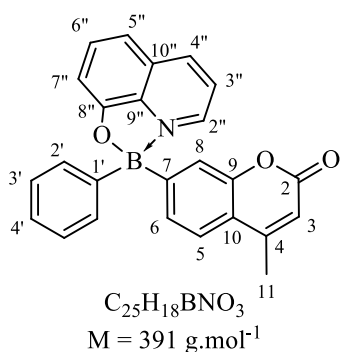
A mixture of [1-1'-bis(diphenylphosphino)-ferrocene]dichloropalladium(II)•DCM complex (270 mg, 10 mol%), bis(pinacolato)diboron (1.01 g, 3.98 mmol, 1.2 equiv), dry potassium acetate (485 mg, 4.95 mmol, 1.5 equiv) and 7-(trifluoromethanesulfonyloxy) 4-methylcoumarin (1.00 g, 3.25 mmol) were suspended in toluene (12 mL). The resulting mixture was irradiated in a sealed tube at 120°C for 3 hours using a microwave reactor. The solvent was then removed under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 9:1 to 7:3) to afford the expected product, which is contaminated with pinacol. Recrystallization from CH₂Cl₂ gave the pure ester boronic (600 mg, 2.10 mmol, η = 65%) as colorless crystals. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.40; **mp**: 161-162°C; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ : 7.71 (s, 1H, H-8), 7.67 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H-6), 7.56 (d, 1H, J

¹⁸³ J. Kövér, S. Antus, *Z. Naturforsch.* **2005**, 60b, 792-796.

¹⁸⁴ A. Mukhopadhyay, V. K. Maka, J. N. Moorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 4758-4767.

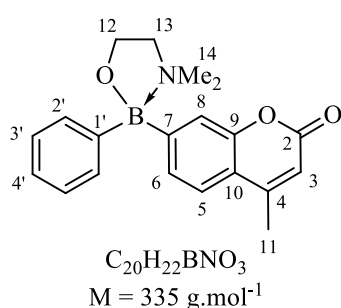
= 7.7 Hz, H-5), 6.30 (d, 1H, $J = 1.3$ Hz, H-3), 2.43 (d, 3H, $J = 1.3$ Hz, H-11) 1.34 (s, 12H, H-12) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ : 161.0 (C-2), 153.1 (C-9), 152.3 (C-4), 130.2 (C-6), 123.9 (C-5), 123.3 (C-8), 122.2 (C-10), 116.3 (C-3), 84.6 (C-13), 25.1 (C-12), 18.9 (C-11); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ : 30.6 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{BNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 309.1272 found: 309.1259. NMR data were in accordance with the literature.⁶⁶

8''-Hydroxyquinoline (7-(4-methylcoumanriny)) (phenyl)borinate 38



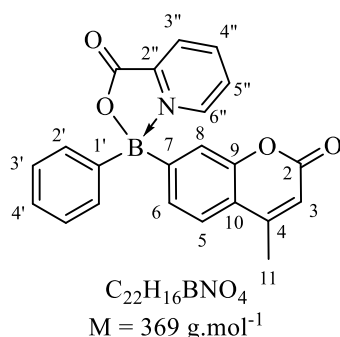
To a solution of 4-methylcoumarin-7-pinacolboronate (389 mg, 1.36 mmol, 1 equiv) in THF (13 mL) cooled to -78°C , a 1.4 M solution of PhLi in Bu_2O (1.07 mL, 1.5 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at -78°C . The mixture was carefully quenched with a 2M aqueous solution of HCl (5mL) at -78°C stirred for 10 minutes. Then the mixture was warmed up at rt and stirred for further 50 minutes. The mixture was diluted with H_2O (10 mL) and Et_2O (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et_2O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et_2O (10 mL) and hydroxyquinoline (203 mg, 1.4 mmol, 1.05 equiv) was added. The mixture was stirred overnight until a green precipitate was observed in the mixture. The resulting precipitate was filtrated, dried under vacuum to afford the expected product (137 mg, 0.350 mmol, $\eta = 26\%$) as a green solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.35; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.64 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, H-2''), 8.50 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4''), 7.71 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H-6''), 7.70 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 4.9$ Hz, H-3''), 7.53 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-5), 7.44 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.41 (d, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-2'), 7.34 (s, 1H, H-8), 7.33 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-5''), 7.27 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H-3'), 7.24 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-4'), 7.20 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-7''), 6.17 (s, 1H, H-3), 2.39 (s, 3H, H-11); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 161.6 (C-2), 158.6 (C-8''), 153.3 (C-9), 153.0 (C-4), 139.5 (C-2'' and C-4''), 137.7 (C-9''), 133.3 (C-6''), 132.0 (C-2'), 128.7 (C-4 or C-1'), 128.4 (C-6), 128.0 (C-3'), 127.6 (C-4'), 123.7 (C-5), 123.1 (C-3''), 119.7 (C-8), 118.8 (C-10), 114.4 (C-3), 112.9 (C-5''), 110.2 (C-7''), 18.8 (C-11); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ 11.2 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BNaO}_3$ $[\text{M-hydroxyquinoline} + \text{Na}]^+$: 287.0853 found 287.0856.

2-(*N,N*-Dimethylamino)ethyl (7-(4-methylcoumarinyl))(phenyl)borinate 39



To a solution of 4-methylcoumarin-7-pinacolboronate (400 mg, 1.40 mmol, 1 equiv) in THF (13 mL) cooled to -78°C , a 1.8 M solution of PhLi in Bu₂O (0.86 mL, 1.54 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at -78°C . The mixture was carefully quenched with a 2M aqueous solution of HCl (6 mL) at -78°C stirred for 10 minutes. Then the mixture was warm up at room temperature and stirred for further 50 minutes. The mixture was diluted with H₂O (10 mL) and Et₂O (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (5 mL) and 2-(*N,N*-dimethylamino)ethanol (280 μL, 2.8 mmol, 2 equiv) was added. The mixture was stirred overnight until a green precipitate was observed. The resulting precipitate was filtrated, dried under vacuum to afford the expected product (111 mg, 0.331 mmol, $\eta = 24\%$) as a pale-yellow solid; **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.53; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (s, 1H, H-8), 7.74 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2H-2'), 7.72 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-5), 7.50 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H-6), 7.30 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, 2H-3'), 7.21 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-4'), 6.22 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H-3), 4.32 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-12); 2.97 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, H-13); 2.64 (s, 6H, H-14), 2.41 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, H-11); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 161.8 (C-2), 153.1 (C-4 or C-9), 153.0 (C-4 or C-9), 132.6 (C-2'), 128.8 (C-5), 127.7 (C-3'), 126.8 (C-4'), 123.3 (C-6), 120.4 (C-8), 118.3 (C-10), 114.2 (C-3), 61.1 (C-13), 60.7 (C-12), 47.5 (C-14), 18.7 (C-11); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 8.2 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₆H₁₂BO₃ [M-(2(*N,N*-dimethylamino)ethanol)]⁻: 263.0888, found 263.0877.

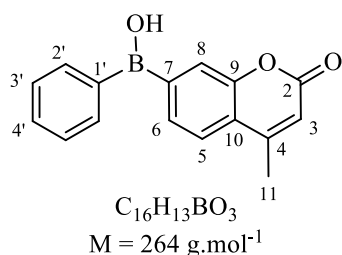
2''-Picolinic (7-(4-methylcoumarinyl))(phenyl)borinate 40



To a solution of 4-methylcoumarin-7-pinacolboronate (500 mg, 1.75 mmol, 1 equiv) in THF (12 mL) cooled to -78°C , a 1.9 M solution of PhLi in Bu₂O (1.01 mL, 1.92 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at -78°C . The mixture was carefully quenched with a 2M aqueous solution of HCl (8 mL) at -78°C stirred for 10 minutes. Then the mixture was warm up at room temperature and stirred for further 50 minutes. The mixture was diluted with H₂O (10 mL) and Et₂O (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (5 mL) and picolinic acid (258 mg, 2.10 mmol, 1.2

equiv) was added. The mixture was stirred overnight until a green precipitate was observed. The resulting precipitate was filtrated and dissolved in EtOAc. The organic solution was washed two times with NaOH (1M) to remove the excess of picolinic acid. All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and dried under vacuum to afford the expected borinate (74 mg, 0.201 mmol, $\eta = 11\%$) as a pale-green oil; *R_f* (EtOAc, 7:3): 0.60; ¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.75 (d, 1H, *J* = 5.6 Hz, H-6''), 8.44 (ddd, 1H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 7.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-4''), 8.37 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H-3''), 7.99 (ddd, 1H, *J* = 7.6 Hz, *J* = 5.6 Hz, *J* = 1.1 Hz, H-5''), 7.52 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, H-6), 7.29-7.37 (m, 3H, H-5 and H-2'), 7.22-7.29 (m, 4H, H-8, H-3' and H-4'), 6.17 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz, H-3), 2.38 (d, 3H, *J* = 0.9 Hz, H-11); ¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ 163.4 (C-1''), 161.2 (C-2), 153.5 (C-4 or C-9), 153.1 (C-4 or C-9), 144.3 (C-4''), 143.6 (C-2''), 142.3 (C-6''), 132.4 (C-2'), 129.9 (C-5''), 128.4 (C-5), 128.2 (C-3'), 128.1 (C-4'), 124.5 (C-6 or C-3''), 124.2 (C-6 or C-3''), 120.1 (C-8), 119.5 (C-10), 114.9 (C-3), 18.7 (C-11); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.5 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₂₂H₁₇BNO₄ [M+H]⁺: 370.1249, found 370.1232.

B,B-(Phenyl)(7-(4-methylcoumarinyl))borinic acid **41**



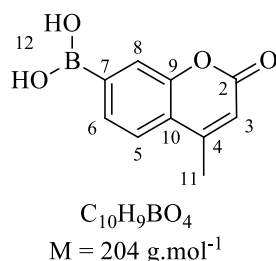
To a solution of 8''-hydroxyquinoline (7-(4-methylcoumarinyl)) (phenyl)borinate (30 mg, 76.7 μ mol, 1.0 equiv) in CH₃CN (1.5 mL, *c* 0.05M), was added, a aqueous 1M solution of HCl (1 mL). The *suspension* was stirred vigorously during overnight at 50°C. The mixture was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum.

Then the reaction mixture was purified by reversed phase chromatography (LUNA C-18 5 μ , 150 \times 4.60 mm, H₂O/CH₃CN, gradient from 9:1 to 1:1), to afford the expected borinic acid (0.9 mg, 3.41 μ mol, $\eta = 4\%$).

To a solution of 2-(*N,N*-dimethylamino)ethyl (7-(4-methylcoumarinyl))(phenyl)borinate (34 mg, 101 μ mol) in Et₂O (0.70 mL), was added a 1M aqueous HCl solution (0.7 mL). The reaction mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times 5 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum to afford the expected borinic acid (18.0 mg, 68.1 μ mol, $\eta = 67\%$) as a pale-green solid with small impurities (purity 93%). The solid was dissolved in a mixture of CH₃CN/H₂O (6:4, *c* 15 mg/mL) and was purified by reversed phase chromatography (LUNA C-18 5 μ , 150 \times 4.60 mm, H₂O/CH₃CN, isocratic 4:6), to afford the pure expected borinic acid. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.21; ¹H NMR (CD₂Cl₂, 600 MHz): δ 7.79 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 7.75-7.69 (m, 3H, H-5, H-6 and H-8), 7.55 (dd, 1H, *J* = 7.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, H-4'), 7.48 (dd,

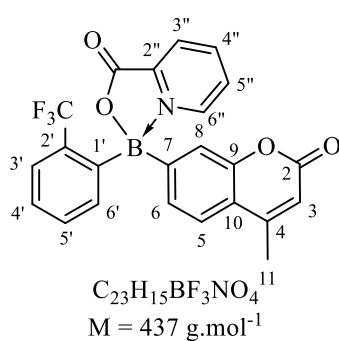
2H, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-3'), 6.32 (s, 1H, H-3), 2.47 (s, 3H, H-11); ^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75 MHz) : δ 161.0 (C-2), 153.4 (C-9), 152.8 (C-4), 135.0 (C-2'), 131.9 (C-4'), 130.3 (C-5), 128.5 (C-3'), 124.5 (C-6), 123.3 (C-8), 122.2 (C-10), 116.4 (C-3), 18.8 (C-11); ^{11}B NMR (CD_2Cl_2 , 96 MHz) : δ 45.2 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{BNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 287.0853, found: 287.0841.

7-(4-Methylcoumarinyl)boronic acid 42



4-Methylcoumarin-7-pinacolboronate (100 mg, 0.350 mmol) and methylboronic acid (63.0 mg, 1.05 mmol, 3.0 equiv) were added to a solution of TFA in dichloromethane (3.5 mL, 5% v/v).¹⁶² The solution was stirred for 4h at room temperature. The solution was concentrated under vacuum to afford the pure boronic acid (62 mg, 0.304 mmol, $\eta = 87\%$) as an amorphous white solid; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5): 0.40; ^1H NMR (360 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ : 7.73-7.70 (m, 3H, H-5, H-6 and H-8), 6.39 (d, 1H, $J = 0.9$ Hz, H-3), 2.42 (d, 3H, $J = 0.9$ Hz, H-11); ^{13}C NMR (90 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 160.2 (C-2), 153.4 (C-9), 152.5 (C-4), 129.9 (C-6), 124.5 (C-5), 121.7 (C-8), 121.0 (C-10), 115.1 (C-3), 18.2 (C-11); ^{11}B NMR (96 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : δ 29.0 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{BNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 227.0488, found: 227.0483.

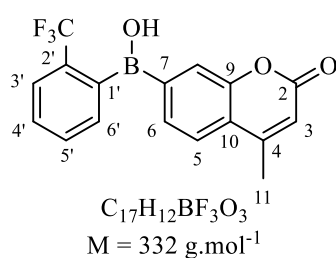
2''-Picolinic (7-(4-methylcoumarinyl))(2'-trifluoromethylphenyl)borinate 63



To a solution of bromotrifluorotoluene (286 μL , 2.05 mmol, 1.2 equiv) in THF (7.0 mL), cooled to -78°C , was added a 1.4M solution of *sec*-BuLi (2.2 mL, 3.08 mmol, 1.8 equiv) dropwise. The reaction was stirred for further 30 min at -78°C before adding to a dry ice-cooled solution of 4-methylcoumarin-7-pinacolboronate (500 mg, 1.75 mmol) in THF (4.0 mL). The reaction was stirred for 4 hours at -78°C and then quenched with a 2M solution of HCl in Et_2O (8.0 mL). The mixture was allowed to warm to room temperature. The mixture was diluted with water (10 mL) and Et_2O (15 mL). The aqueous layer was extracted twice with Et_2O (10 mL). All organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et_2O (10.0 mL) and 2-picolinic acid (260 mg, 2.11 mmol, 1.2 equiv) was added. The reaction was stirred overnight. The resulting precipitate was filtrated and dissolved in EtOAc . The organic solution was washed two times with NaOH (1M) to remove the excess of picolinic acid. All organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and dried under vacuum to

afford the expected borinate (581 mg, 1.33 mmol, $\eta = 76\%$) as an amorphous white solid; **R_f** (EtOAc): 0.55; **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.73 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, H-6''), 8.51 (dd, 1H, $J = 7.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-4''), 8.41 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, H-3''), 8.05 (dd, 1H, $J = 5.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H-5''), 7.72 (dd, 1H, $J = 3.8$ Hz, $J = 5.7$ Hz, H-3'), 7.56 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-6), 7.48-7.42 (m, 2H, H-4' and H-5'), 7.36-7.31 (m, 2H, H-5 and H-6'), 7.17 (s, 1H, H-8), 6.20 (s, 1H, H-3), 2.41 (s, 3H, H-11); **¹³C NMR** (90 MHz, CD₂Cl₂): δ 162.9 (CO), 160.7 (CO), 153.1 (C-4 or C-9), 152.7 (C-4 or C-9), 144.3 (C-4''), 143.6 (C-2''), 142.6 (C-6''), 135.9 (C-6'), 133.2 (q, $^2J_{C-F} = 30.4$ Hz, C-2'), 130.9 (C-4' or C-5'), 129.2 (C-5''), 128.1 (C-4' or C-5'), 127.3 (C-5), 126.7 (q, $^3J_{C-F} = 6.6$ Hz, C-3'), 124.1 (C-3''), 123.9 (C-6), 123.6 (C-10), 118.9 (C-8), 114.4 (C-3), 18.3 (C-11); **¹¹B NMR** (96 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.5 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₂₃H₁₆BF₃NO₄ [M+H]⁺: 438.1123, found: 438.1107

B,B-7-(4-Methylcoumarinyl)(2'-trifluoromethylphenyl)borinic acid 64

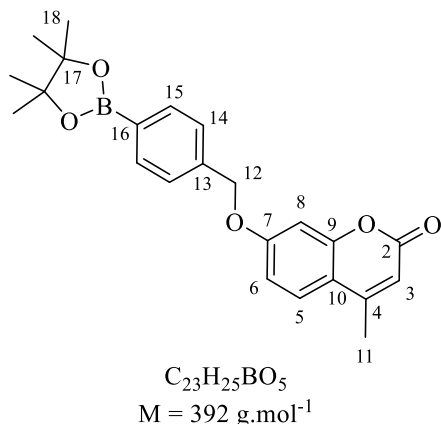


A 0.17M aqueous solution of lithium hydroxide monohydrate (1 mL, 0.17 mmol, 1.2 equiv) was added to a solution of borinate (60 mg, 0.137 mmol) in THF (1 mL). The reaction was stirred for 3 hours. Then, the solution was diluted with CH₂Cl₂. The organic layer was successively washed with a 1M aqueous HCl solution and a saturated aqueous NaHCO₃ solution to remove the excess of picolinic acid, dried over Na₂SO₄ and filtered. The solvent was then removed under vacuum. A flash column chromatography on silica gel (gradient of heptane/EtOAc: from 3:1 to 0:1) afforded the expected product (30 mg, 90.4 μ mol, 66%) as a white solid and the starting material (19 mg, 43.5 μ mol, $\eta = 31\%$); **R_f** (EtOAc): 0.74; **¹H NMR** (360 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.73 (br s, 1H, H-3'), 7.67-7.48 (m, 6H, H-5, H-6, H-8, H-4', H-5' and H-6'), 6.75 (br s, 1H, OH), 6.28 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H-3), 2.44 (d, 3H, $J = 1.2$ Hz, H-11); **¹³C NMR** (90 MHz, CD₂Cl₂): δ 160.9 (CO), 153.2 (C-9 or C-4), 152.7 (C-9 or C-4), 132.2 (q, $^2J_{C-F} = 31.7$ Hz, C-2'), 131.8, 131.5, 130.7, 129.6 (4C, C-5, C-4', C-5' and C-6'), 125.9 (q, $^3J_{C-F} = 3.9$ Hz, C-3'), 124.0, 123.7 (2C, C-6 and C-8), 122.9 (C-10), 116.6 (C-3), 18.7 (C-11); **¹¹B NMR** (115 MHz, CD₂Cl₂): δ 46.4 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₇H₁₁BF₃O₃ [M-H]⁻: 331.0762, found: 331.0757.

3. Probes with self immolative spacers

a) Ether link, boronic and borinic probes:

7-(*p*-Benzyl pinacolboronate)oxy-4-methylcoumarin **67**¹⁸⁵

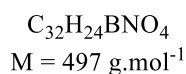
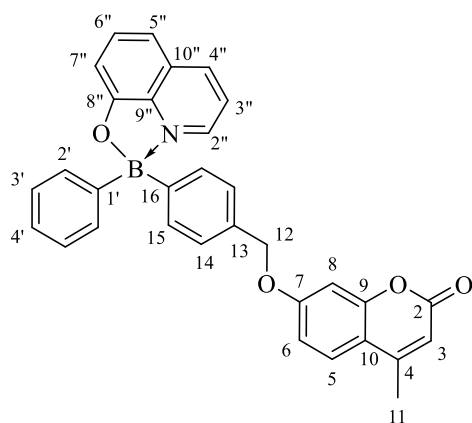


To an ice-cold solution of 7-hydroxy-4-methylcoumarin (503 mg, 2.86 mmol, 1 equiv) in DMF (9.5 mL) was added K_2CO_3 (470 mg, 3.41 mmol, 1.2 eq). Then 4-bromomethylphenylpinacolboronate (1.19 g, 3.05 mmol, 1.4 equiv) was added in small portions. The suspension was stirred at 70°C for 4 hours. The solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc and washed with water. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The organic layers

were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The collected residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 100:0 to 1:1). The expected product (1.0 g, 2.55 mmol, $\eta = 90\%$) was obtained as a white solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.44; 1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$): δ 7.80 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-**15**), 7.47 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H-**5**), 7.40 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-**14**), 6.90 (dd, 1H, $J = 8.9$ Hz, $J = 2.5$ Hz, H-**6**), 6.85 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H-**8**), 6.11 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H-**3**), 5.13 (s, 2H, H-**12**), 2.37 (d, 3H, $J = 1.3$ Hz, H-**11**), 1.32 (s, 12H, H-**18**); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 161.7 (C-**7**), 161.2 (C-**2**), 155.3 (C-**9**), 152.6 (C-**4**), 139.0 (C-**13**), 135.3 (C-**15**), 126.6 (C-**14**), 125.7 (C-**5**), 113.9 (C-**10**), 112.9 (C-**6**), 112.4 (C-**3**), 102.1 (C-**8**), 84.0 (C-**17**), 70.4 (C-**12**), 25.0 (C-**18**), 18.7 (C-**11**); ^{11}B NMR (96 MHz, $CDCl_3$): δ 31.6; HRMS (ESI): m/z calculated for $C_{23}H_{25}BNaO_5$ $[M+Na]^+$: 415.1691 found: 415.1671. In accordance with the literature.¹⁸⁵

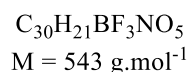
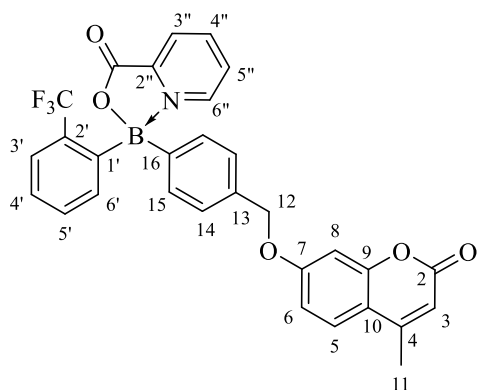
¹⁸⁵ S. Palanisamy, P. Y. Wu, S. C. Wu, Y. J. Chen, S. C. Tzou, C. H. Wang, C. Y. Chen, Y. M. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 849-856.

