



HAL
open science

Synthèses et applications de groupements protecteurs photolabiles pour la libération de principes actifs in vivo

Juliane Chaud

► **To cite this version:**

Juliane Chaud. Synthèses et applications de groupements protecteurs photolabiles pour la libération de principes actifs in vivo. Chimie thérapeutique. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAF023 . tel-04321618

HAL Id: tel-04321618

<https://theses.hal.science/tel-04321618>

Submitted on 4 Dec 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.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

UMR 7199

THÈSE présentée par :

Juliane CHAUD

soutenue le : **26 Novembre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie biologique et thérapeutique

**Synthèses et applications de
groupements protecteurs photolabiles
pour la libération de principes actifs *in
vivo.***

THÈSE dirigée par :

Dr SPECHT Alexandre
Dr CHASSAING Stefan

Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg
Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr SUZENET Franck
Dr MINGOTAUD Christophe

Professeur, Université d'Orléans
Directeur de recherche au CNRS, Université Paul Sabatier,
Toulouse

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr LEVACHER Vincent
Dr MURA Simona

Directeur de recherche au CNRS, Université de Rouen-
Normandie
Maître de conférences, Université de Paris-Saclay

Remerciements

Ce travail, financé par l'ANR et présenté dans ce manuscrit, a été réalisé au laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives dans l'équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire sous la direction du Dr Alexandre Specht et du Dr Stefan Chassaing.

Je tiens à remercier en premier lieu le Pr Franck Suzenet, le Dr Christophe Mingotaud, le Dr Vincent Levacher et le Dr Simona Mura d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer ces travaux.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse, les Drs Alexandre Specht et Stefan Chassaing, pour m'avoir accordé leur confiance avec ces passionnants projets de recherche.

Alex, merci de m'avoir accueillie dans ton laboratoire, j'ai appris grâce à toi de nouvelles techniques qui m'étaient alors inconnues. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils. J'essaierai de garder à l'esprit de « faire de la chimie qui marche ! » dans mes futurs projets. Merci de m'avoir laissé une grande liberté pour tester mes idées (bonnes ou moins bonnes) et pour accomplir ce travail. Merci aussi pour tes bons plans de randonnées ainsi que pour tes conseils sur les cépages alsaciens ; toute ma famille en a bien profité !

Stefan, merci pour tes précieux conseils et idées lorsque j'étais bloquée lors de mes synthèses. Merci aussi pour ta relecture minutieuse de ce manuscrit !

Thomas, merci pour tes réponses à mes questions de biologie ainsi que pour la pertinence de tes commentaires lors des séminaires.

Merci aux autres permanents du laboratoire : Thierry pour ta bienveillance, ton humour et tes conseils sur l'après-thèse, Fred pour ton enseignement sur l'absorption à deux photons, pour ta bonne humeur et tes sifflements entraînants au labo.

Je tiens à remercier mes deux compagnons de labo, Benoit et Clément, pour votre accueil et votre bonne humeur. Merci Benoit pour tes conseils fitness et ta gentillesse. Merci Clément pour ton soutien face aux coumarines (même galère !) et pour tes réinterprétations de chansons. Vous m'avez permis de passer ces 3 années de thèse dans un environnement agréable et bienveillant et de ne pas trop prendre à cœur les échecs à la paillasse. Je vous souhaite le meilleur pour la suite !

Je souhaite ensuite remercier les « bio » du labo, Adeline, Federico et Francisco. Merci à vous pour votre soutien moral, votre bonne humeur, et vos réponses à mes éternels « qu'est-ce-que vous faites ? ». Grace à vous j'ai eu un aperçu des recherches autour des P2X ainsi que différentes techniques de biologie ! Federico, good luck for your last year !

J'aimerais également remercier les personnes qui ont travaillé de près ou de loin sur mes projets. Je remercie l'équipe 3Bio, notamment les Dr Benoit Frisch, Dr Antoine Kichler et Dr Béatrice Heurtault pour leurs conseils et leur bienveillance. Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Anaïs Brion pour son travail, ses conseils, ses réponses à mes questions en biologie et pour son inconditionnelle bonne humeur. Merci au Dr Jérémie Léonard et ses étudiantes pour son aide en physique.

Je souhaite aussi remercier le Dr Delphine Garnier en charge de la plateforme d'analyse chimique (PACSI). Merci Delphine pour ta gentillesse et ton coup de main sur les RMN et notamment pour nos expéditions à l'IGBMC (et l'accès au fameux spectromètre 700 MHz).

Certaines de ces expéditions se sont révélées être de vraies courses de relais avec des échantillons ultra-photosensibles !

Je remercie aussi tous les stagiaires qui ont travaillé au laboratoire, auxquels j'ai pu donner quelques conseils et qui m'ont donné un coup de main sur certaines de mes synthèses, notamment Mickaël, Sarah-Julie, et Maxime.

Je tiens également à remercier tous mes amis qui m'ont soutenue dans cette folle aventure et plus particulièrement Evolène avec qui je partage les mêmes galères depuis la prépa. Merci pour ton soutien, ton humour et nos sessions réconfort au Macdo ou chez Jeannette.

Merci à « la famille » aka « les compagnons du rondin » qui m'ont vu grandir et qui ont toujours été présents pour moi (et même capables de faire plus de 600 km de route pour assister à ma soutenance !).

Merci à ma famille et notamment mes tantes Sophie, Isabelle et Marie-Christine pour vos encouragements et votre intérêt dans mon parcours. Merci Sophie pour tes visites avec les filles à Strasbourg et de m'avoir incluse dans vos projets de vacances ; le soleil de Grèce m'a fait un bien fou après les longues sessions en chambre noire !

Un énorme merci à mes cousins, Alicia, Charlotte, Clémentine, Raphaël et Yohan, pour votre soutien indéfectible et votre présence. Merci pour nos cousinades pré-pandémie qui ont été un vrai bol d'air et pour nos apéro-visio pendant le confinement. Merci à Charlotte et Clémentine dont les visites en période de marché de Noël m'ont toujours réjouie.

Enfin, je voudrais remercier mes parents qui m'ont toujours soutenue, au-delà du raisonnable. Merci d'avoir fait en sorte que je ne manque de rien pendant toutes ces années et de m'avoir encouragée. Rien n'aurait été possible sans vous !

Merci à tous !

Abréviations :

AA : *acide ascorbique*
aAB : *aminoazobenzène*
AB : *azobenzène*
ACN : *acétonitrile*
ADN : *acide désoxyribonucléique*
ATBC : *acétyle citrate de tributyle*
ATP : *adénosine triphosphate*
APTS : *acide paratoluènesulfonique*
BEP : *bras espaceur photosécable*
BODIPY : *bore-dipyrrrométhène*
BSA : *bovine serum albumin, albumine de sérum bovin*
cAMP : *adénosine monophosphate cyclique*
CCM : *chromatographie sur couche mince*
Cre : *enzyme recombinante (« causes recombinaison », induit une recombinaison)*
CuAAC : *copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition, cycloaddition 1,3 dipolaire entre un azoture et un alcyne.*
DDAO : *1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyl-2(9H)-Acridinone*
DHP : *3,4-dihydropyrane*
DEACAS : *diethylaminocoumarine aminostyrene*
DIAD : *azodicarboxylate de diisopropyle*
DIC : *N,N'-diisopropylcarbodiimide*
DIPEA : *N,N-diisopropyléthylamine*
DMAP : *4-diméthylaminopyridine*
DME : *1,2-diméthoxyéthane*
DMF : *N,N-diméthylformamide*
DMLA : *dégénérescence maculaire liée à l'âge*
DMNPB : *3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2-butyle*
DMNPP : *2-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)propyle*
DMNPT : *1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle*
DMP : *périodinane de Dess-Martin*
DMSO : *diméthylsulfoxyde*
DNBOC : *2,2'-dinitrodiphénylméthoxyloxycarbonyle*
DOX : *doxorubicine*
E2 : *estradiol*
EANBP : *2-(4'-((di(tris-éthoxy(méthyl))amino)-4-nitro-(1,1'-biphényl)-3-yl)propyle*
EE2 : *17 α -éthynylestradiol*
EGFP : *enhanced green fluorescent protein, protéine fluorescente verte optimisée*
ESA : *absorption à l'état excité*
ET : *energy transfer, transfert d'énergie*
FRET : *Förster or fluorescence resonance energy transfer, transfert d'énergie par résonance de type Förster*
GABA : *gamma-aminobutyric acid, acide γ -aminobutyrique*
GFAP : *glial fibrillary acidic protein, protéine acide fibrillaire gliale*
Glu : *glutamate*
GM : *Goeppert-Mayer*

GP : *groupe partant*
 GPP : *groupement protecteur photolabile*
 GPS : *(3-glucodyloxypropyl)triméthoxysilane*
 HDL : *high density lipoprotein, lipoprotéines de haute densité*
 HEPES : *acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique*
 HMT : *histamine N-méthyltransférase*
 HPLC : *chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)*
 HSP90 : *“heat shock protein 90”*
 IR : *infrarouge*
 IRM : *imagerie par résonance magnétique*
 ISC : *Intersystem crossing, croisement inter-système*
 LBD : *ligand-binding domain, domaine de liaison de ligand*
 Lck : *« lymphocyte protein tyrosine kinase »*
 LC-MS : *« liquid chromatography – mass spectrometry », chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse*
 LED : *diode électroluminescente (DEL)*
 LiTFSI : *bis (trifluorométhanesulfonyl) imide de lithium*
 LoxP : *locus of crossing over (x), P1*
 LUV : *large unilamellar vesicle, grosse vésicule unilamellaire*
 MLV : *multilamellar vesicle, vésicule multilamellaire*
 MMAE : *monométhyl auristatine E*
 MOM : *méthoxyméthyle*
 MsCl : *methanesulfonyl chloride, chlorure de méthanesulfonyle*
 MVV : *multivesicular vesicle, vésicule multivésiculaire*
 NBOC : *2-nitrobenzyloxycarbonyl*
 NBS : *N-bromosuccinimide*
 NC = LNC : *lipid nanocapsule, nanocapsule lipidique*
 NIR : *near infrared/ proche infrarouge*
 NPT : *1-(2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle*
 Nu : *nucléophile*
 NVOC : *6-nitroveratyloxycarbonyl*
 OHT : *4-hydroxytamoxifène*
 o-NB : *ortho-nitrobenzyle*
 PA : *photon avalanche, avalanche de photon*
 PAA : *polyacrylic acids, acides polyacriliques*
 PBS : *phosphate-buffered saline, tampon phosphate salin*
 PdTAP : *complexe de palladium(II) tétraanthraporphyrine*
 PdTPBP : *complexe de palladium tétraphényltétrabenzoporphyrine*
 PEG : *polyéthylène glycol*
 PEGBA : *(polyethylene glycol) bisazide*
 PFOB : *bromure de perfluorooctyle*
 pH : *potentiel hydrogène*
 p-MBA : *acide p-méthoxybenzoïque*
 PMNB : *3-(2-propyl)-4'-méthoxy-4-nitrobiphényle*
 pSB : *pseudo-stillbène*
 RMN : *résonance magnétique nucléaire*
 ROS : *reactive oxygen species, espèces réactives oxygénées*

RPE : *retinal pigment epithelium, épithélium pigmentaire rétinien*
SUV : *small unilamellar vesicle, petite vésicules unilamellaire*
T : *température*
TA : *température ambiante*
TBAF : *tetrabutylammonium fluoride, fluorure de tétra-n-butylammonium*
TBDMS : *tert-butyldiméthylsilyle*
TBME : *tert-butyl methyl ether, méthyl tert-butyl éther*
TBPe : *2,5,8,11-tétra-tert-butylpérylène*
TLC : *thin-layer chromatography, chromatographie sur couche mince.*
THF : *tétrahydrofurane*
Trolox : *acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique*
TTA : *triplet-triplet annihilation, annihilation triplet-triplet*
TTT : *transfert d'énergie triplet-triplet*
UC : *upconversion, conversion ascendante de photons*
UCNP : *upconverting nanoparticle, nanoparticule à conversion ascendante de photons*
ULV : *unilamellar vesicle, vésicule unilamellaire*
UV : *ultraviolet*
VEGF : *vascular endothelial growth factor, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire*
VIH : *virus de l'immunodéficiences humaine*
 ϵ : *coefficient d'extinction molaire*
 Φ_u : *rendement quantique de photolyse*

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations :	5
Chapitre I : Introduction	11
I-1) Les stimuli endogènes ou exogènes pour la libération d'effecteurs biologiques	11
I-2) La lumière comme stimulus exogène d'intérêt	16
I-2-a) Deux types de photoluminescence : la fluorescence et la phosphorescence	17
I-2-b) Le phénomène de photoisomérisation	18
I-2-b.1) Isomérisation <i>cis/trans</i>	18
♦ Synthèse d'azobenzènes	19
♦ Propriétés d'isomérisation <i>cis/trans</i> de l'azobenzène non substitué	19
♦ Les différents types d'azobenzènes selon les substituants :	21
♦ Exemple d'application	22
I-2-b.2) Isomérisation par cyclisation/cycloréversion	23
♦ Les diaryléthènes	24
♦ Modulation des propriétés	24
♦ Synthèse	26
♦ Exemple d'application	27
I-2-c) Le phénomène de photolyse et les groupements protecteurs photolabiles	28
I-2-c.1) La photolyse à 1 photon	28
I-2-c.2) La photolyse à 2 photons	30
I-2-c.3) Exemples de groupements protecteurs photolabiles existants (GPPs)	32
♦ Les nitrobenzyles	33
♦ Les groupements nitrophénéthyles	36
♦ Les coumarines	39
I-3) Application <i>in vivo</i> de la lumière	45
I-3-a) Absorption des tissus et fenêtre thérapeutique	45
I-3-b) Le cas particulier de l'œil	47
I-3-c) Exemples d'applications de la lumière <i>in vivo</i>	48
I-4) Objectifs de la thèse	52
Chapitre II : Synthèses et développement de nouveaux GPPs rigides et sensibles à 1 et 2 photons	53
II-1) Introduction	53
II-2) Nouvelle voie de synthèse du composé de référence et étude de la stabilité dans un tampon	58
II-3) Synthèse d'un nouveau GPP grâce à des réactions domino initiées par une cyclocarbopalladation 5-exo-dig	60
II-3-a) Evaluation de la faisabilité de la réaction domino avec l'alcool protégé	60
II-3-b) Approche directe à partir de l'alcool libre (non protégé)	63
II-3-c) Propriétés de photoisomérisation	63
II-3-d) Propriétés de photolyse	66

II-3-e) Variation des groupements introduits en position 3	69
II-3-f) Résultats.....	70
II-4) Différents essais pour l'introduction d'une ancre ou d'une fonction pour coupler un groupe solubilisant	76
II-4-a) Tentatives en série alcyne.....	77
II-4-b) Tentatives en série azoture.....	79
II-4-b.1) Première stratégie	79
II-4-b.2) Identification d'un sel de sulfonium alternatif et plus approprié.....	80
II-4-b.3) Tentatives d'insertion d'un alcyne en série azoture.....	83
II-5) Conclusion du chapitre	85
Chapitre III : Expression Cre-dépendante d'un transgène dans l'œil grâce à un analogue photoactivable du tamoxifène	87
III – 1) Développement d'outils photochimiques pour des applications biomédicales : traitement de pathologies rétinienne.....	87
III-1-a) La rétinopathie diabétique.....	87
III-1-a-1) Deux types de rétinopathies diabétiques	87
III-1-a-2) Prévention et traitements.....	88
♦ Contrôle de la glycémie	88
♦ Traitement chirurgical.....	89
♦ La photocoagulation panrétinienne.....	89
♦ Injections rétinienne	90
III-1-b) Le système Cre-LoxP et ses modifications.....	91
III-1-b.1) Définition du système	91
III-1-b.2) Application dans des lignées de souris	92
III-1-b.3) Modifications du système Cre-LoxP pour un meilleur contrôle temporel.....	93
♦ Cre-ER-LBD	93
♦ Cre-ER ^T	94
III-1-c) Genèse du projet	95
III-2) Synthèse et modifications de GPPs pour l'activation ciblée par la lumière du système Cre-ER^{T2}	98
III-2-a) Validation de la méthode de photolibération	98
III-2-b) Modification du GPP pour plus de photostabilité : introduction d'un bras espaceur auto-immolable.....	101
III-3) Conclusion du chapitre	109
Chapitre IV : libération photo-induite de principe actif à l'aide de nanovecteurs à conversion ascendante de photons.....	110
IV – 1) L' « upconversion », un processus anti-Stokes prometteur.....	110
IV-1-a) Le phénomène d' « upconversion » ou conversion ascendante de photons.....	110
IV-1-a.1) Découverte du phénomène	110
IV-1-a.2) Les différents mécanismes d' « upconversion »	111
♦ Le cas des lanthanides	111
♦ L' « upconversion » par annihilation triplet-triplet.....	117
IV-1-b) Applications de l' « upconversion » pour la délivrance d'effecteurs biologiques.....	118
IV-1-b.1) L' « upconversion » afin de déstabiliser le nanovecteur et libérer le principe actif.....	118

IV-1-b.2) L' « upconversion » et la photolyse pour libérer le principe actif	121
IV-2) Le FRET : un transfert d'énergie non radiatif.....	126
IV-3) Le projet LightInDR	129
IV-1-b) Contexte	129
IV-3-b) Les nanoparticules	130
IV-3-b.1) les liposomes	130
IV-3-b.2) Les nanocapsules	133
IV-3-c) Nanoparticules à conversion ascendante de photons pour l'application <i>in vivo</i> en milieu aérobie	136
IV-3-d) Transfert d'énergie à la surface des nanoparticules.....	140
IV-3-e) Libération d'un anticancéreux par photolyse TTA-UC	146
IV-3-f) Expériences <i>in vitro</i>	169
IV-3-g) Expériences <i>in vivo</i>	171
IV-4) Décaler les longueurs d'onde d'irradiation encore plus dans le NIR.....	174
IV-4-a) Changement de sensibilisateur	174
IV-4-b) Changement du couple d' « upconversion » et modifications de la coumarine	179
IV-5) Conclusion du chapitre.....	182
V) Conclusion et perspectives	184
VI) Liste des publications.....	188
VII) Partie expérimentale / Experimental part	188
VII-1) General	188
VII-2) Synthesis	190
VII-3) Photochemical and photophysical studies	241
VII-3-a) Absorption measurements and fluorescence quantum yields determination	241
VII-3-b) One-photon photolysis.....	241
VII-3-c) Determination of the photochemical quantum yields	241
VII-3-d) Two-photon experiments	242
VII-4) General protocols for the formulation of liposomes and nanocapsules	243
Références.....	245

Chapitre I : Introduction

I-1) Les stimuli endogènes ou exogènes pour la libération d'effecteurs biologiques

Un objectif de la médecine personnalisée est d'adapter chaque thérapie à la physiopathologie de chaque patient. Dans ce contexte, différentes techniques de libération d'agents bioactifs sont à l'étude. Ces techniques cherchent à délivrer des médicaments de façons plus efficaces et plus localisées afin de minimiser une éventuelle toxicité et de maximiser les effets sur les cibles impliquées dans une pathologie. À ce jour, beaucoup de stimuli différents (seuls et en combinaison) ont été utilisés dans des systèmes intelligents de distribution de médicaments, y compris le pH, la température... En particulier, de nombreux systèmes utilisent un stimulus endogène pour contrôler la libération du principe actif (système « fermé »). Ainsi, les systèmes « fermés » sont autorégulés et répondent aux changements de l'environnement physiologique pour contrôler la libération (ex. pH...). A l'inverse, les systèmes « ouverts » sont indépendants de l'environnement physiologique et libèrent des molécules biologiquement actives en réponse à une stimulation externe.¹

Afin de décrire les deux types de systèmes développés pour le relargage d'un principe actif, quelques exemples marquants vont maintenant être exposés dans ce paragraphe :

Dans le cas de l'utilisation d'un stimulus endogène, il est possible de citer par exemple les travaux récents sur des hydrogels qui, en fonction de changements mineurs dans l'environnement comme le pH ou la température, vont se déformer. Un hydrogel est un matériau insoluble dans l'eau, composé d'un réseau réticulé de polymères hydrophiles et capable d'absorber une très grande quantité d'eau (jusqu'à plus de 100g/g).^{2,3} Ce matériau forme donc une sorte de gel qui peut se comporter comme un réservoir et libérer de l'eau et des effecteurs biologiques sous l'action de stimuli.

En effet, la température peut être considérée comme un stimulus endogène car les tissus malades ou tumoraux ont en général des températures supérieures aux tissus sains.⁴ Certains

hydrogels thermosensibles vont rétrécir et se tasser et ainsi libérer les effecteurs biologiques pris au piège dans leur structure (Figure 1).⁵

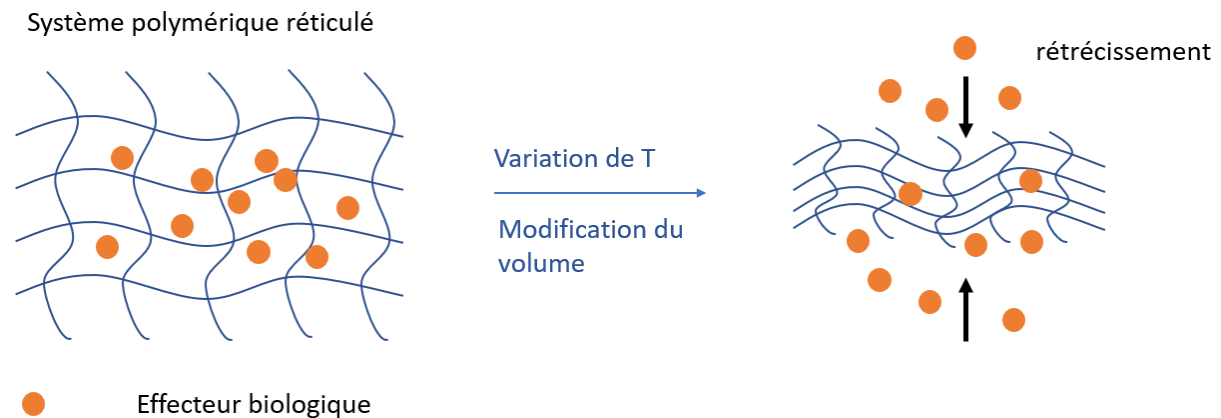


Figure 1 - Modification de la structure d'un hydrogel en fonction du pH, conduisant à la libération d'effecteurs biologiques.

Mais ce type de relargage a des inconvénients. Il est en effet difficile de contrôler ce stimulus *in vivo* car les températures de tissus malades sont de l'ordre de 40-42 °C contre 37 °C pour des tissus sains.⁶ L'écart de température est donc relativement faible et cela demande de concevoir des outils particulièrement sensibles. De plus, ce type de système libère des effecteurs biologiques de façon soudaine et il n'est pas possible de contrôler leur libération dans le temps.

D'autres systèmes polymériques comme ceux développés par Mahkam M. *et al.* sont capables de résister à des pH faibles (comme dans l'estomac) mais peuvent se « désintégrer » (s'hydrolyser) lorsque le pH augmente pour libérer un effecteur biologique.⁷ Comme le pH varie tout au long du chemin gastro-intestinal,⁸ les auteurs indiquent qu'il serait ainsi possible d'utiliser ces hydrogels pour délivrer des médicaments dans le côlon et limiter les effets secondaires dans le reste du système digestif.⁷ En effet, les auteurs expliquent que le degré de gonflement de leurs hydrogels augmente (dû à l'augmentation du pH), au fur et à mesure du trajet dans le chemin gastro-intestinal, jusqu'à atteindre le gonflement le plus important dans le colon ce qui induit la libération du médicament.

Cependant, ces stimuli endogènes bien qu'intéressants conduisent bien souvent à une libération stochastique et abrupte de l'effecteur biologique.

Idéalement, le profil de libération de ces systèmes doit dépendre à la fois de l'intensité et de la durée de la stimulation. Ce degré de contrôle et d'adaptabilité est justement accessible

grâce aux systèmes « ouverts », ce qui leur confère des propriétés intéressantes pour le transport de médicaments dans les applications de médecine personnalisée.

Ainsi, la seconde approche cherche à tirer avantage de stimuli appliqués à l'extérieur du tissu biologique cible. Ces stimuli peuvent être des champs électromagnétiques comme la lumière ou les ultrasons.

Par exemple, les ultrasons sont des stimuli non invasifs et avec un bon contrôle spatio-temporel. Ils ont un effet à la fois thermique et mécanique.⁹ Il est donc possible d'exploiter ces deux effets afin par exemple d'exacerber l'internalisation dans une cellule d'une nanoparticule (comportant des effecteurs biologiques) protégée par un groupement thermosensible¹⁰ et / ou afin de déstabiliser la membrane d'un liposome grâce aux vibrations et mouvements induits par des composés sensibles aux ultrasons ainsi capables de libérer les effecteurs biologiques (Figure 2).¹¹

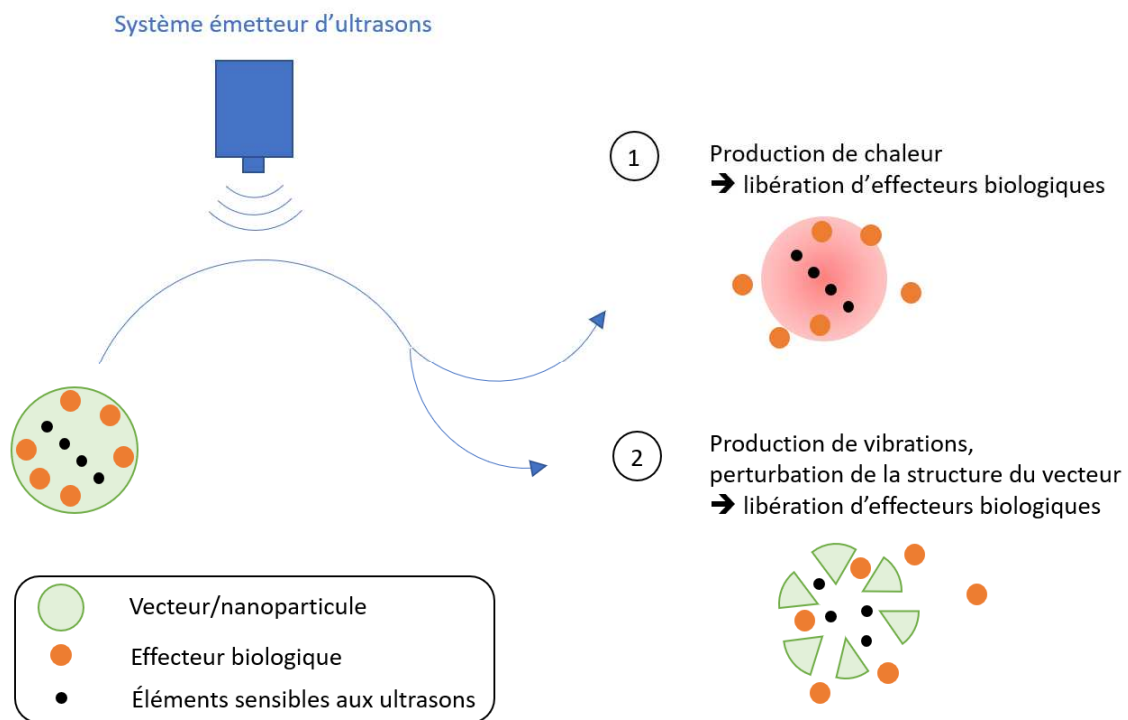


Figure 2 - Fonctionnement d'un système de libération d'effecteurs biologiques en réponse à des ultrasons.

Il est possible de citer plusieurs exemples de la littérature qui utilisent ce type de systèmes. En 2017, Bezagu M. *et al.* décrivent l'encapsulation d'une prodrogue et sa libération par ultrasons.¹² Cette équipe s'est en effet intéressée au cas de la MonoMéthylAuristatine E (MMAE), un agent antitumoral pour des cas de lymphomes. Comme il est établi que la MMAE

est également toxique pour des cellules non cancéreuses, l'idée des auteurs a été de l'encapsuler sous forme de prodrogue pour ne libérer l'effecteur biologique qu'au niveau des tissus tumoraux. En effet, la prodrogue choisie MMAE-glu est plus intéressante car elle est moins toxique pour les cellules saines (40 à 100 fois moins) et plus hydrophile ce qui facilite son encapsulation (Figure 3). Cette prodrogue est composée de la MMAE reliée à l'acide glucuronique *via* un lien autoimmolable. La MMAE peut donc être libérée à partir de la prodrogue MMAE-glu sous l'action de la β -glucuronidase, une enzyme surexprimée dans l'environnement immédiat de la plupart des tumeurs (Figure 3).¹³ La prodrogue a été encapsulée avec succès dans des gouttelettes composites de perfluorocarbures. Après l'obtention d'une première nano-émulsion (MMAE-glu, milieu de culture, perfluorohexane et surfactant fluoré) par sonication, cette nano-émulsion primaire est ensuite encapsulée dans des gouttelettes (d'une taille de l'ordre du μm) par un procédé de microfluidique appelé « step-emulsification ».

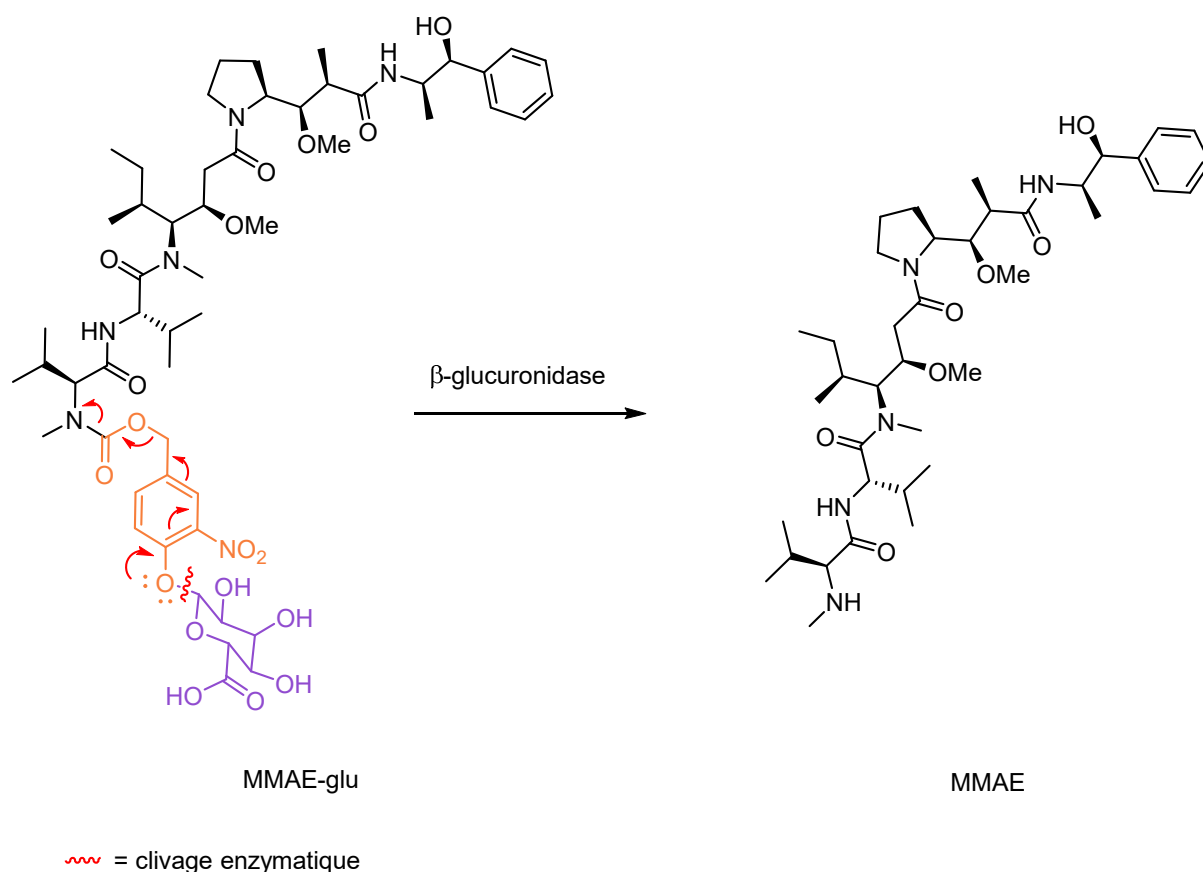


Figure 3 – Evolution de la prodrogue MMAE-glu sous l'action de la β -glucuronidase.

Les expériences *in vitro* ont été réalisées sur des plaques 96 puits thermostatées à 37 °C, avec des cellules cancéreuses de type KB (carcinome squameux oral humain). Les auteurs ont alors

ajouté les gouttelettes à base de perfluorocarbure, contenant ou non la prodrogue, puis appliqué des ultrasons en ajoutant ou non l'enzyme et enfin en incubant les cellules pendant 72 h. Après ces 72 h, un test de viabilité a été effectué. La libération de la prodrogue sans la présence de la β -glucuronidase n'a pas engendré de différence notable de viabilité. Cependant, en présence de cette enzyme, la viabilité a chuté de 80 %. De plus, ils n'ont pas observé de fuite de prodrogue sans application d'ultrasons montrant ainsi la résistance de leur système.

Il existe plusieurs mécanismes de libération utilisant des ultrasons décrits dans la littérature récente, dont notamment :

- l'utilisation de la température combinée à des nanovecteurs thermosensibles (des liposomes ou polymères par exemple),
- l'utilisation du phénomène de cavitation à partir de gaz dissous dans le milieu ou en utilisant des microbulles injectées,
- l'utilisation de la vaporisation de gouttelettes de perfluorocarbures (comme l'exemple précédent).

Toujours via l'utilisation d'ultrasons, Al Rifai N. *et al.* ont souhaité exploiter une nouvelle propriété physicochimique sur des vecteurs non thermosensibles, à savoir le relargage de la drogue en utilisant une augmentation de la perméabilité du vecteur afin de permettre à l'effecteur biologique de diffuser plus rapidement.¹⁴

Afin de prouver ce concept de relargage, ils ont conçu des émulsions à l'aide de surfactants fluorés et biocompatibles de type « dendri-TAC », et d'une phase liquide composée de bromure de perfluorooctyle (PFOB) (Figure 4). Ce PFOB a été choisi car il est possible de faire de la détection IRM à l'aide de PFOB marqué au ¹⁹F. Afin de solubiliser l'effecteur biologique, ils ont ajouté 5 % d'acétylcitrate de tributyle (ATBC). Dans un premier temps, ils ont donc encapsulé du Nile Red (un composé fluorescent) afin de vérifier le mécanisme et ils ont observé une diffusion de ce dernier à de faibles pressions acoustiques, donc sans phénomène de cavitation ni de vaporisation pendant l'application d'ultrasons. Ils ont ensuite effectué des expériences avec du Paclitaxel, une molécule anticancéreuse très utilisée comme agent chimiothérapeutique. Sans ultrasons, les auteurs ont rapporté une diffusion passive du Paclitaxel et une viabilité de cellules CT26 (adénocarcinome colique murin) réduite de 10 %.

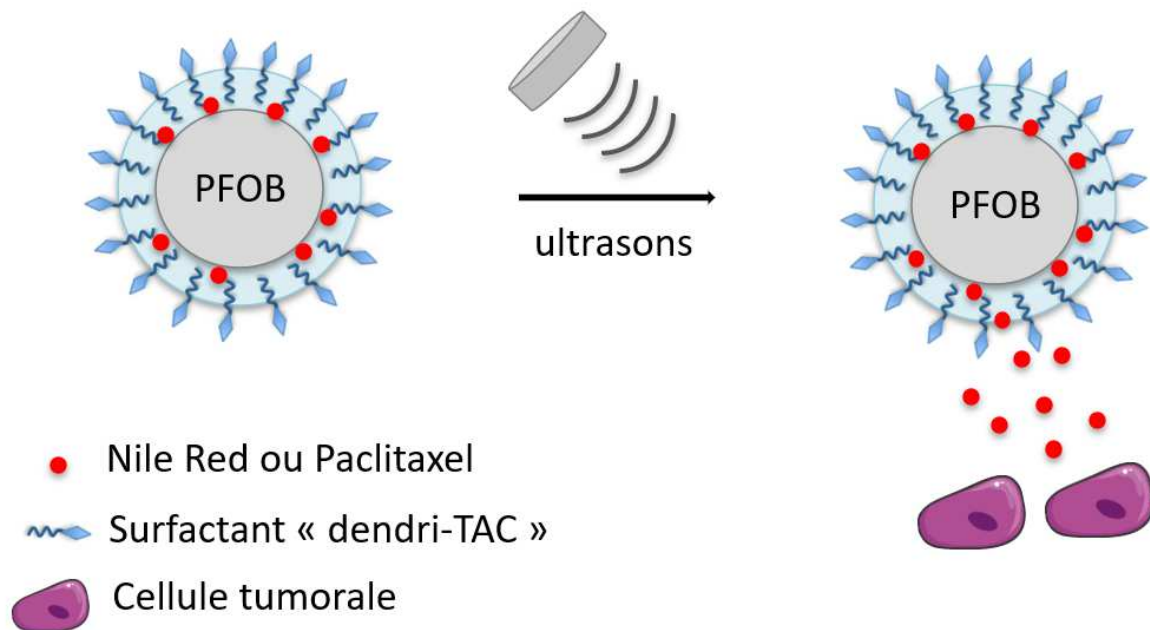


Figure 4 - Schéma de principe : application d'ultrasons sur des nano-émulsions « intelligentes » chargées de Nile Red ou de Paclitaxel.

Une application d'ultrasons pendant 20 minutes à une pression de 0.4 MPa conduit à une élévation de température de 1 °C et après 48 heures d'incubation, une viabilité d'environ 50 % est observée. Avec une pression de 3.5 MPa, la température s'est élevée de 4 °C et la viabilité est inférieure à 40 %. Ils ont donc réussi à libérer du Paclitaxel par cette approche assistée aux ultrasons, prouvant le concept proposé. Cependant, il n'est pas exclu que l'élévation de la température influence le mécanisme de libération.

Dans la littérature récente, de nombreuses équipes de recherche cherchent à tirer avantage de systèmes répondant à une combinaison de stimuli comme pH/température^{15,16} ou température/champ magnétique¹⁷...

I-2) La lumière comme stimulus exogène d'intérêt

L'un des stimuli exogènes qui semble être l'un des plus prometteurs pour la libération ciblée d'un principe actif est la lumière. En effet, il est possible de contrôler sa puissance, son intensité, sa focalisation et le temps d'application afin de permettre le contrôle spatial et temporel de la libération d'un effecteur biologique. Ainsi, il serait possible, contrairement à certains exemples cités précédemment, de contrôler précisément le saut de concentration local de principe actif.

Les molécules sensibles aux stimuli lumineux possèdent dans leur structure un ou des chromophores. Ces derniers vont être capables d'absorber des photons pour atteindre un état excité. Plusieurs phénomènes peuvent alors se produire selon la nature de l'état excité et le type de molécule.

Afin de retrouver son état fondamental, le chromophore peut se désexciter par différents phénomènes photophysiques comme la photoluminescence ou conduire à de la photochimie comme une photoisomérisation ou une photolyse.

I-2-a) Deux types de photoluminescence : la fluorescence et la phosphorescence

La photoluminescence comprend deux phénomènes différents : la fluorescence (Figure 5) et la phosphorescence.

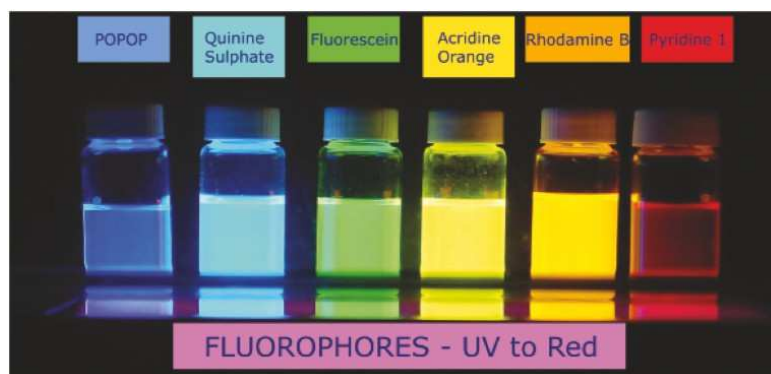


Figure 5 - Exemples d'émission de fluorescence de différents composés. ¹⁸

La fluorescence correspond à la désactivation radiative de l'état excité singulet (S1) vers tous les états vibrationnels de l'état fondamental (S0) également singulet (Figure 6). A l'état excité, l'électron au niveau (S1) est de spin opposé de celui à l'état fondamental. Le retour à (S0) est donc autorisé (« spin allowed » - respect d'une règle de sélection) et s'effectue rapidement avec une émission de photon. La durée de vie d'émission de fluorescence est de l'ordre de la picoseconde à quelques dizaines de nanosecondes.

La phosphorescence est également un phénomène de désactivation radiative mais cette fois-ci de l'état excité triplet (T1) à S0. Cependant, dans ce cas, l'électron dans l'orbitale excitée (T1) a la même orientation de spin que celui à l'état fondamental. La transition de T1 à S0 est donc interdite et l'émission du photon a une durée de vie de l'ordre de la milliseconde jusqu'à la seconde.

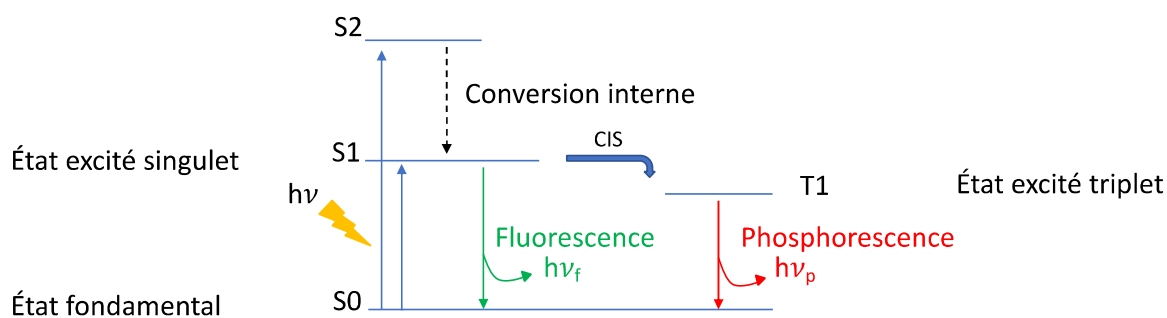


Figure 6 - Diagramme de Jablonski représentant les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence (CIS = croisement inter-système).

A noter que la fluorescence sera exploitée comme un outil de contrôle dans les expériences de photophysique ou *in vivo* de cette thèse. C'est en particulier un phénomène de choix pour vérifier et visualiser un événement déclenché par la lumière.

Nous allons maintenant nous focaliser sur les réactions photochimiques car elles sont très attractives et utiles au sein de différents domaines de chimie et biologie, en particulier pour permettre un contrôle spatial et temporel de nombreux processus. Les deux grands types de mécanismes photochimiques qui peuvent être utilisés pour un contrôle spatio-temporel en biologie sont la photoisomérisation et la photolyse. Nous allons donc décrire ces deux phénomènes, leurs fonctionnements ainsi que des exemples d'application.

I-2-b) Le phénomène de photoisomérisation

Les molécules photoisomérisables ou photochromiques également appelées « photoswitches » peuvent conduire à la formation de deux structures d'une molécule sous l'effet de la lumière : des isomères *cis/trans* ou des formes ouvertes/fermées.

I-2-b.1) Isomérisation *cis/ trans*

Comme exemples les plus utilisés d'isomérisation *cis-trans*, les composés les plus exploités sont les azobenzènes, découverts par Mitscherich E. en 1834.¹⁹ A l'origine, les azobenzènes sont des composés qui ont été largement utilisés dans l'industrie en tant que pigments et dont la coloration peut être modulée en équipant les cycles aromatiques avec des groupements

électro-attracteurs ou électro-donneurs. Plus récemment, l'exploitation du changement de géométrie de ces molécules a été appliquée à la photorégulation d'un grand nombre de processus chimiques et biologiques.²⁰

◆ Synthèse d'azobenzènes

Il existe de nombreuses méthodes d'obtention de ces composés mais la majorité peuvent être obtenus par couplage azoïque.²¹ Elle débute par une diazotisation d'une amine primaire aromatique à basse température, conduisant à l'obtention d'un sel de diazonium. Cette réaction a été décrite pour la première fois par Griess J. P. en 1858. Ce sel est alors mis en présence d'une espèce enrichie en électrons, des phénols comportant des substituants donneurs d'électrons comme des groupes amino ou hydroxyle (Schéma 1). Cette réaction s'effectue en général en *para* du groupe électro-donneur.

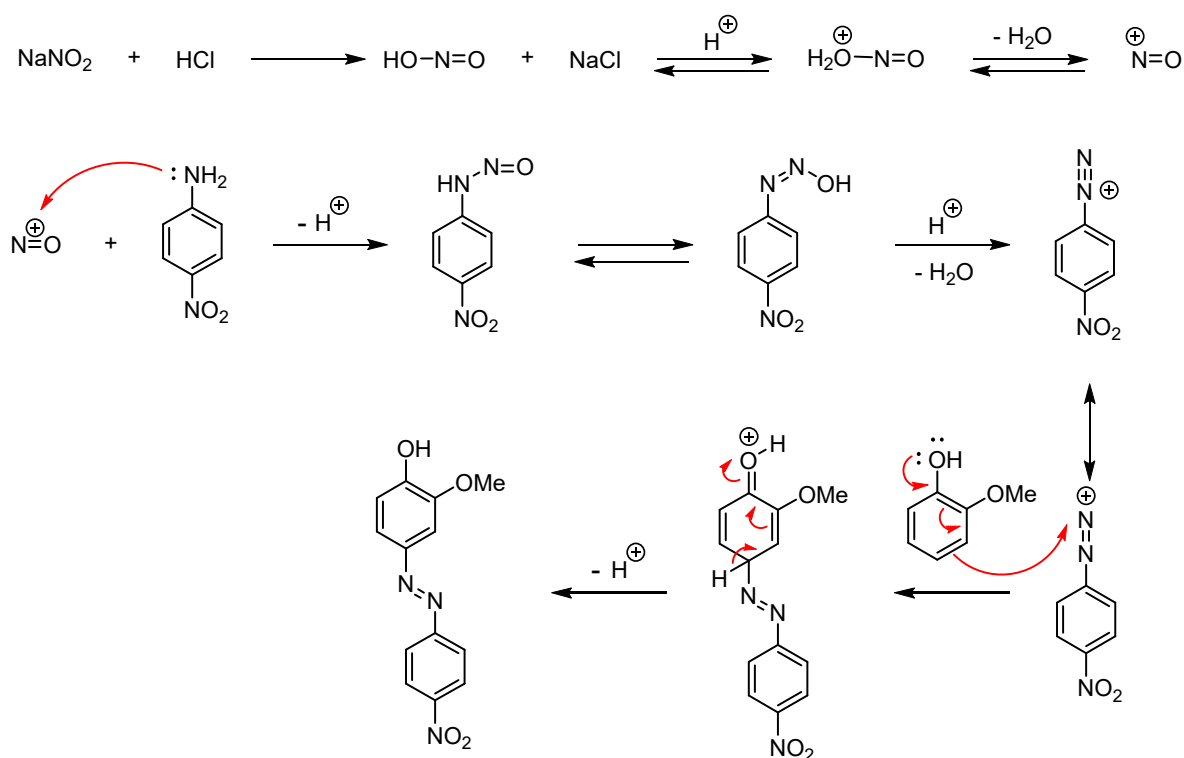


Schéma 1 - Mécanisme d'une réaction de couplage azoïque, d'après Mérino E. et al. ²¹

◆ Propriétés d'isomérisation *cis/trans* de l'azobenzène non substitué

L'azobenzène a deux isomères qui ont été découverts par Hartley G. S. en 1937 et cette découverte est fondée sur des résultats de recristallisation dans l'acétone en présence de

lumière qui n'étaient pas reproductibles.²² Il existe donc généralement pour les azobenzènes, un isomère *trans* thermodynamiquement plus stable et un isomère *cis*.

Il est ainsi possible d'irradier le composé *trans* dans les longueurs d'onde UV (généralement entre 320-350 nm) pour obtenir la configuration *cis*.²³ L'isomère *cis* peut ensuite redonner spontanément l'isomère *trans* par relaxation thermique, un processus plus lent et qui peut prendre de quelques millisecondes à quelques mois suivant les substituants des azobenzènes. Mais cette dernière transition est aussi possible par irradiation avec des longueurs d'onde dans le domaine du visible (généralement entre 400-450 nm) (Schéma 2).

Les réactions d'isomérisation par irradiation sont rapides (de l'ordre de la picoseconde), réversibles et elles entraînent une modification de la « forme ou géométrie » de la molécule.

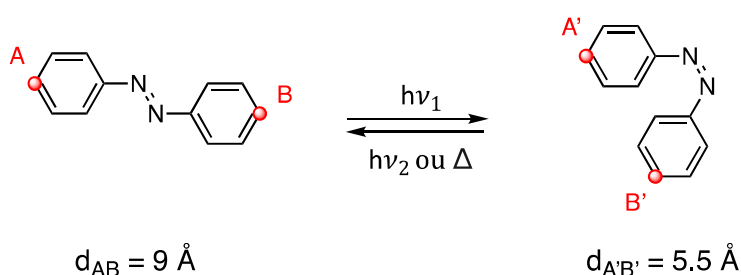


Schéma 2- isomérisation de l'azobenzène non substitué.

L'isomère *trans* de l'azobenzène non substitué est plan et n'a pas de moment dipolaire, contrairement au *cis* ($\mu = 3.0$ D). En effet, pour l'isomère *cis*, un des deux phényles tourne légèrement pour minimiser les répulsions électroniques et stériques entre deux cycles aromatiques.

Ces deux isomères ont deux bandes notables dans leurs spectres d'absorption :

- une bande qui correspond à la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ dans la région UV
- une seconde qui correspond à la transition $n \rightarrow \pi^*$ et due aux doublets non liants des deux atomes d'azote.

Les deux isomères ont des spectres d'absorption distincts (Figure 7).²⁴ L'isomère *trans* montre une bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ très intense et une autre $n \rightarrow \pi^*$ beaucoup plus faible car cette transition électronique n'est pas autorisée dans cet isomère *trans* par les règles de symétrie. Pour l'isomère *cis*, on observe un effet hypsochrome pour la bande d'absorption correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$, c'est-à-dire qu'elle est située dans des longueurs d'onde

plus courtes. De plus, l'intensité de cette bande est plus faible que pour l'isomère *trans*. La transition $n \rightarrow \pi^*$ est autorisée dans cet isomère et donc l'intensité de la bande d'absorption est plus importante.

Ces différences d'absorption entre les isomères *cis* et *trans* permettent d'obtenir, à différentes longueurs d'onde, des proportions différentes des deux formes. On parle d'équilibre photostationnaire. Par exemple, à 366 nm, des états photostationnaires de 20-25 % pour l'isomère *trans* et 80-75 % pour l'isomère *cis* sont obtenus. A l'inverse, avec une irradiation à 430 nm, l'isomère *cis* est obtenu de façon quasi quantitative. On notera que les équilibres photostationnaires varient fortement en fonction des longueurs d'onde d'excitation et de la nature des substituants des azobenzènes.²⁵

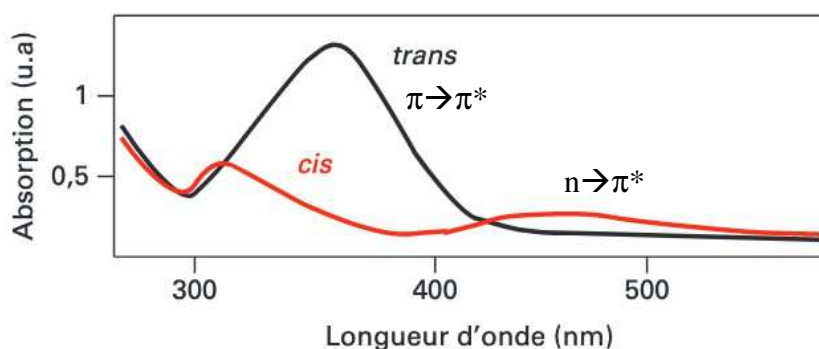


Figure 7 - Spectres d'absorption des isomères *cis* et *trans* de l'azobenzène (adapté de Barillé R.²⁴).

◆ Les différents types d'azobenzènes selon les substituants

Il est possible de moduler les propriétés physico-chimiques en fonction de la nature électronique des substituants équipant les cycles aromatiques.²⁶ On peut dénombrer 3 catégories de variantes en fonction des états d'énergie électroniques $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ (Figure 8) :

- les azobenzènes (ABn) : la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ est très intense dans la région UV et $n \rightarrow \pi^*$ est très faible dans le visible.
- les aminoazobenzènes (aAB) : les deux bandes $\pi \rightarrow \pi^*$ et $n \rightarrow \pi^*$ se rapprochent dû à la présence des substituants électro-donneurs en *ortho* ou *para*.
- les pseudo-stillbènes ou systèmes « push-pull » (pSB) : la bande correspondant à la transition électronique $\pi \rightarrow \pi^*$ est décalée dans le rouge. Ce décalage bathochrome

résulte d'un mécanisme de type « push-pull » induit par des substituants donneurs d'électrons d'un côté (position 4) et accepteurs d'électrons de l'autre (en position 4').

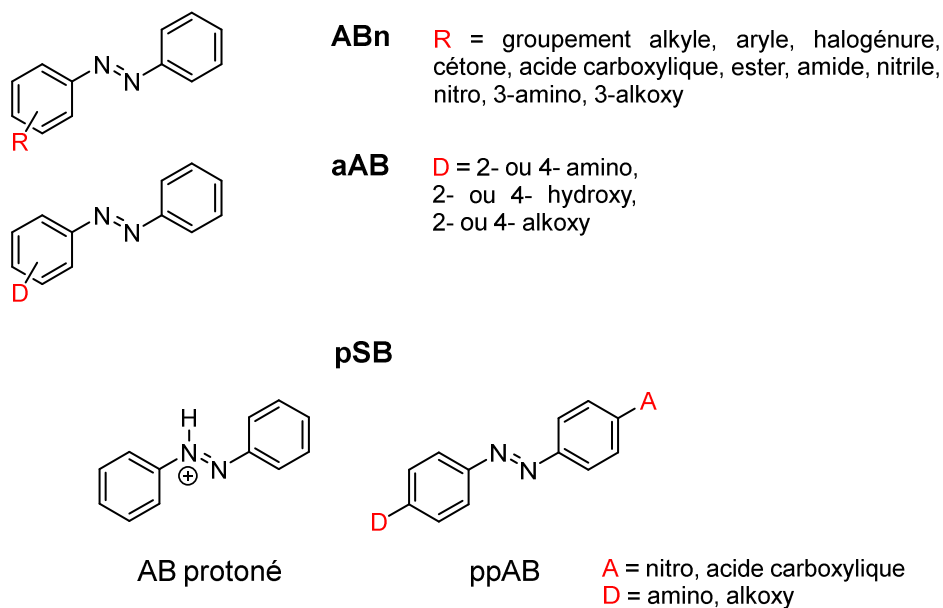


Figure 8 - Les différentes catégories d'azobenzènes (selon Dhammika Bondara H. M. et al.) ABn = azobenzènes, aAB = aminoazobenzènes, pSB = pseudo-stillbènes. ²⁶

◆ Exemple d'application

Il existe de nombreuses applications mais les dérivés azobenzènes avec des substituants alkyles, amides, nitriles ou esters sont utilisés dans le photocontrôle d'activités biologiques par exemple en tant que « photoswitches » pour contrôler par la lumière l'ouverture ou la fermeture de canaux potassiques.²⁷

Banghart M. *et al.* ont pris avantage du changement de géométrie des azobenzènes en fonction des isomères. Ils ont en effet développé un azobenzène MAL-AZO-QA qui consiste en une partie maléimide qui sert d'attache sur une cystéine de la protéine, un ammonium quaternaire terminal pour bloquer le canal K⁺, et une partie azobenzène centrale capable de s'isomériser (Figure 9). Ils ont alors créé un mutant E422C du canal potassique comportant une cystéine en position 422. Cette mutation permet de lier covalamment la molécule MAL-AZO-QA au voisinage du canal. Le principe validé avec succès est alors simple : lorsque l'azobenzène est en configuration *trans*, le canal K⁺ est alors fermé alors qu'en configuration *cis* induite par une irradiation à 380 nm, le canal se retrouve ouvert.

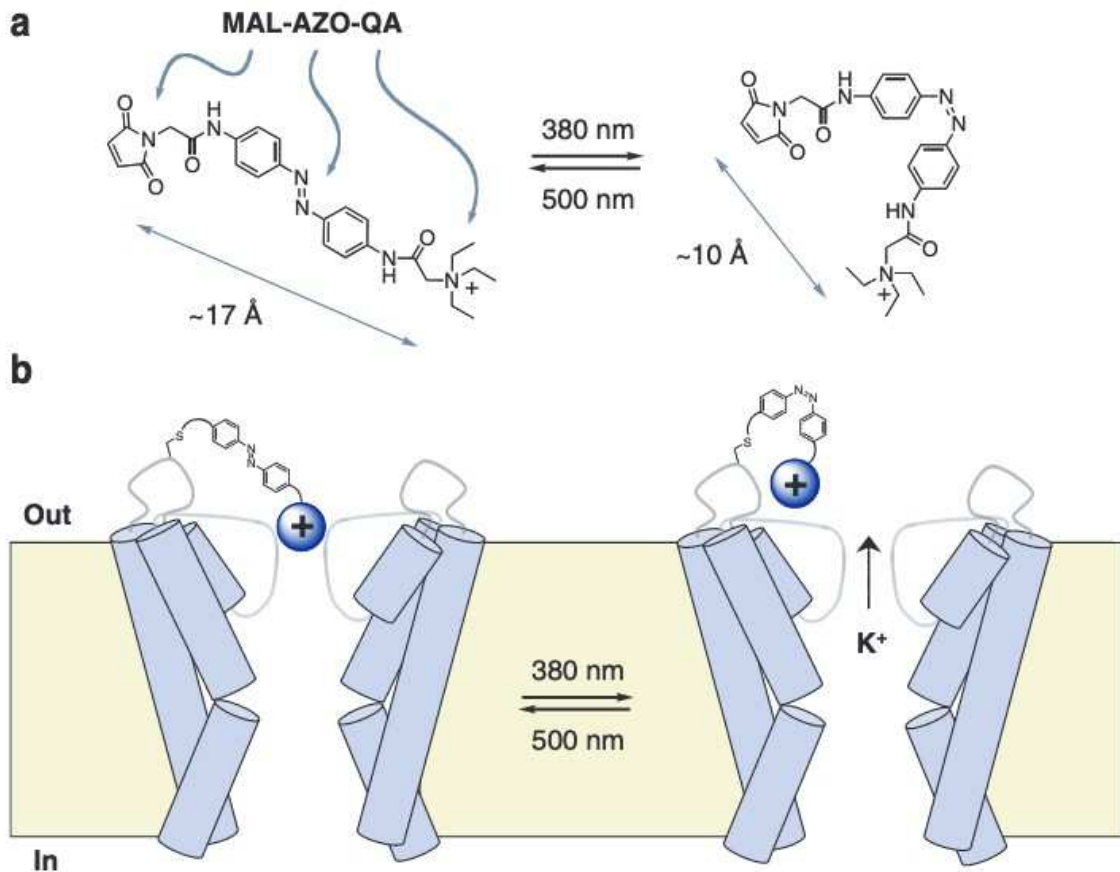


Figure 9 - Schéma de principe de l'activité du « photoswitch » pour le contrôle d'un canal K^+ (Banghart M. et al.²⁷) : a) isomérisation du composé MAL-AZO-QA, b) fermeture et ouverture du canal K^+ en fonction de la configuration de l'azobenzène.