8''-Hydroxyquinoline (7-(p-benzyl)oxy-4-methylcoumarinyl)(phenyl)borinate **68**



To a solution of **67** (400 mg, 1.02 mmol, 1 equiv) in THF (14 mL) cooled to -78°C , a solution of PhLi in Bu₂O (1.3 M) (0.86 mL, 1.12 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at -78°C . The mixture was carefully quenched with a 2M aqueous solution of HCl (5mL) at -78°C stirred for 10 minutes. Then the mixture was warm up at rt and stirred for further 50 minutes. The mixture was diluted with H₂O (10 mL) and Et₂O (10 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (10 mL) and hydroxyquinoline (201 mg, 1.4 mmol, 1.4 equiv) was added. The mixture was stirred overnight until a green precipitate was observed in the mixture. The resulting precipitate was filtrated, dried under vacuum to afford the expected product (149 mg, 0.300 mmol, $\eta_c = 28\%$) as an amorphous solid which is contaminated with pinacol (an average of 20%). **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.40; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz, H-2''), 8.41 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-4''), 7.68 (dd, 2H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H-6''), 7.63 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 4.9$ Hz, H-3''), 7.45-7.55 (m, 5H, H-5, H-15, H-2'), 7.22-7.38 (m, 6H, H-14, H-3', H-8', H-5''), 7.20 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H7''), 6.92 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.88 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.13 (s, 1H, H-3), 5.11 (s, 2H, H-12), 2.38 (s, 3H, H-11); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 162.0 (CO), 161.5 (CO), 158.8 (CO), 155.3 (C-4 or C-9), 152.7 (C-4 or C-9), 139.4 (C-2''), 139.0 (C-4''), 137.6 (-C9''), 134.4 (C-13), 133.0 (C-6''), 132.5 (C-2' or C-15), 132.0 (C-2' or C-15), 128.6 (C-10''), 127.8 (C-3' or C-14), 127.2 (C-4'), 127.0 (C-3' or C-14), 125.6 (C-5), 122.9 (C-3''), 113.7 (C-10), 113.1 (C-6), 112.5 (C-3), 112.0 (C-5''), 109.9 (C-7''), 102.1 (C-8), 70.9 (C-12), 18.8 (C-11); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 12.8; **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₂₃H₁₉BNaO₄ [M-hydroxyquinoline+Na]⁺: 393.1272 found: 393.1262.

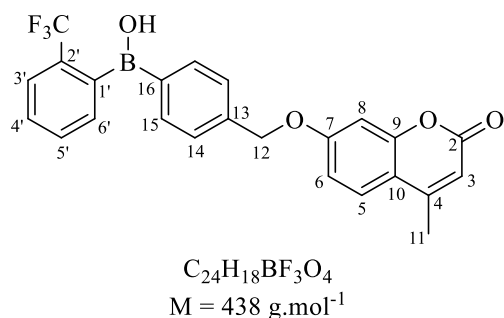
2''-Picolinic(7-(p-benzyl)oxy-4-methylcoumarinyl)(2'-trifluoromethylphenyl) borinate **69**



To a solution of 2-bromobenzotrifluoride (105 μL , 0.771 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (2.5 mL), cooled to -78°C , a 1.4 M *sec*-butyllithium solution in cyclohexane (840 μL , 1.18 mmol, 1.8 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred at -78°C for 30 minutes before adding to a solution of compound **67** (254 mg, 0.648 mmol) dissolved in dry THF (1.5 mL). The mixture was stirred at -78°C for 4 hours. The reaction was quenched with a 2M HCl solution in Et_2O (3.0 mL), allowed to warm up

at room temperature, and stirred for further 1 hour. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with water. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to afford a green-brown solid. The residue was dissolved in Et_2O (9.0 mL) and 2-picolinic acid (95 mg, 0.772 mmol, 1.2 equiv) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc. The solution was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash-column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 0:1) to afford the expected product (87 mg, 0.160 mmol, $\eta = 25\%$) as a green solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 3:7): 0.20; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl_3): δ 8.68 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, H-6''), 8.45-8.35 (m, 2H, H-3'', H-4''), 7.93 (m, 1H, H-5''), 7.68 (m, 1H, H-3'), 7.51 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-5), 7.47-7.38 (m, 5H, H-14 or H-15, H-4', H-5', H-6'), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, H-14 or H-15), 6.94 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.7$ Hz, H-6), 6.86 (d, 1H, $J = 2.7$ Hz, H-8), 6.14 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz, H-3), 5.11 (s, 2H, H-12), 2.40 (d, 3H, $J = 1.0$ Hz, H-11); **¹³C NMR** (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 163.1 (C-1''), 161.7 (C-2 or C-7), 161.3 (C-2 or C-7), 155.0 (C-4 or C-9), 152.6 (C-4 or C-9), 143.8 (C-2''), 143.6 (C-4''), 142.3 (C-6''), 137.3 (C-6'), 134.6 (C-13), 133.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 30.8$ Hz, C-2'), 131.7 (C-15), 130.6 (C-4' or C-5'), 128.5 (C-5''), 127.9 (C-4' or C-5'), 126.9 (C-14), 126.4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 6.6$ Hz, C-3'), 125.5 (C-5), 124.9 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 274$ Hz, CF_3), 123.7 (C-3''), 113.6 (C-10), 112.9 (C-6), 111.8 (C-3), 101.7 (C-8), 70.5 (C-12), 18.6 (C-11); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl_3): δ 8.6 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{BF}_3\text{NaNO}_5$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 566.1362 found: 566.1346.

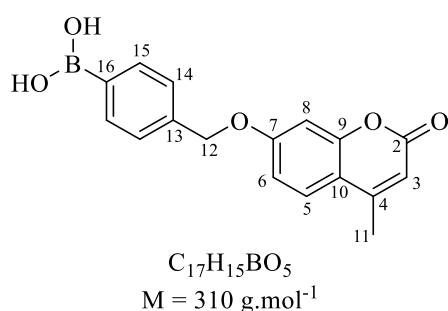
B,B-(7-(*p*-Benzyl)oxy-4-methylcoumarin)(2'-trifluoromethylphenyl)borinic acid **66**



To a solution of compound **69** (72 mg, 0.133 mmol) in THF (1.0 mL) was added a 0.17M solution of LiOH.H₂O in water (1.2 mL, 0.204 mmol, 1.5 equiv). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with a 1M aqueous HCl solution. The solution was diluted with EtOAc and washed with a saturated aqueous NaHCO₃ solution.

The aqueous layer was extracted 3 times with CH₂Cl₂. The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash-column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc, 7:3) to afford the expected product (38 mg, 86.8 μmol, η = 65%) as a green solid. *R_f* (Cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.20; ¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.73 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-15), 7.72 (m, 1H, H-3'), 7.64-7.49 (m, 4H, H-5, H-4', H-5' and H-6'), 7.47 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, H-14), 6.95 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.6 Hz, H-6), 6.86 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz, H-8), 6.42 (br s, 1H, OH), 6.07 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz, H-3), 5.18 (s, 2H, H-12), 2.38 (d, 3H, *J* = 0.8 Hz, H-11); ¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂): δ 161.9 (C-2 or C-7), 161.3 (C-2 or C-7), 155.6 (C-9), 153.1 (C-4), 140.4 (C-13), 136.2 (C-14 or C-15), 132.0, 131.3, 129.3 (3C, C-4', C-5' and C-6'), 127.0 (C-14 or C-15), 126.1 (C-5), 125.7 (q, ³*J*_{C-F} = 3.8 Hz, C-3'), 114.3 (C-10), 113.0 (C-6), 112.3 (C-3), 102.2 (C-8), 70.6 (C-12), 18.8 (C-11); ¹¹B NMR (96 MHz, CD₂Cl₂): δ 45.8 (s); HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₂₄H₁₇BF₃O₄ [M-H]⁻: 566.1362 found: 566.1346.

7-(*p*-Benzyl)oxy-4-methylcoumarin)boronic acid **70**



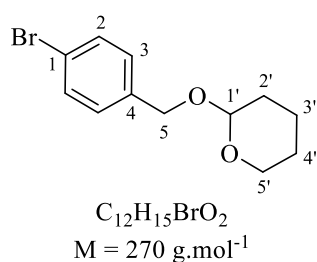
To a solution of trifluoroacetic acid in dry CH₂Cl₂ (5.1 mL, 5% TFA) were successively added compound **67** (200 mg, 0.510 mmol) and methylboronic acid (92 mg, 1.53 mmol, 3 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 5 hours. The solution was concentrated *in vacuo*. The residue

was purified by flash-column chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 99:1) to afford the expected product (102 mg, 0.329 mmol, η = 65%) as a pink solid. *R_f* (DCM/MeOH, 99:1): 0.22; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.26 (s, OH), 7.74 (d, 2H, *J* = 7.7 Hz, H-15), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H-5), 7.39 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H-14), 6.99 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.3 Hz, H-6), 6.93 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H-8), 6.14 (s, 1H, H-3), 5.18 (s, 2H, H-12), 2.33 (s, 3H, H-11); ¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂/CD₃OD ≈ 4:1): δ 162.0 (C-2), 155.3 (C-4 or C-9), 153.7 (C-4 or C-9), 138.4 (C-13), 134.2 (C-15), 126.9 (C-14), 126.0 (C-5), 114.1 (C-

10), 113.1 (C-6), 111.8 (C-3), 102.0 (C-8), 70.6 (C-12), 18.6 (C-11); ^{11}B NMR (96 MHz, $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CD}_3\text{OD} \approx 4:1$): δ 28.6 (s); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{BNaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 333.0908, found: 333.0894.

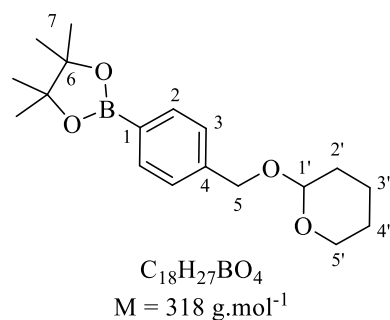
b) Carbamate link, boronic and borinic probes

2-(4-bromobenzyl)oxy-tetrahydro-2H-pyran 75¹⁸⁶



To a solution of commercial 4-bromobenzyl alcohol (1.5 g, 8.02 mmol, 1 equiv) in dichloromethane (10 mL) was added 3,4-dihydro-2H-pyran (1.09 mL, 12.0 mmol, 1.5 equiv) and CSA (18 mg, 0.08 mmol, 1 mol%). The reaction mixture was stirred for 3 hours at room temperature before quenching the reaction with a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (8 mL). The mixture was extracted with EtOAc (3×10 mL) and the combined organic extracts were then washed with brine (10 mL) before being dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 9:1) to afford the expected product (2.05 g, 7.59 mmol, $\eta = 95\%$) as a colorless liquid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.58; ^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.50 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-2), 7.28 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-3), 4.74 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, H-5), 4.71 (d, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-1'), 4.46 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz, H-5), 3.90 (ddd, 1H, $J = 11.1$ Hz, $J = 8.4$ Hz, $J = 3.2$ Hz, H-5'), 3.50-3.57 (m, 1H, H-5'), 1.49-1.95 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'); ^{13}C NMR (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 138.3 (C-4), 131.7 (C-2), 129.8 (C-3), 121.5 (C-1), 98.3 (C-1'), 68.3 (C-5), 62.4 (C-5'), 31.0 (C-2'), 26.0 (C-4'), 19.8 (C-3'); HRMS (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{BrNaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 293.0148 found: 293.0141. ^1H NMR was in accordance with the literature.¹⁸⁷

2-(4-benzyl pinacolboronate)oxy-tetrahydro-2H-pyran-2-yl 75¹⁸⁸



To a solution of commercial 4-methanolphenyl-(pinacolato)borane (400 mg, 1.71 mmol, 1 equiv) in DCM (2.5 mL) was added dropwise DHP (185 μL , 2.04 mmol, 1.2 eq) and CSA (4 mg, 1 mol%). The mixture was stirred at rt for 2 hours. Then an aqueous solution of NaHCO_3 (2.5 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3×10 mL). The

¹⁸⁶ M. Elliott, N. F. Janes, B. C. Pearson, *J. Sci. Food Agric.* **1967**, *18*, 325-331.

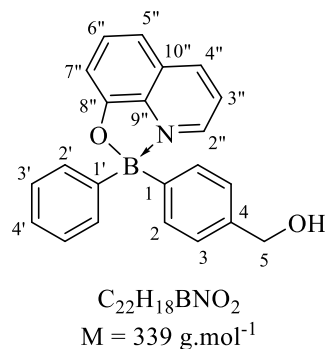
¹⁸⁷ C. S. Fischer, M. C. Baier, S. Mecking, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1148-1154.

¹⁸⁸ P. A. Champagne, Y. Benhassine, J. Desroches, J.-F. Paquin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13835-13839.

combined organic layers were washed with brine solution (10 mL), then dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 1:1) to afford the expected product (525 mg, 1.65 mmol, $\eta_c = 97\%$) was obtained as colorless oil with an average of 15 % of the hydrolyzed product **76**.

To a solution of 2-(4-bromobenzyloxy)-tetrahydro-2H-pyran **1** (1.35 g, 5.00 mmol, 1 equiv) in *anhydrous* dioxane (40 mL), bis(pinacolato)diboron (1.40 g, 5.51 mmol, 1.1 equiv), [1-1'-bis(diphenylphosphino)-ferrocene] dichloropalladium (II)DCM (207 mg, 5 mol%), and *dry* potassium acetate (1.48 g, 15.1 mmol, 3 equiv) were successively added to the mixture. Then the mixture was heated at 80°C for 24 hours and was then concentrated under vacuum. The residue was diluted with DCM. The organic layer was washed with NaHCO₃ solution (20 mL). The aqueous layer was extracted with DCM (3×20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, concentrated under vacuum. The crude residue was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 9:1 to 7:3) to afford the expected product (1.25 g, 3.93 mmol, $\eta = 79\%$) as pale-yellow crystals. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.55; **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-**2**) 7.39 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H-**3**), 4.82 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, H-**5**), 4.72 (t, 1H, $J = 3.7$ Hz, H-**1'**), 4.56 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz, H-**5**), 3.93 (m, 1H, H-**5'**), 3.52-3.60 (m, 1H, H-**5'**), 1.50-1.96 (m, 6H, H-**2'**, H-**3'**, H-**4'**), 1.37 (s, 12H, H-**7**); **¹³C NMR** (90 MHz, CDCl₃): δ 141.5 (C-**4**), 134.6 (C-**2**), 127.0 (C-**3**), 97.7 (C-**1'**), 83.7 (C-**6**), 68.6 (C-**5**), 62.1 (C-**5'**), 30.5 (C-**2'**), 25.5 (C-**4'**), 24.8 (C-**7**), 19.3 (C-**3'**); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 31.6 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for C₁₈H₂₇BNaO₄ [M+Na]⁺: 341.1898 found: 341.1888. ¹H NMR was in accordance with the literature.¹⁸⁸

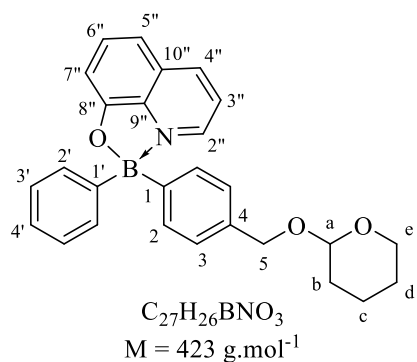
8-Hydroxyquinoline (4-hydroxymethylphenyl)(phenyl)borinate **77**



To a solution of **75** (500 mg, 1.57 mmol, 1 equiv) in THF (10.5 mL) cooled to -78°C, a 0.8 M solution of PhLi in Bu₂O (2.20 mL, 1.73 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4h at -78°C. The mixture was carefully quenched with a 2M HCl solution in Et₂O (5 mL) at -78°C and stirred for 10 minutes. Then the mixture was warm up at rt and stirred overnight. The mixture was diluted with H₂O (5 mL) and Et₂O (5 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (8 mL) and hydroxyquinoline (291 mg, 2.00 mmol, 1.3 equiv) was added. The mixture was stirred 4h at rt. The resulting suspension was concentrated

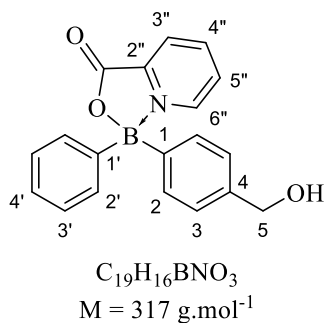
under vacuum. A purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 1:1) furnished the unprotected protected borinate **79** (0.156 g, 0.369 mmol, $\eta = 23\%$) as a yellow solid and the expected borinate (0.346 g, 1.02 mmol, $\eta = 65\%$) as a yellow solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.21; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.59 (dd, 1H, $J = 5.1$ Hz, $J = 0.9$ Hz, H-2''), 8.44 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 0.9$ Hz, H-4''), 7.68 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H-6''), 7.64 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 5.1$ Hz, H-3''), 7.41 (d, 4H, $J = 7.8$ Hz, H-2 and H-2'), 7.20-7.30 (m, 6H, H-3, H-3', H-4' and H-5''), 7.16 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-7''), 4.60 (s, 2H, H-5); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 158.9 (C-8''), 140.1 (C-4 or C-9''), 139.9 (C-2''), 139.4 (C-4''), 137.8 (C-4 or C-9''), 133.1 (C-6''), 132.4 (C-2 or C-2'), 132.2 (C-2 or C-2'), 128.9 (C-10''), 127.9 (C-3), 127.2 (C-4'), 126.6 (C-3'), 123.4 (C-3''), 112.8 (C-5''), 109.8 (C-7''), 65.6 (C-5); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ 11.7 (s); **HRMS** calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{BNNaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 362.1327, found 362.1311.

Compound 79



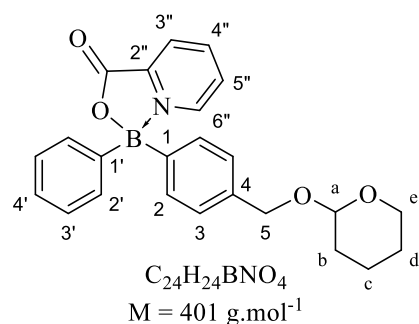
Yellow solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.47; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.59 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-2''), 8.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-4''), 7.68 (dd, $J = 8.5$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6''), 7.63 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-3''), 7.39-7.45 (m, 4H, H-2 and H-2'), 7.19-7.31 (m, 6H, H-3, H-3', H-4' and H-5''), 7.17 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-7''), 4.72 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-5), 4.69 (t, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-a), 4.43 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz, H-5), 3.85-3.94 (m, 1H, H-b), 3.47-3.55 (m, 1H, H-b), 1.45-1.87 (m, 6H, H-c, H-d and H-e); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 159.0 (C-8''), 139.9 (C-2''), 139.4 (C-4''), 137.8 (C-4 or C-2''), 137.3 (C-4 or C-2''), 132.7 (C-6''), 132.2 (C-2' and C-2), 128.9 (C-10''), 127.9 (C-3 or C-3'), 127.6 (C-3 or C-3'), 127.2 (C-4'), 123.4 (C-3''), 112.7 (C-5''), 109.6 (C-7''), 98.1 (C-a), 69.3 (C-5), 62.3 (C-e), 31.0 (C-b), 25.9 (C-d), 19.8 (C-c); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ 12.0 (s); **HRMS** calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{BNNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 446.1903, found 446.1881.

2-picolinic (4-hydroxymethylphenyl)(phenyl)borinate **78**



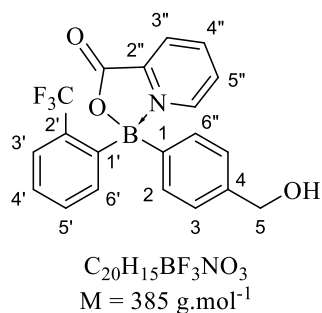
To a solution of **75** (503 mg, 1.58 mmol, 1 equiv) in THF (10.5 mL) cooled to -78°C , a solution of PhLi in Bu₂O (1.9 M) (0.90 mL, 1.74 mmol, 1.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 4 hours at -78°C . The mixture was carefully quenched with a 2M HCl solution in Et₂O (8 mL) at -78°C and stirred for 10 minutes. Then the mixture was warm up at rt and stirred overnight. The mixture was diluted with H₂O (5 mL) and Et₂O (5 mL). The aqueous layer was extracted with Et₂O (3×10 mL). All organic layers were combined, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The residue was dissolved in Et₂O (5 mL) and 2-picolinic acid (233 mg, 1.90 mmol, 1.2 equiv) was added. The suspension was stirred overnight at rt. The resulting mixture was concentrated under vacuum. A purification by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 0:1) furnished the protected borinate **79** (0.119 g, 0.297 mmol, $\eta = 19\%$) as a white solid and the expected borinate (0.258 g, 0.814 mmol, $\eta = 65\%$) as a white solid. **R_f**(Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.22; **¹H NMR** (360 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.16 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz, H-6''), 8.63 (ddd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 7.7$, $J = 1.1$ Hz, H-4''), 8.46 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H-3''), 8.17 (ddd, 1H, $J = 7.7$ Hz, $J = 5.5$ Hz, $J = 1.1$ Hz, H-5''), 7.16-7.32 (m, 9H, H-2, H-2', H-3, H-3' and H-4'), 5.06 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, OH), 4.44 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz, H-5); **¹³C NMR** (90 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163.3 (C-1''), 144.9 (C-4''), 142.9 (C-6''), 141.5 (C-4 or C-9''), 141.3 (C-4 or C-9''), 131.8 (C-2 or C-2'), 131.6 (C-2 or C-2'), 130.4 (C-5''), 127.5 (C-3 or C-3'), 127.0 (C-4'), 125.8 (C-3 or C-3'), 124.0 (C-3''), 63.0 (C-5); **¹¹B NMR** (96 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.05 (s); **HRMS** calculated for C₁₉H₁₆BNNaO₃ [M+Na]⁺: 340.1119, found 340.1104.

Compound **80**



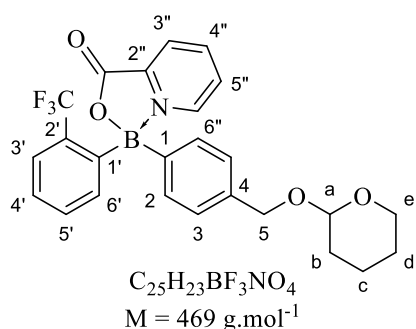
White solid. **R_f**(Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.51; **¹H NMR** (360 MHz, CD₃OD): δ 8.95 (d, 1H, $J = 5.5$, H-6''), 8.57 (dd, 1H, $J = 7.9$ Hz, $J = 7.2$ Hz, H-4''), 8.42 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H-3''), 8.09 (dd, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 5.5$ Hz, H-5''), 7.32 (d, 4H, $J = 6.7$ Hz, H-2 and H-2'), 7.20-7.28 (m, 5H, H-3, H-3' and H-4'), 4.59-4.72 (m, 2H, H-5 and H-a), 4.45 (d, 1H, $J = 11.8$ Hz, H-5), 3.86-3.93 (m, 1H, H-e), 3.48-4.58 (m, 1H, H-e), 1.47-1.90 (m, 6H, H-b, H-c and H-d); **¹¹B NMR** (96 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.9 (s).

2-Picolinic (4-hydroxymethylphenyl)(2-trifluoromethylphenyl)borinate **81**



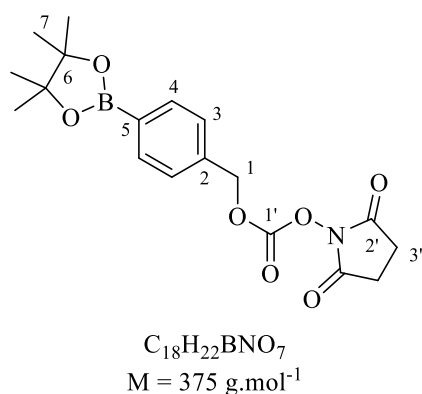
To a solution of 2-bromobenzotrifluoride (105 μL , 0.771 mmol, 1.2 equiv) in dry THF (2.5 mL), cooled to -78°C , a 1.4M *sec*-butyllithium solution in cyclohexane (840 μL , 1.18 mmol, 1.8 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred at -78°C for 30 minutes before adding to a solution of compound **74** (254 mg, 0.648 mmol) dissolved in dry THF (1.5 mL). The mixture was stirred at -78°C for 4 hours. The reaction was quenched with a 2M HCl solution in Et_2O (3.0 mL), allowed to warm up to room temperature, and stirred for further 1 hour. The solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with EtOAc. The organic layer was washed with water. The aqueous layer was extracted twice with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo* to afford a green-brown solid. The residue was dissolved in Et_2O (9.0 mL) and 2-picolinic acid (95 mg, 0.772 mmol, 1.2 equiv) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature and the solvent was then evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc. The solution was washed with a saturated aqueous NaHCO_3 solution and the aqueous layer was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash-column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: gradient from 1:0 to 0:1) to afford the expected product (87 mg, 0.160 mmol, $\eta = 25\%$) as a white foam. $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 8.64 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, H-**6''**), 8.37 (dd, 1H, $J = 7.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H-**4''**), 8.29 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H-**3''**), 7.92 (dd, 1H, $J = 5.4$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H-**5''**), 7.66 (m, 1H, H-**3'**), 7.41-7.34 (m, 3H, H-**4'**, H-**5'**, H-**6'**), 7.31 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-**2**), 7.23 (d, 2H, $J = 7.7$ Hz, H-**3**), 4.61 (s, 2H, H-**5**); $^{13}\text{C NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 163.3 (CO), 143.7 (C-**2''**), 143.5 (C-**4''**), 142.3 (C-**6''**), 139.8 (C-**4**), 137.2 (C-**6'**), 133.1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 30.4$ Hz, C-**2'**), 131.5 (C-**2**), 130.6 (C-**4'** or C-**5'**), 128.6 (C-**5''**), 127.8 (C-**4'** or C-**5'**), 126.5 (C-**3**), 126.4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 6.6$ Hz, C-**3'**), 123.7 (C-**3''**), 65.1 (C-**5**); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ 8.5 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{BF}_3\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 408.0993 found: 408.0974.