I-2-b.2) Isomérisation par cyclisation/cycloréversion

Comme deuxième catégorie de « photoswitches », il est possible de citer les diaryléthènes, les fulgides et les fulgimides qui peuvent conduire, de façon réversible, à des ouvertures ou fermetures de cycle sous excitation lumineuse (Schéma 3).²⁸

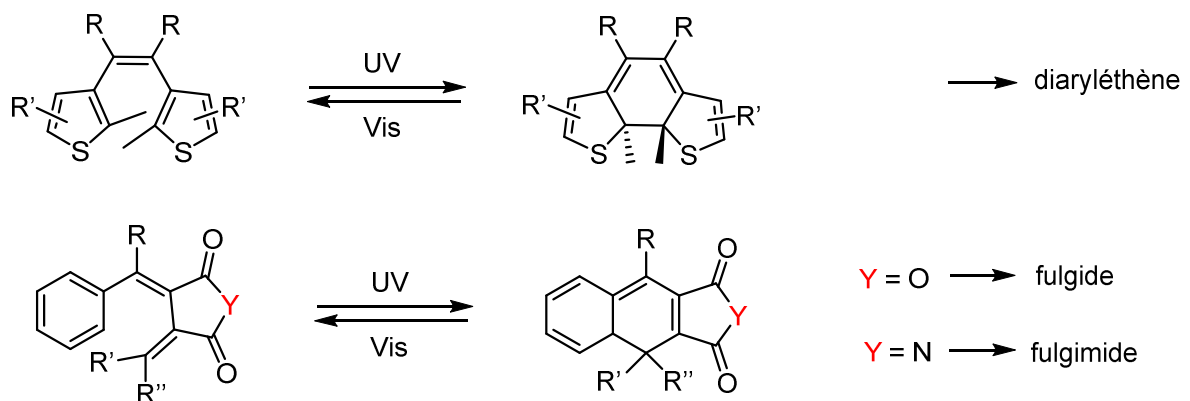


Schéma 3 - Photoisomérisations des diaryléthènes, fulgides et fulgimides.

◆ Les diaryléthènes

Ce sont des molécules photochromiques qui intéressent particulièrement les chercheurs car les conversions sont efficaces, les isomères sont stables thermiquement et peuvent subir un grand nombre de cycles d'irradiation.²⁹

Les spectres d'absorption des isomères ouvert/fermé de diaryléthènes sont différents, ce qui permet une conversion en général supérieure à 90 % pour passer de la forme ouverte, incolore et flexible à la forme fermée, colorée et rigide (Figure 10). La cyclisation et la cycloréversion peuvent se faire en solution et/ou à l'état solide selon les composés.

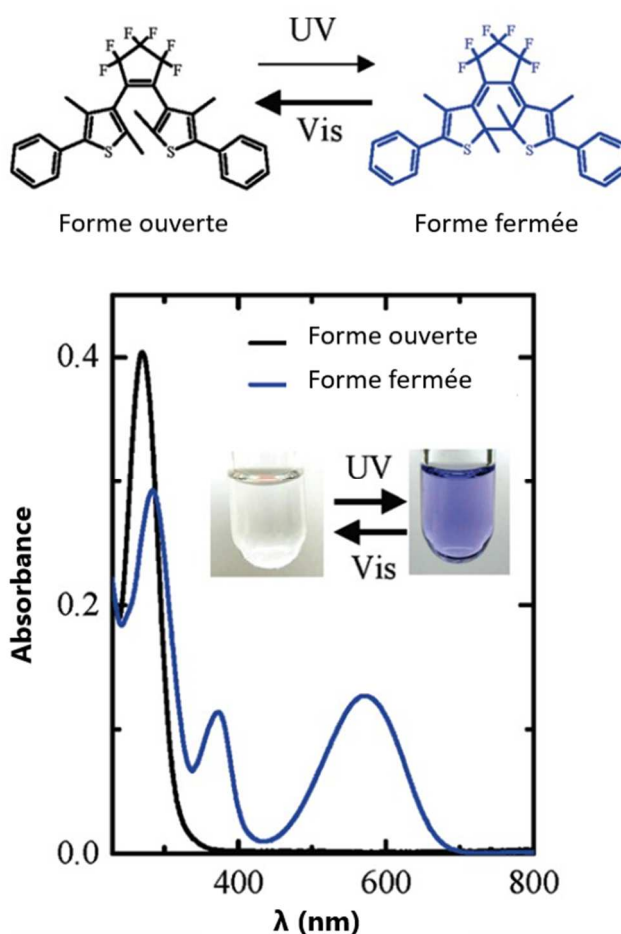


Figure 10 - Exemple de diaryléthènes - équilibre photochimique et spectres d'absorption associés (modifié de Tsuboi Y. et al.).³⁰

◆ Modulation des propriétés

Tout comme les azobenzènes, il est possible de moduler les propriétés spectroscopiques et photophysiques de ces composés. La longueur d'onde d'irradiation pour passer de la forme fermée à la forme ouverte est modulable en modifiant les substituants. Pour illustration, Pu S. *et al.* ont montré qu'il était possible d'utiliser des irradiations de 500 nm jusqu'à 700 nm.³¹

Cette équipe de chercheurs a modifié les substituants en position 5 des deux cycles thiophènes. Ils ont pu obtenir des maxima d'absorption de l'isomère cyclisé de 544 nm jusqu'à 739 nm dans l'hexane (Schéma 4 et Tableau 1). Ainsi les groupements électroattracteurs (formyle et cyano) décalent de façon importante l'absorption maximale à des longueurs d'onde plus élevées.

Ils ont également observé que les rendements quantiques de cycloréversion des diaryléthènes comportant des substituants électrodonneurs étaient beaucoup plus importants que ceux ayant des groupes électroattracteurs. Cela est dû au fait que les rendements quantiques de cycloréversion dépendent de l'étendue de la conjugaison π du système fermé et décroissent quand cette dernière augmente.

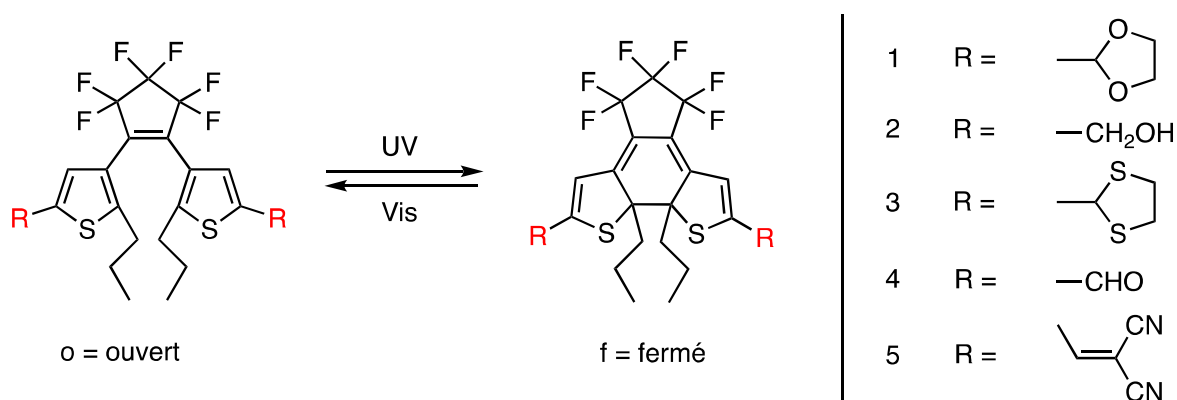


Schéma 4 - Isomérisation des différents dérivés synthétisés par Pu S. et al.³¹

Tableau 1 - Résultats rapportés par Pu S. et al. pour les formes ouvertes et fermées de leurs dérivés.³¹

	$\lambda_{o,max}$ (nm)	$\lambda_{f,max}$ (nm)	Φ_{o-f}	Φ_{f-o}
1	239	544	0.31	0.26
2	239	526	0.29	0.24
3	249	559	0.19	0.12
4	261	632	0.38	0.078
5	354	739	0.22	0.071

L'impact important du motif de substitution du squelette diaryléthène a également été illustré par Morimitsu K. *et al.* qui ont montré par exemple que l'introduction de groupements éthynyles en position 2 et 2' tend à augmenter le rendement quantique de cycloréversion (Schéma 5 et Tableau 2).³²

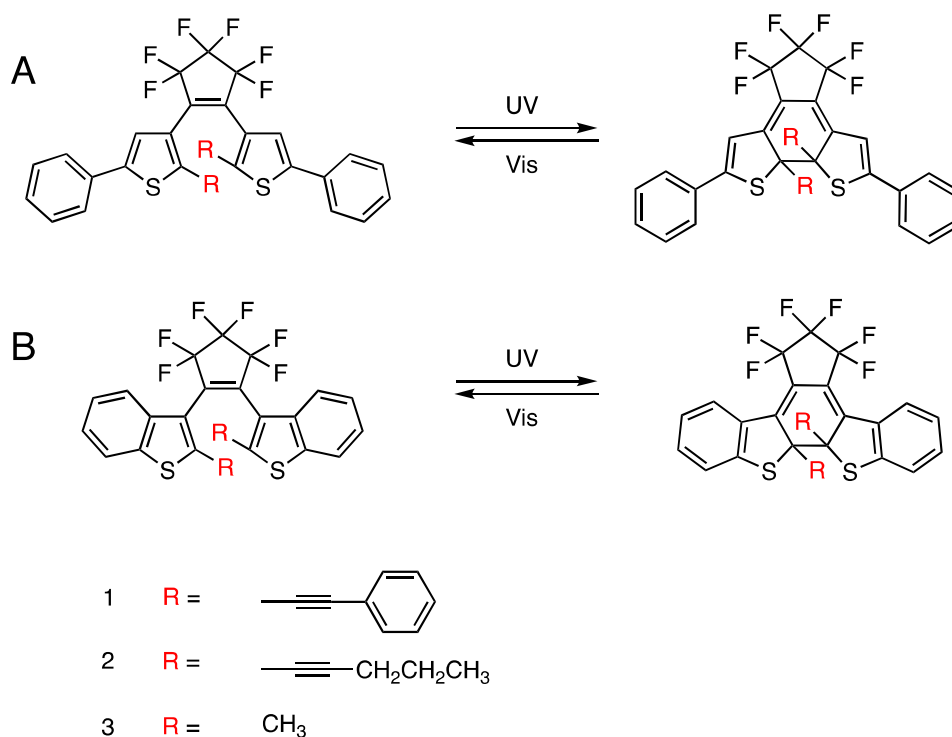


Schéma 5 - Cyclisation et cycloréversion de diaryléthènes substitués en position 2 et 2'.

Tableau 2 - Rendements quantiques de cycloréversion ³²

	$\Phi_{A_{f-o}}$	$\Phi_{B_{f-o}}$
1	0.32	0.55
2	0.27	0.58
3	0.013	0.35

Il est donc possible de moduler les différentes caractéristiques de ces molécules en adaptant les substituants.

◆ Synthèse

Les diaryléthènes les plus utilisés sont des diarylperfluorocyclopentènes. Un exemple de synthèse très utilisé pour sa conception est décrit au Schéma 6. Le 2,4-diméthylthiophène **1** est traité par du *n*-BuLi puis par du ZnCl_2 . Après transmétallation, le zincique **2** formé est alors employé comme partenaire d'un couplage croisé de Negishi avec l'iodobenzène en présence d'une quantité catalytique de tétrakis(triphénylphosphine) palladium. La position 3 du thiophène **3** obtenu est alors bromée ou iodée, puis traité par du *n*-BuLi. L'organolithien résultant réagit finalement avec le perfluorocyclopentène pour conduire au diaryléthène escompté **5**.²⁹

De nombreux dérivés sont ainsi synthétisés, symétriques ou non, et avec différents substituants.

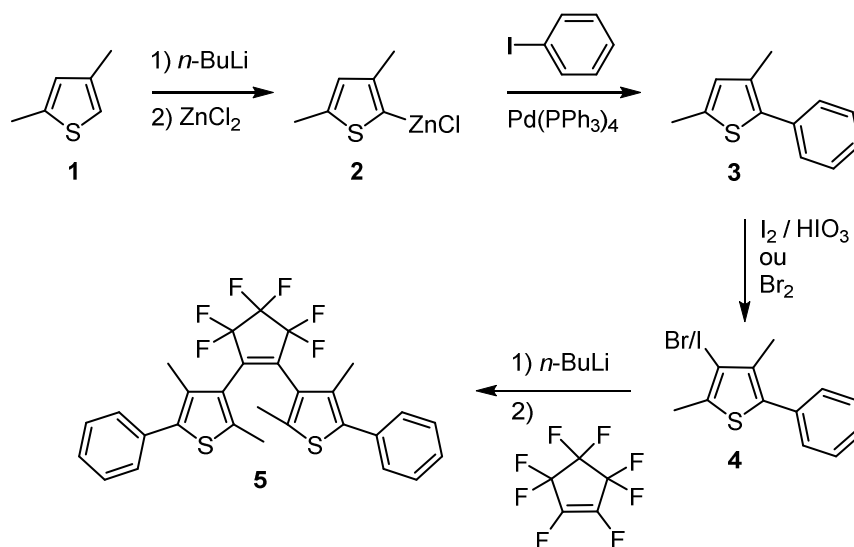


Schéma 6 - Synthèse de diarylperfluorocyclopentènes, adapté de Irie M. et al.²⁹

◆ Exemple d'application

Une application en chimie des matériaux suggérée par Irie M. *et al.* est le stockage optique. Le stockage optique utilise des lasers pour enregistrer ou lire des informations. Il est ainsi possible de mettre à profit les propriétés photochromiques de ces molécules. En effet, les propriétés physiques des diaryléthènes sont modifiées dans leurs formes ouvertes ou fermées comme la transmittance, la réflectance ou la fluorescence. Cette dernière peut donc être utilisée comme signal de lecture.

Le diaryléthène décrit dans le Schéma 7 a été synthétisé par Tsivgouli G. M. et Lehn J.-M..³³ Sa forme ouverte A a une bande d'absorption à 329 nm et une autre à 459 nm (Figure 11). Mais lorsque la molécule est irradiée avec une excitation vers 400-500 nm, il n'y a pas de réaction. La fermeture de cycle n'est effective qu'avec une irradiation à une longueur d'onde inférieure à 400 nm. La forme fermée B a elle une large bande d'absorption à 704 nm, donc la cycloréversion est possible avec des irradiations à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm. La forme A ouverte a la propriété de réémettre efficacement un photon par fluorescence à 589 nm après une excitation entre 400 et 500 nm. La forme B a elle une très faible fluorescence. Or comme une irradiation à une longueur d'onde entre 400 et 500 nm n'induit

pas la cyclisation, il est donc possible d'utiliser le signal de fluorescence comme signal de lecture.

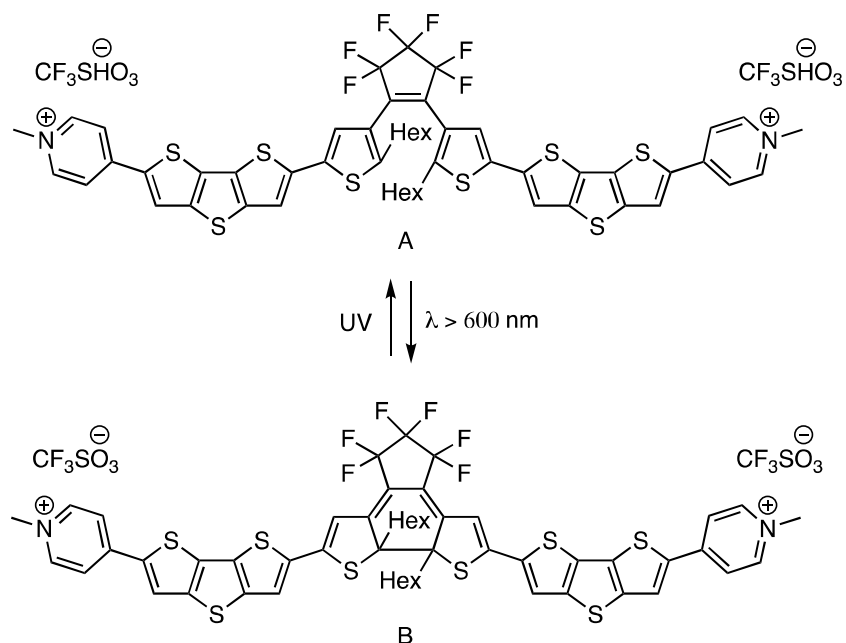


Schéma 7 - Formes A et B du diaryléthène synthétisé par Tsivgouli G. M. et Lehn J.-M.³³

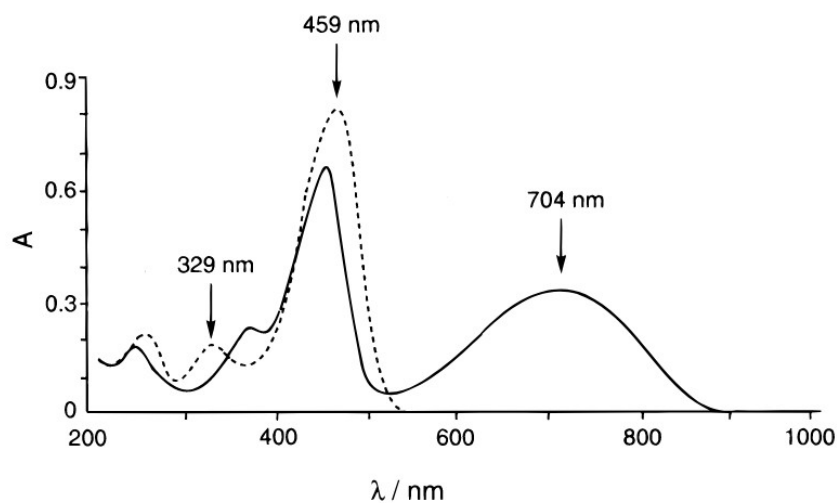


Figure 11 - Spectres d'absorption des formes A (pointillés) et B (trait plein).²⁹

I-2-c) Le phénomène de photolyse et les groupements protecteurs photolabiles

I-2-c.1) La photolyse à 1 photon

L'absorption d'une énergie suffisante peut permettre dans certaines conditions d'initier une réaction photochimique qui conduit à une photolyse (Figure 12).

Il est possible de tirer avantage de ce processus pour libérer un composé afin de restaurer son activité chimique ou biologique qui était préalablement masquée : on parle communément de photolibération (« uncaging »).

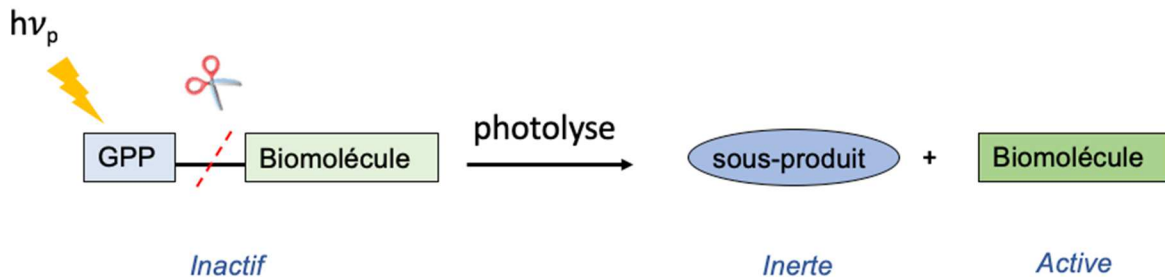


Figure 12 - Schéma du principe de l'utilisation de réactions de photolyse pour la libération de biomolécules.

Un effecteur biologique est ainsi lié à un chromophore appelé groupement protecteur photolabile (GPP) de façon covalente. Sous l'action de la lumière, le GPP atteint un état excité ce qui permet d'induire une photolyse.

Le rendement quantique de cette photolyse peut être défini par le nombre de molécules qui effectuent le clivage par rapport au nombre de molécules qui absorbent des photons. Il est noté Φ_u . Pour une irradiation à 1 photon, l'efficacité de photolibération est donc définie par $\epsilon_{\max}\Phi_u$, ϵ_{\max} étant le coefficient d'extinction molaire de la molécule à la longueur d'onde d'absorption maximale.

Les GPPs sont des chromophores capables, après absorption de photons, d'effectuer un clivage. Une biomolécule est donc liée à un GPP ce qui a pour effet de masquer/bloquer son activité chimique ou biologique. Cette activité sera restaurée après la photolyse et donc après la libération de cet effecteur chimique ou biologique.

Le GPP idéal pour pouvoir être appliqué dans des conditions *in vivo* devrait avoir les caractéristiques suivantes :²⁸

- il doit être soluble dans le milieu physiologique lorsque ce groupement est uniquement lié à un effecteur biologique. On notera que dans le cas d'une utilisation de ces groupements sur des nanoparticules, cette propriété physicochimique n'est plus déterminante,

- le GPP doit être stable dans les conditions physiologiques,
- il doit avoir un ϵ important pour une photoactivation efficace,
- il doit aussi avoir un bon rendement quantique Φ_u de libération, c'est-à-dire que le pourcentage de molécules qui effectue réellement le clivage doit le plus élevé possible,
- la réaction de photolyse doit être plus rapide que le phénomène biologique étudié,
- la longueur d'onde d'irradiation ne doit pas dégrader les produits de photolyse et notamment les effecteurs libérés. Ces produits doivent idéalement être transparents à cette longueur d'onde afin de permettre une photolyse totale,
- le sous-produit de photolyse ne doit pas être toxique ou néfaste vis-à-vis de l'activité visée,
- le groupement doit inactiver efficacement la réponse biologique lorsqu'il est couplé à un effecteur biologique.

I-2-c.2) La photolyse à 2 photons

Là où pour une photolyse à 1 photon, une lumière de longueur d'onde plutôt courte est appliquée (et donc de plus forte énergie) pour atteindre l'état excité de la molécule, la photolyse à 2 photons utilise, elle, 2 photons de plus basse énergie (et donc de longueur d'onde décalée dans le rouge) (Figure 13).

C'est Maria Göppert-Mayer qui a démontré, en 1931, d'un point de vue théorique, qu'un atome pouvait être excité par 2 photons s'ils étaient de même énergie et s'ils étaient absorbés en un temps très court.³⁴

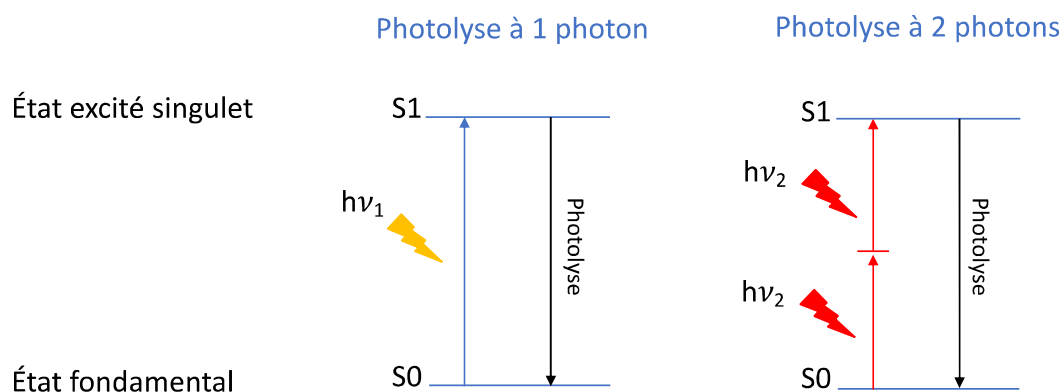


Figure 13 - Excitation d'un précurseur photolabile à 1 ou 2 photons.

Cette technique permet d'exploiter des stimuli lumineux moins énergétiques qu'à 1 photon (2 photons d'énergie $E = \frac{h\nu}{2}$) et qui sont donc dans le rouge ou le proche infra-rouge (NIR). Cependant, l'irradiation bi-photonique demande l'utilisation de lasers spécifiques : des lasers pulsés. Le laser pulsé le plus utilisé est le laser titane-saphir. Il permet d'irradier avec des pulses de 100 femtosecondes et un taux de répétition de 80 MHz.

La probabilité d'une excitation bi-photonique est relativement faible. Elle est proportionnelle au carré de l'intensité locale :

$$P \approx \frac{\langle I \rangle^2}{\tau * f}$$

avec I l'intensité, τ la durée d'impulsion et f la fréquence de répétition du laser.³⁵

Ainsi, contrairement à une irradiation à 1 photon qui excite sur la totalité du chemin optique de la source, l'excitation bi-photonique n'est effective qu'au point focal du laser (Figure 14). Ce volume est extrêmement petit, de l'ordre du femtolitre. En effet, dans ce volume, la probabilité pour que deux photons arrivent en même temps est maximale (Figure 15).

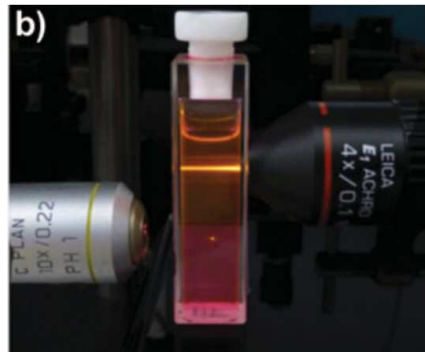


Figure 14 - Excitation à 1 photon (en haut à droite) vs 2 photons (en bas à gauche).³⁶

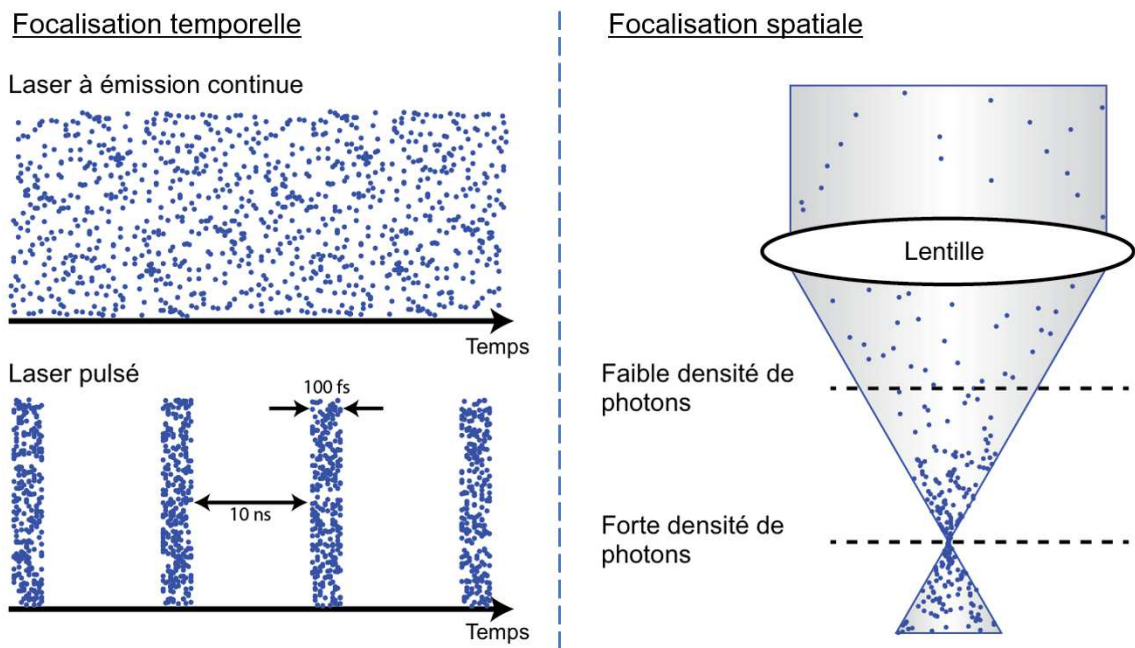


Figure 15 - Focalisations temporelle et spatiale d'un laser pulsé, modifié depuis <http://sites.middlebury.edu/durst/research/>.

Cela confère donc une excellente précision pour stimuler une zone.

L'efficacité de libération d'un effecteur biologique grâce à une excitation à 2 photons est définie par $\delta_a \Phi_u$, Φ_u étant la section efficace de photolyse (« uncaging ») à 2 photons et on notera que δ_a est la section efficace d'absorption à 2 photons, exprimée en GM en hommage à Maria Göppert-Mayer. Cependant, il est à noter que tous les chromophores sensibles à des irradiations à 1 photon ne le sont pas nécessairement à des irradiations bi-photoniques car la plupart des chromophores présentent des valeurs de δ_a extrêmement faibles.

I-2-c.3) Exemples de groupements protecteurs photolabiles existants (GPPs)

Depuis la découverte de la propriété de photolyse de certaines molécules, de nombreux GPPs ont été développés dans le but de libérer des effecteurs biologiques. Nous allons donc dans cette partie en présenter quelques-uns ainsi que leurs optimisations et applications.

◆ Les nitrobenzyles

Depuis les premières utilisations de GPPs, de nombreux chromophores ont fait leur apparition, notamment les groupements nitrobenzyles et nitrophénéthyles qui sont les plus utilisés à ce jour.³⁷

Le groupe nitrobenzyle a pour la première fois été décrit et étudié par Barltrop J. A. *et al.* en 1966. Ils ont utilisé avec succès ce groupe en tant que GPP afin de libérer des acides carboxyliques et des amines (Schéma 8).³⁸

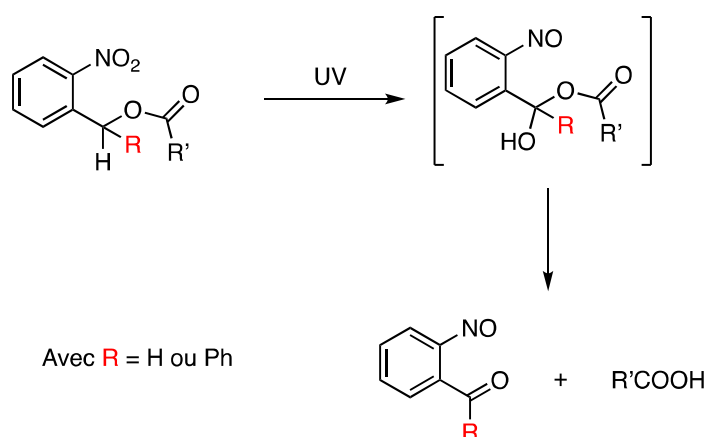


Schéma 8 – Mécanisme de photolyse d'un GPP de type *ortho*-nitrobenzyle pour la libération d'un acide carboxylique.

La caractéristique des GPPs de type *ortho*-nitrobenzyles est de comporter en position benzylique un groupement partant, pouvant ainsi être libéré grâce à un stimulus lumineux. En plus des acides carboxyliques ou des amines, Partchornik A. *et al.* émettent l'hypothèse qu'il est possible de protéger d'autres fonctions comme des phosphates ou des hydroxyles.³⁹ Engels J. et Schlaeger E.-J. ont ainsi développé une application de ces GPPs à la biologie : la libération de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) par irradiation à 366 nm d'un phosphoester équipé d'un résidu *ortho*-nitrobenzyle (Schéma 9).⁴⁰ Le cAMP joue un rôle clé dans la régulation de différents processus dans les organismes eucaryotes. Le problème majeur est de traverser la membrane cellulaire et le cAMP a une faible capacité à la traverser à cause de son groupement phosphate chargé négativement à pH physiologique. Ils ont donc développé ce phosphoester afin de permettre une meilleure internalisation de la molécule et une libération photochimique du cAMP dans le cytosol.

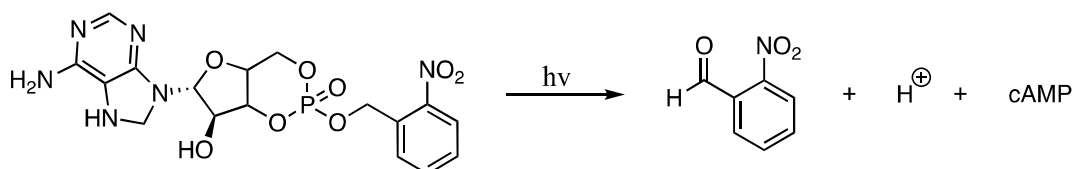
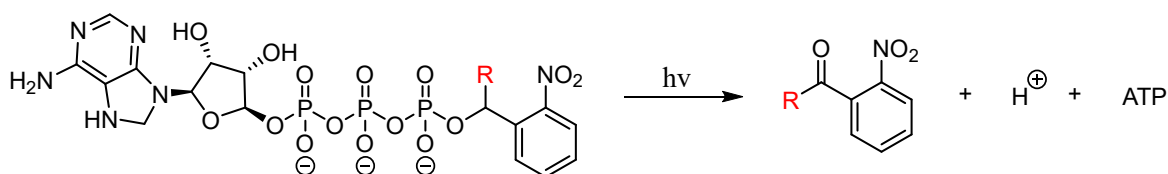


Schéma 9 - Photolyse d'une forme cagée de cAMP.

Puis peu de temps après, Kaplan J. H. *et al.* ont démontré la libération d'ATP, « cagée » (on remarquera que ces auteurs ont défini pour la 1^{ère} fois le terme de « caged compound ») par un groupement *ortho*-nitrobenzyle (plus particulièrement, un groupement *ortho*-(nitrophényl)éthyle), grâce à une irradiation à 340 nm (Schéma 10).⁴¹



Avec R = H → *ortho*-nitrobenzyle
 R = CH₃ → *ortho*-(nitrophényl)éthyle

Schéma 10 – Photolyse d'une forme cagée d'ATP.

Ils ont donc étudié la libération d'ATP et l'effet de ce dernier sur une pompe Na⁺/K⁺ nommée Na⁺-K⁺ATPase, une protéine transmembranaire responsable du transport des ions sodium et potassium. Tandis que l'ATP « cagée » n'avait pas d'effet sur la pompe Na⁺/K⁺, l'ATP a pu être libéré par photoactivation pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de la Na⁺-K⁺ATPase et ainsi photoréguler le transport des ions sodium et potassium.

D'autres dérivés du groupement *ortho*-(nitrophényl)éthyle ont été développés pour améliorer les performances de ce GPP. Ces modifications ont principalement été effectuées en position benzylique et sur le cycle aromatique du chromophore.³⁷ Les modifications en position benzylique ont tendance à affecter le rendement quantique alors que celles sur la partie aromatique engendrent des effets sur l'absorbance du composé.

En 1970, Patchornik A. *et al.* proposent déjà plusieurs dérivés du 2-NitroBenzylOxyCarbonyle (NBOC), comme par exemple le 2,2'-DiNitrophénylméthylOxyCarbonyle (DNBOC) et le 6-NitroVératrylOxyCarbonyle (NVOC) (Figure 16).³⁹

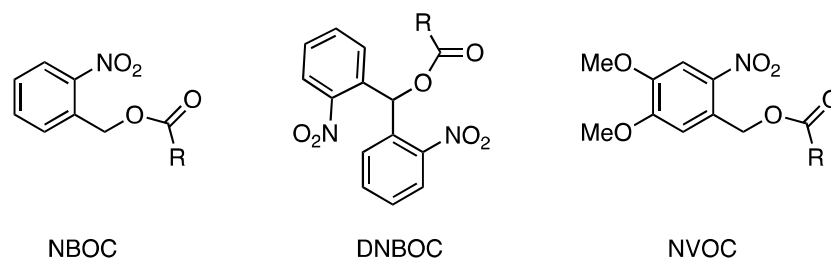


Figure 16 - Structures de différents dérivés ortho-nitrobenzyles.

Les résultats obtenus pour la libération de L-phénylalanine et L-alanine montrent que le rendement de libération de ces deux composés est plus efficace (notamment des temps d'irradiation plus courts) avec le NVOC et le DNBOC qu'avec le NBOC, les meilleurs résultats étant obtenus avec le DNBOC (entre 70 et 95 %).

Specht A. *et al.* (2004) ont décrit l'introduction d'un groupement trifluorométhyle en position benzylique pour conduire à deux dérivés : 1-(2-NitroPhényl)-2,2,2-Trifluoroéthyle (NPT) et le 1-(4,5-Diméthoxy-2-NitroPhényl)-2,2,2-Trifluoroéthyle (DMNPT).⁴² Ces dérivés ont été utilisés en tant que GPPs pour la libération d'alcool comme la choline, l'arsenocholine et le galactose. Ces dernières molécules ont été sélectivement couplées au GPP à l'aide d'un couplage de Mitsunobu (Schéma 11).

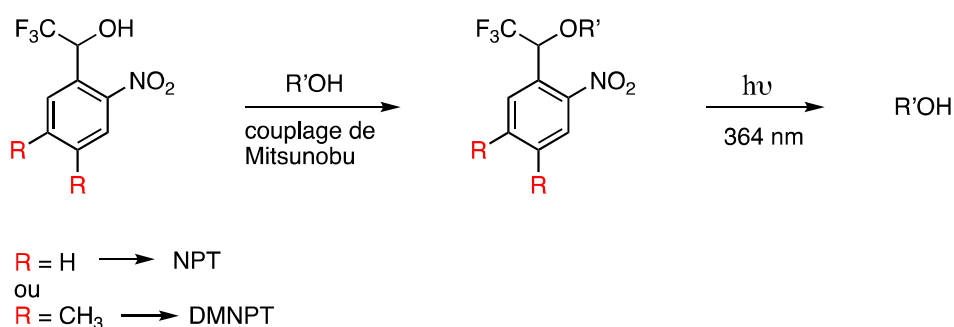


Schéma 11 – Principe du couplage et de la photolibération de biomolécules avec les GPPs NPT et DMNPT.

L'introduction de ce groupe fluoré, fortement électro attracteur, a drastiquement augmenté les rendements quantiques de photolyse, jusqu'à d'excellentes valeurs de 0.7 pour les NPT et des valeurs supérieures à 0.4 pour les DMNPT.

Le changement de substituants sur le cycle aromatique des nitrobenzyles a également souvent été utilisé comme stratégie pour introduire des groupements solubilisants comme des acides

carboxyliques. Mitchison T. J. *et al.* ont travaillé sur la protection du C2CF-sulfo-N-hydroxysuccinimide (SNHS), un dérivé de la fluorescéine (Figure 17).⁴³ Alors que le groupe C2CF est très hydrophobe, la partie SNSH permet de garder le composé hydrosoluble. Cependant, pendant des expériences de marquage, ce groupement solubilisant a été hydrolysé ce qui a conduit à des agrégats et des précipités. Mitchison T. J. et ses collègues ont donc développé un GPP plus soluble et stable à savoir un dérivé *ortho*-nitrobenzyle substitué en position *para* du groupe nitro du groupe OCH₂COOH (Figure 17).

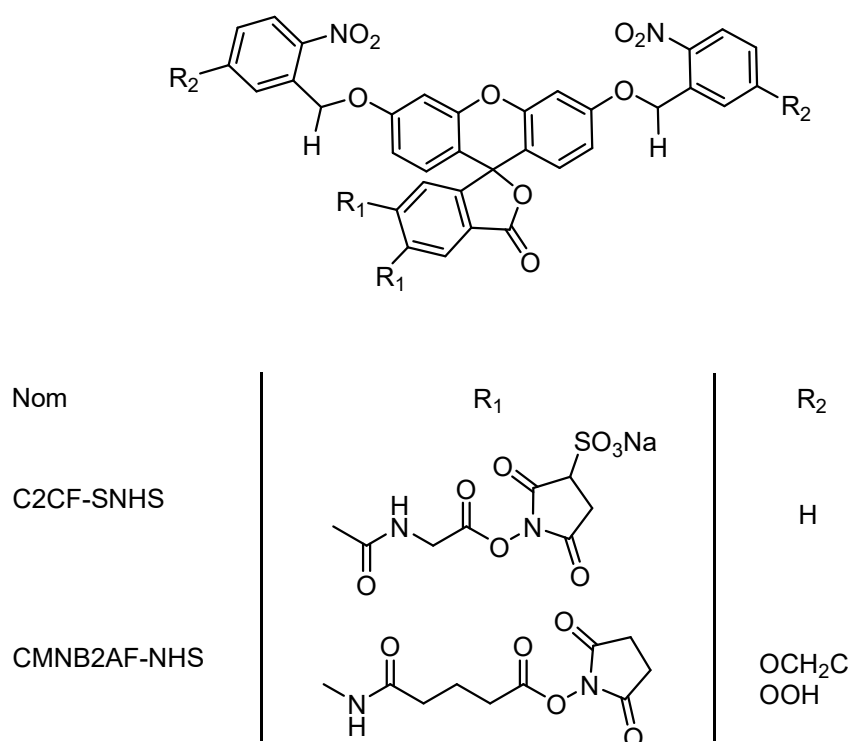


Figure 17 - Modification de structures de fluorescéine « cagée » par Mitchison T. J. *et al.* afin d'augmenter la solubilité du système.

◆ Les groupements nitrophénéthyles

Un autre dérivé est le groupe *ortho*-nitrophénéthyle qui est un homologue du groupe *ortho*-nitrobenzyle présentant un atome de carbone supplémentaire entre le cycle aromatique et le groupe partant (Schéma 12). Dans ce cas, le stimulus lumineux va induire la formation d'une espèce *aci*-nitro qui, après déprotonation, va permettre une β -élimination du groupe partant OR. Parmi les sous-produits de photolyse, un nitrostyrène est notamment formé.⁴⁴

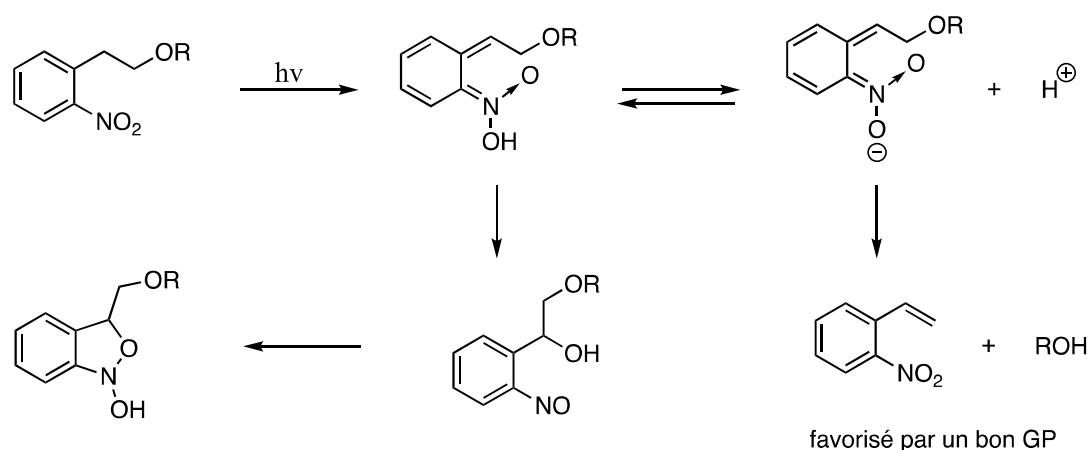


Schéma 12 – Mécanisme général proposé par Pelliccioli A. P. et al. pour la photolyse d'un groupe *ortho*-nitrophénéthyle.⁴⁴

Afin d'optimiser les performances du groupe *ortho*-nitrophénéthyle, cette structure de base a été modifiée tout comme les *ortho*-nitrobenzyles, avec des effets similaires. Pour illustration, l'introduction d'un groupe méthyle en position benzylique a également eu comme effet d'augmenter considérablement le rendement quantique. Hasan A. *et al.* ont ainsi montré que le rendement quantique de photolibération de thymidines passait de 0.042 à 0.35 *via* l'introduction d'un groupe méthyle sur le carbone benzylique.⁴⁵

Notre équipe a développé ce type de GPPs. Dans un premier temps, une étude a été faite sur le dérivé 1-(4,5-DiMéthoxy-2-NitroPhényl)Ethyle (DMNPE) pour la libération d'acides carboxyliques comme le glutamate, l'étude réalisée visant à optimiser le rendement quantique du DMNPE. Deux dérivés ont donc été synthétisés : le 3-(4,5-DiMéthoxy-2-NitroPhényl)-2-Butyle (DMNPB) et le 2-(4,5-DiMéthoxy-2-NitroPhényl)Propyle (DMNPP).⁴⁶ Alors que leur photolyse à 1 photon s'est révélée très efficace ($\Phi_u \geq 0.26$) avec une irradiation vers 364 nm, leurs performances sous régime biphotonique n'ont pas été suffisantes pour envisager leur utilisation *via* une photolyse à 2 photons. Le laboratoire s'est alors engagé dans le développement de nouveaux dérivés ayant de meilleures propriétés d'absorption à 2 photons.

Afin d'améliorer la section efficace d'absorption à deux photons (δ_a) d'un chromophore, plusieurs pistes peuvent être privilégiées : étendre la conjugaison π , augmenter le caractère électro-donneur ou électro-accepteur des substituants tout en conservant le NO_2 qui est nécessaire au mécanisme de photolyse. L'idée a donc été d'inclure un groupement styryle pour obtenir un système stilbényle beaucoup plus conjugué (Figure 18). Cependant, il a été observé que dans le cas de tels stilbènes, bien que la conjugaison π soit étendue, le rendement

quantique lui chute (vraisemblablement en raison du processus de photoisomérisation en compétition avec la photolyse souhaitée).⁴⁷ Il a donc été préféré de relier les deux cycles aromatiques par une liaison simple, un excellent rendement quantique de 90 % étant obtenu avec le système biphenyle correspondant (Figure 18).

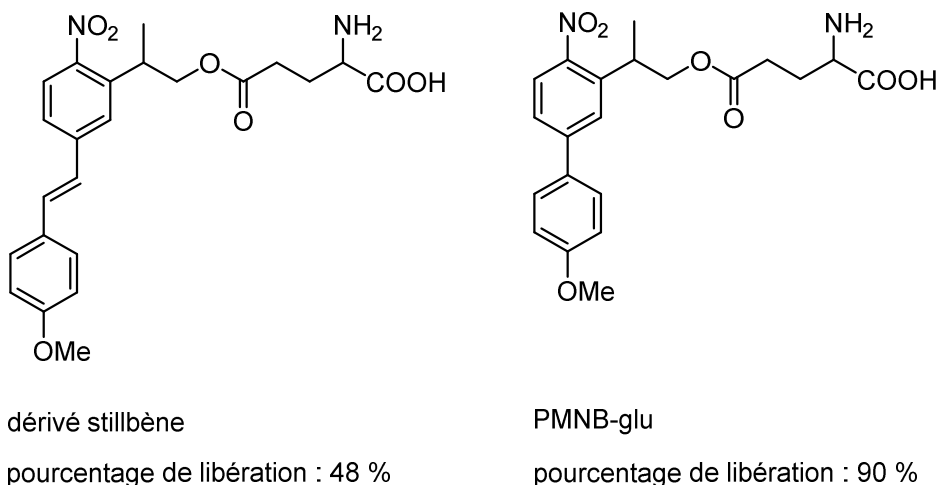


Figure 18 - Structures des dérivés stilbène et biphenyle (PMNB) afin d'augmenter la conjugaison du GPP *ortho*-nitrophénéthyle.⁴⁷

Comme attendu, un déplacement bathochrome significatif a été observé en passant d'un groupe *ortho*-nitrobenzyle classique (262 nm) au groupe PMNB (317 nm). Ce composé PMNB-glutamate a une section efficace de photolibération à 2 photons de 0.45 GM à 800 nm (1 GM=10⁵⁰ cm⁴.s par photon) et de 3.4 GM à 720 nm alors que pour comparaison, la valeur n'était que de 0.17 GM à 720 nm pour le DMNPB-glutamate.

Toujours afin d'améliorer ces propriétés, notre équipe a cherché à moduler le caractère accepteur ou donneur des substituants du système biphenyle. Différentes plateformes biphenyles basées sur un système donneur-accepteur ont donc été synthétisées (Figure 19). Tout d'abord, différents régioisomères ont été étudiés et la meilleure performance a été obtenue avec un substituant méthoxyle en position *para*.⁴⁸ Le groupement méthoxyle a ensuite été remplacé par une amine secondaire, meilleur groupe électrodonneur. Cela a permis d'induire un déplacement bathochrome de l'absorbance maximale de 90 nm, de conserver les très bons pourcentages de relargage (95 %), mais surtout d'améliorer la sensibilité à deux photons de ce précurseur photolabile. En effet, le δ_u de cette molécule EANBP a atteint les 11 GM à 800 nm.



GP = groupe partant

PMNB : $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OMe,$
 $\delta_u = 3.2 \text{ GM (740 nm)}$

mMNB : $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H,$
 $\delta_u = 1.8 \text{ GM (740 nm)}$

oMNB : $R_1 = OMe, R_2 = H, R_3 = H,$
 $\delta_u = 2.2 \text{ GM (740 nm)}$

EANBP : $D = N(2-(2\text{-méthoxyéthoxy})\text{éthyle})_2,$
 $\delta_u = 11 \text{ GM (800 nm)}$

Figure 19 - Structures des dérivés ortho-nitrobenzyles développés par notre équipe et basés sur un système donneur-accepteur.

◆ Les coumarines

La coumarine est une molécule odorante utilisée depuis longtemps dans les parfums et les cosmétiques (Figure 20). Elle donne son nom à une grande classe d'hétérocycles.

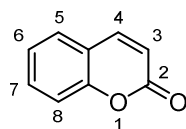


Figure 20 - Nomenclature et structure de la coumarine.

Lorsque Perkin W. H. s'intéresse à la coumarine, les scientifiques pensaient que cette dernière se dégradait sous l'action de potasse pour former de l'acide salicylique et de l'acide acétique. Mais Perkin émet l'hypothèse que l'acide salicylique formé provient plutôt de l'acide coumarique. Il va alors chercher à synthétiser la coumarine à partir de l'anhydride acétique et de sel de sodium de salicylaldéhyde (Schéma 13).^{49, 50}

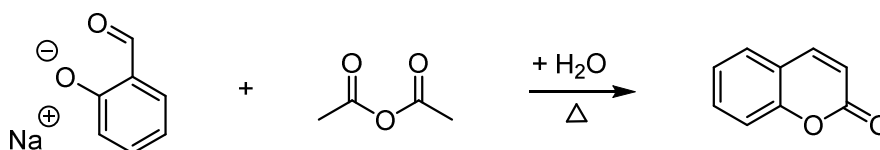


Schéma 13 -Synthèse de la coumarine à partir de sel de sodium de salicylaldéhyde et d'anhydride acétique en présence de base faible.

Puis Von Pechmann H. a ensuite trouvé un autre moyen de synthétiser la coumarine et certains dérivés par condensation de phénols avec l'acide malique ou avec des β -céto-esters (Schéma 14).⁵¹ Le nom de Pechmann a été conservé pour nommer cette réaction, qui a trouvé de nombreuses applications.

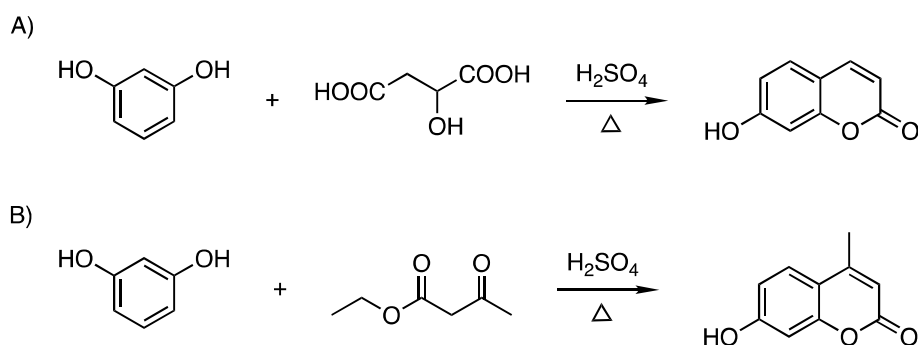
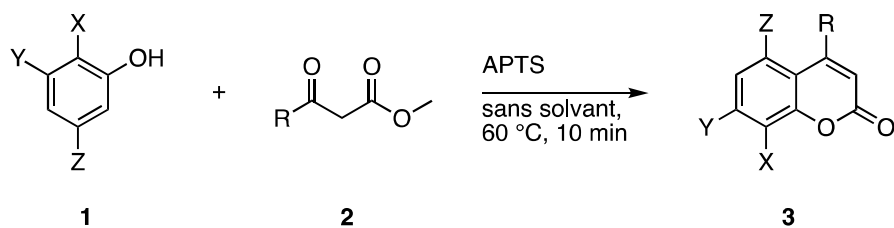


Schéma 14 - Synthèses proposées par Von Pechmann H. pour l'obtention de coumarines à partir A) d'acide malique ou B) de β -céto-esters.

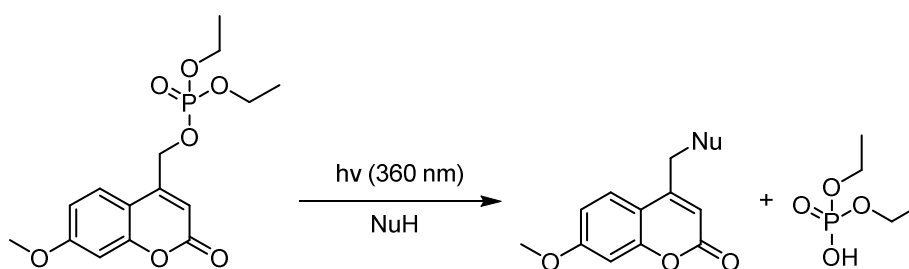
Initialement réalisée en présence d'acide sulfurique, d'autres agents de condensation peuvent être utilisés comme POCl_3 , AlCl_3 , HCl , ZnCl_2 ...⁵² Cependant, les rendements obtenus sont souvent dépendants de la nature des phénols et des β -céto-esters et de longs chauffages à haute température sont également souvent nécessaires. Afin de faciliter l'accès au motif coumarine, d'autres méthodes de synthèse ont donc été développées comme des réactions sans solvant. Sugino T. *et al.* ont par exemple décrit la synthèse de coumarines diversement substituées *via* des condensations de Pechmann et Knoevenagel dans des conditions sans solvant et de manière très rapide.⁵³ Le phénol, le β -céto-ester et une quantité catalytique d'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) sont introduits et mélangés dans un mortier à température ambiante. Le mélange est ensuite chauffé à 60 °C pendant 10 minutes. Le solide est ensuite filtré et lavé à l'eau puis recristallisé dans de l'éthanol. Ils ont ainsi obtenu des rendements équivalents voire bien supérieurs qu'avec la méthode en solution « classique » (Figure 21).



3	X	Y	Z	R	Rendement (%)	
					sans solvant	dans H ₂ SO ₄
a	H	OH	H	Me	98	82-90
b	H	OH	H	Ph	92	0
c	H	OH	H	CH ₂ CO ₂ Et	79	40
d	H	OH	H	CH ₂ Cl	0	0
e	OH	OH	H	Me	69	0
f	H	OH	OH	Me	81	0
g	H	Me	OH	Me	66	68

Figure 21 - Rendements obtenus par réaction de Pechmann sans solvant par rapport à la méthode « classique ». ⁵³

En plus de ses propriétés odorantes, la coumarine a également suscité un intérêt particulier pour ses propriétés photophysiques (c'est un fluorophore très utilisé) et photochimiques. Pour cette dernière propriété, Givens R. S. s'est aperçu que les esters phosphoriques cagés par des 4-méthylcoumarines étaient sensibles à la lumière. En effet, l'hydrogénophosphate de diéthyle a été libéré après irradiation à 360 nm, en présence de différents nucléophiles (Schéma 15).⁵⁴



NuH = MeOH, pipéridine, cystéine, tyrosine, α -chymotrypsine, HMT

Schéma 15 - Photolibération d'hydrogénophosphate de diéthyle en présence de nucléophiles.

Sous irradiation lumineuse, la liaison C-X (X = hétéroatome, souvent O) en position C4 est rompue, laissant un anion sur le groupe partant et une charge positive sur le méthyle de la coumarine (Schéma 16). Ce dernier peut alors réagir avec un nucléophile, comme le solvant.⁵⁵

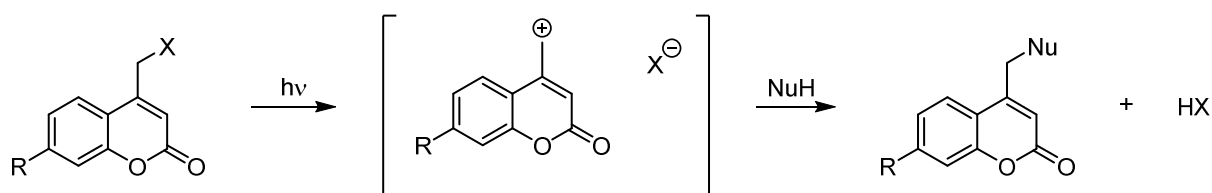


Schéma 16 - Mécanisme de photolyse des 4-méthylcoumarines.

Il est ainsi possible de libérer de nombreuses fonctions : thiol, alcool, sulfonate, phosphate et très rarement des amines en milieu acide.⁵⁶ Mais les mauvais groupes partants comme les alcools ou phénols rendent la photolyse difficile. Il est possible d'améliorer la libération en utilisant un lien carbonate (Schéma 17). De même, cette stratégie peut être utilisée pour « cager » les amines avec un lien carbamate. Le mécanisme de clivage débute donc de la même manière : rupture de la liaison C-X puis le carbonate libéré et instable va subir une décarboxylation pour redonner l'amine, l'alcool ou le thiol souhaité. Cette dernière étape est néanmoins plus lente (quelques ms), ce qui peut être un problème selon les applications.

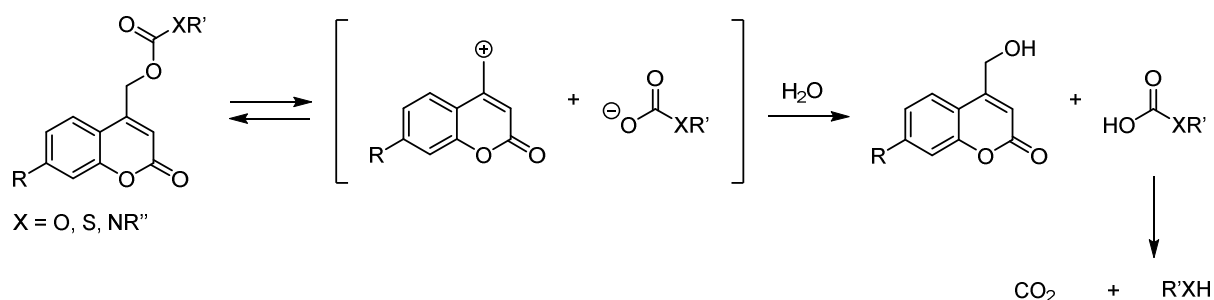


Schéma 17 - Mécanisme de photolyse de 4-méthylcoumarines en présence de lien carbonate ou carbamate.

La plateforme 4-méthylcoumarine s'est révélée être un GPP de choix de par ses propriétés photochimiques. En effet, Givens R. S. a exploité les propriétés de fluorescence du système coumarinique. Il l'utilise donc pour le marquage fluorescent de deux enzymes, à savoir l' α -chymotrypsine et l'histamine *N*-méthyltransférase (HMT)⁵⁷. Même si les rendements quantiques de photolyse des premières coumarines conçues n'étaient pas très élevés, la photolyse est rapide et le coefficient d'extinction molaire ϵ des coumarines est relativement élevé. Enfin, ces chromophores ont une longueur d'onde maximale d'absorption décalée vers des longueurs d'onde plus grandes (≥ 350 nm) comparée à celles des GPPs déjà cités précédemment. Tout comme les GPPs précédemment cités, il est possible de moduler les propriétés photophysiques en fonction des substituants sur le système coumarinique.

Tout d'abord, l'introduction de substituants sur la position 6 comme un groupe méthoxyle décale l'absorption maximale de 30 nm, alors qu'un atome de brome la décale de 60 nm pour atteindre des longueurs d'onde de l'ordre de 330-380 nm (Figure 22).³⁷ La position 7 de la coumarine a également son importance. En modifiant le pouvoir électrodonneur à cette position, en introduisant par exemple un groupement *N,N*-diéthyle, il peut y avoir un effet bathochrome et les longueurs d'onde se rapprochent des 400 nm ce qui permet d'envisager des applications *ex vivo*.

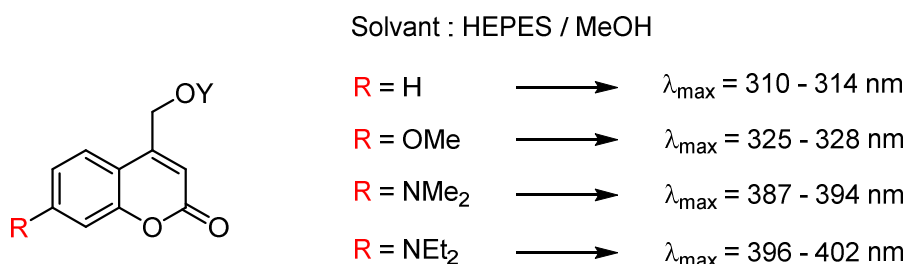


Figure 22 - Impact sur les propriétés d'absorption de diverses substitutions en position 7 des GPPs de type coumarinyle.