Compound 82



Pale yellow solid. $^1\text{H NMR}$ (360 MHz, CDCl_3): δ 8.56 (d, 1H, $J = 5.5 \text{ Hz}$, H-6''), 8.29 (dd, 1H, $J = 6.7 \text{ Hz}$, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-4''), 8.25 (d, 1H, $J = 7.3 \text{ Hz}$, H-3''), 7.81 (dd, 1H, $J = 5.5 \text{ Hz}$, $J = 6.7 \text{ Hz}$, H-5''), 7.58 (dd, 1H, $J = 3.8 \text{ Hz}$, $J = 5.4 \text{ Hz}$, H-3'), 7.38-7.24 (m, 5H, H-4', H-5', H-6', H-2), 7.20 (d, 2H, $J = 7.5 \text{ Hz}$, H-3), 4.69 (d, 1H, $J = 11.8 \text{ Hz}$, H-5''), 4.62 (t, 1H, $J = 3.5 \text{ Hz}$, H-a), 4.37 (d, 1H, $J = 11.8 \text{ Hz}$, H-5), 3.84 (ddd, 1H, $J = 10.9 \text{ Hz}$, $J = 2.7 \text{ Hz}$, $J = 8.4 \text{ Hz}$, H-e), 3.47 (m, 1H, H-e), 1.85-1.38 (m, 6H, H-b, H-c and H-d); $^{13}\text{C NMR}$ (90 MHz, CDCl_3): δ 163.1 (CO), 144.0 (C-2''), 143.3 (C-4''), 142.3 (C-6''), 137.7 (C-4), 137.1 (C-6'), 133.2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 30.4 \text{ Hz}$, C-2'), 131.4 (C-2), 130.6 (C-4' or C-5'), 128.2 (C-5''), 127.8 (C-4' or C-5'), 127.3 (C-3), 126.4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 5.3 \text{ Hz}$, C-3'), 123.7 (C-3''), 97.9 (C-a), 65.1 (C-5), 62.1 (C-e), 30.6 (C-b), 25.4 (C-d), 19.4 (C-c); $^{11}\text{B NMR}$ (96 MHz, CDCl_3): δ 9.0 (s); **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_{25}H_{23}BF_3NNaO_4$ $[M+Na]^+$: 492.1569 found: 492.1553.

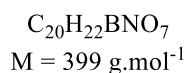
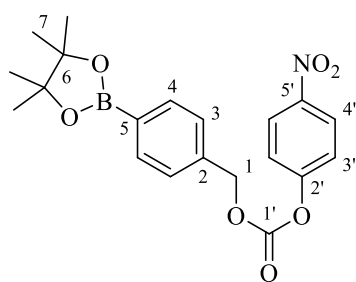
4-benzyl pinacolboronate N-succidiminyl carbonate 85¹⁸⁹



4-methanolphenyl-(pinacolato)borane (200 mg, 0.855 mmol, 1 equiv) and DSC (328 mg, 1.28 mmol, 1.5 equiv) were dissolved in DCM (2 mL), then Et_3N (0.37 mL, 1.71 mmol, 3.1 equiv) was added dropwise. The mixture was stirred for 2 hours at rt. The mixture was concentrated under vacuum, then dissolved in EtOAc. The organic phase obtained was washed with a saturated solution of NaHCO_3 ($2 \times 10 \text{ mL}$). The combined organic phases obtained were dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum. The residue collected was purified by flash column chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient from 1:0 to 3:1), to afford the pure carbonate (237 mg, 0.632 mmol, $\eta = 74\%$) as a white amorphous solid. R_f (Cyclohexane/EtOAc, 1:1): 0.58; $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (d, 2H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, H-3), 7.40 (d, 2H, $J = 7.9 \text{ Hz}$, H-4), 5.33 (s, 2H, H-1), 2.82 (s, 4H, H-3'), 1.35 (s, 12H, H-7); $^{13}\text{C NMR}$ (62.5 MHz, CDCl_3): δ 168.5 (C-1'), 151.5 (C-2'), 139.1, 136.0, 135.1, 127.5 (C-Ar), 83.9 (C-6), 72.5 (C-1), 25.4 (C-3'), 24.8 (C-7); $^{11}\text{B NMR}$ (MHz, CDCl_3): δ (s) 30.8; **HRMS** (ESI): m/z calculated for $C_{18}H_{22}BNNaO_7$ $[M+Na]^+$: 398.1384, found: 398.1375. $^1\text{H NMR}$ was in accordance with literature.¹⁸⁹

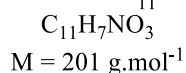
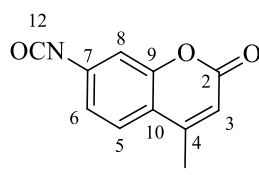
¹⁸⁹ A. R. Lippert, T. Gschneidtner, C. J. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 7510-7512.

4-benzyl pinacolboronate p-nitrophenol carbonate **86**¹⁹⁰



4-methanolphenyl-(pinacolato)borane (200 mg, 0.855 mmol, 1 equiv) and 4-nitrophenylchlorocarbonate (200 mg, 0.992 mmol, 1.2 equiv) were dissolved in THF (2 mL). The mixture was cooled at 0°C before adding Et₃N (0.24 mL, 1.71 mmol, 2 equiv) dropwise. The mixture was warm up at rt and stirred for 2 hours. The mixture was successively washed with an aqueous solution of HCl 1M (10 mL), a saturated solution of NaHCO₃ (2×10 mL) and brine solution (10 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash column chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient from 1:0 to 9:1), to afford the pure carbonate (301 mg, 0.754 mmol, η = 88 %) as a colorless oil, which crystallize. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 9:1): 0.34; **¹H NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ 8.28 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, H-4'), 7.86 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-4), 7.45 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, H-3), 7.38 (d, 2H, *J* = 9.1 Hz, H-3'), 5.32 (s, 2H, H-1), 1.36 (s, 12H, H-7); **¹³C NMR** (62.5 MHz, CDCl₃): δ 155.5 (C-1'), 152.4 (C-2'), 145.4 (C-5'), 137.0 (C-5), 135.1 (C-4), 127.6 (C-3), 125.3 (C-4'), 121.7 (C-3'), 83.9 (C-6), 70.7 (C-1), 24.8 (C-7); **¹¹B NMR** (MHz, CDCl₃): δ (s) 30.6; **HRMS** (ESI): *m/z* calculated for C₂₀H₂₂BNNaO₇ [M+Na]⁺: 422.1385, found: 422.1374. In accordance with the literature.¹⁹⁰

7-isocyanate-4-methylcoumarin **87**¹⁹¹

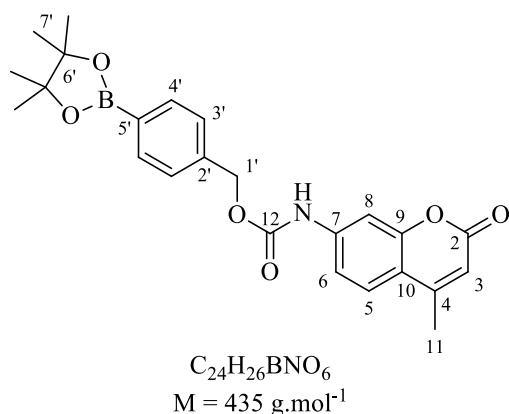


To a ice-colded solution of 7-amino-4-methylcoumarin (100 mg, 0.571 mmol, 1 equiv) in 10 mL of dry DCM was added Et₃N (120 μL, 0.890 mmol, 1.5 equiv). The *pale-yellow suspension* was stirred for 10 min. Then a solution of triphosgene (388 mg, 1.31 mmol, 2.3 equiv) in dry DCM (2 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at 0 °C for 2 hours. and then concentrated under *vacuum*. The residue was directly used in the next step. **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-5), 6.98-7.03 (m, 2H, H-6 and H-8), 6.23 (s, 1H, H-3), 2.40 (s, 3H, H-11); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 160.5 (C-2), 154.4 (C-9), 151.9 (C-4), 136.9 (C-7), 125.9 (C-5), 125.7 (C-12), 121.3 (C-6), 118.0 (C-10), 114.8 (C-3), 113.1 (C-8), 18.9 (C-11). **¹H NMR** in accordance with the literature.¹⁹¹

¹⁹⁰ J. L. Major Jourden, S. M. Cohen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6795-6797.

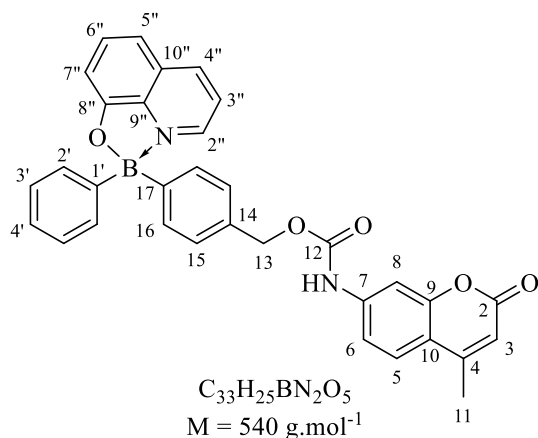
¹⁹¹ S. Everett, S. Ulhaq, R. S. Naismith, (Eds.: University, of, Dundee), USA, **2010**.

(*p*-benzyl pinacolboronate) 7-amino-4-methylcoumarin carbamate **83**¹⁹²



To a solution of commercial 4-methanolphenyl-(pinacolato)borane (160 mg, 0.684 mmol, 1.2 equiv), of crude 7-isocyanate-4-methylcoumarin (115 mg, 0.572 mmol, 1.0 equiv) in DCM (5 mL) was added 4Å molecular sieves. The mixture was stirred for 15 minutes before adding dibutyltin dilaurate (36 μL, 60.8 μmol, 0.1 equiv) in one portion. The resulting suspension was stirred at room temperature overnight and filtered on celite. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient from 1:0 to 1:3) to afford the expected product (155 mg, 0.33 mmol, η = 62%) as a pale-yellow solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.29; **¹H NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-4'), 7.51 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-5), 7.50 (s, 1H, H-8), 7.44 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz, H-6), 7.39 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, H-3'), 6.17 (s, 1H, H-3), 5.24 (s, 2H, H-1'), 2.37 (s, 3H, H-11), 1.32 (s, 12H, H-7'); **¹³C NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ 161.3 (C-2), 154.4 (C-9), 152.9 (C-12), 152.5 (C-4), 141.6 (C-7), 138.6 (C-2'), 135.1 (C-4'), 127.4 (C-3'), 125.4 (C-5), 115.5 (C-10), 114.5 (C-6), 113.1 (C-3), 106.0 (C-8), 83.9 (C-6'), 67.2 (C-1'), 24.9 (C-7'), 18.6 (C-11); **¹¹B NMR** (96 MHz, CDCl₃): δ 30.8; **HRMS** (ESI): *m/z* calculated for C₂₄H₂₆BNNaO₆ [M+Na]⁺: 458.1750 found: 458.1730.

Compound **88**



To a solution of borinate **77** (160 mg, 0.684 mmol, 1.2 equiv), of crude 7-isocyanate-4-methylcoumarin (0.572 mmol, 1.0 equiv) in DCM (5 mL) was added 4Å molecular sieves. The mixture was stirred for 15 minutes before adding dibutyltin dilaurate (36 μL, 60.8 μmol, 0.1 equiv) in one portion. The resulting suspension was stirred at room temperature overnight, and then filtered on celite. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (Cyclohexane/EtOAc gradient from 1:0 to 1:3) to afford the expected product (78 mg, 0.144 mmol, η = 25%) as a pale-yellow solid. **R_f** (Cyclohexane/EtOAc, 7:3): 0.29; **¹H NMR** (300 MHz,

¹⁹² G. Liu, G. Zhang, J. Hu, X. Wang, M. Zhu, S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11645-11655.

CDCl₃): δ 8.59 (d, 1H, *J* = 5.1 Hz, H-2''), 8.43 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H-4''), 7.60-7.72 (m, 2H, H-3'' and H-6''), 7.39-7.53 (m, 6H, H-5, H-8, H-16 and H-2'), 7.24-7.37 (m, 7H, H-6, H-14, H-3', H-4', H-5'' and H-7''), 7.20 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H-7''), 6.18 (s, 1H, H-3), 5.19 (s, 2H, H-13), 2.40 (s, 3H, H-11); ¹¹B NMR (96 MHz, CDCl₃): δ 12.1; HRMS (ESI): *m/z* calculated for C₂₄H₂₀BNNaO₅ [M-hydroxyquinoline+Na]⁺: 436.1331 found: 436.1312.

II. ^1H NMR experiments

H_2O_2 -triggered oxidations of boronic and borinic derivatives were followed by ^1H NMR spectroscopy and performed on a Bruker Advance II 600 MHz spectrometer at 20°C . Boronic or borinic acids reference samples were prepared in a deuterated PBS buffer 1X (pH 7.4) containing 5% $\text{DMSO-}d_6$ (v/v) at 2 mM concentration ($V = 500 \mu\text{L}$). The H_2O_2 -mediated oxidation was performed using 1 equivalent of oxidant. For this purpose, each sample was prepared by mixing 4 mM solutions of boronic or borinic acids in deuterated PBS buffer 1X (pH 7.4) containing 10% $\text{DMSO-}d_6$ (v/v) ($250 \mu\text{L}$) and a 4 mM deuterated aqueous H_2O_2 .urea solution ($250 \mu\text{L}$). The first spectrum was recorded after 2 minutes upon addition of H_2O_2 and the progress of the reaction was then monitored as a function of time.

a) Symmetrical borinic acids

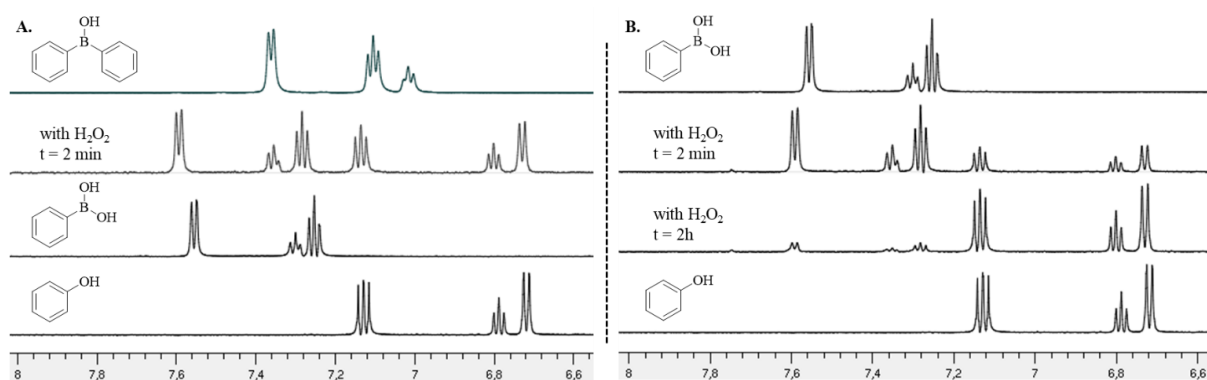


Figure S1 : Time-dependent oxidation of phenyl borinic and phenyl boronic models with one equivalent of H_2O_2

A. ^1H NMR spectra of phenylboronic acid (reference), phenylboronic acid with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes, phenylboronic acid and phenol as expected compounds. B. ^1H NMR spectra of phenylborinic acid (reference), phenylborinic acid with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes and 2h, and phenol as expected compound

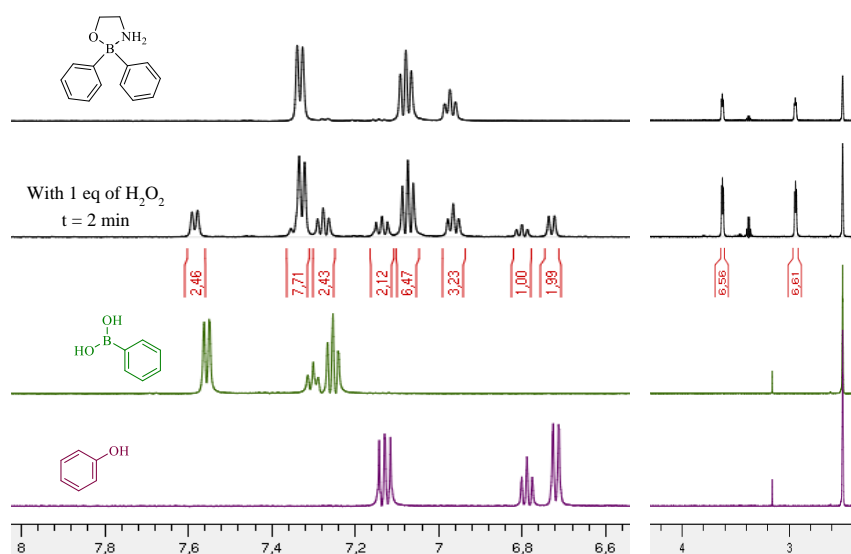


Figure S2: Time-dependent oxidation of borinate 24 with one equivalent of H_2O_2
 ^1H NMR spectra of borinate 24 (reference), borinate 24 with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes, phenylboronic acid and phenol as expected compounds.

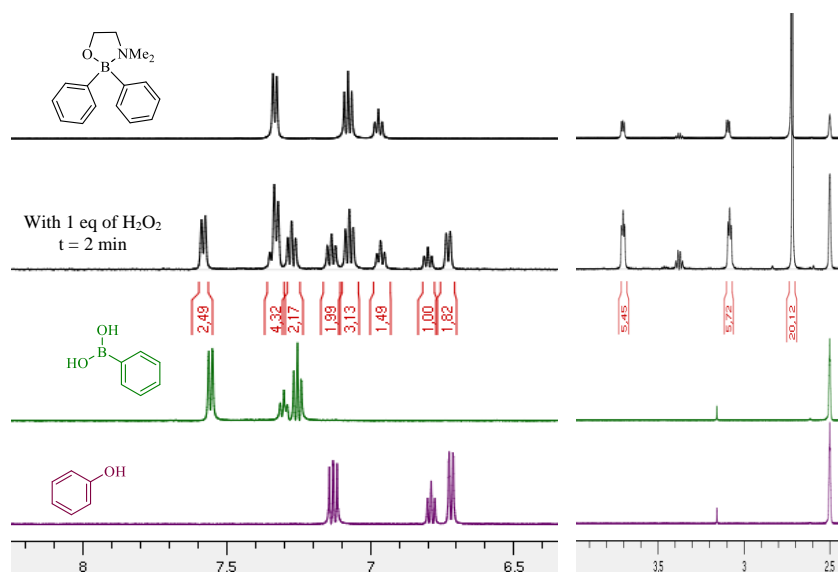


Figure S3: Time-dependent oxidation of borinate 25 with one equivalent of H_2O_2 . ^1H NMR spectra of borinate 25 (reference), borinate 25 with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes, phenylboronic acid and phenol as expected compounds.

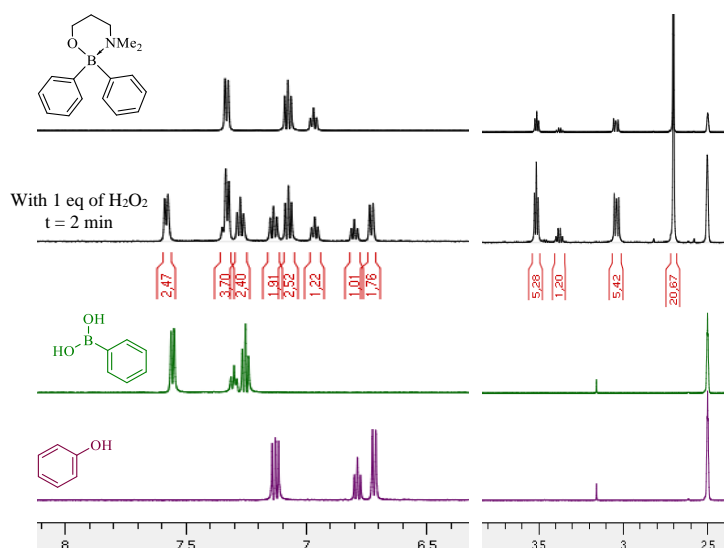


Figure S4: Time-dependent oxidation of borinate 26 with one equivalent of H_2O_2 . ^1H NMR spectra of borinate 26 (reference), borinate 26 with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes, phenylboronic acid and phenol as expected compounds.

b) Borinic acid **41** and borinic acid **42**

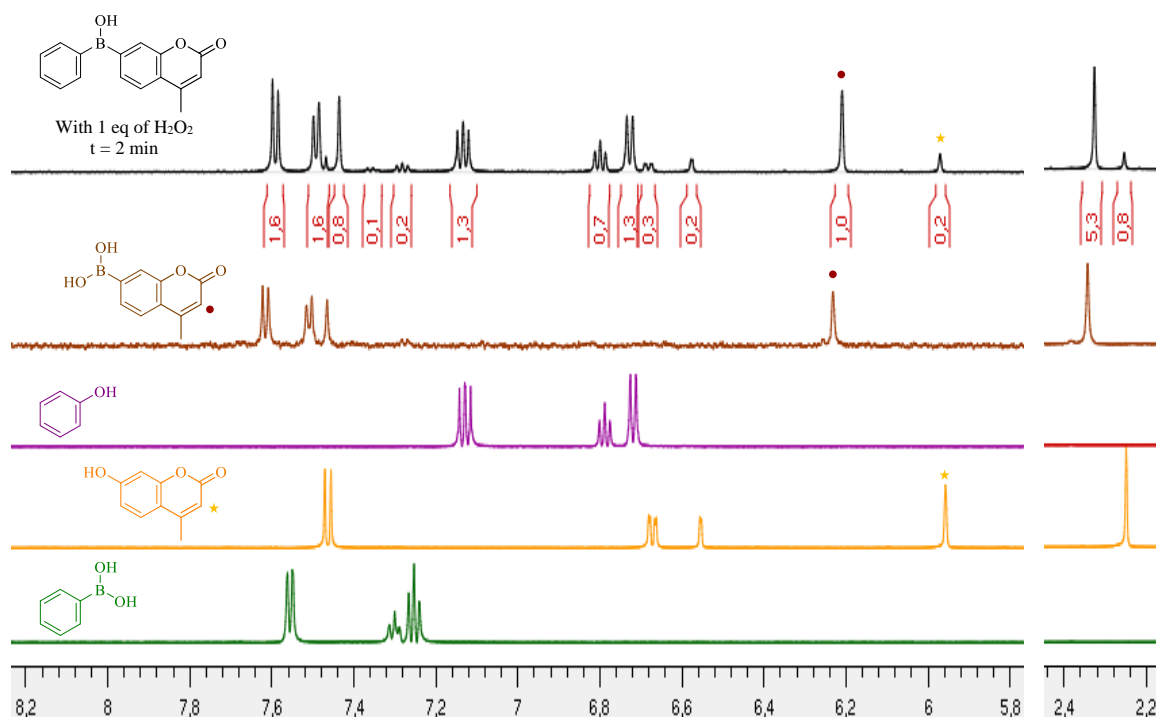


Figure S5: Time-dependent oxidation of borinic acid **41** with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of borinic acid **41** (reference), borinic acid **41** with H_2O_2 (1 eq) after 2 minutes, 7-hydroxy-4-methylcoumarin, phenylboronic acid, phenol and boronic acid **42** as expected compounds.

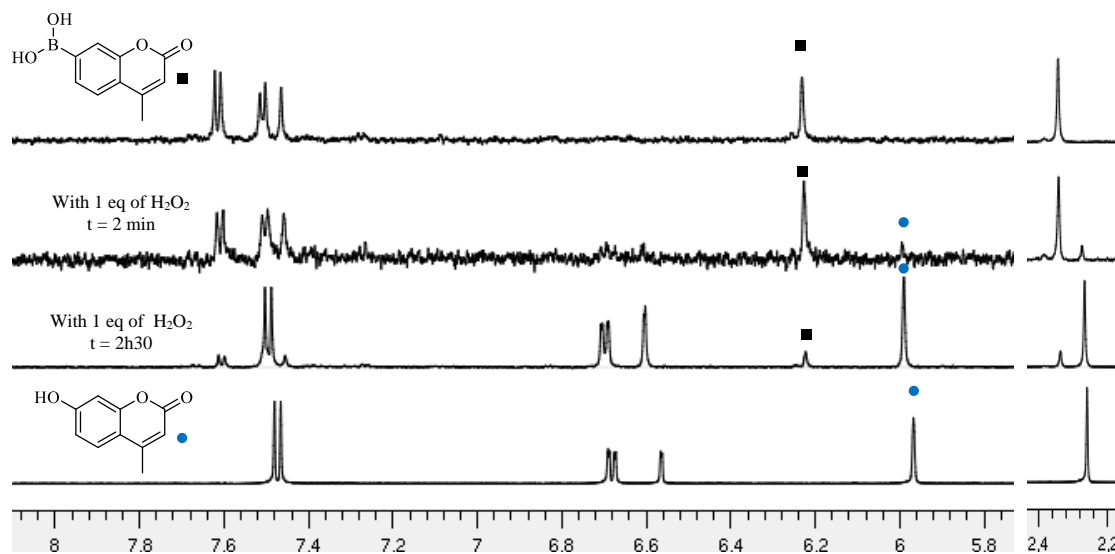


Figure S6: Time-dependent oxidation of 4-methyl coumarin boronic acid **42** with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of 4-methyl coumarin boronic acid **42** (reference), 4-methyl coumarin boronic acid **42** with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes and 2h30, and umbelliferone (4-MU) as expected product.

c) *Unsymmetric borinic acids models*

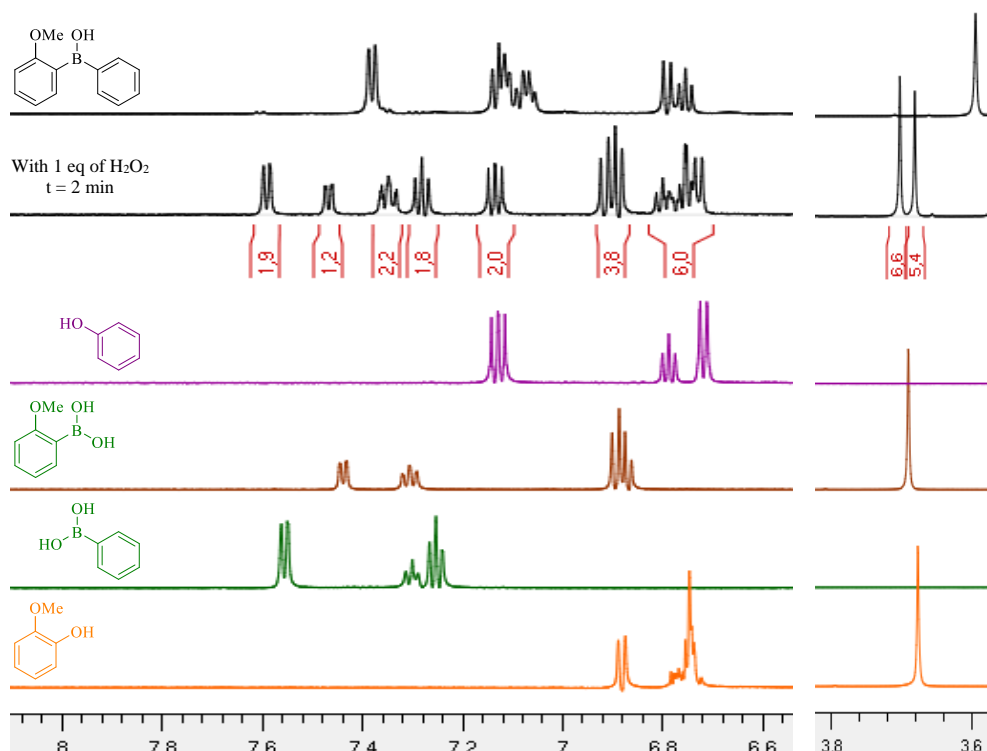


Figure S7: Time-dependent oxidation of borinic acid **46** with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of borinic acid **46** (reference), borinic acid **46** with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol, 2-methoxyphenylboronic acid and 2-methoxyphenol.

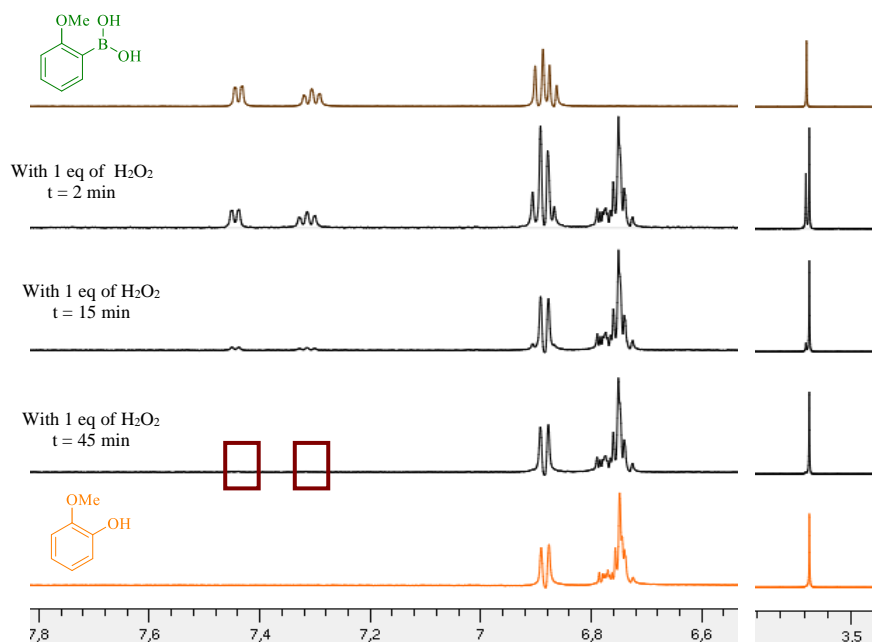


Figure S8: Time-dependent oxidation of 2-methoxyphenylboronic acid with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of 2-methoxyphenylboronic acid (reference), 2-methoxyphenylboronic acid with H_2O_2 (1 equiv) after 2, 15 and 45 minutes, and 2-methoxyphenol as expected product.

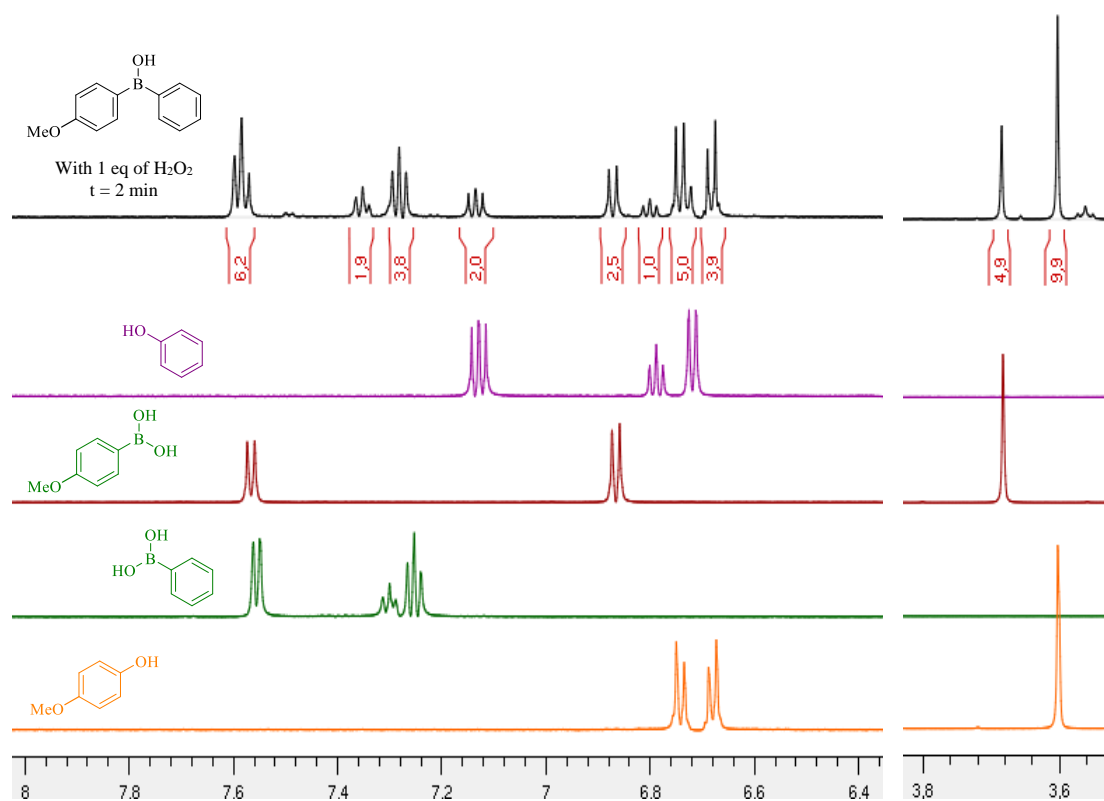


Figure S9: Time-dependent oxidation of borinic acid 45 with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of borinic acid 45 (reference), borinic acid 45 with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenol, 4-methoxyphenylboronic acid and 4-methoxyphenol.

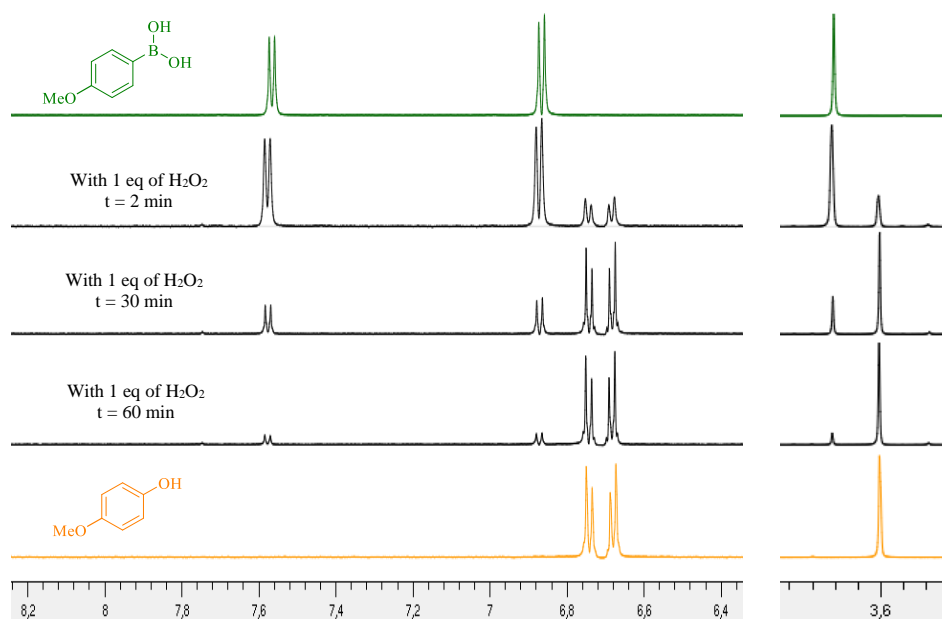


Figure S10: Time-dependent oxidation of 4-methoxyphenylboronic acid with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of 4-methoxyphenylboronic acid (reference), 4-methoxyphenylboronic acid with H_2O_2 (1 equiv) after 2, 30 and 60 minutes, 4-methoxyphenol as expected product.

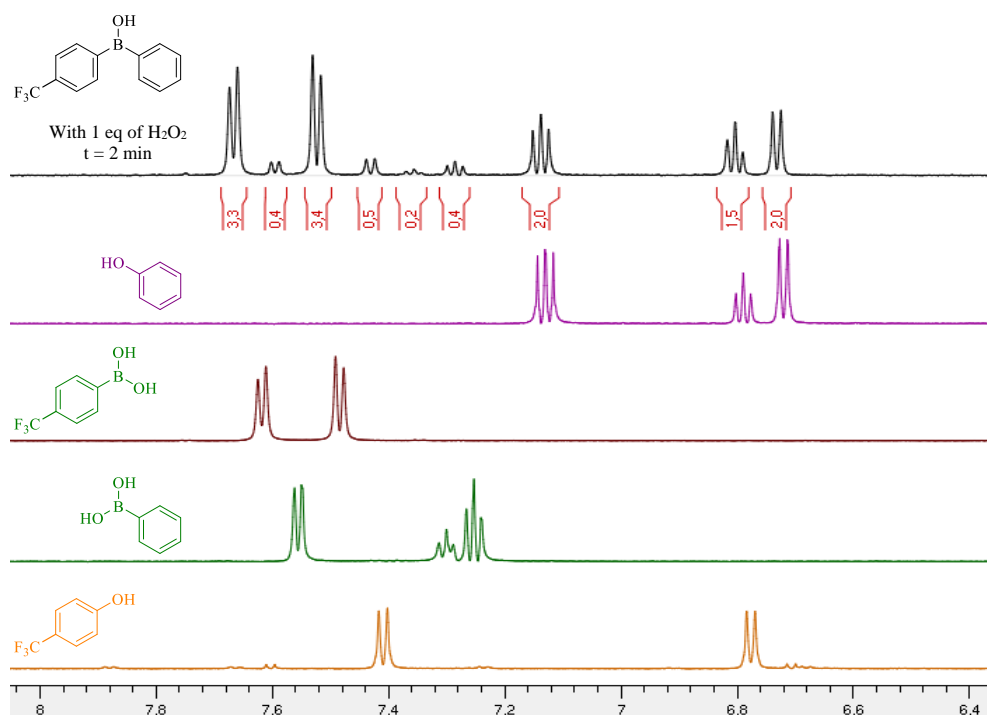


Figure S11: Time-dependent oxidation of borinic acid 43 with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of borinic acid 43 (reference), borinic acid 43 with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol, 4-trifluoromethylphenylboronic acid and 4-trifluoromethylphenol.

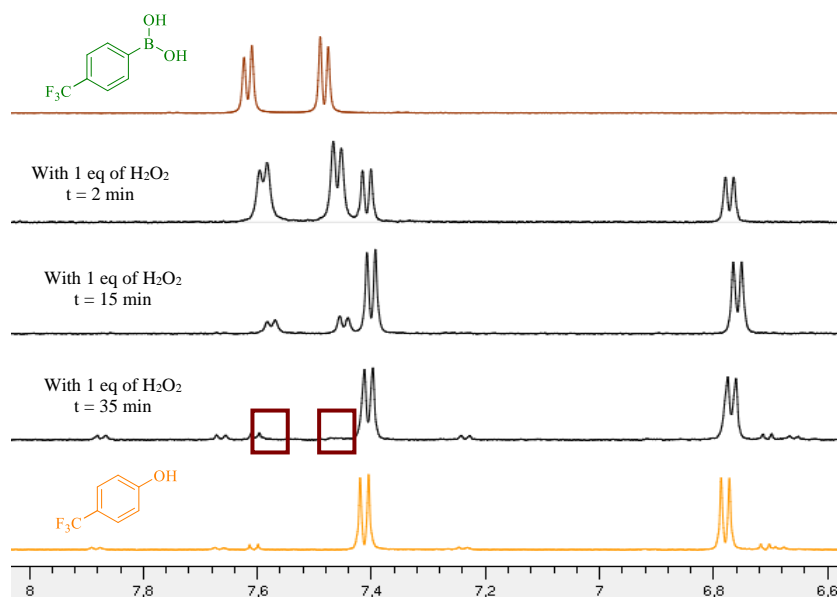


Figure S12: Time-dependent oxidation of 4-trifluoromethylphenylboronic acid with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of 4-trifluoromethylphenylboronic acid (reference), 4-trifluoromethylphenylboronic acid with H_2O_2 (1 equiv) after 2, 15 and 35 minutes, 4-trifluoromethylphenol as expected product.

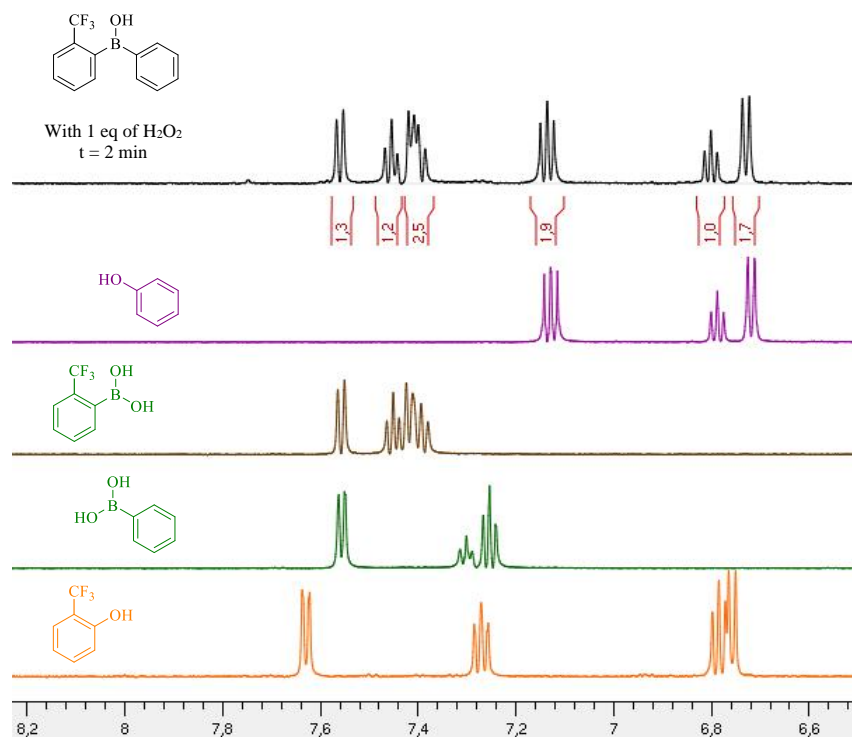


Figure S13: Time-dependent oxidation of borinic acid **44 with one equivalent of H_2O_2**

1H NMR spectra of borinic acid **44** (reference), borinic acid **44** with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol, 2-trifluoromethylphenylboronic acid and 2-trifluoromethylphenol.

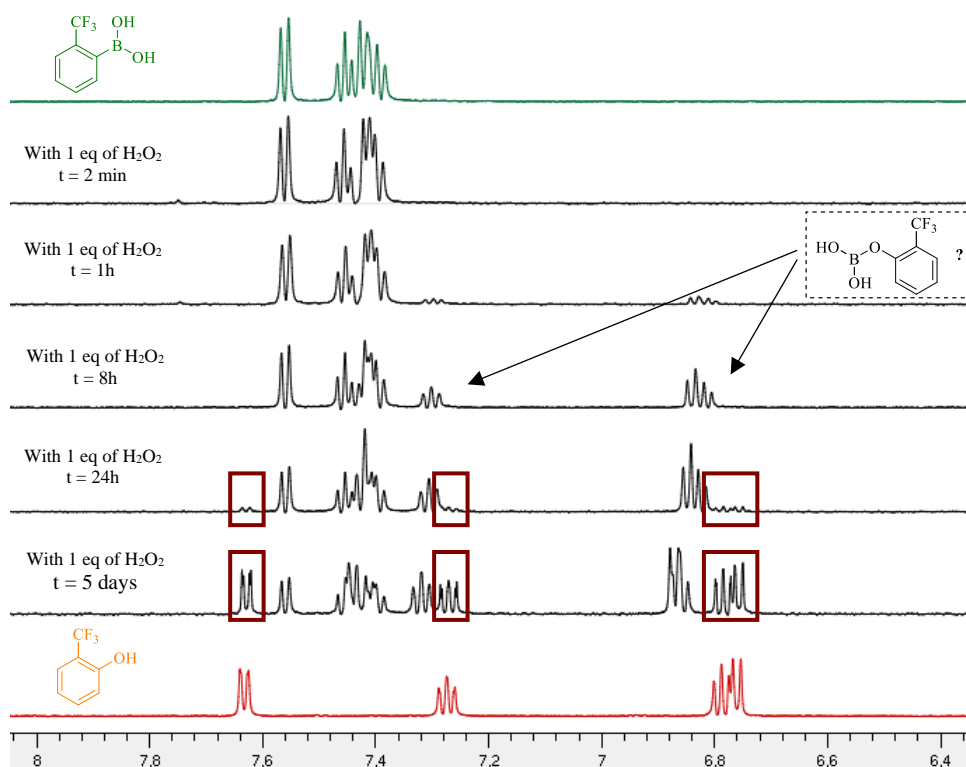


Figure S14: Time-dependent oxidation of 2-trifluoromethylphenylboronic acid with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of 2-trifluoromethylphenylboronic acid (reference), 2-trifluoromethylphenylboronic acid with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, 1h, 8h, 24h, and 5 days, 2-trifluoromethylphenol as expected product.

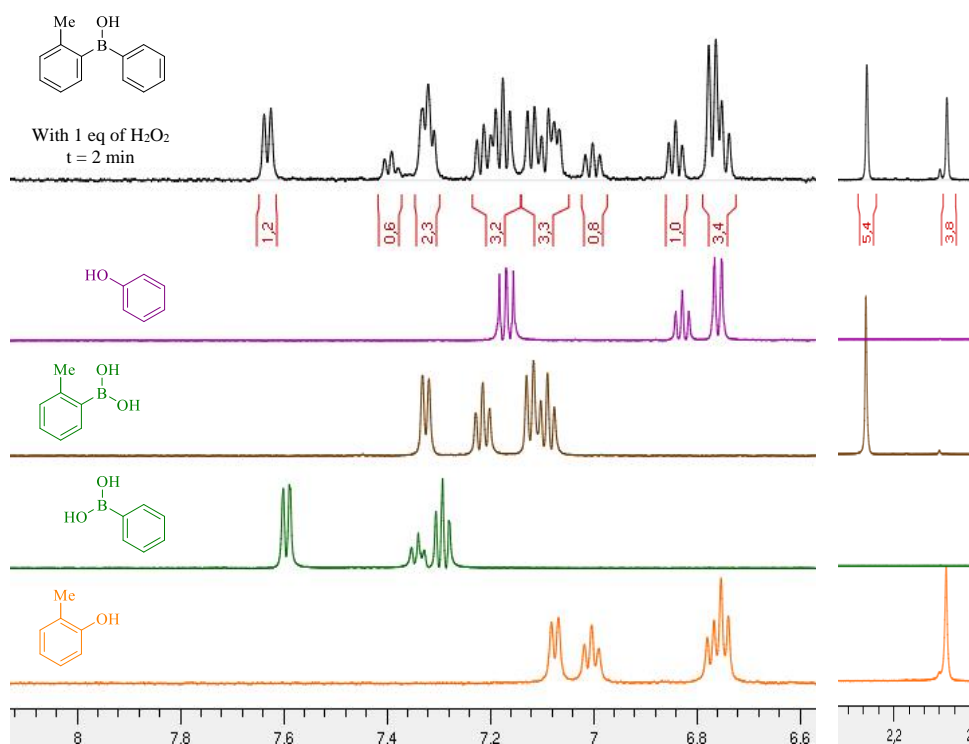


Figure S15: Time-dependent oxidation of borinic acid 48 with one equivalent of H_2O_2

^1H NMR spectra of borinic acid **48** (reference), borinic acid **48** with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol, 2-methylphenylboronic acid and 2-methylphenol.