Une autre stratégie peut être l'extension du système conjugué de la coumarine par l'introduction de groupements en position 3. Récemment, le groupe d'Ellis-Davies G. C. R. a développé une coumarine DEAC450 afin de « cager » du glutamate et qui présente une absorbance maximale à 450 nm (Figure 23).⁵⁸ Cette coumarine, dont le coefficient d'extinction molaire ϵ est particulièrement important ($43000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), est également sensible à l'excitation bi-photonique à 900 nm. De même, Lin Q. *et al.* ont synthétisé une coumarine dont le système π a été étendu par l'introduction en position 3 d'un résidu styryle azoté et atteignant une λ_{\max} similaire de 446 nm.⁵⁹

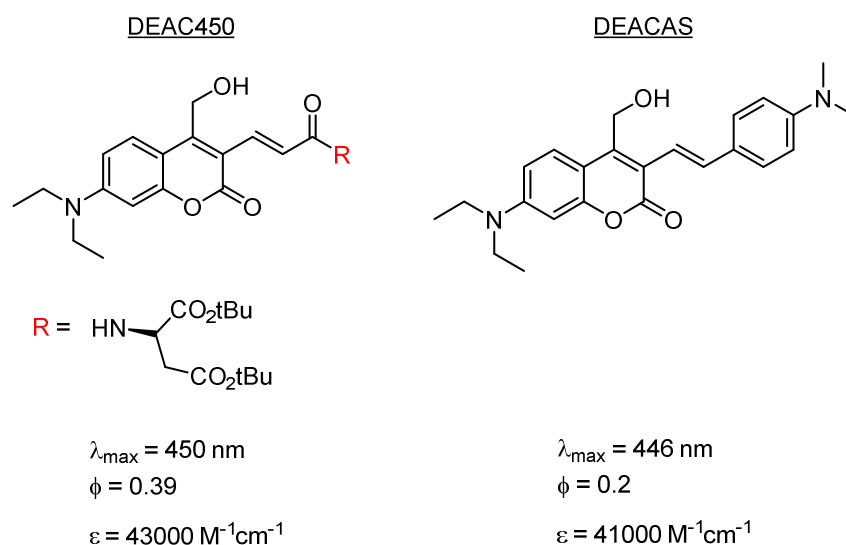


Figure 23 - Structures de la DEAC450 et DEACAS et leur propriétés photophysiques.

Dans ce même article, Lin Q. *et al.* introduisent des hétérocycles contraints comme groupement : des julolidines (Figure 24). Avec un seul résidu styryljulolidine en position 3, la longueur d'onde maximale d'absorption est décalée à 456 nm et en ajoutant un groupe julolidine en position 7 elle atteint les 467 nm. Ainsi, chaque motif julolidine induit un déplacement bathochrome d'une dizaine de nm.

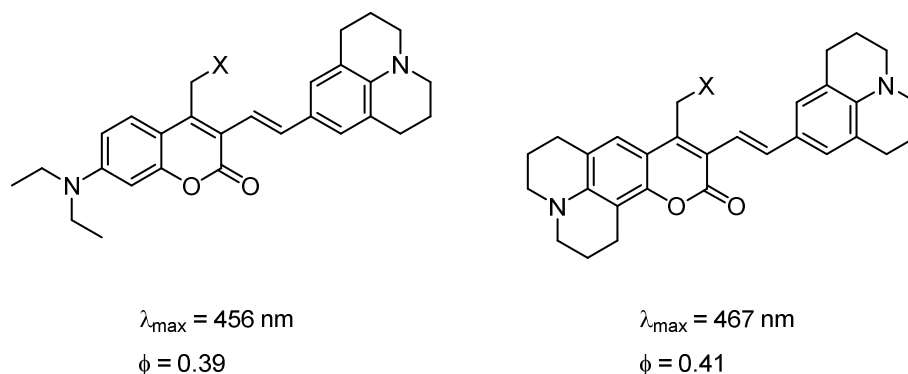


Figure 24 - Influence de l'ajout d'un motif julolidine sur des noyaux 4-méthylcoumarines.

Enfin, les travaux de recherche qui ont permis d'obtenir un effet bathochrome drastique consistent en la substitution de l'atome d'oxygène en position 2 par un autre hétéroatome. Fournier L. *et al.* proposent donc de le remplacer par un atome de soufre ou d'azote.⁶⁰ L'atome d'azote, une fois protoné, va devenir très électroattracteur ce qui induit un déplacement du λ_{\max} dans le rouge. L'atome de soufre quant à lui comporte une orbitale 3d vide qui peut intervenir dans le transfert de charge intramoléculaire. Les meilleurs résultats rapportés par cette équipe sont ceux obtenus avec l'atome de soufre. Ils ont observé un décalage d'environ 75 nm (Figure 25).

Lin Q. *et al.* ont donc appliqué cette idée à leur composé et en combinant les cycles julolidines et la substitution de l'atome d'oxygène par un atome de soufre ; la coumarine obtenue a atteint une valeur de λ_{\max} de 515 nm.

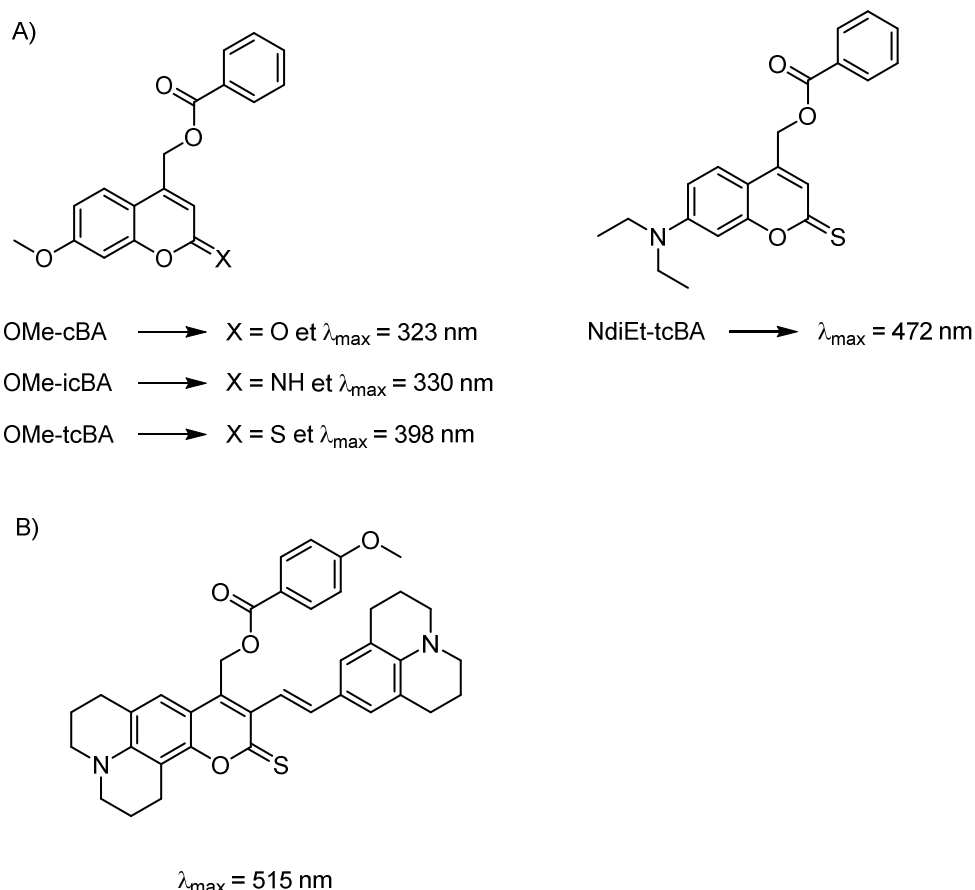


Figure 25 - Structures des 4-méthylcoumarines synthétisées par A) Fournier L. et al. et B) Lin Q. et al.

À la vue des résultats spectaculaires obtenus récemment sur ces nouveaux types de GPPs, cette thèse va donc se focaliser sur cette classe de coumarines pour des applications biomédicales en tant que GPPs.

I-3) Application *in vivo* de la lumière

I-3-a) Absorption des tissus et fenêtre thérapeutique

Il existe cependant quelques restrictions quant à l'utilisation de GPPs *in vivo*.

En effet, les GPPs présentés précédemment nécessitent des excitations lumineuses avec des longueurs d'onde dans l'UV ou dans le visible proche (à 1 photon) pour effectuer la photolyse et libérer l'effecteur biologique. Cela pose néanmoins problème dans les applications biomédicales *in vivo* car ces longueurs d'onde sont connues pour être relativement phototoxiques envers les tissus biologiques. De plus, la pénétration de la lumière dans la peau est dépendante de la longueur d'onde. De nombreux travaux ont permis de montrer que les rayonnements UV et ceux du visible proche pénètrent moins bien dans la peau car ils sont

absorbés par certains chromophores biologiques comme l'hémoglobine (Hb sur la Figure 26).⁶¹ A titre de comparaison, il a été observé sur des expériences faites sur la peau de rats que la lumière ne pénètre qu'à moins de 1 mm pour les UVA, autour de 1 mm à 408 nm, 7.5 mm à 705 nm et jusqu'à 8 mm à 808 nm.⁶² Au-delà de 808 nm, dans le lointain IR, la pénétration diminue à nouveau car ces longueurs d'onde sont absorbées par l'eau contenue dans les tissus.

Il existe ainsi une fenêtre de transparence des tissus biologiques ou fenêtre thérapeutique qui se situe entre 650 et 900 nm, où la lumière est moins phototoxique et moins absorbée par les composants tissulaires.

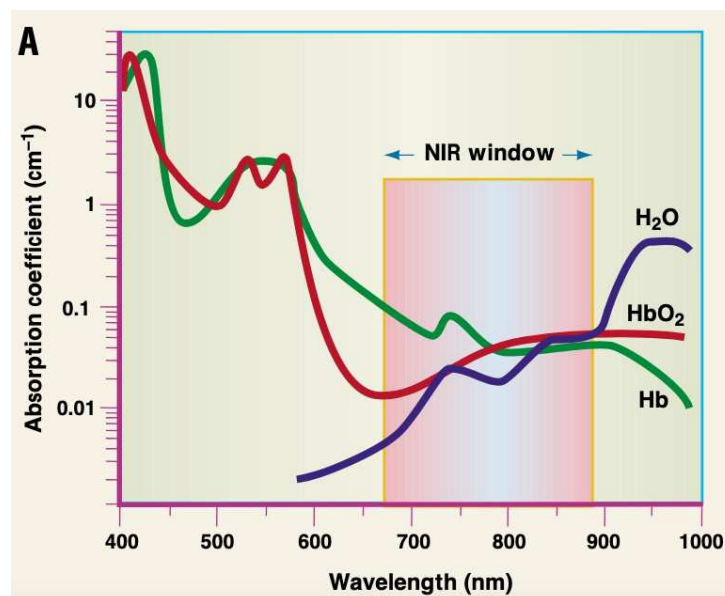


Figure 26 - Spectres d'absorption de certains composés du corps humain montrant l'existence d'une fenêtre thérapeutique pour des excitations lumineuses.⁶¹

En conséquence, les systèmes de délivrance de molécules bioactives sensibles à des excitations dans le rouge ou le proche infrarouge (NIR) sont donc plus particulièrement recherchés. Les réactions photolytiques nécessitent, dans la majeure partie des cas, des excitations lumineuses inférieures à 500 nm pour être efficaces. Une solution pour exciter les chromophores dans la fenêtre de transparence optique des tissus est d'utiliser des irradiations bi-photoniques dont le principe et les avantages ont été mentionnés dans la partie précédente (voir sous-partie I-2-c.2).

Une autre solution au problème de la fenêtre de transparence optique des tissus est d'utiliser des systèmes nanoparticulaires capables de recevoir de la lumière NIR et de transmettre une

énergie plus élevée à des GPPs pour libérer des effecteurs biologiques. Nous développerons ce type de système dans un prochain chapitre (Chapitre IV).

I-3-b) Le cas particulier de l'œil :

Il existe néanmoins une partie du corps humain plus transparente aux rayonnements UV : l'œil. Une grande partie du spectre lumineux passe à travers la rétine avant d'être absorbée par certains composants au fond de l'œil. La lumière bien que nécessaire à la vision peut aussi générer des espèces réactives oxygénées (ROS) et ainsi induire des dommages à l'œil. Il existe donc des standards qui limitent et encadrent les excitations lumineuses dans l'œil.

Les dommages induits par la lumière peuvent être classés en différentes catégories.⁶³ Tout d'abord, ils peuvent être thermiques, comme la photocoagulation ou la photovaporisation. L'augmentation de la température localement peut dénaturer les protéines après absorption de la lumière par la mélanine dans l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE). Ensuite, la deuxième catégorie concerne les dommages photochimiques. A des longueurs d'onde courtes et des temps d'exposition supérieurs à 1 s, il peut y avoir des réactions au niveau des photorécepteurs ainsi que de la dégradation de lipofuscine un pigment dans la RPE. Les chromophores naturels absorbent la lumière bleue, entrent dans un état excité singulet et par croisement intersystème, ils atteignent un état triplet. Ces chromophores ont ensuite le temps de réagir avec d'autres molécules dans leur environnement et de conduire à la formation de radicaux libres ou d'oxygène singulet. Les lipofuscines sont un groupe d'agrégats de lipides-protéines qui s'accumulent dans les tissus et qui contiennent des fluorophores ; Boulton M. *et al.* ont montré qu'en irradiant les granules de lipofuscines, cela conduit à la formation d'anions superoxydes.⁶⁴ Il a été également montré que plus la longueur d'onde d'irradiation est courte, plus la formation d'anions superoxydes est importante (10 fois plus importante à 420 nm qu'à 520 nm).⁶⁵

Les états triplets et radicaux produits par la lipofuscine ont des durées de vie suffisantes pour interagir avec d'autres molécules et induire des dommages compromettant des fonctions cellulaires et contribuant au vieillissement cellulaire.

Enfin, le corps vitré et la cornée absorbent la lumière à des longueurs d'onde inférieures à 300 nm et le cristallin, lui, absorbe celles inférieures à 400 nm (Figure 27). Donc à minima, des

longueurs d'onde supérieures à 400 nm doivent être utilisées pour des applications de la photoactivation dans l'œil.⁶³

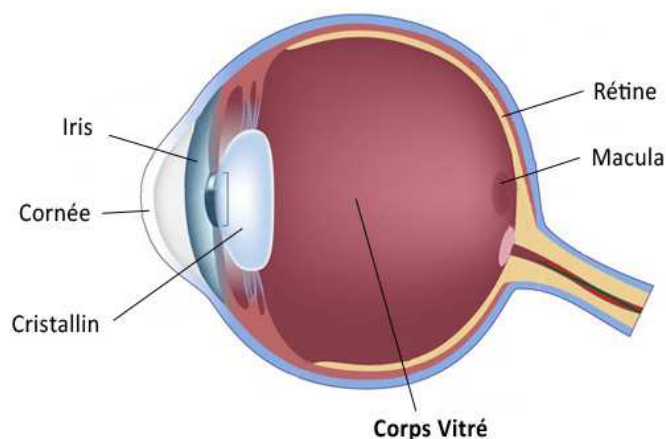


Figure 27 - Schéma général de l'œil, issu de www.guide-vue.fr.

I-3-c) Exemples d'applications de la lumière *in vivo*

Il existe des « photoswitches » qui permettent un contrôle rapide et réversible de systèmes biologiques par action de la lumière.

Samanta S. *et al.* avaient préalablement observé qu'un dérivé azobenzène substitué par 4 groupes méthoxyles en position *ortho* du lien diazo, avait des transitions $n \rightarrow \pi^*$ dans le visible (bleu/vert) qui étaient bien distinctes pour les isomères *cis* et *trans* (Figure 28).^{66, 67} Cela a donc permis d'effectuer des isomérisations sans utiliser une excitation lumineuse avec des longueurs d'onde dans l'UV. A noter que l'isomérisation thermique *cis-trans* de tels composés est très lente, de l'ordre de plusieurs heures. Ils ont ensuite couplé des azobenzènes au peptide FK11 qui possède un résidu cystéine nucléophile toutes les 11 unités dans la séquence. Le principe envisagé est que le peptide ainsi agrafé au motif azobenzène change de conformation grâce à l'isomérisation contrôlée de l'azobenzène. Le couplage au peptide a entraîné un effet bathochrome de 20 nm avec une longueur maximale d'absorption de 490 nm dans l'eau. Cependant, ce composé présente une large bande d'absorption correspondant à la transition $n \rightarrow \pi^*$ qui s'étale au-delà de 600 nm. De plus, l'isomère *trans* présente des capacités d'absorption bien plus importantes que le *cis* dans la région 500-700 nm. En irradiant donc à 635 nm à 90 mW/cm², l'isomérisation *trans-cis* a atteint un rendement de 98 %, induisant un repliement en structure hélicoïdale du peptide agrafé. En

utilisant des longueurs d'onde encore plus décalées dans le rouge, à 660 nm, l'isomérisation était effective mais à une bien moindre vitesse.

Toutefois, le retour à la forme *trans* s'est avéré problématique car très lent de manière thermique et inefficace par irradiation à 760 nm. L'isomère *trans* n'a pu être régénéré rapidement qu'avec une lumière bleue (460 nm). De plus, bien que cet azobenzène soit stable et ne photoblanchisse pas, la présence de glutathion conduit à sa réduction en seulement quelques heures. Cet azobenzène équipé de groupes méthoxyles ne peut donc être utilisé *in vivo* qu'en extracellulaire ou alors en intracellulaire mais sur une durée courte.

Afin de palier à ce problème de réduction des azobenzènes, un analogue tétrachloré de l'azobenzène tétraméthoxylé a été envisagé et évalué (Figure 28A vs Figure 28B). Ce composé a conduit à des résultats, en conditions physiologiques, plus robustes.

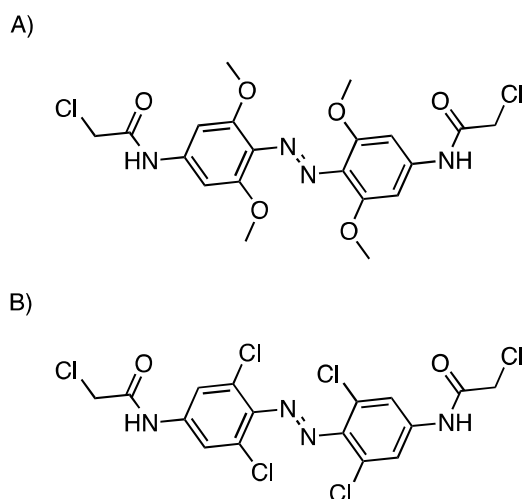


Figure 28 - Structures des deux azobenzènes étudiés par Samanta S. et al. A) azobenzène comportant des substituants méthoxyles, B) analogue tétrachloré résistant à la réduction par le glutathion.

Les auteurs ont donc choisi ce dérivé pour une expérimentation *in vivo* et l'ont couplé à un modèle de peptide rapporteur de fluorescence, le FI-(Pro)9-FK11, qui comporte une fluorescéine. Ce rapporteur a été injecté dans des embryons de poissons-zèbres de manière à le retrouver dans tous les tissus. Le fait que ces poissons-zèbres soient transparents facilite le suivi de fluorescence. Les chercheurs ont alors irradié en certains points le poisson-zèbre avec une lumière à 635 nm, induisant l'isomérisation *trans-cis* de l'azobenzène puis au changement de conformation du peptide en hélice et conduisant enfin à une extinction (« quenching ») important de la fluorescence de la fluorescéine. Le retour à l'isomère *trans* a été à nouveau

effectué avec une irradiation dans le bleu. Les chercheurs ont donc mesuré les différences de fluorescence en fonction des stimuli lumineux appliqués sur le poisson-zèbre.

Samanta S. *et al.* sont donc parvenus à synthétiser et utiliser un photocommutateur pour effectuer une isomérisation *trans-cis* dans le rouge et induire une réponse biologique.

Un autre exemple plus singulier a été publié en 2020 par Durand-de Cuttoli R. *et al.*⁶⁸

De nombreux scientifiques ont « cagé » le glutamate avec divers GPPs, mais il y a souvent un effet secondaire. En effet, on observe un blocage des récepteurs des neurotransmetteurs inhibiteurs (les composés cagés sont en effet des antagonistes de récepteurs GABAergiques). Pour remédier à cela, Ellies-Davies G. C. R. et ses collaborateurs ont d'abord développé un précurseur photolabile du glutamate, le G5-MNI-Glu (Figure 29), qui comporte un large dendrimère G5.⁶⁹ Le rôle de ce dendrimère est justement d'empêcher l'interaction non souhaitée avec les récepteurs membranaires endogènes du GABA (en agissant comme un écran grâce à la gêne stérique engendrée par l'utilisation du dendrimère). Le dendrimère neutre est installé par chimie click sur le neurotransmetteur « cagé ». Ainsi, ce système est inerte et n'a pas d'activité biologique et permet d'éviter un effet antagoniste envers les récepteurs GABA A. Il peut donc être appliqué sur des tranches de cerveau sans effet apparent de toxicité pendant plusieurs heures.

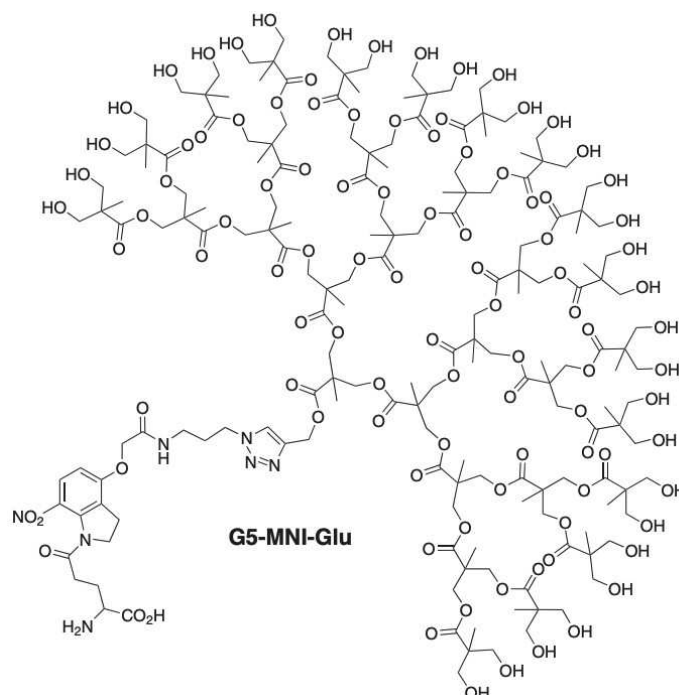


Figure 29 - Structure du G5-MNI-Glu comportant un large dendrimère.⁶⁸

Les auteurs ont ensuite utilisé ce composé avec une nouvelle technique d'optofluidique qui permet de délivrer la molécule et d'appliquer un stimulus lumineux dans des souris libres de leurs mouvements. Le test de cette molécule a été réalisé pendant le conditionnement dit classique ou pavlovien, en provoquant la libération de glutamate au niveau de l'aire tegmentale ventrale du cerveau (dans le mésencéphale) qui est impliqué dans le système de récompense.

Afin de vérifier si la libération de glutamate augmente la stimulation des neurones dopaminergiques, l'expérience est ainsi construite : les systèmes d'optofluidique sont implantés sur 11 souris. Deux à trois semaines après l'opération, les souris ont pu, lors d'une première expérience de place conditionnée, explorer deux espaces similaires mais néanmoins distinguables. Leurs déplacements et leurs durées de résidence sont alors enregistrés lors de ce pré-test. Les trois jours suivants, les souris sont placées dans les deux espaces, l'un après l'autre. Dans l'un des espaces, le glutamate à une concentration de 2.5 mM est libéré grâce à une irradiation à 390 nm (10 W, 200 ms, 2 Hz). Le jour d'après, le test de préférence de place conditionnée est effectué : les deux chambres sont accessibles par les souris et leurs mouvements sont enregistrés.

Les temps de résidence du pré-test et du test sont alors comparés. Durand-de Cuttoli R. *et al.* ont ainsi observé une augmentation du temps de résidence dans la chambre associée à la libération de glutamate, montrant ainsi un comportement conditionné. Les auteurs ont donc réussi à libérer *in vivo*, par stimuli lumineux, un composé préalablement « cagé » dans le cerveau de souris et induire une réponse biologique.

Il est néanmoins à noter qu'ici l'irradiation à 390 nm se fait à l'intérieur même de l'organe.

Ces exemples montrent la nécessité et l'intérêt de développer des outils permettant le contrôle spatiotemporel le plus précis possible de la délivrance d'effecteurs biologiques.

I-4) Objectifs de la thèse

La lumière est une source de stimuli particulièrement intéressante et son utilisation dans divers domaines de la chimie et de la biologie est croissante. En effet, la lumière permet notamment un contrôle spatial et temporel très précis de la libération d'agents thérapeutiques. Néanmoins, l'utilisation *in vivo* de la lumière comme photoactivateur reste limitée. De plus, l'utilisation de réactions de photolyse semble extrêmement prometteuse car elles permettent d'induire des sauts de concentration extrêmement bien localisés de différents principes actifs. Malheureusement, la plupart des GPPs existants nécessitent des longueurs d'onde d'excitation dans l'UV-visible proche qui ont une faible pénétration dans la peau et qui peuvent induire des dommages aux tissus biologiques.

C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des solutions pour décaler les longueurs d'onde d'irradiation dans le rouge ou proche infrarouge. Ce travail de thèse porte donc dans un premier temps, sur le développement et la synthèse d'une nouvelle série de GPPs hautement rigides et sensibles à 1 et 2 photons en collaboration avec Clément Morville (étudiant en thèse au sein de l'équipe CNM/ CAMB-UMR 7199). Dans une seconde partie sera présenté un projet mené en collaboration avec l'équipe du Dr Sidney Cambridge initialement basée dans le département d'anatomie et de biologie cellulaire à Heidelberg en Allemagne. Ce projet consiste en le développement et la synthèse d'un GPP qui, sous irradiation, libère *in vivo* un œstrogène capable d'activer un système d'expression de gènes dans l'œil. Il s'inscrit dans des études de type thérapies géniques, sachant que l'expression photoactivable d'un gène inhibiteur de l'angiogenèse est une voie de recherche particulièrement attrayante pour le traitement de pathologies oculaires liées au diabète ou à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Enfin, dans un dernier chapitre, nous nous focaliserons sur le projet nommé LightInDR, financé par l'agence nationale de la recherche (ANR) et mené en collaboration avec l'équipe 3BIO (UMR 7199-CAMB) dirigée par les Drs Benoit Frisch et Antoine Kichler, le Dr Jérémie Leonard au laboratoire d'optique ultrarapide et nanophotonique (DON, équipe BIODYN) et le Dr Stefan Chassaing de l'institut de chimie de Strasbourg. Mon travail portait sur le développement d'un GPP couplé à une ancre lipidique pour la libération *in vivo* d'un anticancéreux au moyen de nanoparticules capables d'effectuer une conversion ascendante de photons assistée par annihilation triplet-triplet.

Chapitre II : Synthèses et développement de nouveaux GPPs rigides et sensibles à 1 et 2 photons

II-1) Introduction

La lumière est un outil particulièrement adapté pour étudier des processus biologiques. En effet, l'étude des interactions ligand/récepteur nécessite une résolution spatiale et temporelle fine. Il faut par exemple perturber le système biologique à l'étude avec un saut de concentration d'un effecteur biologique dans un laps de temps et une localisation similaire au processus physiologique.⁷⁰

Pour certaines applications comme la libération de glutamate sur des tranches de cerveaux, la précision est fondamentale car même avec un système de focalisation de la lumière, l'excitation à 1 photon induira une libération de glutamate non seulement à l'endroit souhaité mais aussi au-dessus et en-dessous de ce point.⁷¹ En effet, contrairement à l'excitation bi-photonique, l'excitation à 1 photon est linéaire.

De plus et comme déjà mentionné précédemment dans l'introduction, l'excitation à 2 photons permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus que les excitations avec des longueurs d'onde UV-visible et induit moins de dommages.

Ainsi, pour des applications notamment en neurophysiologie, l'excitation à 2 photons se révèle être particulièrement intéressante. L'utilisation de ce type d'excitation pour induire la libération de biomolécules liées à des GPPs a été décrite dès la fin des années 1990 par l'équipe de Tsien R. Y.⁷² Ils ont en effet développé une hydroxycoumarine bromée en position 6, le Bhc-Glu, capable de relarguer du glutamate avec une section efficace de photo-libération à 2 photons de l'ordre de 1 GM à 740 nm et un δ_a d'environ 50 GM (Figure 30). Le groupe de Kasai H. a ensuite effectué une avancée avec le développement du MNI-Glu.⁷³ C'est l'un des premiers GPPs suffisamment stable et efficace à 2 photons pour étudier le fonctionnement synaptique. Ce GPP a en effet une section efficace de 0.06 GM à 730 nm et il est donc possible de libérer du glutamate au niveau d'une unique épine dendritique.

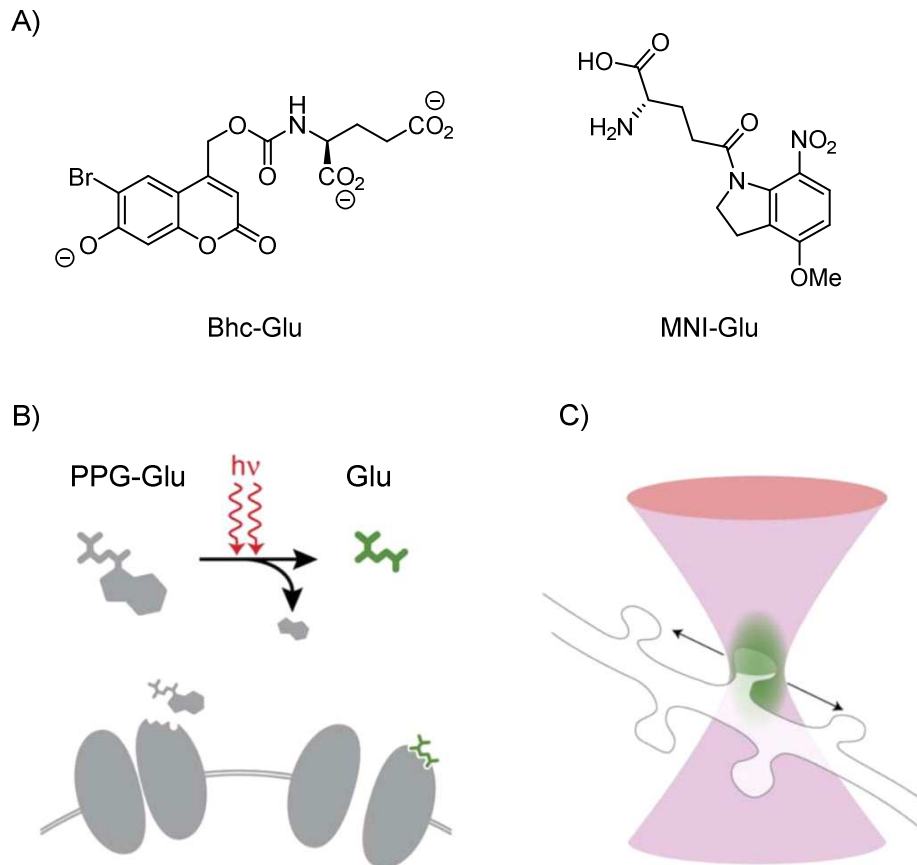


Figure 30 - A) Structures des GPPs Bhc-Glu et MNI-Glu développés respectivement par les groupes de Tsien ⁷² et Kasai ⁷³; B) schéma de principe de la libération de glutamate au niveau d'une épine dendritique, modifié des travaux de Judkewits B. et al.⁷⁴

Comme l'efficacité de la photolibération dépend de la section efficace d'absorption à 2 photons δ_a et de l'efficacité de la réaction photochimique ϕ_u , ces deux propriétés doivent donc être améliorées. La plupart des GPPs existants sont basés sur des systèmes dipolaires donneur/accepteur de type « push-pull » (par exemple MeO/NO₂ pour des GPPs comme les nitrobenzyles ; Figure 31). En effet, l'amélioration de ces propriétés donneur/accepteur ou l'augmentation de la conjugaison conduit à l'augmentation du δ_a .