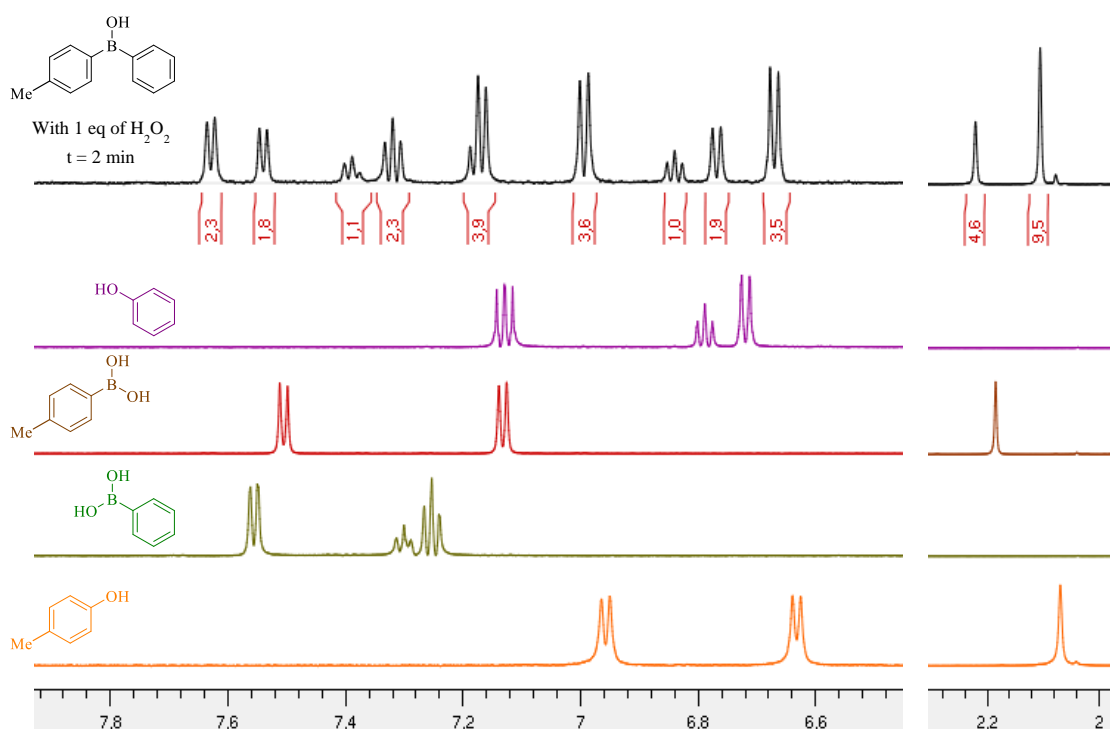


Figure S16: Time-dependent oxidation of borinic acid 47 with one equivalent of H_2O_2

^1H NMR spectra of borinic acid **47** (reference), borinic acid **47** with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol and 4-methylphenol.

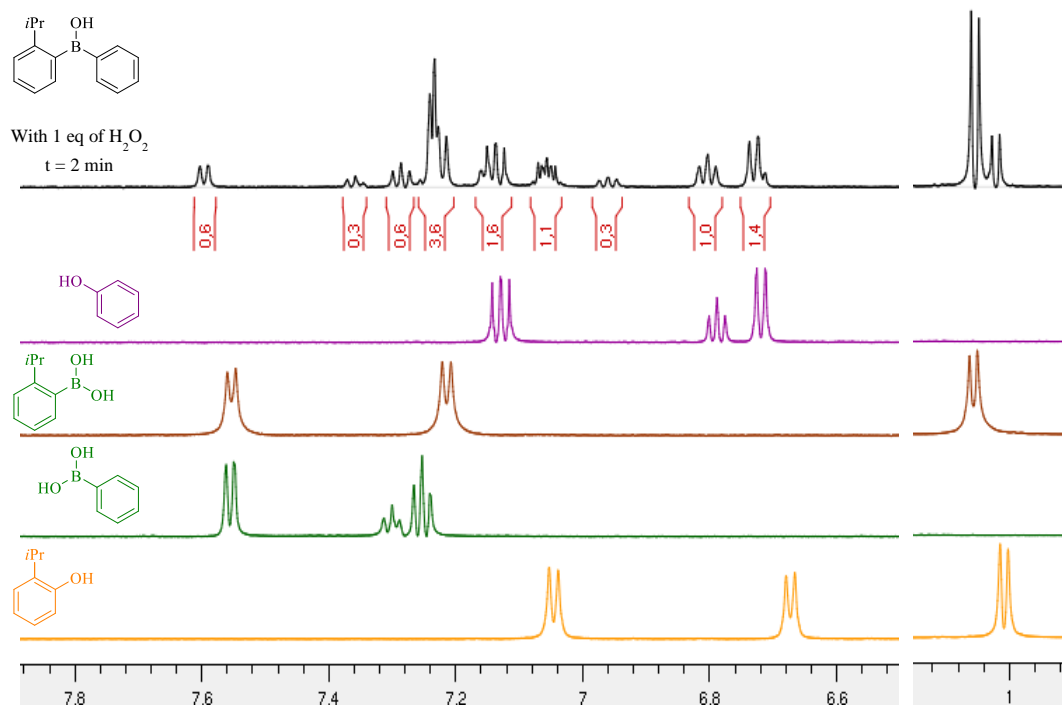


Figure S17: Time-dependent oxidation of borinic acid 59 with one equivalent of H_2O_2

1H NMR spectra of borinic acid 59 (reference), borinic acid 57 with H_2O_2 (1 equiv) after 2 minutes, expected products: phenylboronic acid, phenol, 2-isopropylphenylboronic acid and 2-isopropylphenol.

d) Borinic acid **64**

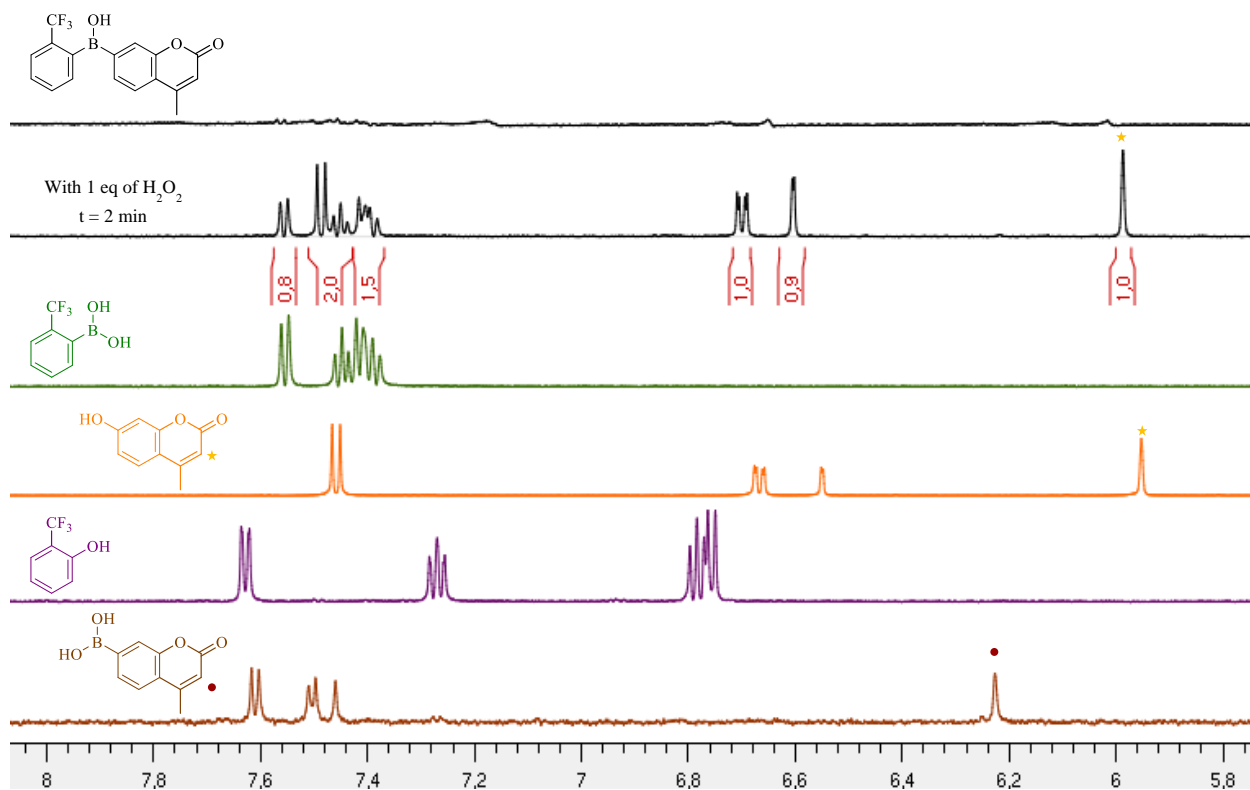


Figure S18: Time-dependent oxidation of borinic acid **64** with one equivalent of H₂O₂

¹H NMR spectra of borinic acid **64** (reference), borinic acid **64** with H₂O₂ (1 equiv) after 2 minutes, expected products: 2-trifluoromethylphenylboronic acid, 4-MU, boronic acid **42** and 2-trifluoromethylphenol.

e) Borinic acid **66**

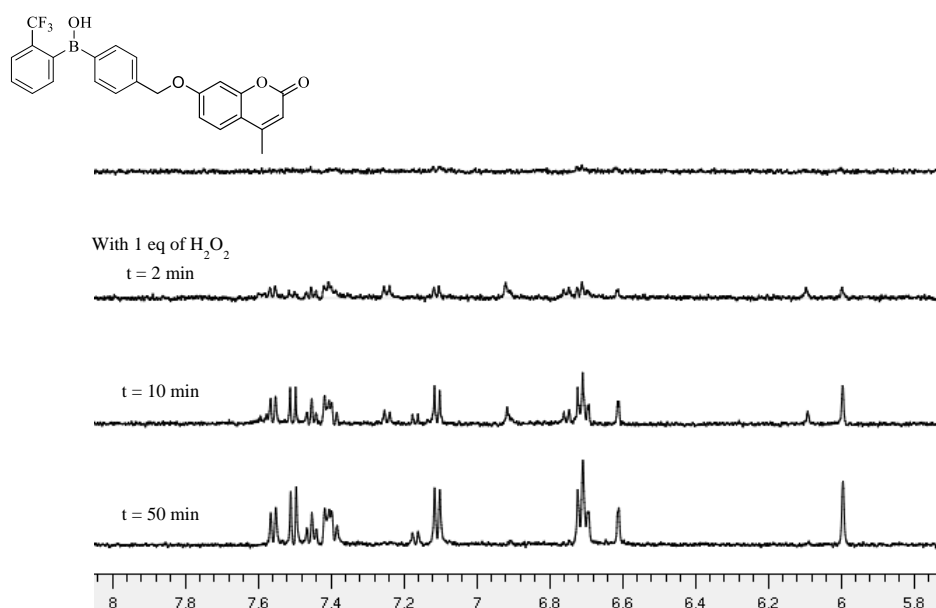


Figure S19: Time-dependent oxidation of borinic acid **66** with one equivalent of H_2O_2
 ^1H NMR spectra of borinic acid **66** (reference), borinic acid **66** with H_2O_2 (1 equiv) after 2, 15 and 50 minutes.

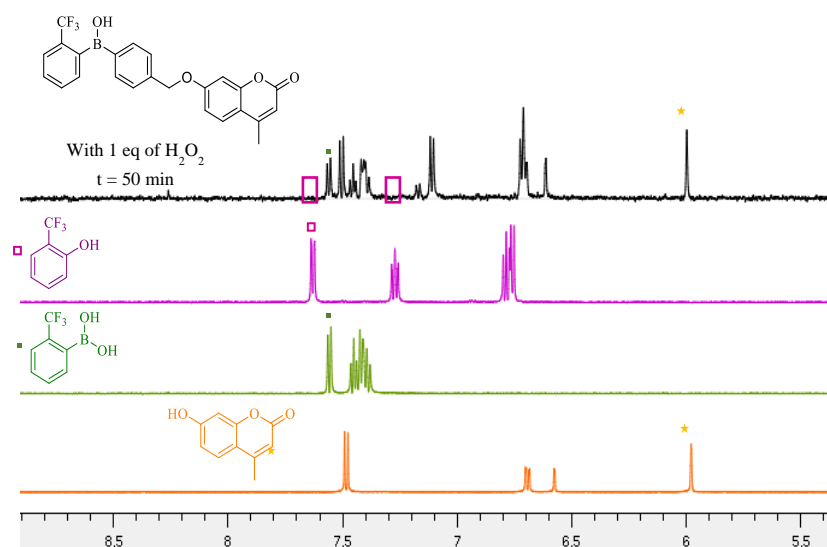


Figure S20: Time-dependent oxidation of borinic acid **66** with one equivalent of H_2O_2
 ^1H NMR spectra of borinic acid **66** (reference), borinic acid **66** with H_2O_2 (1 equiv) after 50 minutes, expected products: 4-MU, 2-trifluoromethylphenylboronic acid and 2-trifluoromethylphenol.

III. Kinetic studies

a) Methods

Analytical Solutions: All measurements of protonation constants were performed in Britton-Robinson buffer 1X and kinetic analyses were performed in PBS buffer 1X (pH 7.4).¹⁹³ All solutions were prepared using water purified through a Direct-Q 5 (Millipore, Billerica, MA).

pH Measurements: pH measurements were performed on a Standard pH meter PHM210 Radiometer Analytical (calibrated with aqueous buffers at pH 4 and 7 or 10) with a Crison 5208 Electrode (Barcelona, Spain), which is accurate over the 0-14 pH range.

UV-Visible Absorption: UV-Vis absorption spectra were recorded in 1 cm × 1 cm quartz cuvettes (Hellma) on a diode array UV-Vis spectrophotometer (Evolution array, Thermo Scientific) at 293 K. The molar absorption coefficients were extracted while checking the validity of the Beer-Lambert law.

The absorbance evolutions as a function of pH were analyzed with the SPECFIT/32 Global Analysis System (version 3.0 for 32-bit Windows systems) to extract the pK of the investigated compounds.¹⁹⁴

Steady-state fluorescence emission: Corrected fluorescence spectra upon one-photon excitation were recorded with a Photon Technology International QuantaMaster QM-1 spectrofluorimeter (PTI, Monmouth Junction, NJ) equipped with a Peltier cell holder (TLC50, Quantum Northwest, Shoreline, WA). Solutions for fluorescence measurements were adjusted to concentrations such that the absorption maximum was below 0.15 at the excitation wavelength.

¹⁹³ C. Frugoni, *Gazz. Chim. Ital.* **1957**, 87, 403-407.

¹⁹⁴ a) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, 32, 95-101; b) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, 32, 257-264; c) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, 32, 1133-1139; d) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1986**, 33, 943-951.

b) Measurement of the protonation constants

Figures S21A-C display the evolution of the UV-Vis absorption spectra of **41**, **42** and 4-methylumbelliferone (**4-MU**) on pH in Britton-Robinson buffer 1X.

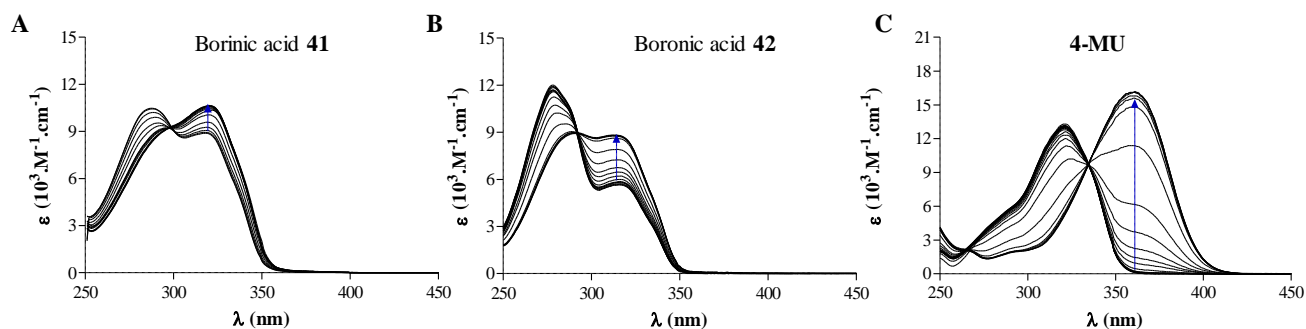


Figure S21 : Dependence of the absorption spectra of 20 μM solutions on pH for the probe **41** (A; from acidic to basic: pH = 2.92, 3.66, 4.29, 4.71, 5.16, 5.62, 6.17, 6.65, 7.00, 7.34, 7.92, 8.64, 9.06, 9.37), **42** (B; from acidic to basic: pH = 3.84, 4.25, 4.57, 4.82, 5.16, 5.56, 6.08, 6.50, 6.7, 7.03, 7.28, 7.63, 8.43, 8.88, 9.20, 9.55, 10.24), and 4-MU (C; from acidic to basic: pH = 2.87, 2.98, 3.15, 3.75, 4.16, 4.46, 4.68, 4.93, 5.22, 5.63, 6.17, 6.56, 6.80, 7.06, 7.31, 8.15, 8.78, 9.13, 9.36, 9.73, 10.15, 10.66). Solvent: Britton-Robinson buffer 1X at 293 K.

The corresponding evolutions of the absorbance as a function of pH were analyzed with the *SPECFIT/32TM* Global Analysis System (Version 3.0 for 32-bit Windows systems) to extract the protonation constants of the acidic groups. The results are displayed in Table S1.

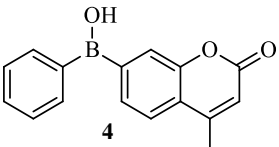
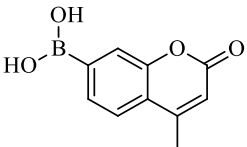
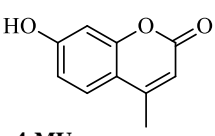
Compound	<i>pKa</i>
 <p>4</p>	5.3 ± 0.1
 <p>5</p>	7.4 ± 0.1
 <p>4-MU</p>	7.8 ± 0.1

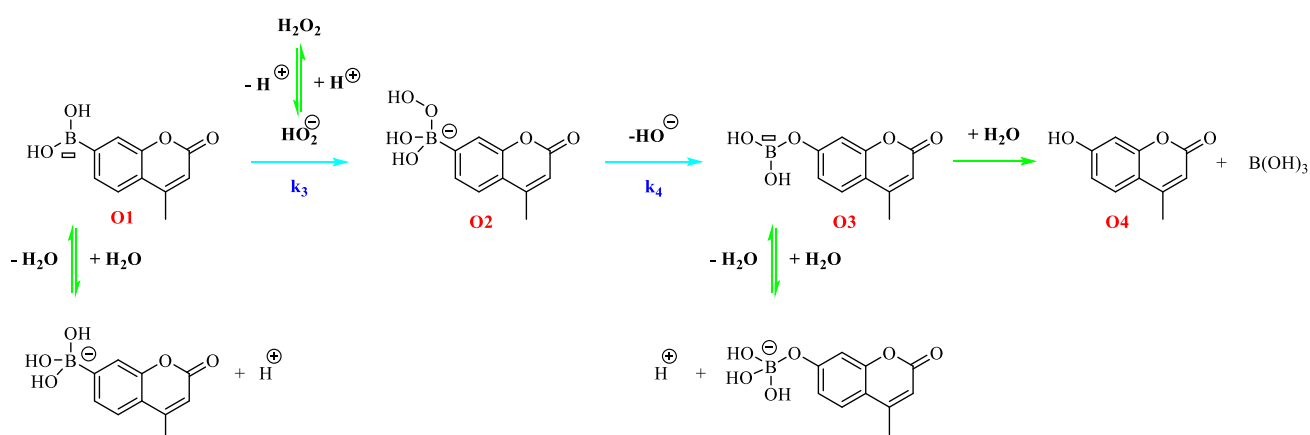
Table S1: Protonation constants of **41**, **42** and 4-MU. Solvent: Britton-Robinson buffer 1X at 293 K.

c) Kinetic analysis of oxidation of **41** and **42**

The kinetic analysis of the oxidation of the boron-containing profluorophores has been performed and validated stepwise. For a better understanding of mechanism, we chose here to adopt the **O1**, **O4**, and **I1** abbreviations for boronic acid **42**, 4-methylumbelliferrone (**4-MU**) and borinic acid **41**, respectively.

3.1 4-Methylcoumarin boronic acid **42** oxidation

We first addressed the kinetics of oxidation of 4-methylcoumarin boronic acid **42** (**O1**), which exhibits a simple oxidation scheme and which will be subsequently used to analyze the oxidation of the borinic acid **41** (**I1**) (Scheme S1).



*Scheme 1: General oxidation scheme of the boronic acid **O1**.
Green and blue arrows are respectively associated to fast and slow steps*

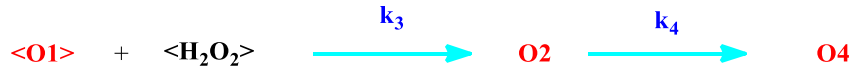
To reduce the mechanisms associated to the oxidations of the boro- and borinic acid derivatives, we notably took into account that several reactions were rapid at the timescale of the overall oxidation process: (i) the proton exchange reactions involving the acids (boro- and borinic, hydrogen peroxide) the relaxation times of which are expected to be in the second range under our experimental conditions¹⁹⁵ and (ii) the hydrolysis of the borate esters occurring below the second time scale.¹⁹⁶ At the “slow” time scale investigated in this paper, such fast steps disappear from the reduced mechanism and the species **S_i** engaged in fast exchanges can be replaced by “averaged” species **<S>**. One is correspondingly left with a reduced mechanism involving only two types of reactions: (i) the nucleophilic attacks of hydrogen peroxide onto the boronic and borinic acids and (ii) the migration of the aryl moieties giving rise to the formation of borate or boronate esters.

3.1.1 Theoretical model

After reduction following the principles exposed above, the relevant mechanism governing **O1** oxidation is shown in Scheme S2:

¹⁹⁵ The rate constant associated to the reaction between boric acid and the hydroxide ion is in the $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ range (see G. Waton, P. Mallo, S. J. Candau, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3301-3305). At neutral pH, this value yields a relaxation time associated to this reaction in the second range.

¹⁹⁶ H. Steinberg, D. L. Hunter, *Ind. Eng. Chem.* **1957**, *49*, 174-181.



Scheme S2: Reduced oxidation mechanism of the boronic acid derivative **O1**.

The kinetic model shown in Scheme S4 involves two successive reactions (associated with two rate constants: k_3 and k_4) leading to the formation of **O4** (4-MU) from the boronic acid **O1** via one intermediate hydrogen peroxide adduct **O2**.

Denoting h and $K_{a,O1}$ for the proton concentration and for the proton exchange constant of **O1**, the set of differential equations governing the evolution of the concentration in the species shown in Scheme S4 is given in Eqs.(1-3):

$$\frac{d\langle O1 \rangle}{dt} = -k_3 \frac{h}{h+K_{a,O1}} \times \langle H_2O_2 \rangle \langle O1 \rangle = -\kappa_3 \langle O1 \rangle \quad (1)$$

$$\frac{dO2}{dt} = \kappa_3 O1 - k_4 O2 \quad (2)$$

$$\frac{dO4}{dt} = k_4 O2 \quad (3)$$

with the additional conservation law

$$\langle O1 \rangle_0 = \langle O1 \rangle + O2 + O4 \quad (4)$$

since the system is closed. In the most general case,¹⁹⁷ the rate constants k_3 and k_4 are different and the solutions of Eqs.(1-3) are given in Eqs.(5-7):

$$\frac{\langle O1 \rangle(t)}{\langle O1 \rangle_0} = e^{-\kappa_3 t} \quad (5)$$

$$\frac{O2(t)}{\langle O1 \rangle_0} = \frac{\kappa_3}{k_4 - \kappa_3} (e^{-\kappa_3 t} - e^{-k_4 t}) \quad (6)$$

$$\frac{O4(t)}{\langle O1 \rangle_0} = 1 - \frac{k_4 e^{-\kappa_3 t} - \kappa_3 e^{-k_4 t}}{k_4 - \kappa_3} \quad (7)$$

In the case $k_4 \gg \kappa_3$ (*vide infra*), this set of equations transforms into Eqs.(8-10) at $t \gg 1/k_4$.

$$\frac{\langle O1 \rangle(t)}{\langle O1 \rangle_0} = e^{-\kappa_3 t} \quad (8)$$

¹⁹⁷ When $k_4 = \kappa_3$, the solutions of Eqs.(1-3) yield:

$$\frac{O2(t)}{\langle O1 \rangle_0} = \kappa_3 t e^{-\kappa_3 t}$$

$$\frac{O4(t)}{\langle O1 \rangle_0} = 1 - (1 + \kappa_3 t) e^{-\kappa_3 t}$$

$$\frac{O2(t)}{\langle O1 \rangle_0} \approx 0 \quad (9)$$

$$\frac{O4(t)}{\langle O1 \rangle_0} = 1 - e^{-\kappa_3 t} \quad (10)$$

3.1.2 Experimental results

The absorption spectra of the fluorescent reporter **O4** (4-MU) and of the boronic acid precursor **O1** are displayed in Figure S22. At the excitation wavelength (405 nm) subsequently used in our kinetic experiments, one expects that the coumarin scaffold would be essentially the only species giving rise to absorption under the illumination conditions used for the kinetic experiment.

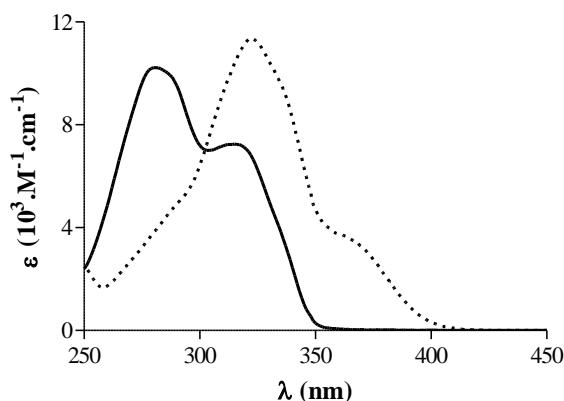


Figure S22: Absorption spectra of **O1** (solid line) and **O4** (dashed line). Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4) at 293 K.

Figure S23 displays the temporal evolution of the fluorescence emission originating from adding various concentrations of H₂O₂ to a continuously illuminated 5 μM solution of **O1** at 293 and 310 K. As anticipated, an increase of fluorescence emission was observed, which is associated to the photo-release of the fluorescent 4-methylumbelliferone **O4**.

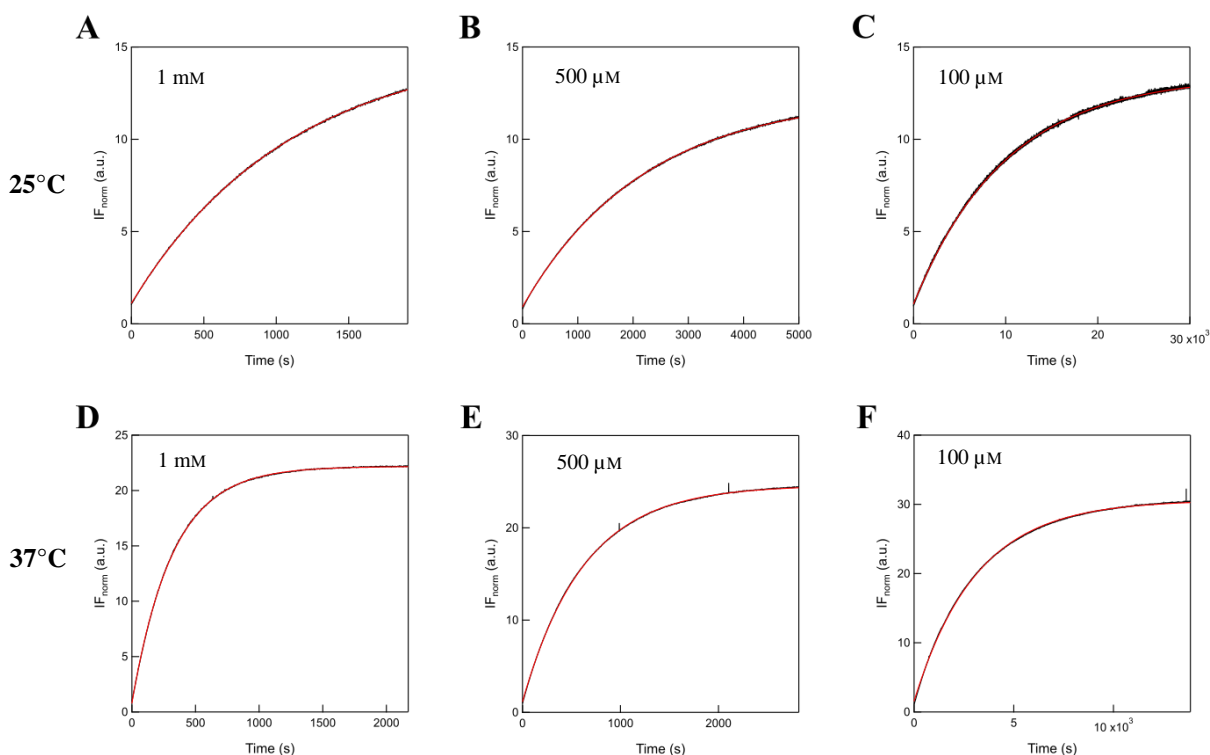


Figure S23: Temporal evolution of the fluorescence emission at $\lambda_{em}=450$ nm of a $5.0 \mu\text{M}$ **O1** solution upon addition of H_2O_2 at various concentrations at 293 K (A: 1000 μM ; B: 500 μM ; C: 100 μM) and 310 K (D: 1000 μM ; E: 500 μM ; F: 100 μM).

Black solid line: experimental data; red solid line: fit with Eq.(10). From the fits, we retrieved κ_3 values equal to $9.1 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-6}$, $4.7 \times 10^{-4} \pm 2.9 \times 10^{-7}$, and $1.0 \times 10^{-4} \pm 2.8 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ at 1000, 500, and 100 μM H_2O_2 respectively at 293 K, and to $3.1 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-6}$, $1.6 \times 10^{-3} \pm 8.5 \times 10^{-7}$, $3.2 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 1000, 500, and 100 μM H_2O_2 respectively at 310 K. Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4). $T = 293$ K (A-C) or 310 K (D-F).

Absorption spectra of **O1** (solid line) and **O4** (dashed line). Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4) at 293 K.

For a total absorbance lower than 0.15 (as in the present series of experiments), fluorescence emission is proportional to the sum of the contributions of the fluorescent components, which are individually proportional to their respective concentrations. By neglecting the contributions of non-absorbing species, we derived

$$I_F^{O4}(t) = \alpha Q_{O4} O4(t) \quad (11)$$

where α and Q_{O4} respectively designate a proportionality optical factor and the brightness of the 4-methylumbelliferone **O4**.

We first adopted the expression of **O4** in Eq.(7) to fit the experimental data with Eq.(11) using κ_3 and k_4 as floating parameters. However, we noticed that a single exponential was sufficient for a satisfactory fit. Furthermore, we observed that the extracted rate constant was proportional to the H_2O_2 concentration (Figure S24) so as to finally adopt Eqs.(10,11) for the fit of the experimental data. Figure S3 shows that experimental data were satisfactorily fitted with

Eqs.(10,11). In particular, we extracted $k_3 = 1.85 \pm 0.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at 293 K and $k_3 = 6.26 \pm 0.1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at 310 K, in line with reported values.^{198, 199, 200}

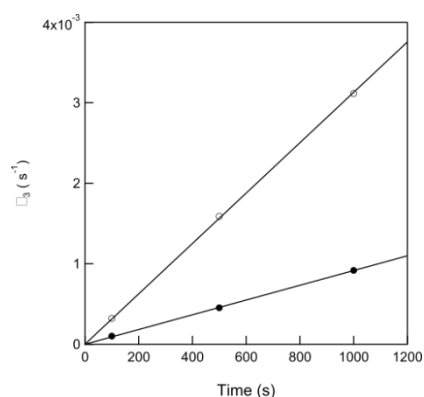
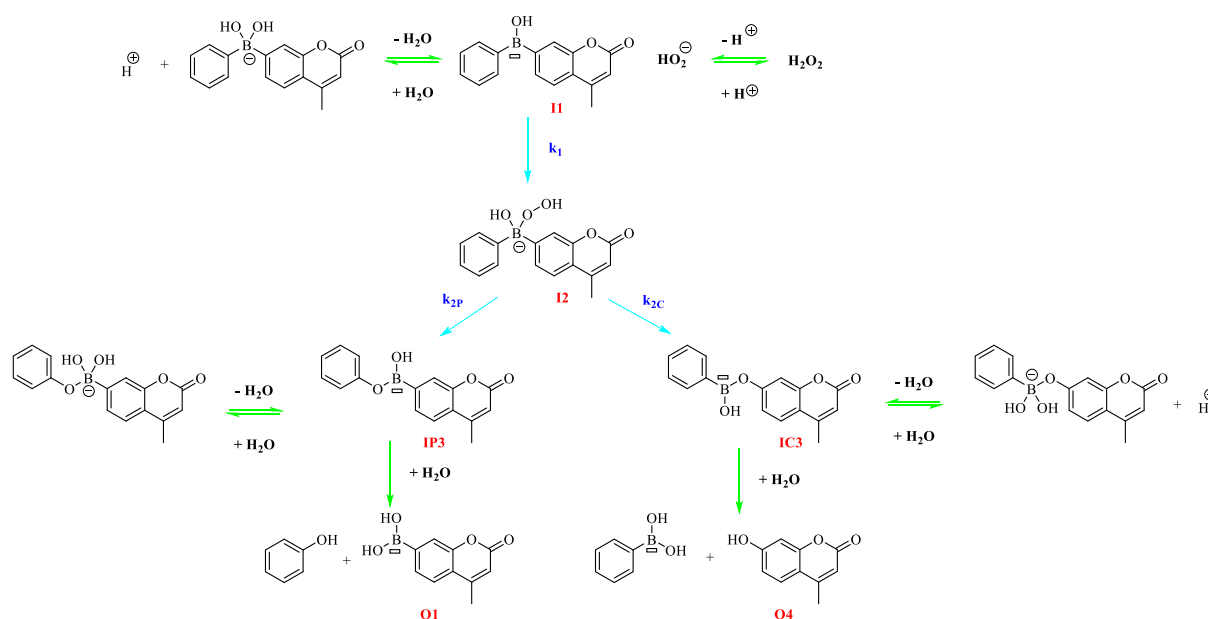


Figure S24: Dependence of k_3 on H_2O_2 concentration. Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4). $T = 293 \text{ K}$ (disks) or 310 K (circles).

3.2 Borinic acid 4 oxidation

Equipped with the results for 4-methylcoumarin boronic acid **O1** oxidation, we could subsequently analyze the more complex kinetic scheme of the borinic acid derivative **II** (Scheme S3).



Scheme S3: General oxidation scheme of the borinic acid derivative **II**. Green and blue arrows are respectively associated to fast and slow steps.

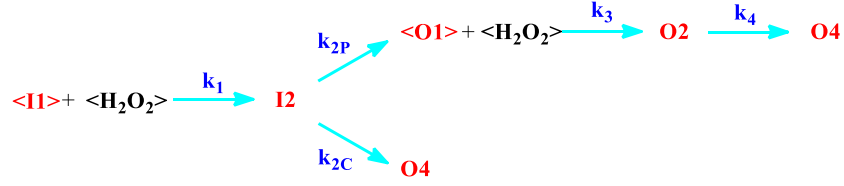
¹⁹⁸ J. N. LaButti, K. S. Gates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 218-221 ($k = 1.2 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

¹⁹⁹ A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1401-1407 ($k = 2.2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

²⁰⁰ J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 14210-14216 ($k = 1.5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

3.2.1 Theoretical model

Under the same assumption as in the preceding subsection, we could reduce the overall mechanism displayed in Scheme S3 into the kinetic model shown in Scheme S4.



Scheme S4: Reduced oxidation mechanism of the borinic acid derivative II.

The set of differential equations governing the evolution of the concentration in the species shown in Scheme S6 is given in Eqs.(12-17):

$$\frac{d\langle I1 \rangle}{dt} = -k_1 \frac{h}{h+K_{a,I1}} \times \langle H_2O_2 \rangle \langle I1 \rangle = -\kappa_1 \langle I1 \rangle \quad (12)$$

$$\frac{dI2}{dt} = \kappa_1 \langle I1 \rangle - (k_{2P} + k_{2C}) I2 \quad (13)$$

$$\frac{d\langle O1 \rangle}{dt} = k_{2P} I2 - k_3 \langle O1 \rangle \quad (14)$$

$$\frac{dO2}{dt} = \kappa_3 \langle O1 \rangle - k_4 O2$$

(15)

$$\frac{dO4}{dt} = k_4 O2 + k_{2C} I2$$

(16)

with the additional conservation law since the system is closed.

$$\langle I1 \rangle_0 = \langle I1 \rangle + I2 + \langle O1 \rangle + O2 + O4 \quad (17)$$

In the most general case, the rate constants are different and the solutions of Eqs.(12-17) are given in Eqs.(19-22):

$$\frac{\langle I1 \rangle(t)}{\langle I1 \rangle_0} = e^{-\kappa_1 t} \quad (18)$$

$$\frac{I2(t)}{\langle I1 \rangle_0} = \frac{\kappa_1}{(k_{2P}+k_{2C})-\kappa_1} \left[e^{-\kappa_1 t} - e^{-(k_{2P}+k_{2C})t} \right] \quad (19)$$

$$\frac{\langle O1 \rangle(t)}{\langle I1 \rangle_0} = \kappa_1 k_{2P} \left[\frac{e^{-\kappa_1 t}}{((k_{2P}+k_{2C})-\kappa_1)(\kappa_3-\kappa_1)} + \frac{e^{-(k_{2P}+k_{2C})t}}{(\kappa_1-(k_{2P}+k_{2C}))(\kappa_3-(k_{2P}+k_{2C}))} + \frac{e^{-\kappa_3 t}}{(\kappa_1-\kappa_3)((k_{2P}+k_{2C})-\kappa_3)} \right]$$

(20)

$$\frac{O2(t)}{\langle I1 \rangle_0} = \kappa_1 k_{2P} \kappa_3 \left[\alpha_2 e^{-\kappa_1 t} + \beta_2 e^{-(k_{2P}+k_{2C})t} + \gamma_2 e^{-\kappa_3 t} + \delta_2 e^{-k_4 t} \right] \quad (21)$$

$$\frac{O4(t)}{(I1)_0} = \kappa_1 k_{2P} \kappa_3 k_4 [\alpha_4 (1 - e^{-\kappa_1 t}) + \beta_4 (1 - e^{-(k_{2P} + k_{2C})t}) + \gamma_4 (1 - e^{-\kappa_3 t}) + \delta_4 (1 - e^{-k_4 t})] \quad (22)$$

with

$$\alpha_2 = \frac{1}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1)(\kappa_3 - \kappa_1)(k_4 - \kappa_1)} \quad (23)$$

$$\beta_2 = \frac{1}{(\kappa_1 - (k_{2P} + k_{2C}))(\kappa_3 - (k_{2P} + k_{2C}))(k_4 - (k_{2P} + k_{2C}))} \quad (24)$$

$$\gamma_2 = \frac{1}{(\kappa_1 - \kappa_3)((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_3)(k_4 - \kappa_3)} \quad (25)$$

$$\delta_2 = \frac{1}{(\kappa_1 - k_4)((k_{2P} + k_{2C}) - k_4)(\kappa_3 - k_4)} \quad (26)$$

$$\alpha_4 = \frac{k_{2C}}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1)\kappa_1 k_{2P} \kappa_3 k_4} + \frac{1}{\kappa_1((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1)(\kappa_3 - \kappa_1)(k_4 - \kappa_1)} \quad (27)$$

$$\beta_4 = -\frac{k_{2C}}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1)(k_{2P} + k_{2C})k_{2P} \kappa_3 k_4} + \frac{1}{(\kappa_1 - (k_{2P} + k_{2C}))(k_{2P} + k_{2C})(\kappa_3 - (k_{2P} + k_{2C}))(k_4 - (k_{2P} + k_{2C}))} \quad (28)$$

$$\gamma_4 = \frac{1}{(\kappa_1 - \kappa_3)((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_3)\kappa_3(k_4 - \kappa_3)} \quad (29)$$

$$\delta_4 = \frac{1}{(\kappa_1 - k_4)((k_{2P} + k_{2C}) - k_4)(\kappa_3 - k_4)k_4} \quad (30)$$

3.2.2 Experimental results

The absorption spectra of **O4** (4-MU) and of the borinic acid precursor **II** are displayed in Figure S25. Again, at the excitation wavelength subsequently used in our kinetic experiments (405 nm), one expects that the coumarin chromophore would be essentially the only species giving rise to absorption under the illumination conditions used for the kinetic experiment.

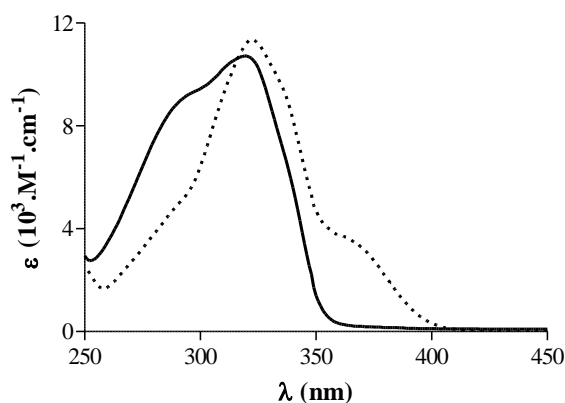


Figure S25: Absorption spectra of **II** (solid line) and **O4** (dashed line). Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4) at 293 K.

Figure S26 displays the temporal evolution of the fluorescence emission originating from addition of various concentrations of H₂O₂ to a continuously illuminated 5 μM solution of **I1** at 293 and 310 K. As anticipated, one observes an increase of fluorescence emission, which is associated to the photo-release of the fluorescent 4-methylumbelliferone **O4**.

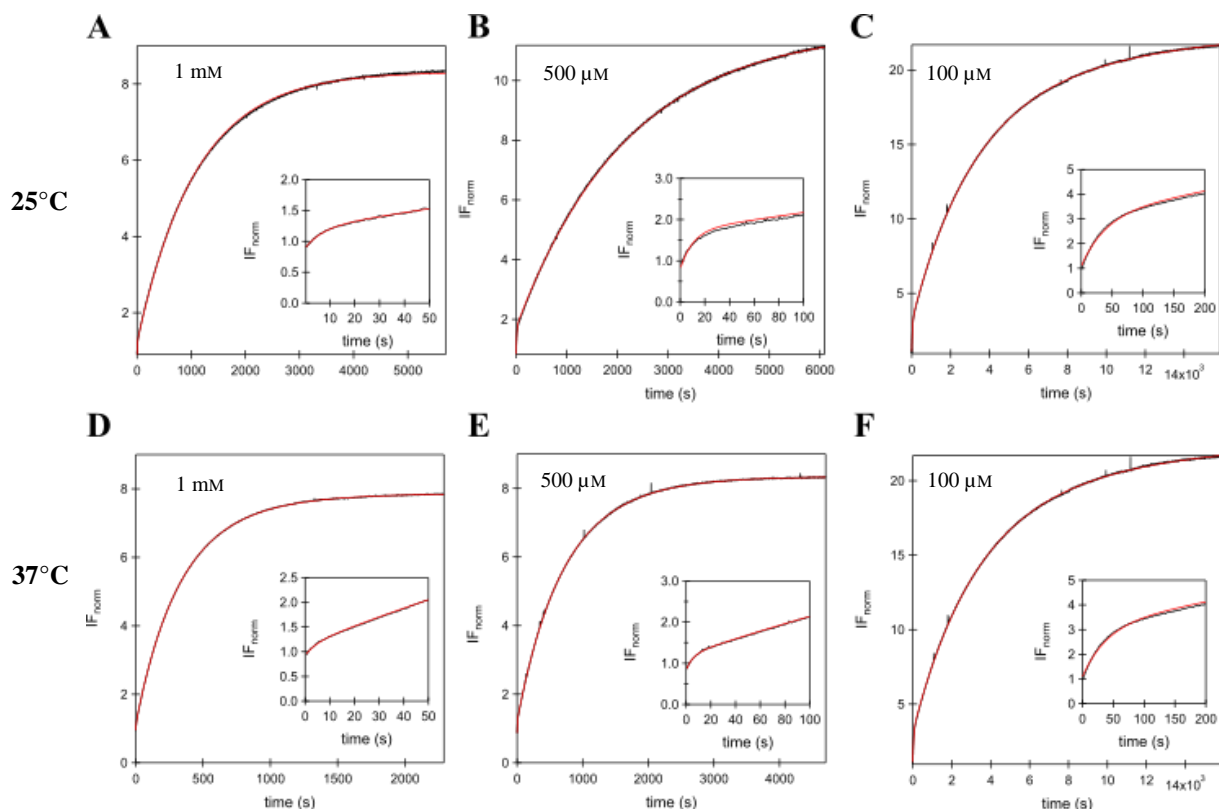


Figure S26: Temporal evolution of the fluorescence emission at $\lambda_{em}=450\text{ nm}$ of a $5.0\ \mu\text{M}$ **I1 solution after addition of H_2O_2 at 293 K (A-C) and 310 K (D-F) of various concentrations: 1000 μM (A, C), 500 μM (B, E), 100 μM (C, F).**

Black solid line: experimental data; red solid line: fit with Eq.(31). From the fits with Eq.(31) by fixing k_3 to the values found in § 3.1.2, we retrieved κ_1 values at 293 K equal to $1.4 \times 10^{-1} \pm 1.5 \times 10^{-2}$, $2.91 \times 10^{-1} \pm 2.6 \times 10^{-3}$, $1.5 \times 10^{-2} \pm 9.9 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ at 1000, 500 and 100 μM H₂O₂ concentrations respectively and κ_1 values at 310 K equal to $3.3 \times 10^{-1} \pm 2.5 \times 10^{-3}$, $1.6 \times 10^{-1} \pm 8.3 \times 10^{-3}$, and $2.5 \times 10^{-2} \pm 2.6 \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ at 1000, 500 and 100 μM H₂O₂ concentrations respectively.