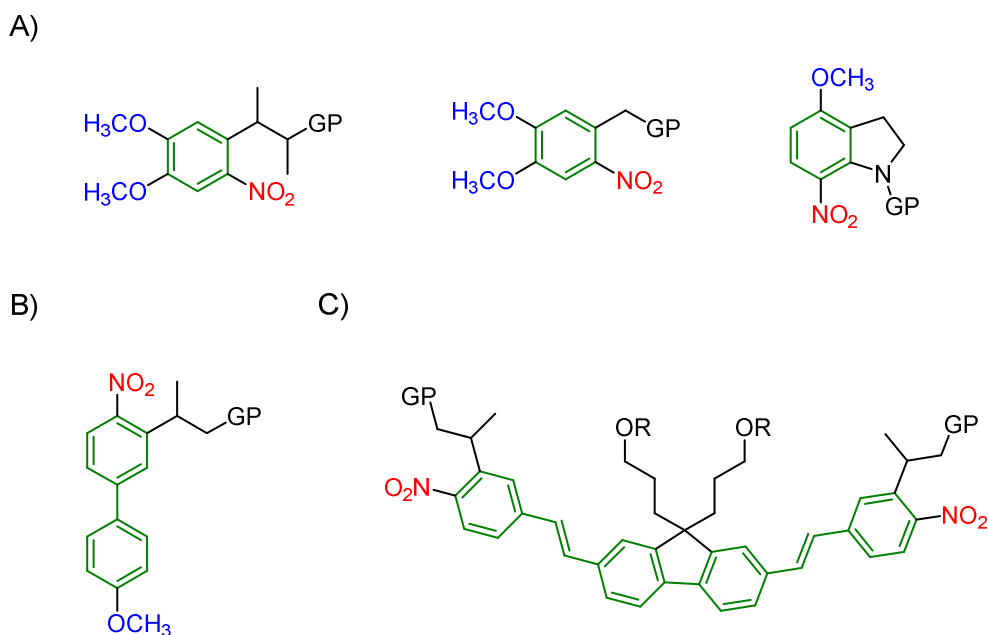
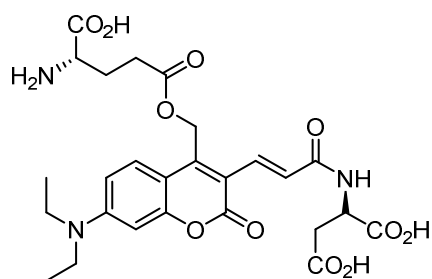


Figure 31 - A) Plateforme dipolaire donneur/accepteur, B) plateforme dipolaire donneur/accepteur avec une délocalisation électronique améliorée, C) plateforme accepteur/accepteur avec délocalisation électronique ; reproduit à partir des travaux de Warther D. et al.⁷⁵ (avec GP = Groupe Partant).

Cependant, l'excitation bi-photonique est en générale moins efficace que l'excitation à 1 photon. C'est pourquoi l'ingénierie moléculaire de nouveaux GPPs sensibles à 2 photons est importante pour améliorer notamment leurs propriétés d'absorption à 2 photons, tout en conservant des propriétés importantes pour leur utilisation comme leur solubilité, leur stabilité en conditions physiologiques (hydrolyse) etc. ...

Ce sont les 4-méthylcoumarines qui, ces dernières années, ont retenu l'attention des chercheurs. En effet, ces chromophores ont montré des propriétés à 2 photons tout-à-fait prometteuses et quelques groupes ont focalisé leurs efforts à modifier ces molécules pour les rendre encore plus sensibles aux excitations bi-photoniques. Notamment en 2013, le groupe d'Ellis-Davies G. C. R. a rapporté le GPP DEAC450 ayant une section efficace de photolibération de 0.5 GM à 900 nm (Figure 32).⁵⁸



$$\delta_u = 0.5 \text{ GM (900 nm)}$$

Figure 32- Structure du GPP DEAC450.

Tableau 3 - Valeurs des sections efficaces d'absorption et de photolibération à 2 photons dans le DMSO des GPPs développés par le groupe de Kele.⁷⁷

λ / Molécule	δ_a en GM (δ_u en GM)		
	1	2	3
740	175 (1.54)		1304 (1.83)
750		291 (3.17)	
940	59 (0.52)		
950		100 (1.09)	

Enfin, le groupe de Blanchard-Desce M. a développé des 4-méthylcoumarines aussi basées sur la présence d'un système donneur/accepteur relié par un système conjugué.⁷⁸ Ainsi, le groupement donneur *N,N*-diéthylamino en position 7 de la coumarine est espacé du groupement accepteur benzothiazole par un pont vinylfluorényle conduisant à un δ_u particulièrement exceptionnel de 442 GM à 730 nm (Figure 35 et Tableau 4).

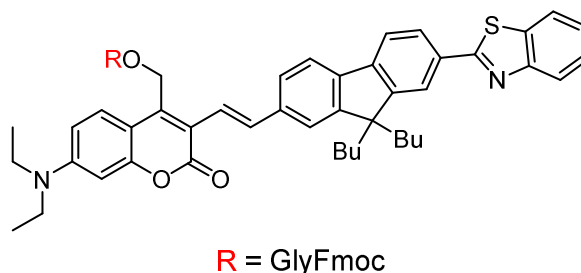


Figure 35 - Structure du GPP développé par l'équipe de Blanchard-Desce M.⁷⁸

Tableau 4 - Valeurs des sections efficaces d'absorption et de photolibération à 2 photons à 940 et 730 nm du GPP développé par l'équipe de Blanchard-Desce M.⁷⁸

λ (nm)	δ_a (GM)	δ_u^{\max} (GM)
730	988	442
940	143	64

Toutes ces modifications sont basées sur l'augmentation de la rigidité des GPPs, de l'extension de la conjugaison par l'introduction de résidus aromatiques connectés par des liaisons doubles ou triples ainsi que sur la fonctionnalisation à l'aide de groupements donneurs ou accepteurs d'électrons. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la série 4-méthylcoumarinyle pour l'élaboration de nouveaux GPPs rigides et conjugués sensibles à 1 et 2 photons.

II-2) Nouvelle voie de synthèse du composé de référence et étude de la stabilité dans un tampon

Inspirés par les travaux de Lin Q. *et al.*⁵⁹ qui ont développé des GPPs à base 4-méthylcoumarinyle très performants sous excitation bi-photonique, nous avons développé une nouvelle voie de synthèse plus rapide pour la référence DEACAS.

Dans un premier temps, la formation de l'aldéhyde **3** (Schéma 18A) a été faite en deux étapes grâce aux protocoles décrits par Elamri I. *et al.*, en partant de la 7-*N,N*-diéthylamino-4-méthylcoumarine **1** qui est commerciale.⁷⁹ Cette séquence en deux étapes a en effet donné de bien meilleurs rendements que l'oxydation directe assistée par le dioxyde de sélénium rapportée dans la littérature.⁸⁰ Après la réduction de l'aldéhyde en l'alcool **4**, nous nous sommes aperçus que la protection de ce dernier par le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle n'était pas nécessaire pour la suite de la synthèse. En effet, l'introduction de l'atome de brome en position 3 s'est avérée performante sans avoir à protéger la fonction alcool, ce qui permet de gagner deux étapes lors de la synthèse.

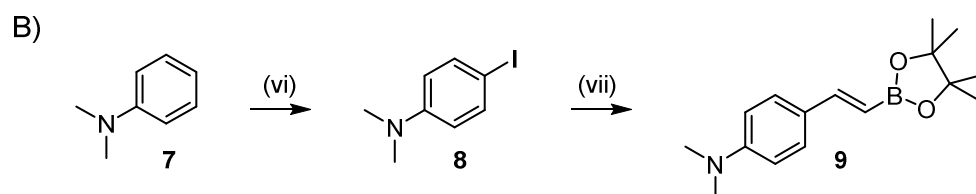
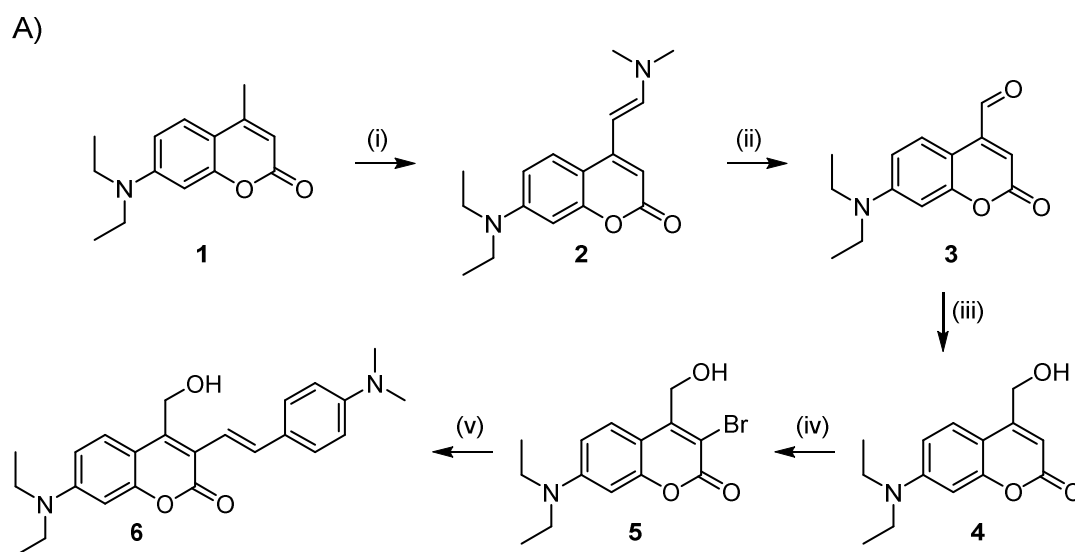


Schéma 18 – A) Nouvelle voie de synthèse de la DEACAS **6**; B) Synthèse de l'ester boronique **9** modifiée par rapport aux conditions de Kulhánek J. *et al.*⁸¹; (i) DMF-DMA, DMF, reflux, 16 h, quant; (ii) NaIO₄, THF/H₂O (1:1), 0 °C à TA, 1 h, 78 %; (iii) NaBH₄, THF, 0 °C à TA, 3 h, 70 %; (iv) NBS, acétate d'ammonium, MeCN, TA, 40 min, 81 %; (v) K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 45 min, 79 %; (vi) NIS, acétate d'ammonium, MeCN, 0 °C, 20 min, quant.; (vii) ¹Pr₂NH, vinylboronate de pinacol, Pd[P(*t*-Bu)₃]₂, toluène, 95 °C, 2 h 30, 80 %.

Ensuite, nous avons tout d'abord essayé de reproduire la réaction de Heck décrite par le groupe de Zhu L., employant **5** et la 4-*N,N*-diméthylvinylaniline comme partenaires de couplage. Cependant, malgré de nombreuses tentatives d'optimisation, nous avons pu observer ce qui semblait être une polymérisation de la vinylaniline conduisant à l'ajout répété de réactif et un rendement faible (Figure 36).



Figure 36 - Photo du tube de réaction après chauffage par micro-onde montrant une possible polymérisation du dérivé 4-*N,N*-diméthylvinylaniline.

Vu cette difficulté, nous avons choisi de nous tourner vers une réaction de Suzuki-Miyaura en remplaçant le partenaire styrylé par son équivalent boré, la *N,N*-diméthyl-4[(*E*)-2-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)éthényl]aniline **9** accessible en deux étapes à partir de la *N,N*-diméthylaniline **7** (Schéma 18B). En appliquant des conditions de couplage de Suzuki-Miyaura à **5** et à **9**, nous avons pu obtenir une conversion totale du produit de départ **5** en **6** et un bon rendement de 79 %.

L'alcool **6** a ensuite été engagé dans une estérification avec l'acide 4-méthoxybenzoïque, pour obtenir le composé final **10** qui nous servira de référence pour la suite (Schéma 19).

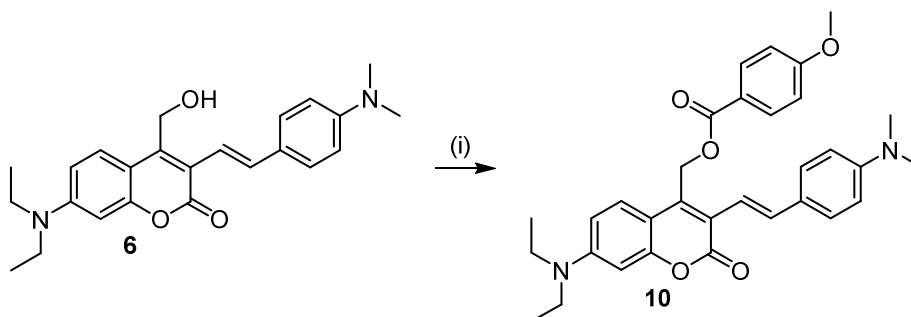


Schéma 19 – Synthèse de l'ester de référence **9**. (i) Acide 4-méthoxybenzoïque, DMAP, DIC, CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 21 h 30, 59 %.

Afin de vérifier qu'il soit possible d'utiliser cette série 4-méthylcoumarinyle pour une potentielle application *in vivo*, ce composé a été dissout dans un mélange PBS/acétonitrile et nous n'avons constaté par analyse HPLC aucune hydrolyse après 5 ou 24 heures.

II- 3) Synthèse d'un nouveau GPP grâce à des réactions domino initiées par une cyclocarbopalladation 5-*exo-dig*

Afin d'augmenter la rigidité du GPP tout en ayant un système très conjugué, nous avons apporté des modifications au niveau de la position 3 afin d'améliorer encore plus la sensibilité des plateformes 4-méthylcoumarinyles aux excitations bi-photoniques.

Grâce à des réactions domino palladocatalysées, nous avons introduit un cycle à 5 chaînons fusionné au corps de la coumarine *via* les positions 3 et 4 (Schéma 20). Pour cela, nous avons développé une réaction « one-pot » domino basée sur une cyclisation 5-*exo-dig* suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira afin d'introduire des groupements conjugués.

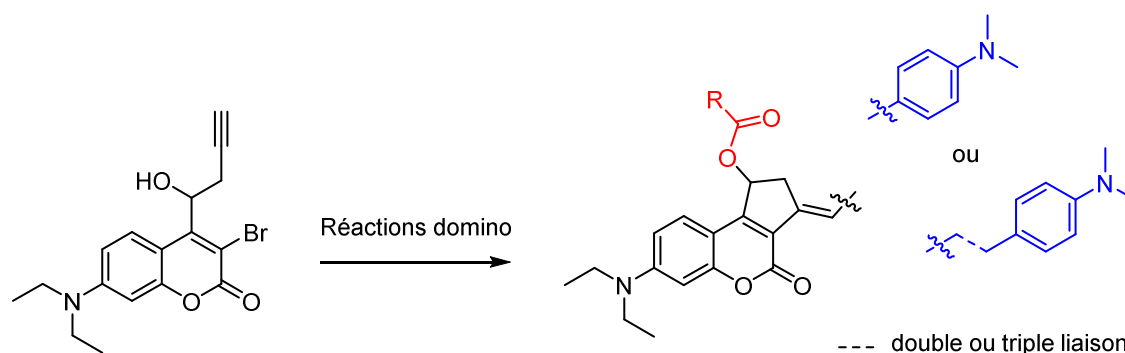


Schéma 20 - Structures cibles obtenues grâce aux réactions domino palladocatalysées.

II-3-a) Evaluation de la faisabilité de la réaction domino avec l'alcool protégé

La première molécule synthétisée de cette série a été développée selon la méthode décrite dans le Schéma 21. Après la formation de l'aldéhyde **3** à partir de la coumarine méthylée (Schéma 18A), un résidu propargyle est introduit en position benzylique *via* l'addition nucléophile du bromure de propargylzinc sur le groupe carbonyle de **3**, conduisant à l'obtention de l'alcool **11** avec 86 % de rendement. La position 3 est ensuite bromée avec 93 % de rendement à l'aide de NBS en présence d'acétate d'ammonium. Après protection de

l'alcool sous forme d'éther silylé, la faisabilité du processus domino basée sur une cyclisation 5-*exo-dig* suivie d'un couplage de Suzuki- Miyaura a pu être évaluée. Pour cela, la coumarine **13** a été mise en présence de l'ester boronique **9** (Schéma 18B), de K₂CO₃, de Pd(PPh₃)₄ (2 mol%), dans un mélange DME/H₂O (3 : 1) avec un chauffage micro-onde de 45 min à 105 °C.

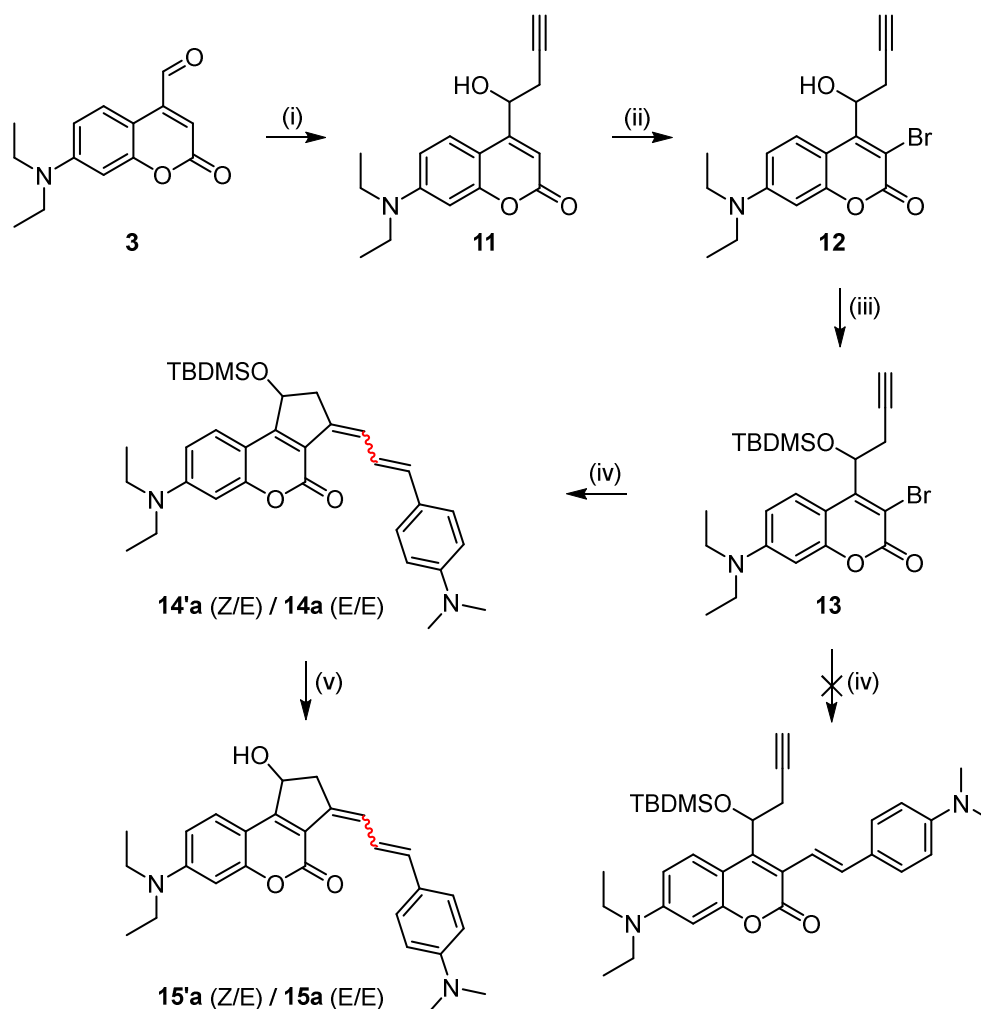


Schéma 21 – Synthèse des GPPs **15'a** et **15a**. (i) Bromure de propargylzinc, THF, TA, 1 h 30, 86 % ; (ii) NBS, acétate d'ammonium, MeCN, TA, 30 min, 93 % ; (iii) TBDMSCl, imidazole, DMF, TA à 50 °C, 2 jours, 56 % ; (iv) **9**, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1 : 3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 45 min, 53 % ; (v) TBAF (1M), TA, 30 min 41 %.

Les analyses HPLC et RMN ont montré que l'isomère majoritairement formé est le (Z/E) ce qui est en accord avec un mécanisme de cyclocarbopalladation *syn* intramoléculaire mais également 20 % du diastéromère (E/E), (Figure 37, Tableau 5). Cependant, en laissant ce composé en solution à la lumière ambiante, nous avons pu remarquer une évolution du ratio en faveur du stéréoisomère tout *trans*, sans doute plus stable que le produit cinétique (Z/E).

A noter qu'aucune trace du produit de couplage de Suzuki-Miyaura direct n'a été observé, ni par RMN ou HPLC (Schéma 21).

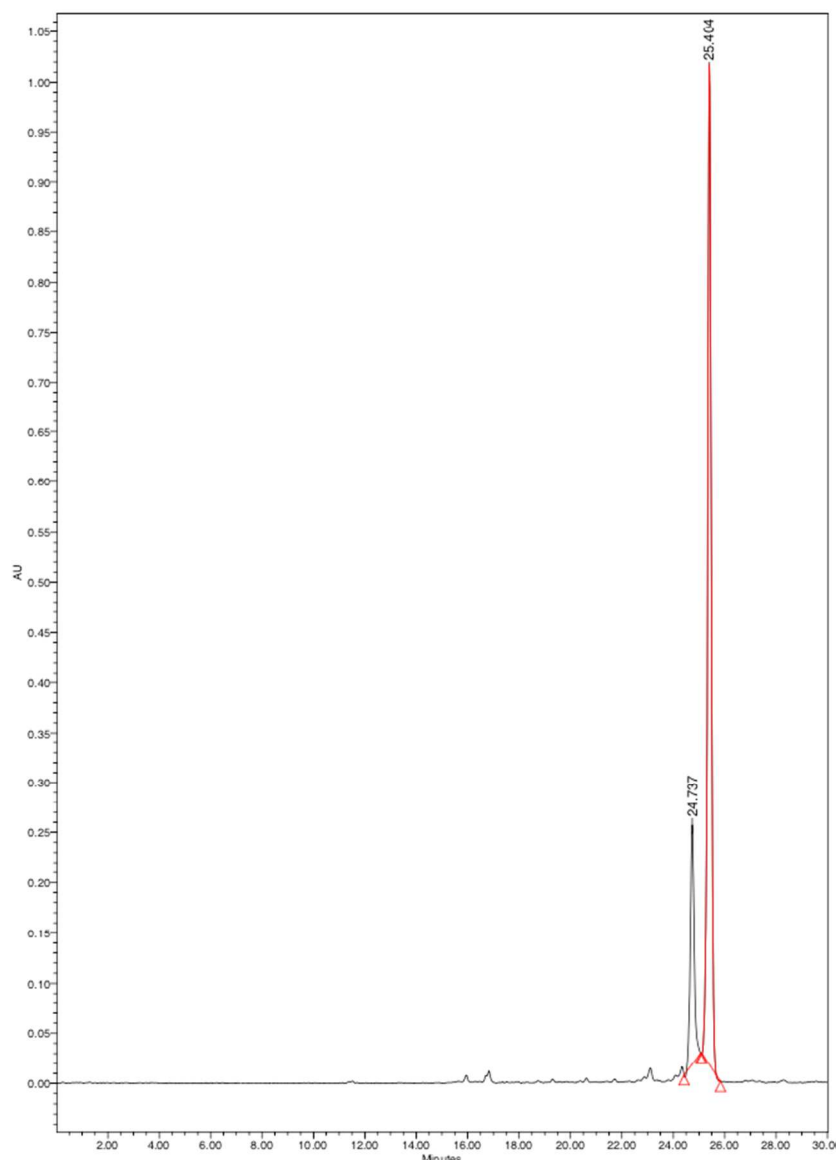


Figure 37 - Analyse HPLC du brut de réaction montrant les deux isomères **14'a** et **14a** (détection à 430 nm).

Tableau 5 - Quantification des deux diastéréoisomères par HPLC.

Pic	Temps de rétention t_R (min)	Aire ($\mu V \cdot s$)	Ratio (%)	Hauteur du pic (μV)
1	24.737	2542557	20.39	237685
2	25.404	9929094	79.61	998787

Pour le vérifier, un étalon interne, le diméthylfumarate, a été ajouté au brut de réaction afin de faire une analyse RMN quantitative qui nous a permis d'estimer un rendement de 65 % du composé **14'a** (Z/E) et de 12 % du composé **14a** (E/E). Après purification, le ratio des deux

isomères est passé à 62:38 pour un rendement total de 53 %, nous laissant donc penser à une photoisomérisation induite par la lumière ambiante.

Ce mélange d'isomères de **14'a/14a** a ensuite été soumis à des conditions standard de déprotection au TBAF pour conduire à la formation de **15'a** et **15a** avec un rendement de 41 %, sans changement notable de ratio des deux diastéréoisomères. Nous avons aussi pu observer une sensibilité de ces composés à la silice ce qui explique ces rendements plutôt faibles malgré des conversions totales.

II-3-b) Approche directe à partir de l'alcool libre (non protégé)

La protection et la déprotection de l'alcool nécessitant deux étapes supplémentaires, nous avons exploré une voie de synthèse plus rapide afin de s'affranchir de ces deux étapes. Ainsi, la réaction domino de cyclisation 5-*exo-dig* suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura a été directement effectuée sur le composé **12**, conduisant directement à l'obtention du mélange de **15'a** et **15a** avec 39 % rendement (Schéma 22).

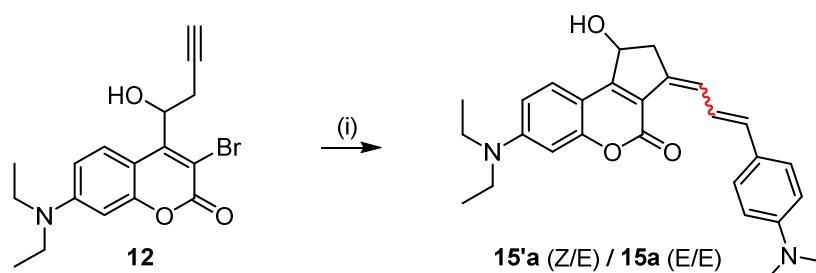


Schéma 22 – Accès direct à **15a'** et **15a** à partir de l'alcool bromé **12**. (i) **9**, K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, H_2O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 45 min, 39 %.

II-3-c) Propriétés de photoisomérisation

Un tube RMN, chargé du mélange de **15'a** et **15a** dissout dans du $CDCl_3$, a été irradié sur différents laps de temps à 430 nm, conduisant à la conversion rapide et totale en l'isomère **15a** (E/E). L'évolution des modifications sur les spectres RMN 1H au niveau des déplacements chimiques des atomes d'hydrogène de la zone aromatique est présentée dans la Figure 38.

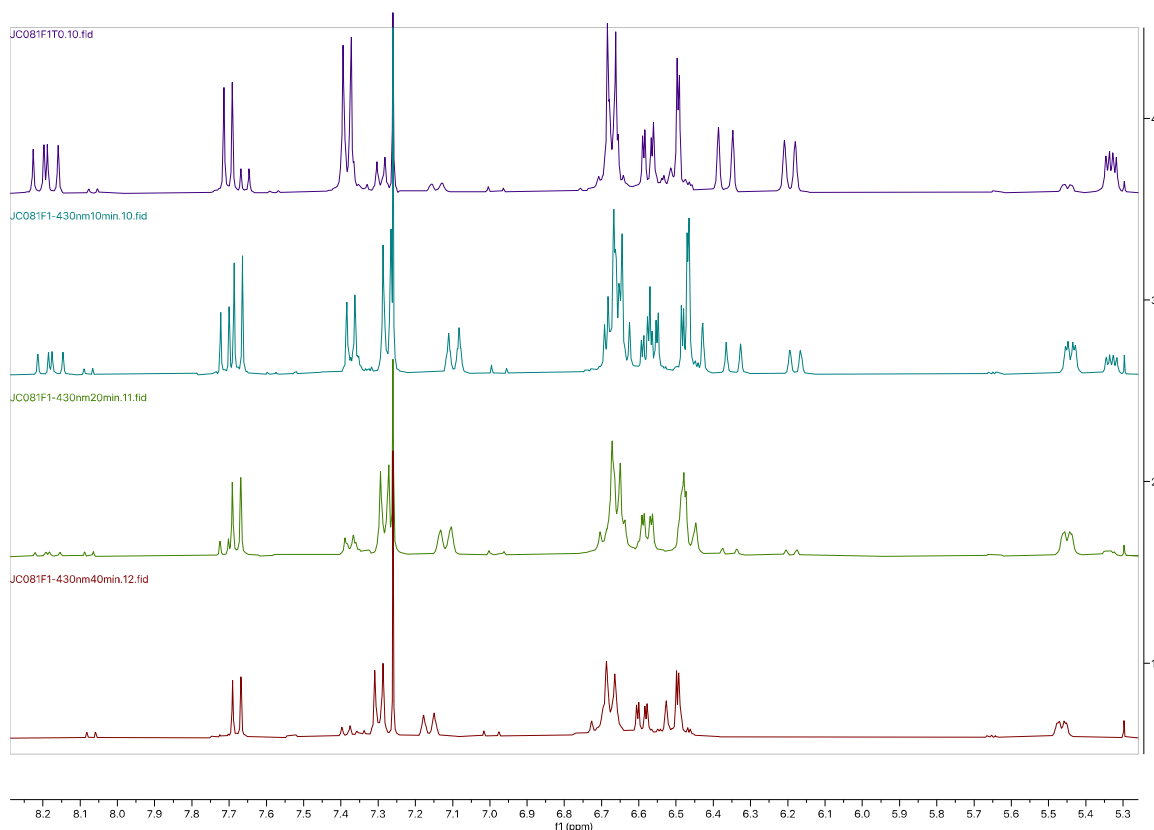


Figure 38 - Focus sur la zone des signaux aromatique des spectres RMN ^1H du mélange initial $15'a/15a$ après différents temps d'irradiation à 430 nm : 0, 10, 20, et 40 min.