Solvent: PBS buffer 1X (pH 7.4). $T = 293\text{ K}$ (A-C) or 310 K (D-F).

Eq.(11) is again valid for analyzing the fluorescence emission in the present series of experiments. As shown in Eq.(22), **O4** concentration - and correspondingly the fluorescence emission - is expected to exhibit a tetraexponential temporal variation. However, we noticed that a biexponential law was sufficient for a satisfactory fit. Furthermore, we observed that κ_1 was proportional to the H₂O₂ concentration (see Figure S27), which suggested that the fastest steps were not revealed at our temporal resolution and that **O4** concentration could be accounted for with Eq.(31) for the fit of the experimental data in our kinetic regime.²⁰¹

$$\frac{O4(t)}{I_{1,0}} = \kappa_1 k_{2P} \kappa_3 k_4 [\alpha_4 (1 - e^{-\kappa_1 t}) + \beta_4 + \gamma_4 (1 - e^{-\kappa_3 t}) + \delta_4] \quad (31)$$

²⁰¹ In fact, the curves observed at 310 K were better fitted with a triexponential law. We suppose that it is the "rapid" migration occurring from **I2**, which manifests itself when the nucleophilic attack of H₂O₂ onto the acidic state of the borinic acid is fast enough. From the third timescale, we estimate that the migration half time is typically 15 min under our experimental conditions.

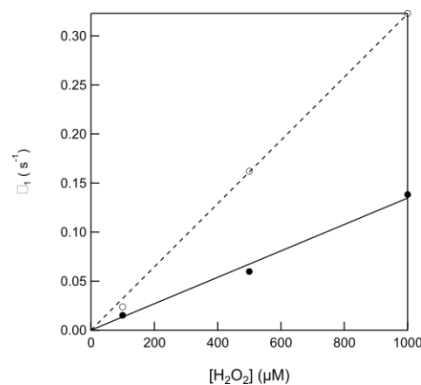


Figure S27: Dependence of κ_1 on H_2O_2 concentration. Solvent: BS buffer 1X (pH 7.4). $T = 293$ K (disks) or 310 K (circles).

Figure S27 shows that experimental data were satisfactorily fitted with Eq.(31). From Figure S27, we extracted $k_1 = (1.94 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at 293 K and $k_1 = (4.17 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ at 310 K, which are typically four orders of magnitude higher than for the boronic acid **5**.

iii. 3.2.3 Kinetic analysis of the cell experiments

Upon assuming the concentration of the probes to be higher than the one of hydrogen peroxide (pseudo-first order conditions), the time evolution of the fluorescence signal has been accounted by using the kinetic models extracted during the cuvette experiments.

As shown in Figure 3, the multiexponential evolutions of the fluorescence signal respectively predicted in Eqs.(11) and (22) (and which were observed in the cuvette experiments) reduce to the linear temporal dependences expected by considering the behavior of these equations at short times.

The exponential term which dominates the time evolution is associated to the highest rate constant. Considering that the fastest steps are not accessible at the time scale of our experiments (*vide supra*), the time evolution is governed by the exponential terms associated to the rate constants κ_3 and κ_1 for the probes **5** and **4** respectively. By retaining the dominating term in Eq.(27) and considering that we experimentally found that $k_{2P}=4k_{2C}$, our kinetic models predict that the ratio of the slopes of the linear fluorescence evolutions observed for **4** and **5** is $\kappa_1/5\kappa_3$. At pH 7 upon using the pKa values given in Tab.S1, this ratio is equal to 16, which is in reasonable agreement with the experimental ratio found equal to 10.

$$\alpha_4 \kappa_1 = \frac{k_{2C} \kappa_1}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1) \kappa_1 k_{2P} \kappa_3 k_4} + \frac{\kappa_1}{\kappa_1 ((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1) (\kappa_3 - \kappa_1) (k_4 - \kappa_1)} \quad (27)$$

$$\gamma_4 \kappa_3 = \frac{\kappa_3}{(\kappa_1 - \kappa_3) ((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_3) \kappa_3 (k_4 - \kappa_3)} \quad (29)$$

$$\alpha_4 \kappa_1 = \frac{k_{2C}}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1) k_{2P} \kappa_3 k_4} + \frac{1}{((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_1) (\kappa_3 - \kappa_1) (k_4 - \kappa_1)} \quad (27)$$

$$\gamma_4 \kappa_3 = \frac{1}{(\kappa_1 - \kappa_3) ((k_{2P} + k_{2C}) - \kappa_3) (k_4 - \kappa_3)} \quad (29)$$

$$\alpha_4 \kappa_1 = \frac{1}{((k_{2P} + k_{2C}))^4 \kappa_3 k_4} \quad (27)$$

$$\gamma_4 \kappa_3 = \frac{1}{(\kappa_1)((k_{2P} + k_{2C}))(k_4)} \quad (29)$$

Slope κ_3 for **6**

$$\text{Slope } \kappa_1 k_{2P} \kappa_3 k_4 \alpha_4 \kappa_1 \text{ for } \mathbf{5} = \frac{\kappa_1 k_{2P}}{((k_{2P} + k_{2C}))^4} = \frac{\kappa_1}{5}$$

Slopes ratio $\mathbf{5/6} = \frac{\kappa_1}{5\kappa_3} = 16$ (20 without rounding to whole numbers on pK and pH)

$$\frac{\alpha_4 \kappa_1}{\gamma_4 \kappa_3} = \frac{\kappa_1 (k_{2P} + k_{2C}) k_4}{((k_{2P} + k_{2C}))^4 \kappa_3 k_4} \quad (27/29)$$

$$\frac{\alpha_4 \kappa_1}{\gamma_4 \kappa_3} = \frac{\kappa_1}{4\kappa_3} \quad (27/29)$$

$$\frac{\alpha_4 \kappa_1}{\gamma_4 \kappa_3} = \frac{k_1 \frac{h}{h + K_{a,1}}}{4k_3 \frac{h}{h + K_{a,0}}} \quad (27/29)$$

$$\frac{\alpha_4 \kappa_1}{\gamma_4 \kappa_3} = \frac{k_1 \frac{10^{-7}}{10^{-7} + 10^{-5}}}{4k_3 \frac{10^{-7}}{10^{-7} + 10^{-7}}} \quad (27/29)$$

$$\frac{\alpha_4 \kappa_1}{\gamma_4 \kappa_3} = \frac{4.2 \times 10^4 \times \frac{10^{-7}}{10^{-7} + 10^{-5}}}{4 \times 6.3 \frac{10^{-7}}{10^{-7} + 10^{-7}}} \approx 16 \quad (27/29)$$

IV. Selectivity tests

a) Classical conditions

Selectivity for the probes **41** and **42** (5 μM , 0.02% DMSO) probes was measured by fluorescence emission of 7-hydroxy-4-methylcoumarin release. Spectra were recorded at 450 nm upon excitation at 360 nm using an Infinite M200 Pro, Tecan trading AG (Switzerland) in 96-black well plates (final volume of 100 μL) at 25°C every 30 seconds for 1h. All experiments were performed in triplicate and the results were averaged. The curves were obtained using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Various reactive oxygen species (ROS) were introduced at 100 μM of final concentration as follows:

- Hydrogen peroxide (H_2O_2) was delivered from 100 mM stock solution of solid H_2O_2 .urea in distilled water.
- Superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) was delivered from 50 mM stock solution of solid KO_2 in DMSO in presence of 18-crown 6-ether (60 mg/mL).
- *tert*-Butylhydroperoxide (TBHP) was delivered from commercially 70% aqueous solution.
- Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) and *tert*-butoxy radical ($\cdot\text{O}^t\text{Bu}$) were produced by the Fenton reaction of 2.5 mM Fe^{2+} with 100 μM H_2O_2 or TBHP, respectively.

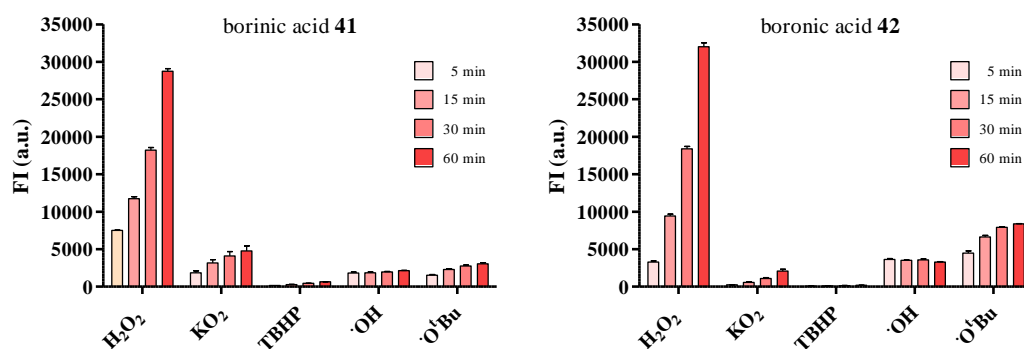


Figure S28: Fluorescence response of borinic acid **41** or borinic acid **42** toward H_2O_2 and other reactive oxygen species.

Chemiluminescence responses of 5 μM borinic acid **41** or borinic acid **42** to various ROS (100 μM) in 1X PBS buffer (pH 7.4) at 25°C. Bars represent emission intensity at 5, 15, 30 and 60 minutes after addition of each ROS. Emission intensity was recorded at $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$).

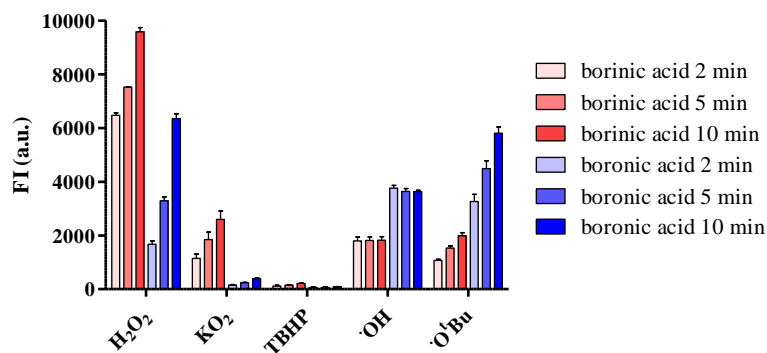


Figure S29: Fluorescence response of boronic acid 41 or boronic acid 42 toward H_2O_2 and other reactive oxygen species.

Chemiluminescence responses of $5\ \mu M$ boronic acid **41** (red bars) or $5\ \mu M$ boronic acid **42** (blue bars) to various ROS ($100\ \mu M$) in 1X PBS buffer (pH 7.4) at $25^\circ C$. Bars represent emission intensity at 2, 5, and 10 minutes after addition of each ROS. Emission intensity was recorded at $\lambda_{em} = 450\ nm$ ($\lambda_{ex} = 360\ nm$).

Response toward H_2O_2 for the boronic **64** was measured by fluorescence emission of 7-hydroxy-4-methylcoumarin release under the same conditions previously described.

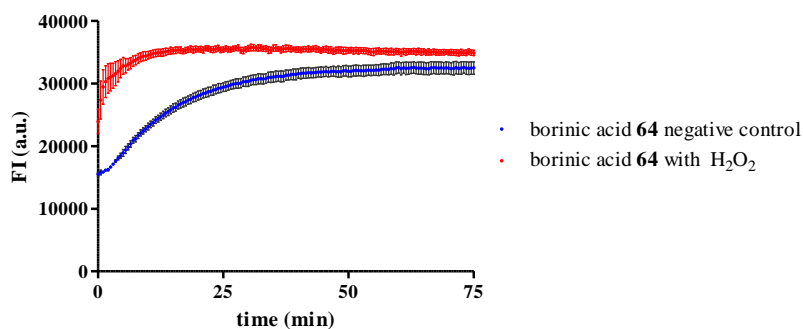


Figure S30: Fluorescence response of boronic acid 64 toward H_2O_2

Chemiluminescence responses of $5\ \mu M$ boronic acid **64** to $100\ \mu M$ of H_2O_2 in 1X PBS buffer (pH 7.4) at $25^\circ C$. Emission intensity was recorded at $\lambda_{em} = 450\ nm$ ($\lambda_{ex} = 360\ nm$).

e) Radiolysis experiments

γ -Irradiations were carried out using the panoramic $60Co$ γ -source IL60PL Cis-Bio International (France) in the University Paris-Saclay (Orsay, France). The dose rate was determined by Fricke dosimetry.²⁰² All irradiations were performed at room temperature on $5\ \mu M$ (0.02% DMSO) solutions of boronic **41** and boronic **42** probes for 10 minutes or 30 minutes (same dose, $100\ \mu M$ of superoxide radical anion or hydroxyl radical). Then the selectivity of the boronic **41** and boronic **42** probes was measured by fluorescence emission of 7-hydroxy-4-methylcoumarin release under the same conditions previously described.

²⁰² A. Henglein, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1991**, 95, 451-451.

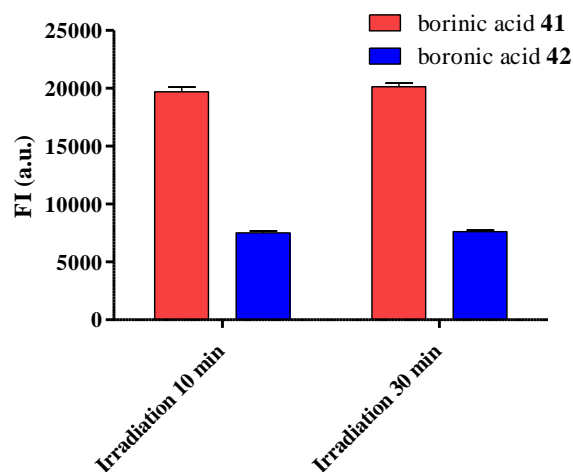


Figure S31: Fluorescence response of borinic acid 41 or borinic acid 42 toward superoxide radical anion or hydroxyl radical formed from radiolysis of water by γ radiation during 10 or 30 minutes
 5 μM probe **41** (red bars) or 5 μM boronic acid **42** (blue bars) with 100 μM of superoxide radical anion or hydroxyl radical. Data were recorded in PBS buffer 1X (pH 7.4, 0.02% DMSO) at 310 K, at $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$). Experiments were performed in triplicate and the results were averaged

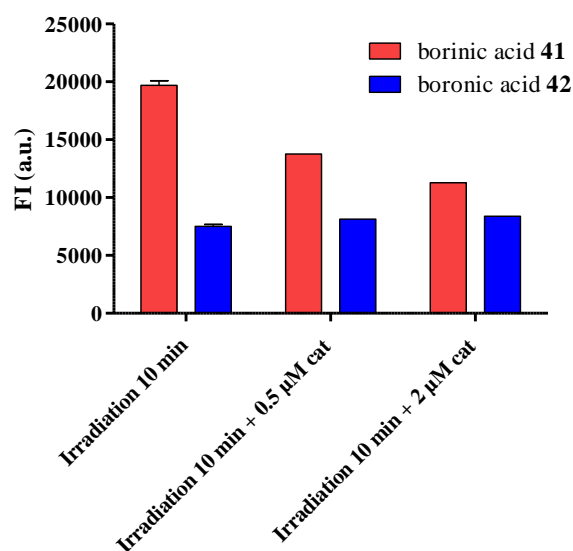


Figure S32: Fluorescence response of borinic acid 41 or boronic acid 42 superoxide radical anion or hydroxyl radical formed from radiolysis of water by γ radiation during 10 or 30 minutes in presence of catalase
 5 μM probe **41** (red bars) or 5 μM boronic acid **42** (blue bars) with 100 μM of superoxide radical anion or hydroxyl radical. Data were recorded in PBS buffer 1X (pH 7.4, 0.02% DMSO) at 310 K, at $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$). Experiments were performed in triplicate and the results were averaged

V. Cellular assays

COS7^{gp91-p22} cells were kindly provided by Pr. M Dinauer (Washington Univ, St Louis, USA). COS7^{gp91-p22} cells were grown in cell DMEM culture medium containing 10% of FBS (Gibco). In case of COS7^{gp91-p22}, the culture medium was supplemented with the selecting antibiotics G418 (1.8 mg/mL, Sigma Aldrich) and Puromycin (1 µg/mL, Sigma Aldrich). For cell splitting, cells are detached from the growing surface with the commercial Cell Dissociation Buffer Enzyme Free (Gibco) to avoid any damage on the extracellular parts of the membranous gp91 and p22.

In order to induce a continuous NADPH oxidase activity, COS7^{gp91-p22} cells were transfected with the cDNA coding for a chimeric protein, also called trimera, composed of all the domains necessary for the activation of the membranous catalytic core of the NADPH oxidase. The trimera contains the *N*-terminus of p47^{phox} (aa 1–286), the *N*-terminus of p67^{phox} (aa 1-212) and a full length Rac1 (aa 1-192) with the Q61L mutation that mimic the GTP bound form.¹⁶⁸

The day before transfection, cells were seeded in 48-wells plates. Cells are transfected at 85-90% of confluency using X-tremeGENE HP DNA transfection reagent following strictly the manufacturer protocol (Roche) with the plasmid coding for a fluorescent protein labelled trimera, Citrine-trimera.

24 h after transfection, the transfection medium was removed, and cells were washed twice with DPBS before the acquisition in 250 µL of PBSG. Probes were added at a final concentration of 10 µM, 250 µL of PBSG were added before the acquisition. Fluorescence was recorded at 450 nm upon excitation at 360 nm with a Synergy H1 microplate reader (BioTeck) at 37°C.

An aqueous solution of H₂O₂-urea complex was added at a final concentration of 100 µM on non-transfected COS7^{gp91-p22} cells (Figure S33).

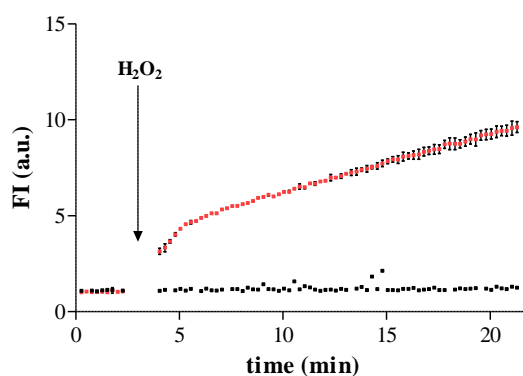


Figure S33: Time-dependent fluorescence release in the presence of 10 µM probe 41 after addition of 100 µM exogenous H₂O₂ in non-transfected COS7^{gp91-p22} cells.

Experiments were performed in duplicate and the results were averaged (red curve). In the negative control, H₂O₂ was lacking (black curve).

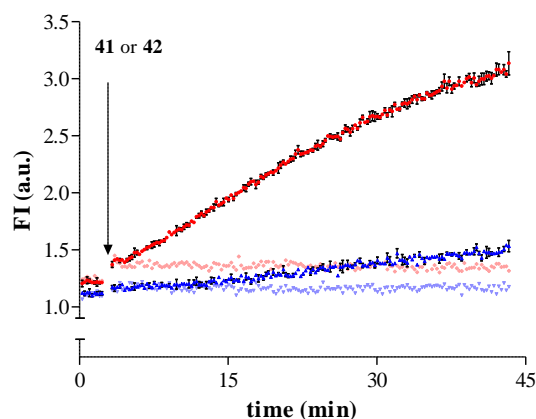


Figure S34: Fluorophore release in a cellular context. Time-dependent fluorescence intensity of 10 μM probe 41 (red curve) or 10 μM boronic acid 42 (blue curve) in transfected $\text{COS7}^{\text{gp91-p22}}$ cells. Negative controls in non-transfected $\text{COS7}^{\text{gp91-p22}}$ cells for probe 41 (light red curve) and boronic acid 42 (light blue curve). Data were recorded in PBS buffer 1X (pH 7.4, 0.02% DMSO) at 310 K, at $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$).

Experiments were performed in triplicate and the results were averaged

Catalase was added at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and diphenyleneiodonium chloride (DPI) at 50 μM on transfected or non-transfected $\text{COS7}^{\text{gp91-p22}}$ cells (Figure S35).

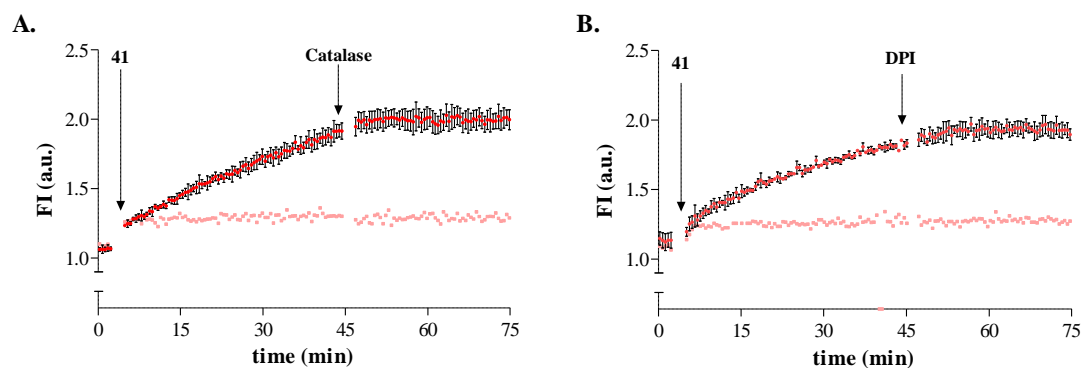


Figure S35: Fluorophore release in a cellular context. Time-dependent fluorescence intensity of 10 μM probe 41 (red curve) in transfected $\text{COS7}^{\text{gp91-p22}}$ cells with catalase, a scavenger of H_2O_2 (red curve, A), or DPI, an inhibitor of NADPH oxidase (blue curve, B). Negative controls in non-transfected $\text{COS7}^{\text{gp91-p22}}$ cells (light red curve, A and B). Data were recorded in PBS buffer 1X (pH 7.4, 0.02% DMSO) at 310 K, at $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$).

Experiments were performed in triplicate and the results were averaged

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- [1] A.-C. V. Bayne, R. J. Mockett, W. C. Orr, R. S. Sohal, *Biochem. J.* **2005**, *391*, 277-284.
- [2] C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, J. H. Livesey, A. J. Kettle, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39860-39869.
- [3] E. R. Stadtman, *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1250-1258.
- [4] S. Kanvah, J. Joseph, G. B. Schuster, R. N. Barnett, C. L. Cleveland, U. Landman, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 280-287.
- [5] M. P. Mattson, *Nature* **2004**, *430*, 631-639.
- [6] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.
- [7] S. G. Rhee, K.-S. Yang, S. W. Kang, H. A. Woo, T.-S. Chang, *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 619-626.
- [8] E. Rendra, V. Riabov, D. M. Mossel, T. Sevastyanova, M. C. Harmsen, J. Kzhyshkowska, *Immunobiology* **2019**, *224*, 242-253.
- [9] S. Schreml, M. Landthaler, M. Schaferling, P. Babilas, *Exp. Dermatol.* **2011**, *20*, 229-231.
- [10] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles*, WILEY-VCH, **2011**.
- [11] J. R. Lakowicz, *Principles Of Fluorescence Spectroscopy*, New York, NY: Springer, **2006**.
- [12] J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973-984.
- [13] D.-J. Zheng, Y.-S. Yang, H.-L. Zhu, *Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 625-651.
- [14] L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1151-1154.
- [15] J. B. Grimm, L. M. Heckman, L. D. Lavis, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Vol. 113* (Ed.: M. C. Morris), Academic Press, **2013**, pp. 1-34.
- [16] Y. Liu, Y. Sun, J. Du, X. Lv, Y. Zhao, M. Chen, P. Wang, W. Guo, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 432-437.
- [17] T. I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9825-9827.
- [18] H. H. Gorris, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6277-6282.
- [19] B. Zhao, F. A. Summers, R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 1080-1087.
- [20] J. P. Crow, *Nitric Oxide* **1997**, *1*, 145-157.
- [21] C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 227-231.
- [22] M. Afzal, S. Matsugo, M. Sasai, B. Xu, K. Aoyama, T. Takeuchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 619-624.
- [23] P. Wardman, *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 995-1022.
- [24] H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2389-2391.
- [25] S. Lechnitz, J. Heinrich, N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13411-13414.
- [26] K. Xu, B. Tang, H. Huang, G. Yang, Z. Chen, P. Li, L. An, *Chem. Commun.* **2005**, 5974-5976.
- [27] J. Heo, C.-K. Lim, Y. Kim, H.-J. Cho, Y.-D. Lee, J.-H. Maeng, D.-R. Ahn, S. Lee, J. Bang, S. Y. Park, S. Kim, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1131-1134.
- [28] H. Guo, G. Chen, M. Gao, R. Wang, Y. Liu, F. Yu, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 1203-1210.