Les structures de ces isomères (Figure 39) ont été déterminées sans ambiguïté par RMN ^1H , ^{13}C , 2D ^1H - ^{13}C et aussi ^1H -NOESY.

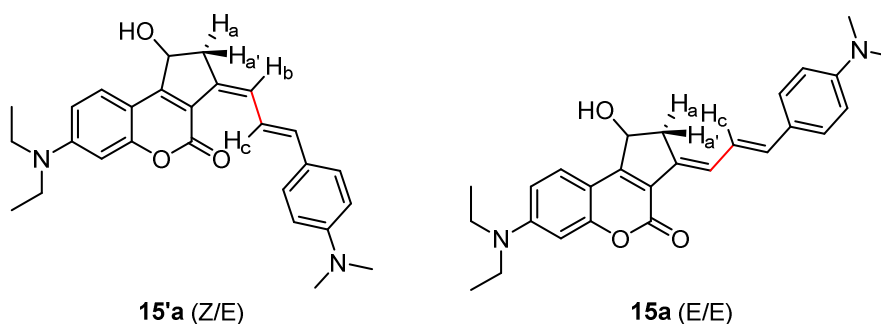
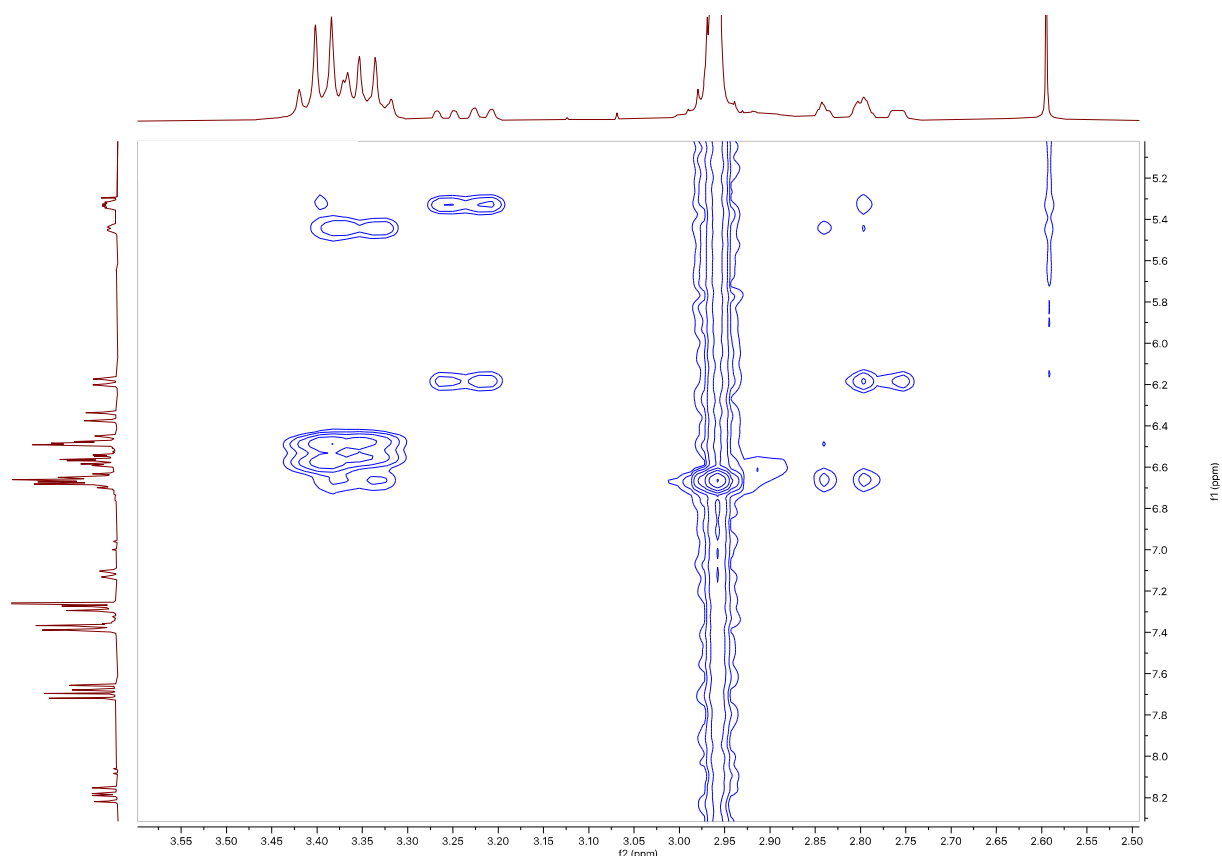


Figure 39 – Structures des deux isomères $15'a$ et $15a$

Une des informations clés qui nous a permis de réaliser cette détermination structurale concerne l'atome d'hydrogène H_c (Figure 39). Dans le cas de l'isomère $15'a$, le H_c se trouve à un déplacement chimique de 8.18 ppm (dd) et comme cela est confirmé sur le spectre RMN NOESY (Figure 40), H_c proton ne couple pas avec les protons H_a et $\text{H}_{a'}$ du groupe méthylène du

cycle à 5 chaînons (multiplet à 2.80-2.73 ppm et dd à 3.24 ppm) ; comme attendu, le proton H_b à 6.19 ppm, lui couple bien avec H_a et $H_{a'}$.

Dans le cas du second isomère **15a**, le doublet dédoublé relatif à H_c se trouve dans le massif à 6.66 ppm et couple bien comme souhaité avec H_a et $H_{a'}$ du cycle à 2.82 ppm et dans le massif à 3.35 ppm.



A noter également que l'isomère **15a** (E/E) est particulièrement stable, celui-ci restant intact après 24 h dans le noir. De même, le ratio ne semble pas s'inverser en chauffant le composé à 50 °C dans un bain pendant une dizaine de minutes.

Plusieurs hypothèses expliquant cette isomérisation sont possibles ; la première est que la lumière donne une énergie suffisante pour qu'il y ait une légère torsion de la double liaison ce qui permet à la molécule de passer la barrière énergétique et de conduire à l'isomère (E/E). Il est aussi possible d'expliquer cette isomérisation en écrivant un état de transition **15'a** (Schéma 23). Ce passage par ce zwitterion montre qu'une libre rotation de la liaison en sortie du cycle à 5 chaînons est possible, pouvant ainsi conduire à l'isomère (E/E).

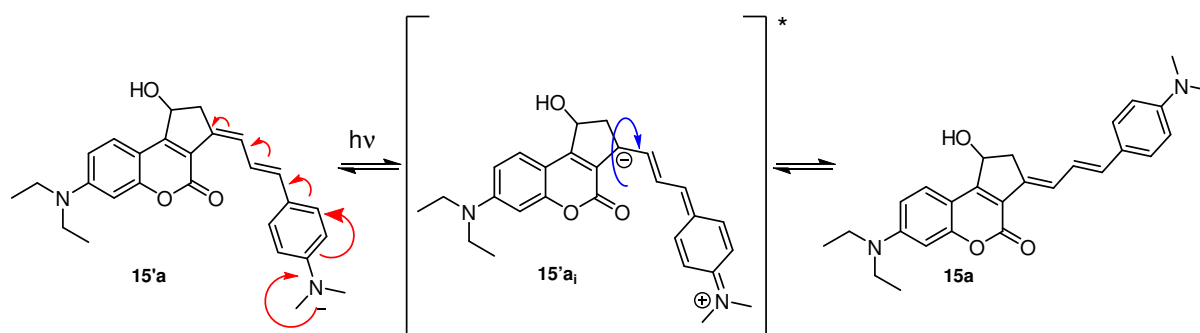


Schéma 23 - Mécanisme envisageable pour l'isomérisation de **15'a**.

De plus, il serait possible d'expliquer que la conversion Z -> E est plus favorable que E->Z par une stabilisation de l'état excité de l'isomère E ce qui entrainerait un rehaussement de la barrière de potentiel pour la rétroconversion E->Z. Ainsi cette rétro-isomérisation ne se ferait quasiment pas.

Gegiou D., Muszkar K. A. et Fischer E. proposent cette explication notamment pour la photoisomérisation de stillbènes (Figure 41).⁸²

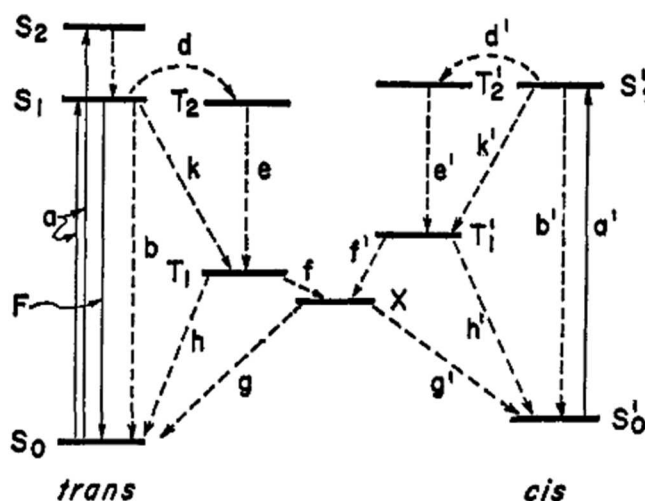


Figure 41 - Diagramme des processus participant à la photoisomérisation cis-trans de stillbènes.⁸²

II-3-d) Propriétés de photolyse

Une fois l'isomère **15a** (E/E) obtenu par photoisomérisation, il est soumis à des conditions d'estérification avec l'acide modèle, l'acide 4-méthoxybenzoïque (Schéma 24). A noter que cette étape de synthèse est réalisée dans le noir le plus complet possible, à l'abri des écrans d'ordinateurs avec comme unique source de lumière un projecteur DEL RGB de la marque MEIKEE (25W) et réglé sur la lumière rouge (630 nm).

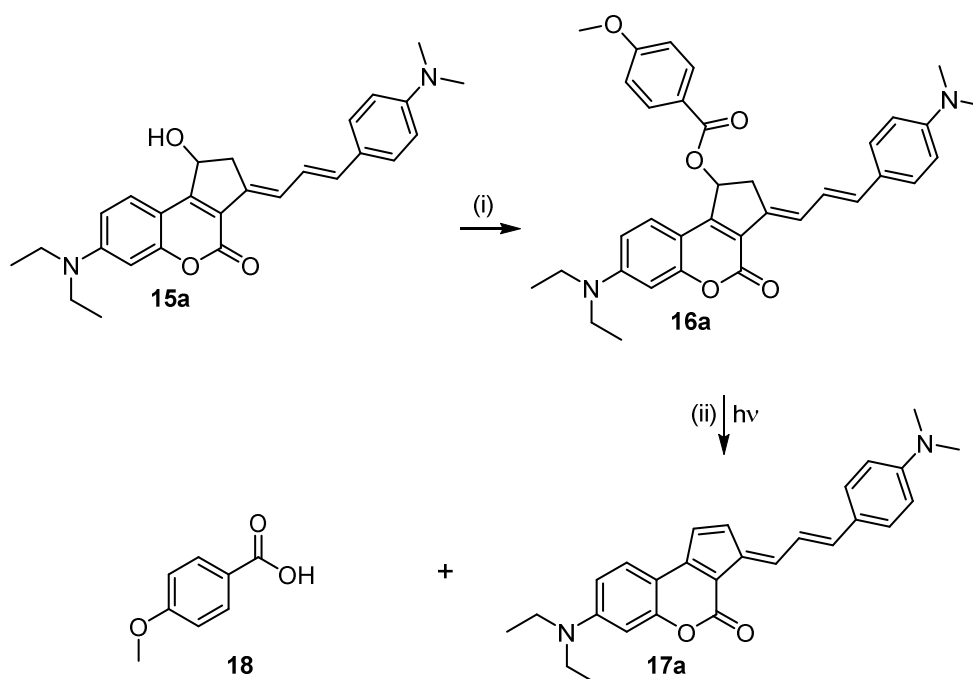


Schéma 24 – Nouveau GPP **15a** : estérification et photolyse. (i) Acide 4-méthoxybenzoïque, DMAP, DIC, CH_2Cl_2 , 0 °C à TA, 43 h, 67 % ; (ii) CH_2Cl_2 , hv (430 nm), 1 h.

Le composé final **16a** est obtenu avec 67 % de rendement. Celui-ci a alors été soumis à des irradiations à 430 nm et les premiers résultats ont montré une photolyse très rapide (Figure 42).

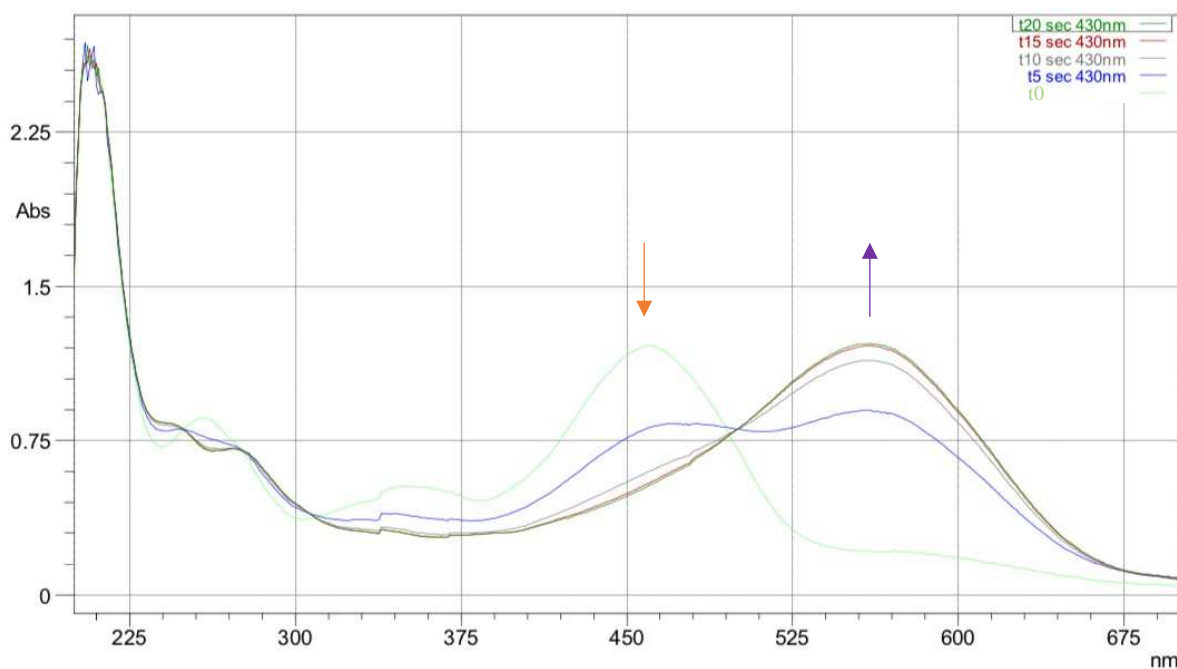


Figure 42 - Résultats préliminaires obtenus : suivi de la photolyse (à 430 nm) par spectroscopie UV-visible.

Sur le spectre d'absorption, nous avons observé l'apparition d'une bande aux environs des 557 nm, soit un déplacement bathochrome conséquent d'environ 100 nm.

Le produit de photolyse **17a** a été caractérisé par spectroscopie de masse et spectroscopie RMN et s'est révélé être un dérivé fulvène encore plus conjugué (Schéma 24). En effet, les deux atomes de carbone hybridés sp^3 du cycle à 5 chaînons (ie, celui porteur de la fonction ester et celui du méthylène) du composé **16a** ont vu leurs déplacements chimiques passer de 74.4 et 37.0 ppm à 121.8 et 123.6 ppm respectivement pour le composé **17a**, indiquant la formation d'une double-liaison à cet endroit. De plus, il a été observé par RMN que l'atome de carbone à 123.6 ppm ne portait qu'un seul atome d'hydrogène, confirmant cette hypothèse.

Basé sur ces résultats, nous proposons ainsi le mécanisme décrit au Schéma 25. La première étape consisterait en la formation de l'intermédiaire carbocationique **16a_i** via la rupture hétérolytique de la liaison C-O induite par la lumière. Cet intermédiaire subirait alors une déprotonation pour conduire au fulvène **17a**. Formellement, ce mécanisme correspond à une élimination de type E1 déclenchée par voie photochimique.

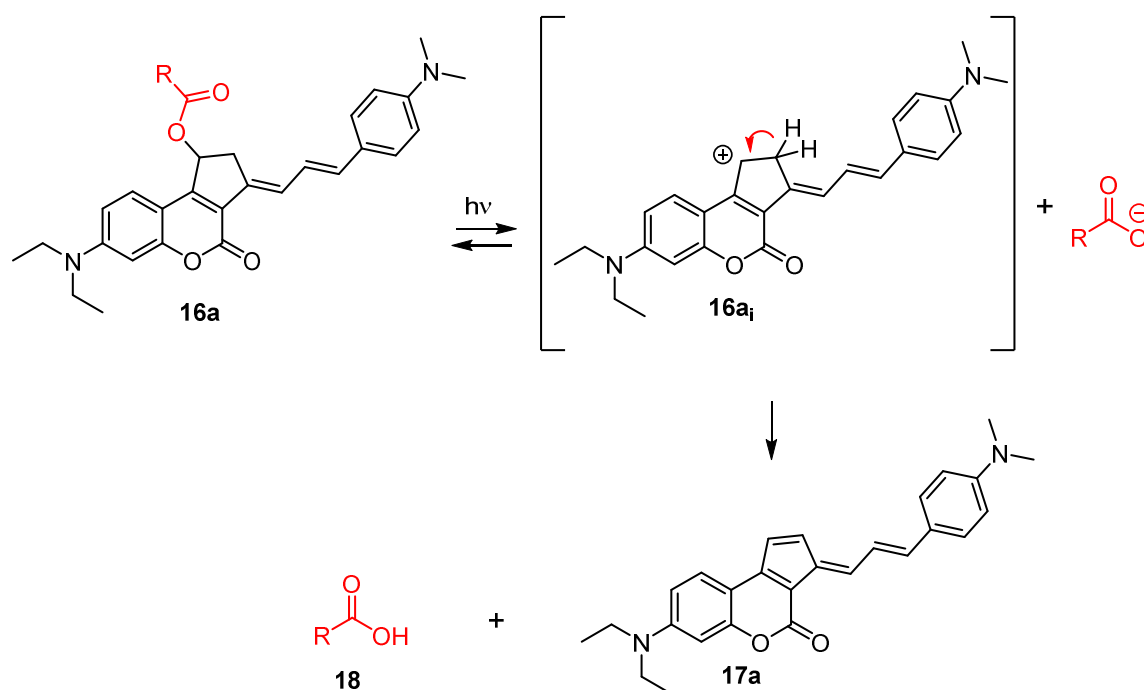


Schéma 25 - Proposition de mécanisme pour la photolyse de **16a** conduisant à la formation du fulvène **17a**.

II-3-e) Variation des groupements introduits en position 3

Nous nous sommes alors intéressés à d'autres possibilités de couplages. Dans un premier temps, la nature de l'ester boronique a été changée en utilisant le composé **b** (Schéma 26). Le composé **15'b** a donc été obtenu avec 23 % de rendement après cyclisation 5-*exo-dig* suivie du couplage de Suzuki-Miyaura. Ce composé a montré les mêmes propriétés de photoisomérisation que **15'a** et il a ensuite été couplé au même acide modèle. Par la suite, au lieu de terminer ces réactions domino par un couplage de Suzuki-Miyaura, nous nous sommes intéressés à la possibilité de finir par un couplage de Sonogashira. En effet, l'introduction d'une triple-liaison nous permettrait de comparer l'influence de la conjugaison et de sa nature sur les propriétés photophysiques et photochimiques de cette série de nouvelles coumarines. Le composé **12** a donc été engagé avec le 4-diméthylaminophénylacétylène **c** pour conduire à la formation de **15'c** avec 45 % de rendement. De même que les deux autres molécules **15'a** et **15'b**, il a été possible grâce à une irradiation à 430 nm d'isomériser ce composé en **15c** puis de former l'ester modèle analogue **16c** avec 37 % de rendement.

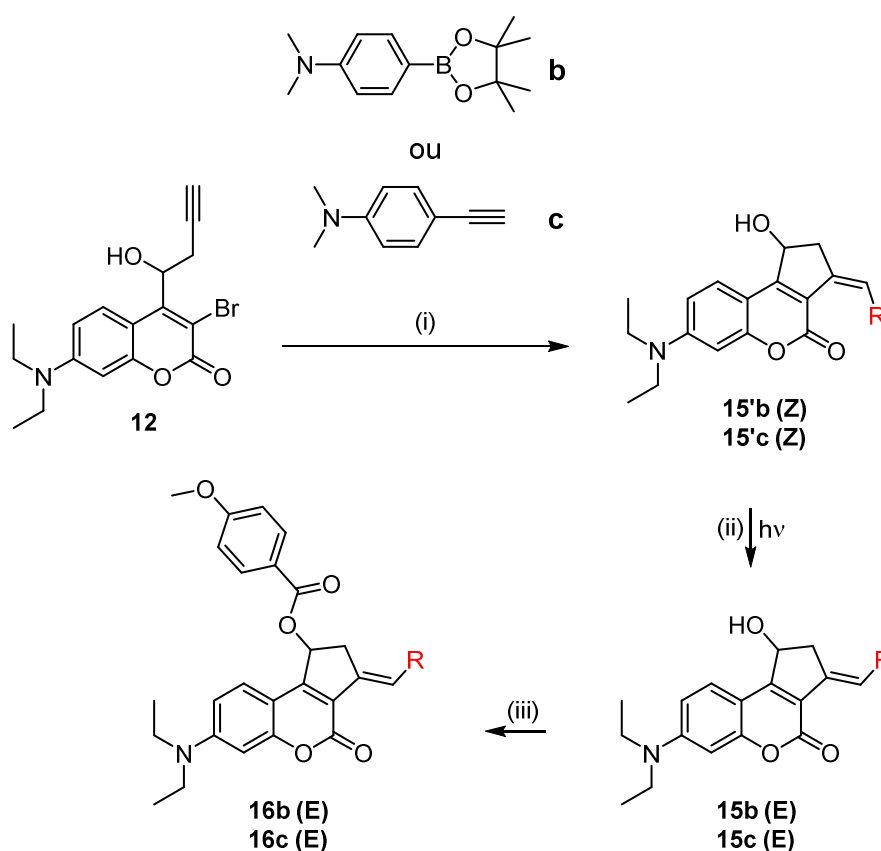


Schéma 26 - Synthèse des analogues **16b** et **16c**. (ib) **b**, K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, H_2O/DME (1:3), 105 °C par chauffage au micro-onde, 45 min, 23 % ; (ic) **c**, CuI , $PdCl_2(PPh_3)_2$, diisopropylamine, 120 °C par chauffage micro-onde, 1 h, 45 % ; (ii) CH_2Cl_2 , $h\nu$ (430 nm), 1 h ; (iiib) Acide 4-méthoxybenzoïque, DMAP, DIC, CH_2Cl_2 , 0 °C à TA, 3 jours et 18 h, 20 % ; (iiic) Acide 4-méthoxybenzoïque, DMAP, iPr_2EtN , EDC, CH_2Cl_2 , 0 °C à TA, 48 h, 37 %.

II-3-f) Résultats

Nous avons alors étudié les propriétés photophysiques et photochimiques des 3 composés **16a-c** ainsi préparés (Tableau 6). Ces GPPs ont été dissous dans un mélange de méthanol et d'eau (9:1, v/v) à raison de 20 μM .

Tableau 6 - Propriétés photochimiques et photophysiques de **16a-c** et comparaison avec la référence **10**.

Composé	Abs. λ_{max} (nm)/ ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	Fluo. λ_{max} (nm)/ ϕ	Abs. sous-prod. λ_{max} (nm)/ ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϕ_u	$\delta_a\phi_u$ 740/800 nm (GM)
Ref 10 ⁵⁹	446 / 41000	510 / 0.02	385 / 14000	0.2	32 / 8
16a	457 / 39000	609 / 0.016	557 / 45300	0.27	63 / 23
16b	437 / 42500	588 / 0.042	534 / 44700	0.57	42 / ND
16c	452 / 45800	556 / 0.018	550 / 36800	0.26	125 / 29

Les composés ont montré une absorption importante dans le visible avec des ϵ entre 39000 et presque 46000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ils sont également fluorescents, mais de manière très modérée vu les rendements quantiques de fluorescence mesurés. Seul le composé **16b** a montré une longueur d'onde maximale d'absorption (437 nm) plus faible que la référence des travaux de Lin Q. *et al.* (446 nm). La photolyse a été étudiée par spectroscopie UV-Visible ainsi que par HPLC et induite par une irradiation à 430 nm. Nous voulions caractériser ces produits de photolyse (Figure 43) de type fulvène même si aucune analyse RMN ^{13}C n'a été faite, à notre connaissance, dans la littérature sur des sous-produits de photolyse. Le produit de photolyse **17a** a donc été entièrement caractérisé (RMN ^1H , ^{13}C et HR-MS, voir partie expérimentale). Pendant la caractérisation RMN, nous nous sommes rendu compte que le sous-produit **17a** était faiblement soluble dans le solvant de RMN (les composés **17b** et **17c** étant encore moins solubles) et qu'après une irradiation totale, le composé **17a** (E/E) pouvait conduire à d'autres isomères (probablement Z/E).

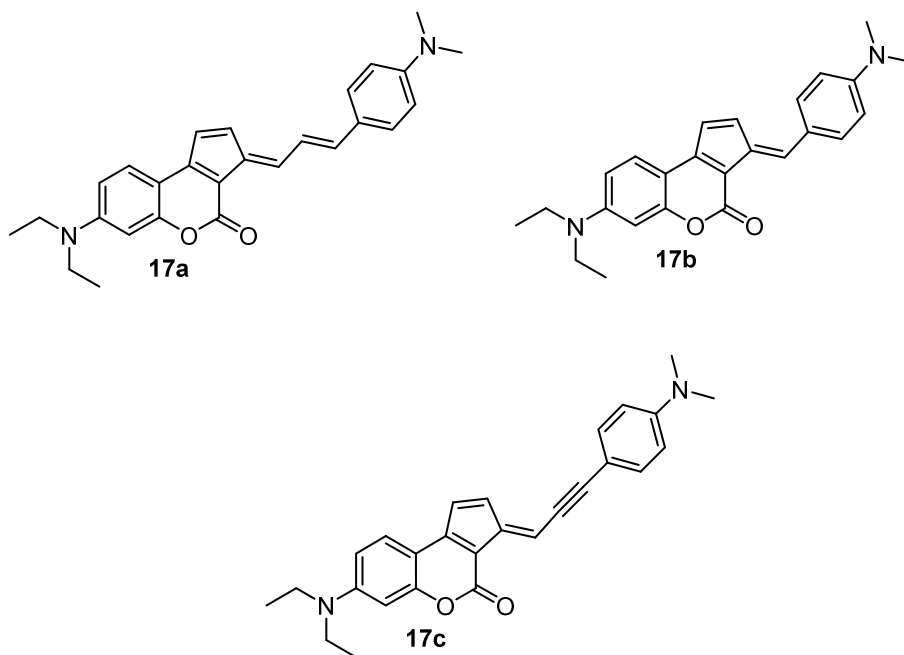


Figure 43 - Structures des produits de photolyse **17a-c**.

Afin de montrer que la photolyse s'effectue de manière hautement sélective dans les 3 cas, nous avons réalisé des analyses par HPLC avant et après irradiation des échantillons de **16a-c** (Figure 44 à Figure 46), ainsi que des analyses par spectroscopie de masse haute résolution des sous-produits **17a-c** formés.

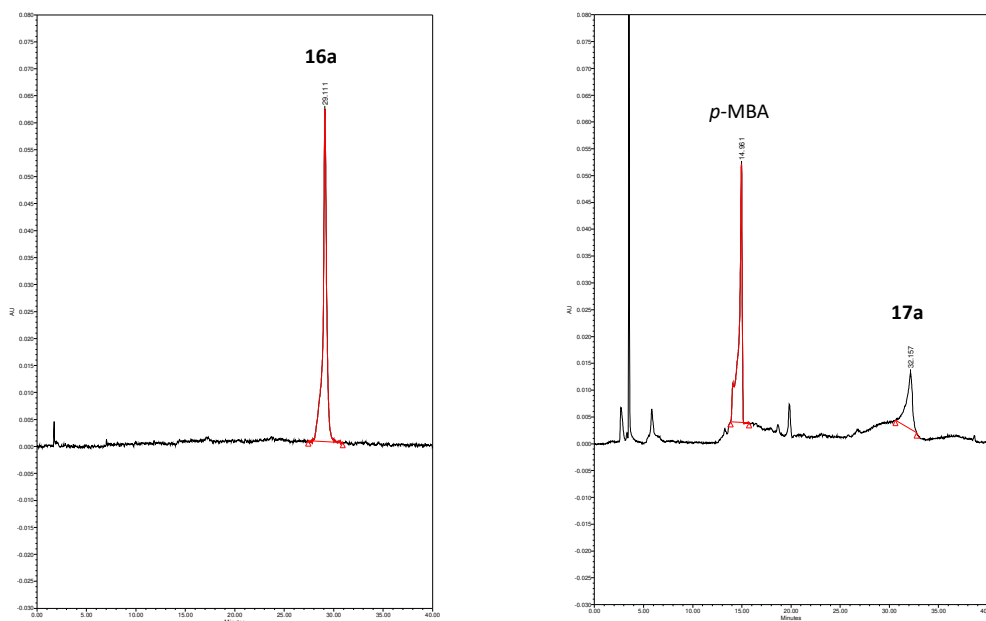


Figure 44 - Analyses HPLC de **16a** (20 μ M) dans MeOH/H₂O 9:1 (en volume) : à gauche = analyse HPLC à 250 nm de **16a** avant irradiation ; à droite = analyse HPLC à 250 nm de **16a** après irradiation de 120 secondes à 430 nm.