- [29] M. Onoda, S. Uchiyama, A. Endo, H. Tokuyama, T. Santa, I. Imai, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1459-1461.
- [30] N. Soh, O. Sakawaki, K. Makihara, Y. Odo, T. Fukaminato, T. Kawai, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1131-1139.
- [31] Y. H. Lee, S. Jana, H. Lee, S. U. Lee, M. H. Lee, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 12069-12072.
- [32] I. Takashima, R. Kawagoe, I. Hamachi, A. Ojida, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2038-2044.
- [33] D. Narendra, A. Tanaka, D.-F. Suen, R. J. Youle, *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 795-803.
- [34] G. Ashrafi, T. L. Schwarz, *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 31-42.
- [35] J. Jing, J.-L. Zhang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2947-2952.
- [36] Y. Chen, W.-J. Zhu, X.-R. Wei, Y.-J. Xu, R. Sun, J.-F. Ge, *Anal. Meth.* **2018**, *10*, 3754-3758.
- [37] A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi, G. Tiegs, R. Otter, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 3241-3245.
- [38] K. Xu, M. Qiang, W. Gao, R. Su, N. Li, Y. Gao, Y. Xie, F. Kong, B. Tang, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1079-1086.
- [39] Z. Lou, P. Li, X. Sun, S. Yang, B. Wang, K. Han, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 391-393.
- [40] H. Ungati, V. Govindaraj, M. Narayanan, G. Mugesh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 8156-8160.
- [41] Y. X. Liao, K. Li, M. Y. Wu, T. Wu, X. Q. Yu, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3004-3008.
- [42] C. Xu, Y. Qian, *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 2714-2721.
- [43] M. Kaur, D. S. Yang, K. Choi, M. J. Cho, D. H. Choi, *Dyes Pigm.* **2014**, *100*, 118-126.
- [44] Y. Sawaki, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6292-6296.
- [45] B. Siegel, J. Lanphear, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 942-946.
- [46] M. Abo, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10629-10637.
- [47] M. Abo, R. Minakami, K. Miyano, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano, H. Sumimoto, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5983-5990.
- [48] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [49] A. Juillerat, C. Heinis, I. Sielaff, J. Barnikow, H. Jaccard, B. Kunz, A. Terskikh, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1263-1269.
- [50] K. M. Zhang, W. Dou, P. X. Li, R. Shen, J. X. Ru, W. Liu, Y. M. Cui, C. Y. Chen, W. S. Liu, D. C. Bai, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 542-546.
- [51] C. Gao, Y. Tian, R. Zhang, J. Jing, X. Zhang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12945-12950.
- [52] J. Peng, X. Hou, F. Zeng, S. Wu, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 278-285.
- [53] X. Xie, X. Yang, T. Wu, Y. Li, M. Li, Q. Tan, X. Wang, B. Tang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 8019-8025.
- [54] B. Li, J.-B. Chen, Y. Xiong, X. Yang, C. Zhao, J. Sun, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *268*, 475-484.
- [55] M. S. Purdey, H. J. McLennan, M. L. Sutton-McDowall, D. W. Drumm, X. Zhang, P. K. Capon, S. Heng, J. G. Thompson, A. D. Abell, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *262*, 750-757.

- [56] Y. He, L. Miao, L. Yu, Q. Chen, Y. Qiao, J.-F. Zhang, Y. Zhou, *Dyes Pigm.* **2019**, *168*, 160-165.
- [57] H. G. Kuivila, A. G. Armour, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5659-5662.
- [58] L. C. Lo, C. Y. Chu, *Chem. Commun.* **2003**, 2728-2729.
- [59] A. R. Lippert, G. C. Van de Bittner, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793-804.
- [60] M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392-15393.
- [61] A. E. Albers, B. C. Dickinson, E. W. Miller, C. J. Chang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5948-5950.
- [62] E. W. Miller, A. E. Albers, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16652-16659.
- [63] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.
- [64] E. W. Miller, O. Tulyathan, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 263-267.
- [65] B. C. Dickinson, C. Huynh, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5906-5915.
- [66] L. Du, M. Li, S. Zheng, B. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3045-3048.
- [67] B. Zhu, H. Jiang, B. Guo, C. Shao, H. Wu, B. Du, Q. Wei, *Sens. Actuator B-Chem.* **2013**, *186*, 681-686.
- [68] H. Li, Q. Yao, J. Fan, J. Du, J. Wang, X. Peng, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *94*, 536-543.
- [69] F. Xu, H. Li, Q. Yao, J. Fan, J. Wang, X. Peng, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 7363-7367.
- [70] J. F. Turrens, *J. Physiol.* **2003**, *552*, 335-344.
- [71] B. C. Dickinson, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9638-9639.
- [72] P. R. Castello, D. A. Drechsel, M. Patel, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14186-14193.
- [73] L. F. Yousif, K. M. Stewart, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1939-1950.
- [74] Y. Liu, J. Niu, J. Nie, F. Meng, W. Lin, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 3320-3325.
- [75] M. Ren, B. Deng, J. Y. Wang, X. Kong, Z. R. Liu, K. Zhou, L. He, W. Lin, *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 237-243.
- [76] H. Xiao, P. Li, X. Hu, X. Shi, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6153-6159.
- [77] B. C. Dickinson, Y. Tang, Z. Chang, C. J. Chang, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 943-948.
- [78] D. Srikun, A. E. Albers, C. I. Nam, A. T. Iavarone, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4455-4465.
- [79] A. E. Albers, V. S. Okreglak, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9640-9641.
- [80] H. Kim, L. Esser, M. B. Hossain, D. Xia, C.-A. Yu, J. Rizo, D. van der Helm, J. Deisenhofer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4902-4903.
- [81] X. Liang, X. Xu, D. Qiao, Z. Yin, L. Shang, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 3187-3194.
- [82] K. Xu, L. He, X. Yang, Y. Yang, W. Lin, *Analyst* **2018**, *143*, 3555-3559.
- [83] H. Y. Hsu, M. H. Wen, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 22131-22139.
- [84] P. L. Carl, P. K. Chakravarty, J. A. Katzenellenbogen, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 479-480.
- [85] A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492-7509.
- [86] M. E. Roth, O. Green, S. Gnaim, D. Shabat, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1309-1352.
- [87] M. Prost, J. Hasserodt, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14896-14899.

- [88] R. Barat, T. Legigan, I. Tranoy-Opalinski, B. Renoux, E. Peraudeau, J. Clarhaut, P. Poinot, A. E. Fernandes, V. Aucagne, D. A. Leigh, S. Papot, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2608-2613.
- [89] Y. Meyer, J. A. Richard, B. Delest, P. Noack, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1777-1780.
- [90] R. Labruère, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9344-9347.
- [91] S. Serra, A. Alouane, T. Le Saux, S. Huvelle, R. Plasson, F. Schmidt, L. Jullien, R. Labruère, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6396-6399.
- [92] A. Alouane, R. Labruère, K. J. Silvestre, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 1334-1340.
- [93] H. Y. Lee, X. Jiang, D. Lee, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2065-2068.
- [94] K. B. Daniel, A. Agrawal, M. Manchester, S. M. Cohen, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 593-598.
- [95] E. Sella, A. Lubelski, J. Klafter, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3945-3952.
- [96] C. Liu, C. Shao, H. Wu, B. Guo, B. Zhu, X. Zhang, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16055.
- [97] J. Hou, M. Qian, H. Zhao, Y. Li, Y. Liao, G. Han, Z. Xu, F. Wang, Y. Song, Y. Liu, *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1024*, 169-176.
- [98] Z. Zhou, Y. Li, W. Su, B. Gu, H. Xu, C. Wu, P. Yin, H. Li, Y. Zhang, *Sens. Actuator B-Chem.* **2019**, *280*, 120-128.
- [99] J. Zhang, L. Shi, Z. Li, D. Li, X. Tian, C. Zhang, *Analyst* **2019**, *144*, 3643-3648.
- [100] J. Liu, S. Zhou, J. Ren, C. Wu, Y. Zhao, *Analyst* **2017**, *142*, 4522-4528.
- [101] L. Tang, M. Tian, H. Chen, X. Yan, K. Zhong, Y. Bian, *Dyes Pigm.* **2018**, *158*, 482-489.
- [102] L. Yuan, W. Lin, Y. Xie, B. Chen, S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1305-1315.
- [103] D. Srikun, E. W. Miller, D. W. Domaille, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4596-4597.
- [104] C. Chung, D. Srikun, C. S. Lim, C. J. Chang, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9618-9620.
- [105] G. Masanta, C. H. Heo, C. S. Lim, S. K. Bae, B. R. Cho, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3518-3520.
- [106] H. Chen, X. He, M. Su, W. Zhai, H. Zhang, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10157-10163.
- [107] Y. Shen, X. Zhang, Y. Zhang, Y. Wu, C. Zhang, Y. Chen, J. Jin, H. Li, *Sens. Actuator B-Chem.* **2018**, *255*, 42-48.
- [108] J. Xu, Q. Li, Y. Yue, Y. Guo, S. Shao, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 58-63.
- [109] L. Yang, J. Y. Niu, R. Sun, Y. J. Xu, J. F. Ge, *Analyst* **2018**, *143*, 1813-1819.
- [110] C. Gao, M. K. Hossain, L. Li, M. A. Wahab, J. Xiong, W. Li, *J. Photochem. Photobiol. A* **2019**, *368*, 97-103.
- [111] X. Zhou, L. Lesiak, R. Lai, J. R. Beck, J. Zhao, C. G. Elowsky, H. Li, C. I. Stains, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4197-4200.
- [112] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- [113] H. C. Brown, T. E. Cole, M. Srebnik, *Organometallics* **1985**, *4*, 1788-1792.
- [114] A. Hofer, G. Kovacs, A. Zappatini, M. Leuenberger, M. A. Hediger, M. Lochner, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3202-3213.

- [115] A. Meudt, M. Erbes, K. Forstinger, (Eds.: Clariant, G.m.b.H.), Germany, **2002**, p. 9.
- [116] X. Chen, H. Ke, Y. Chen, C. Guan, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7572-7578.
- [117] C. Guan, L. Huang, C. Ren, G. Zou, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 824-828.
- [118] L. Marciasini, B. Cacciuttolo, M. Vaultier, M. Pucheault, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3532-3535.
- [119] M. Pucheault, S. Pinet, J. Richard, M. Birepinte, J. Charbonnier, V. Liautard, *Synthesis* **2016**, *49*, 736-744.
- [120] I. S. Robert L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2491-2494.
- [121] K. Ishihara, H. Kurihara, H. Yamamoto, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5664-5665.
- [122] Y. Mori, K. Manabe, S. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2815-2818.
- [123] Y. Mori, J. Kobayashi, K. Manabe, S. Kobayashi, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8263-8268.
- [124] D. Lee, S. G. Newman, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 5486-5489.
- [125] M. Suginome, Y. Tanaka, T. Hasui, *Synlett* **2008**, *8*, 1239-1242.
- [126] Y. Demizu, Y. Kubo, H. Miyoshi, T. Maki, Y. Matsumura, N. Moriyama, O. Onomura, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5075-5077.
- [127] L. Chan, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3090-3093.
- [128] D. Lee, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3724-3727.
- [129] D. Lee, C. L. Williamson, L. Chan, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8260-8267.
- [130] C. Gouliaras, D. Lee, L. Chan, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13926-13929.
- [131] T. M. Beale, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1358-1361.
- [132] M. Tanaka, J. Nashida, D. Takahashi, K. Toshima, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2288-2291.
- [133] J. Nashida, N. Nishi, Y. Takahashi, C. Hayashi, M. Igarashi, D. Takahashi, K. Toshima, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 7281-7289.
- [134] M. Tanaka, D. Takahashi, K. Toshima, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5030-5033.
- [135] N. Nishi, K. Sueoka, K. Iijima, R. Sawa, D. Takahashi, T. Toshima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13858-13862.
- [136] K. Tanveer, K. Jarrah, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 3482-3485.
- [137] G. Wang, G. E. Garrett, M. S. Taylor, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5375-5379.
- [138] M. S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 295-305.
- [139] T. Mohy El Dine, D. Evans, J. Rouden, J. Blanchet, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5894-5898.
- [140] A. Chardon, O. Maubert, J. Rouden, J. Blanchet, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 4460-4464.
- [141] A. Chardon, J. Rouden, J. Blanchet, *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 995-998.
- [142] J. Hubrich, T. Himmler, L. Rodefeld, L. Ackermann, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 474-480.
- [143] V. Dimakos, H. Y. Su, G. E. Garrett, M. S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5149-5153.
- [144] M. Kanai, K. Oisaki, K. Sakai, *Synthesis* **2020**, *52*, A-N.
- [145] N. A. Bumagin, V. V. Bykov, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14437-14450.
- [146] D. D. Winkle, K. M. Schaab, *Org. Process Res. Dev.* **2001**, *5*, 450-451.
- [147] H. Ke, X. Chen, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7132-7140.
- [148] F. Wang, C. Wang, G. Sun, G. Zou, *Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151491.
- [149] X. Li, G. Zou, *J. Organomet. Chem.* **2015**, *794*, 136-145.
- [150] S. Si, C. Wang, N. Zhang, G. Zou, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 4364-4370.

- [151] C. Guan, Y. Feng, G. Zou, J. Tang, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 6906-6913.
- [152] N. Zhang, C. Wang, G. Zou, J. Tang, *J. Organomet. Chem.* **2017**, *842*, 54-58.
- [153] S. J. Baker, C. Z. Ding, T. Akama, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, Y. Xia, *Future Medicinal Chemistry* **2009**, *1*, 1275-1288.
- [154] G. F. S. Fernandes, W. A. Denny, J. L. Dos Santos, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 791-804.
- [155] K. A. Koehler, G. P. Hess, *Biochemistry* **1974**, *13*, 5345-5350.
- [156] S. J. Benkovic, S. J. Baker, M. R. K. Alley, Y.-H. Woo, Y.-K. Zhang, T. Akama, W. Mao, J. Baboval, P. T. R. Rajagopalan, M. Wall, L. S. Kahng, A. Tavassoli, L. Shapiro, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7468-7476.
- [157] T. J. Zimmermann, M. Bürger, E. Tashiro, Y. Kondoh, N. E. Martinez, K. Görmer, S. Rosin-Steiner, T. Shimizu, S. Ozaki, K. Mikoshiba, N. Watanabe, D. Hall, I. R. Vetter, H. Osada, C. Hedberg, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 115-122.
- [158] J. M. Diver, S. O. Sage, J. A. Rosado, *Cell Calcium* **2001**, *30*, 323-329.
- [159] S. J. Baker, T. Akama, Y. K. Zhang, V. Sauro, C. Pandit, R. Singh, M. Kully, J. Khan, J. Plattner, S. J. Benkovic, V. Lee, K. R. Maples, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5963-5967.
- [160] A. G. Baldwin, J. Rivers-Auty, M. J. D. Daniels, C. S. White, C. H. Schwalbe, T. Schilling, H. Hammadi, P. Jaiyong, N. G. Spencer, H. England, N. M. Luheshi, M. Kadirvel, C. B. Lawrence, N. J. Rothwell, M. K. Harte, R. A. Bryce, S. M. Allan, C. Eder, S. Freeman, D. Brough, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 1321-1335.
- [161] Roxane Ottenwelter, Sondes pour la détection de formes actives de l'oxygène in vivo. Chimie organique. Université Paris-Salay, **2017**, Français.
- [162] S. P. A. Hinkes, C. D. P. Klein, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3048-3052.
- [163] G. Waton, P. Mallo, S. J. Candau, *J. Phys. Chem.* **1984**, 3301-3305.
- [164] H. Steinberg, D. L. Hunter, *Ind. Eng. Chem. Res* **1957**, *49*, 174-181.
- [165] J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14210-14216.
- [166] R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine: Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*, Oxford University Press, **1993**.
- [167] O. Mozziconacci, J. Mirkowski, F. Rusconi, P. Pernot, K. Bobrowski, C. Houée-Levin, *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 229-240.
- [168] R. Masoud, X. Serfaty, M. Erard, P. Machillot, G. Karimi, E. Hudik, F. Wien, L. Baciou, C. Houée-Levin, T. Bizouarn, *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *113*, 470-477.
- [169] J. Y. Baek, Y.-J. Shin, H. B. Jeon, K. S. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5143-5147.
- [170] J. Kim, Y. Kim, A. Z. Abdelazem, H. J. Kim, H. Choo, H. S. Kim, J. O. Kim, Y.-J. Park, S.-J. Min, *Bioorg. Chem.* **2020**, *94*, 103405-103418.
- [171] S. Shah, A. Chandra, A. Kaur, N. Sabnis, A. Lacko, Z. Gryczynski, R. Fudala, I. Gryczynski, *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *170*, 65-69.
- [172] T. M. El Dine, J. Rouden, J. Blanchet, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16084-16087.
- [173] J. Douglass, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 1312-1313.
- [174] P. W. Gravelle, S. G. Bott, *J. Chem. Crystallogr.* **1995**, *25*, 521-524.
- [175] J.-Y. Cho, C. N. Iverson, M. R. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12868-12869.

- [176] T. Dombay, C. G. Werncke, S. Jiang, M. Grellier, L. Vendier, S. Bontemps, J.-B. Sortais, S. Sabo-Etienne, C. Darcel, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4062-4065.
- [177] N. V. Subba Rao, V. Sundaramurthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. India A* **1961**, *54*, 105-108.
- [178] Z. Feng, Y. Yu, X. Yang, D. Zhong, D. Song, H. Yang, X. Chen, G. Zhou, Z. Wu, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 7393-7408.
- [180] S. Cacchi, P. G. Ciattini, E. Morera, G. Ortar, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5541-5544.
- [181] M. Chtchigrovsky, A. Primo, P. Gonzalez, K. Molvinger, M. Robitzer, F. Quignard, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5916-5920.
- [182] T. Ishiyama, Y. Itoh, T. Kitano, N. Miyaoura, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3447-3450.
- [183] J. Kövér, S. Antus, *Z. Naturforsch.* **2005**, *60b*, 792-796.
- [184] A. Mukhopadhyay, V. K. Maka, J. N. Moorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 4758-4767.
- [185] S. Palanisamy, P. Y. Wu, S. C. Wu, Y. J. Chen, S. C. Tzou, C. H. Wang, C. Y. Chen, Y. M. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 849-856.
- [186] M. Elliott, N. F. Janes, B. C. Pearson, *J. Sci. Food Agric.* **1967**, *18*, 325-331.
- [187] C. S. Fischer, M. C. Baier, S. Mecking, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1148-1154.
- [188] P. A. Champagne, Y. Benhassine, J. Desroches, J.-F. Paquin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13835-13839.
- [189] A. R. Lippert, T. Gschneidner, C. J. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7510-7512.
- [190] J. L. Major Jourden, S. M. Cohen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6795-6797.
- [191] S. Everett, S. Ulhaq, R. S. Naismith, (Eds.: University, of, Dundee), USA, **2010**.
- [192] G. Liu, G. Zhang, J. Hu, X. Wang, M. Zhu, S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11645-11655.
- [193] C. Frugoni, *Gazz. Chim. Ital.* **1957**, *87*, 403-407.
- [194] a) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 95-101; b) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 257-264; c) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1985**, *32*, 1133-1139; d) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbühler, *Talanta* **1986**, *33*, 943-951.
- [196] H. Steinberg, D. L. Hunter, *Ind. Eng. Chem.* **1957**, *49*, 174-181.
- [198] J. N. LaButti, K. S. Gates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 218-221.
- [199] A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1401-1407.
- [200] J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14210-14216.
- [202] A. Henglein, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1991**, *95*, 451-451.

Titre : Synthèse et évaluation de nouvelles sondes pour l'imagerie cellulaire du peroxyde d'hydrogène

Mots clés : Chemobiologie, peroxyde d'hydrogène, sondes moléculaires

Résumé : Les formes réactives de l'oxygène (FRO : le peroxyde d'hydrogène, les radicaux superoxyde ou hydroxyle) sont des sous-produits formés lors d'une mauvaise régulation de la respiration cellulaire. Parmi ces espèces, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) joue un rôle particulier dans de nombreux processus physiologiques. Néanmoins, lorsque nos cellules subissent des conditions dites de stress oxydant, la surproduction des FRO est responsable, directement ou indirectement, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter les mécanismes cellulaires. Le développement d'outils sensibles permettant de détecter sélectivement le peroxyde d'hydrogène en milieu biologique représente un enjeu important pour élucider son rôle et son degré d'implication dans les processus physiologiques et pathologiques.

Actuellement, les sondes fluorogéniques basées sur une amorce boronate se sont révélées particulièrement efficaces pour détecter le H_2O_2 *in cellula*. Cependant, ce type d'amorce souffre d'un manque de réactivité, qui n'est pas totalement satisfaisant pour des études biologiques.

Le but de ce projet de thèse a été d'améliorer la réactivité de l'amorce réagissant avec H_2O_2 . Pour cela, l'utilisation d'une nouvelle amorce basée sur un motif borinique a été envisagée. Une première sonde fluorogénique comportant un motif coumarine a été synthétisée puis étudiée par 1H RMN, par spectroscopie de fluorescence *in vitro* et *in cellula*.

Dans un second temps, la régiosélectivité de la réaction a été améliorée et de nouvelles sondes fluorogéniques comportant ou non un espaceur auto-immolable ont été étudiées.

Title : Synthesis and evaluation of new probes for cellular imaging of hydrogen peroxide

Keywords : Chemical biology, hydrogen peroxide, molecular probes

Abstract : Reactive oxygen species (ROS: hydrogen peroxide, hydroxyl and superoxide radicals) are by-products of aerobic metabolism. Among them, hydrogen peroxide (H_2O_2) plays a crucial role in a wide range of physiological processes in human. However, when our cells are subjected to oxidative stress conditions, its overproduction is directly or indirectly responsible for numerous damages at the molecular level, which can affect cellular mechanisms. The development of selective and sensitive tools allowing H_2O_2 detection in a biological context represents a great challenge for a better understanding of H_2O_2 -mediated signalling in physiological and pathological processes.

To date, several "off-on" small fluorescent probes triggered by H_2O_2 have been developed for its detection. Among them, probes based on the

boronate oxidation are amongst the most effective for the detection of H_2O_2 *in cellula*. But these probes also suffer from lack of reactivity, which is not fully satisfactory for biological applications.

The aim of this thesis project was to improve the reactivity of the trigger toward H_2O_2 . To address this issue, the use of borinic acids as new trigger was envisioned. A new fluorogenic probe based on a coumarin scaffold was synthesized and studied by 1H RMN, and by *in vitro* and *in cellula* fluorescence spectroscopy. In the second part of this work, the regioselectivity of the reaction was improved and new fluorogenic probes with or without a self-immolative spacer were studied.