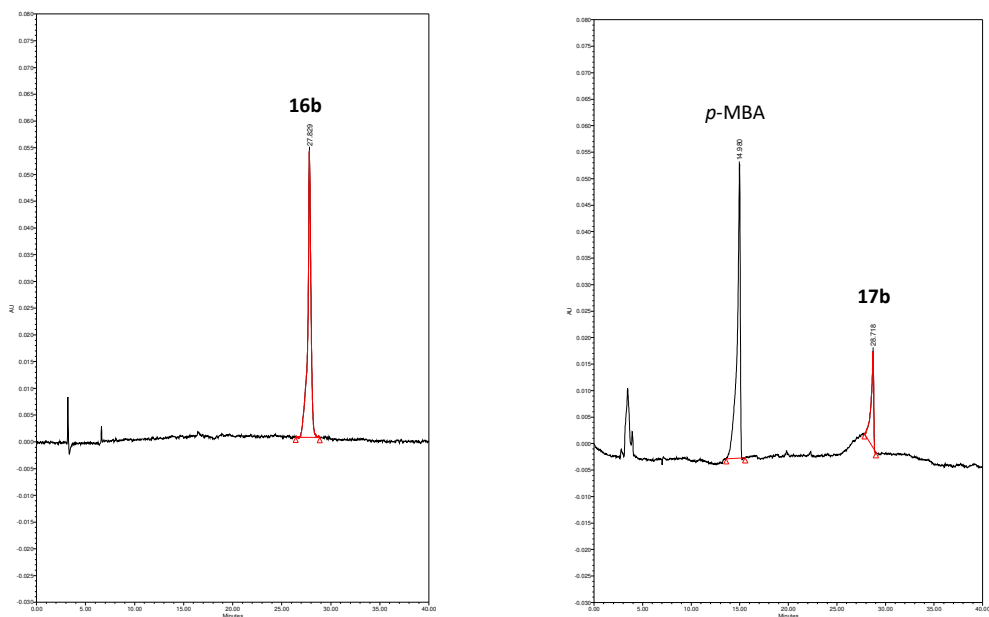


Figure 45 - Analyses HPLC de **16b** (20 μ M) dans MeOH/H₂O 9:1 (en volume) : à gauche = analyse HPLC à 250 nm de **16b** avant irradiation ; à droite = analyse HPLC à 250 nm de **16b** après irradiation de 60 secondes à 430 nm.

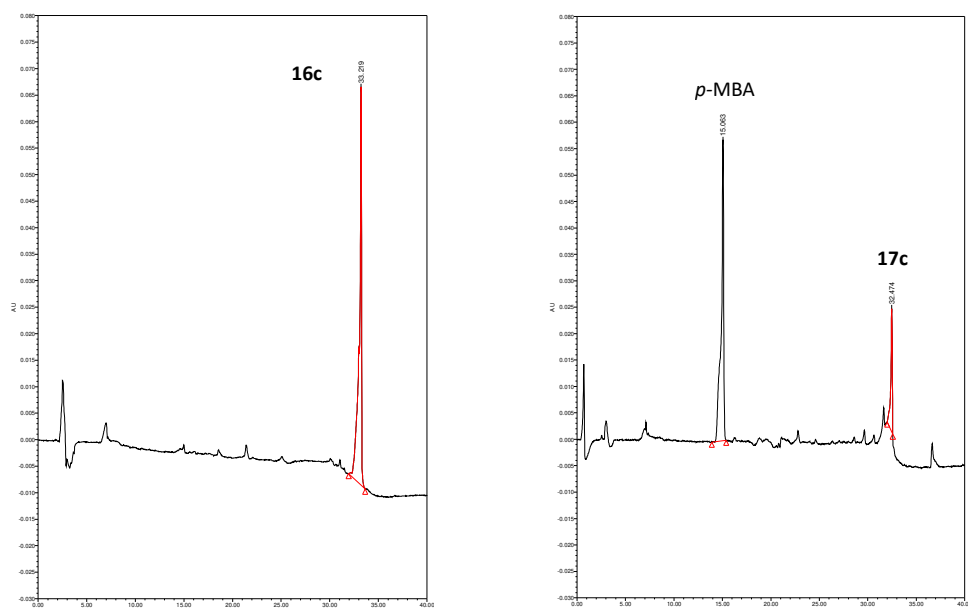


Figure 46 - Analyses HPLC de **16c** (20 μ M) dans MeOH/H₂O 9:1 (en volume) : à gauche = analyse HPLC à 250 nm de **16c** avant irradiation ; à droite = analyse HPLC à 250 nm de **16c** après irradiation de 60 secondes à 430 nm.

En parallèle, les analyses par spectrométrie de masse des composés **17b** et **17c** ont donné les résultats suivants :

- pour le composé **17b** : HR-MS (ESI, mode positif) : m/z [M+H]⁺ calculée pour C₂₅H₂₇N₂O₂ : 387.2067, trouvée : 387.2062 ; m/z [M+Na]⁺ calculée pour C₂₅H₂₆N₂O₂Na :

409.1886, trouvée : 409.1902 ; m/z [M]⁺ calculée pour C₂₅H₂₆N₂O₂ : 386.1994, trouvée : 386.2007 ;

- pour le composé **17c** : HR-MS (ESI, mode positif) : m/z [M+H]⁺ calculée pour C₂₇H₂₇N₂O₂ : 411.2067, trouvée : 411.2071, m/z [M+Na]⁺ calculée pour C₂₇H₂₆N₂O₂Na : 433.1886, trouvée : 433.1899.

De plus, les sous-produits de photolyse ont tous montré un décalage bathochrome des longueurs d'onde avec des λ_{\max} de 557, 534 et 550 nm respectivement pour les composés **17a**, **17b** et **17c**, ce qui nous permet de suivre aisément la photolyse par spectroscopie UV-Visible (Figure 47 à Figure 49).

La présence d'un point isobestique lors de chaque suivi UV-visible démontre sans ambiguïté le caractère sélectif et homogène de la photolyse. La libération quasiment quantitative ($\geq 98\%$) de l'acide 4-méthoxybenzoïque a été quantifiée par HPLC. Malheureusement, les sous-produits de photolyse n'ont pas montré de propriété de fluorescence significative qui aurait pu également nous permettre de suivre le processus de photolyse par fluorescence. Les GPPs sont néanmoins stables en conditions physiologiques (MeCN/PBS, 2:8 v/v, à pH = 7.4) et n'ont pas montré d'hydrolyse à température ambiante dans le noir.

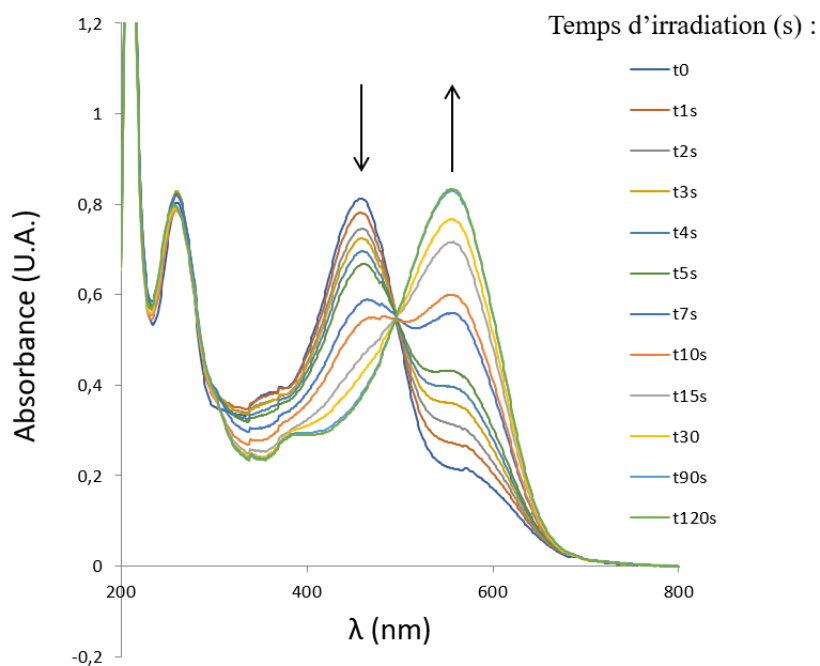


Figure 47 - Suivi par spectrophotométrie UV-visible de la photolyse de **16a** conduisant au composé **17a** et au p-MBA après irradiation à 430 nm (1.8 mL de solution à 20 μ M de **16a** dans un mélange 9:1 en volume de MeOH/H₂O).

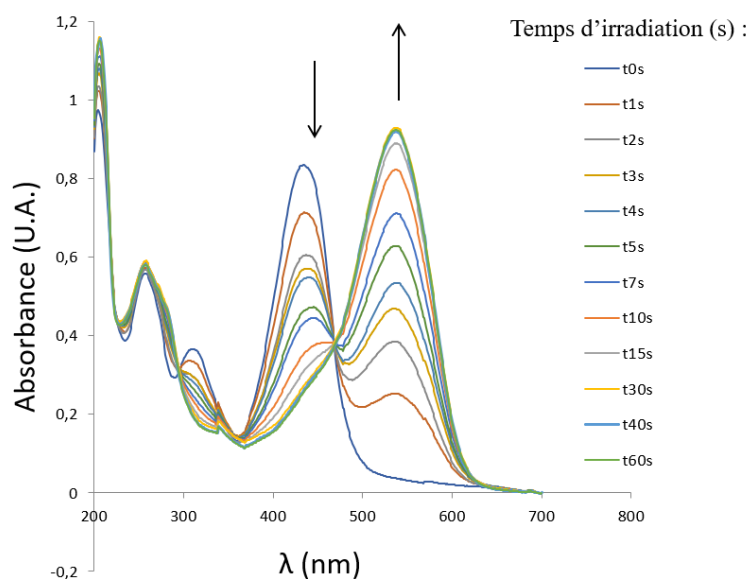


Figure 48 - Suivi par spectrophotométrie UV-visible de la photolyse de **16b** conduisant au composé **17b** et au *p*-MBA après irradiation à 430 nm (1.8 mL de solution à 20 μ M de **16b** dans un mélange 9:1 en volume de MeOH/H₂O).

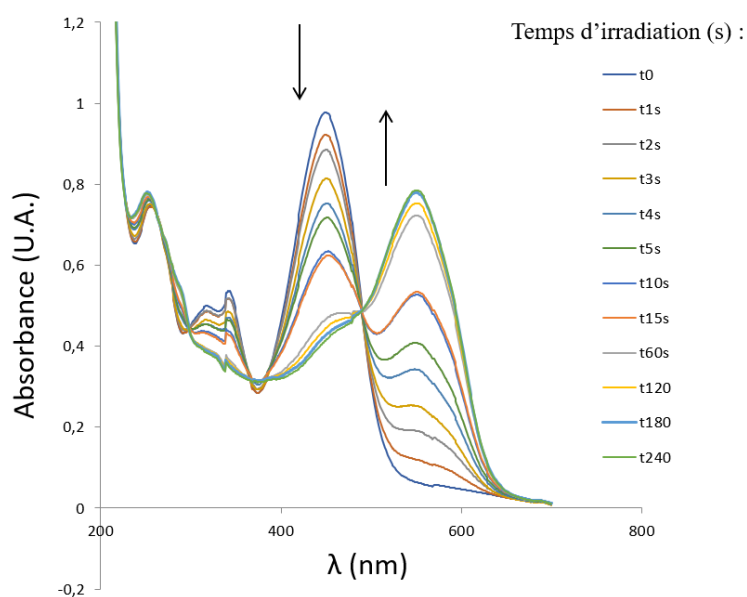


Figure 49 - Suivi par spectrophotométrie UV-visible de la photolyse de **16c** conduisant au composé **17c** et au *p*-MBA après irradiation à 430 nm (1.8 mL de solution à 20 μ M de **16c** dans un mélange 9 :1 en volume de MeOH/H₂O).

Les rendements quantiques à 1 photon ont été déterminés par compétition avec l'analogue de référence **10** et ils sont particulièrement importants : 27, 57 et 26 % respectivement pour les composés **16a**, **16b** et **16c**. Ainsi, le composé **16b** a une efficacité de photolibération remarquable à 1 photon de 24 200 M⁻¹cm⁻¹.

Les propriétés à 2 photons des trois molécules ont été déterminées par Clément Morville à 740 et 800 nm (Figure 50 et Figure 51). Ainsi, des valeurs $\delta_a\phi_u$ de 63, 42 et 125 GM ont été obtenues à 740 nm. Cela montre que la rigidification et l'ajout de cycles enrichis en électrons en position 3 améliorent grandement les propriétés à 2 photons. En effet, le GPP **16c** a une section efficace de photolibération 4 fois plus grande que celle du GPP de référence **10**.

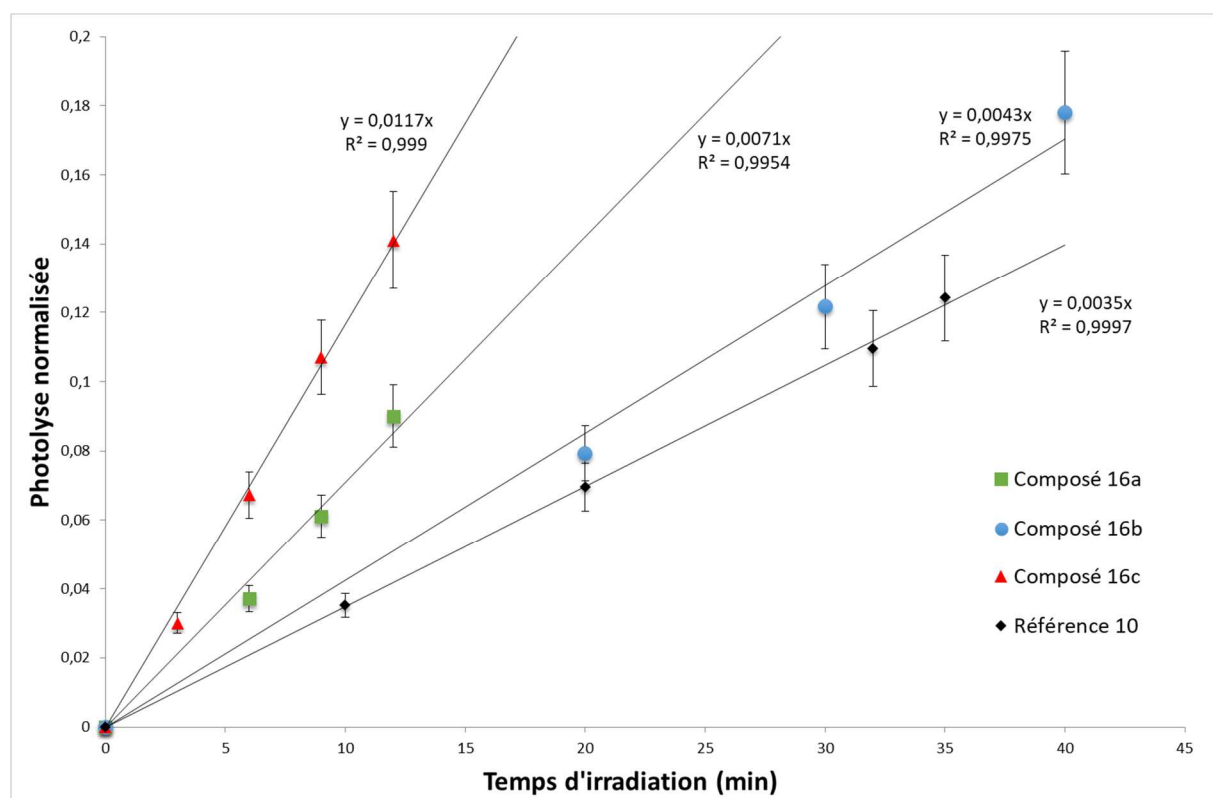


Figure 50 - Photolyse par excitation à 2 photons des composés **16a-c** à 740 nm suivie par analyse UV-visible et comparée à la référence **10** (**10** : losange noir, **16a** : carré vert, **16b** : rond bleu, **16c** : triangle rouge).

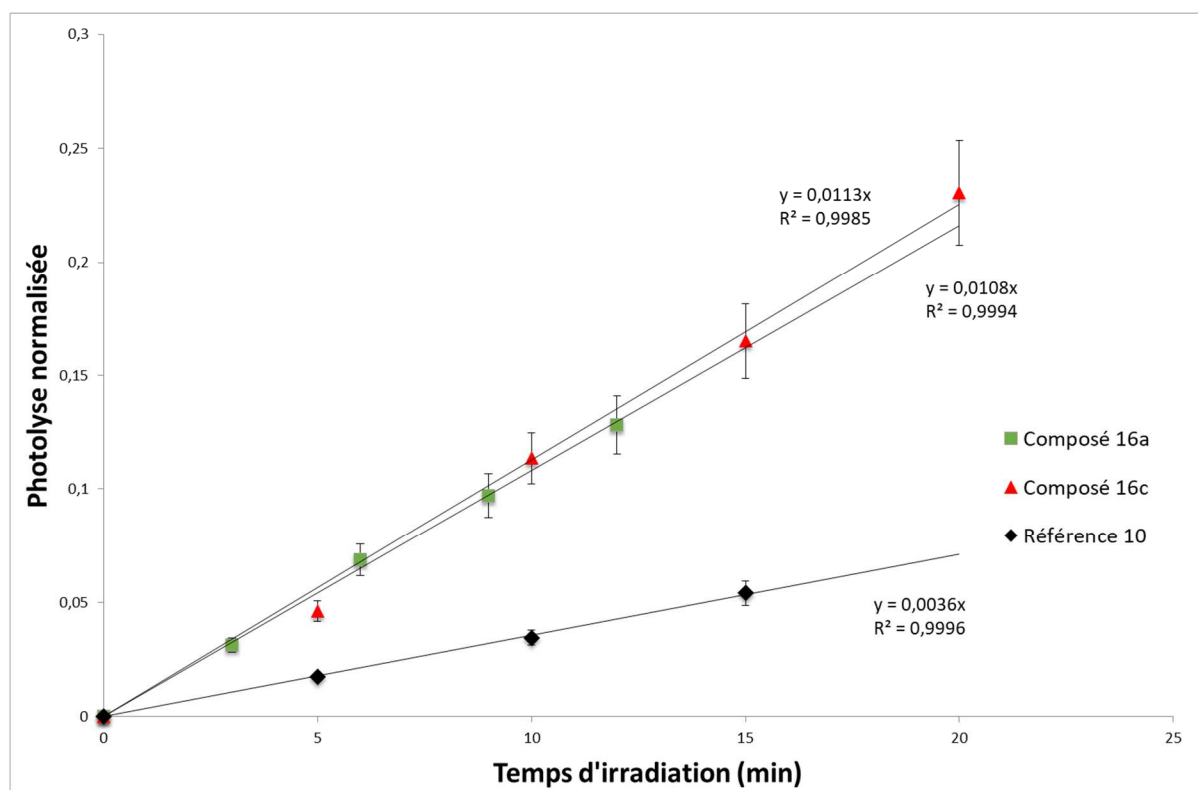


Figure 51 - Photolyse par excitation à 2 photons des composés **16a-c** à 800 nm suivie par analyse UV-visible et comparée à la référence **10** (**10** : losange noir, **16a** : carré vert, **16c** : triangle rouge).

Ces trois composés sont donc particulièrement intéressants pour des applications à 1 photon entre 400 et 500 nm. De plus, ces trois molécules montrent une sensibilité à 2 photons remarquable que peu de GPPs dans la littérature atteignent. Cela ouvre donc la voie à de nouvelles améliorations et applications de ce type de GPPs, notamment en neuroscience ou en biologie cellulaire.

II-4) Différents essais pour l'introduction d'une ancre ou d'une fonction pour coupler un groupe solubilisant.

Afin d'améliorer la solubilité de cette nouvelle plateforme 3,4-dihydrocyclopentacoumarinyle ou afin d'envisager de l'ancrer sur différents supports comme des nanoparticules, il serait intéressant de l'équiper d'une fonction réactive, comme un groupe azoture ou alcynyle, afin de pouvoir envisager une (bio)conjugaison par chimie « click ».

II-4-a) Tentatives en série alcyne

La première idée était d'introduire un groupe propargylique additionnel (Schéma 27). Alors que le squelette fulvène est construit *via* le processus domino précédemment développé à l'aide du premier groupe propargylique, l'autre serait disponible en vue d'une réaction CuAAC (Copper(I)-catalysed Alkyne-Azide Cycloaddition) avec un support ou un groupement solubilisant possédant un groupe azoture.

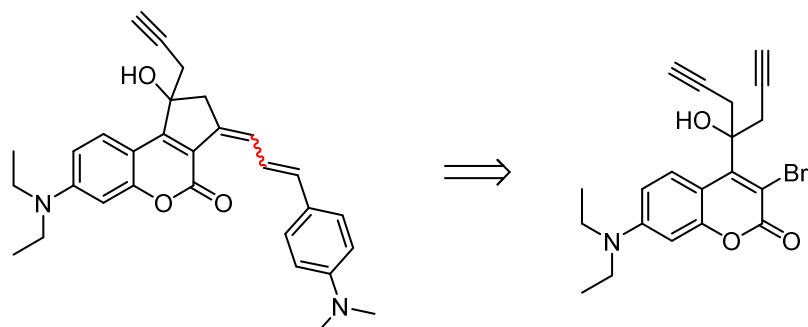


Schéma 27 - Rétrosynthèse d'un GPP équipé d'un groupe propargylique additionnel.

Afin de préparer la coumarine possédant l'alcool bispropargylique nécessaire, nous voulions synthétiser un chlorure d'acyle à partir de l'acide carboxylique **19** et le faire réagir avec 2 équivalents de bromure de propargylzinc (Schéma 28). Des tentatives d'oxydation directes à partir des coumarines **1** et **3** ont été menées avec du KMnO_4 sans aboutir à l'obtention de l'acide carboxylique escompté **19**.

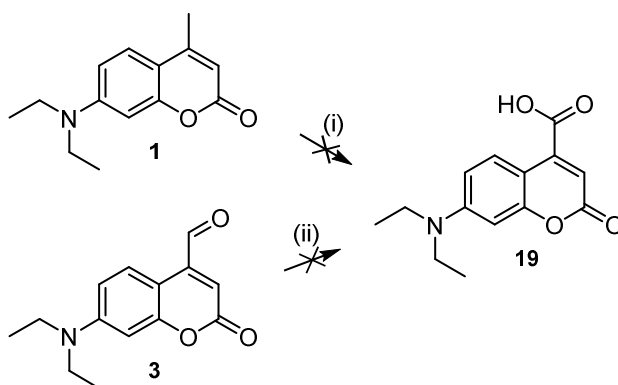


Schéma 28 – Tests d'oxydation pour l'obtention de l'acide carboxylique **19**. (i) KMnO_4 , NaOH , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 0 °C à TA, 6 h, 50 °C, 47 h ; (ii) KMnO_4 , NaOH , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 0 °C à TA, 23 h, 50 °C, 47 h.

Une autre stratégie de synthèse inspirée des travaux de Brubacker A. N. *et al.* a permis l'obtention de l'acide carboxylique **19** en passant par la formation d'une oxime puis d'un nitrile

(Schéma 29).⁸³ Cet acide carboxylique a été obtenu en 2 étapes avec un rendement global de 66 %. Pour cela, l'aldéhyde **3** a été converti en l'oxime **20** par réaction avec du chlorure d'hydroxylammonium en présence d'acétate de sodium. Le traitement de l'aldoxime **20** par de l'anhydride acétique a conduit à l'obtention du nitrile **21** qui a été hydrolysé avec une solution à 50 % de H₂SO₄ sans purification au préalable. L'acide carboxylique **19** a ensuite été traité par du chlorure de thionyle mais la production de HCl *in situ* a entraîné la dégradation de la coumarine. Il a donc été décidé de former l'ester méthylique **23**, synthétisé avec un rendement de 73 %. Cet ester a été traité par un large excès de bromure de propargylzinc fraîchement préparé. Cependant, le produit escompté **22** n'a pas été obtenu.

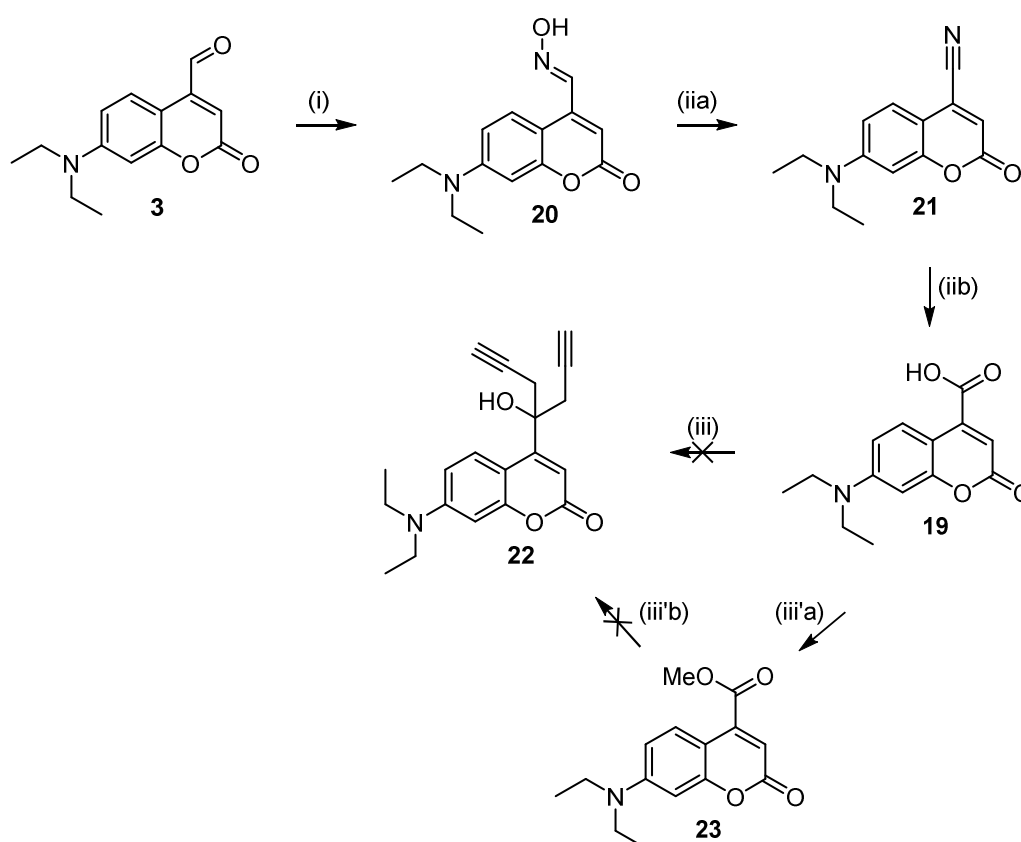


Schéma 29 - Synthèse de l'acide carboxylique **19** et essais d'insertion d'un second groupe propargyle. (i) NaOAc-3H₂O, NH₂OH-HCl, H₂O/EtOH (1:3), reflux, 1 h, 86 % ; (iia) Ac₂O, reflux, 17h, quant. ; (iib) solution aqueuse à 50 % de H₂SO₄, H₂O, 100 °C, 17 h, 77 % ; (iii) SOCl₂, reflux, 3 h 30, évaporation, bromure de propargylzinc, 0 °C à TA, 2 h ; (iii'a) MeOH, DMAP, DIC, 0 °C à TA, 20 h, 73 % ; (iii'b) bromure de propargylzinc, THF, TA, 1 h 30.

Comme l'accès au motif bis-propargylique *via* une approche directe par double addition nucléophile a échoué, une approche séquentielle a alors été envisagée. Il a ainsi été décidé d'effectuer une première réaction de Barbier suivie d'une oxydation de l'alcool puis de l'installation du second groupe propargylique *via* l'addition nucléophile d'un second équivalent de bromure de propargylzinc (Schéma 30).

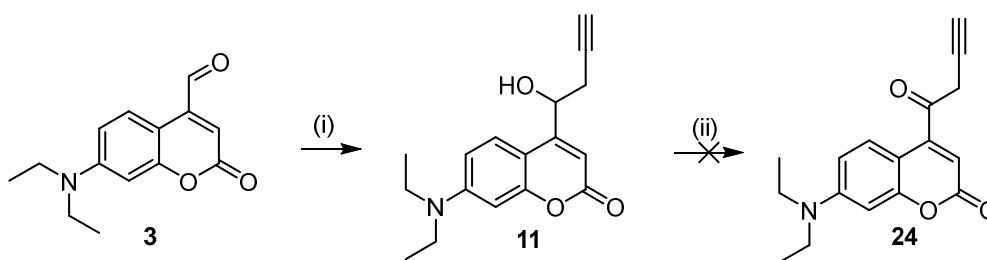


Schéma 30 - Tentative d'oxydation de **11**. (i) Bromure de propargylzinc, THF, TA, 1 h 30, 86 % ; (ii) DMSO, (COCl)₂, Et₃N, CH₂Cl₂, -78 °C à TA, 1 h 30.

L'alcyne **11** a été obtenu avec 86 % de rendement mais l'oxydation de **11** pour former la cétone propargylique **24** a échoué dans les conditions de Swern, mais aussi en présence de MnO₂ ou de périodinanane de Dess-Martin.

Au vu de ces résultats, nous n'avons pas poursuivi nos efforts dans cette série.

II-4-b) Tentatives en série azoture

II-4-b.1) Première stratégie

Puisque la synthèse en série alcyne s'est avérée infructueuse, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un analogue équipé d'un groupe azoture. Une première stratégie de synthèse débute par la formation d'un sel de sulfonium **26** adaptée de Forbes D. C. *et al.* à partir du cyanothioanisole **25** et de triflate d'argent (Schéma 31).⁸⁴ Ce sel a été lavé et trituré au dichlorométhane pour tenter d'éliminer l'excès de benzonitrile. Ce sel, en milieu basique et en conditions de chauffage, forme *in situ* l'ylure de sulfonium qui réagit ensuite avec l'aldéhyde **3**, conduisant à la formation de l'époxyde **27** avec 57 % de rendement. Ce dernier est ensuite ouvert régiosélectivement en présence d'azoture de sodium et de NH₄Cl pour former l'azoture escompté **28** avec 65 % de rendement (autour de 20 % de l'époxyde est aussi converti en l'autre régioisomère). La position 3 de la coumarine est ensuite bromée par du NBS en présence d'une quantité catalytique d'acétate d'ammonium avec un rendement de 73 %. Ces composés **27**, **28** et **29** semblent se dégrader sur silice ce qui explique les rendements modérés obtenus après purification. Enfin, un couplage de Suzuki-Miyaura est effectué sur la molécule **29** afin de vérifier la stabilité de l'azoture dans des conditions de chauffage par micro-onde. Le composé **30** est alors obtenu avec 61 % de rendement.

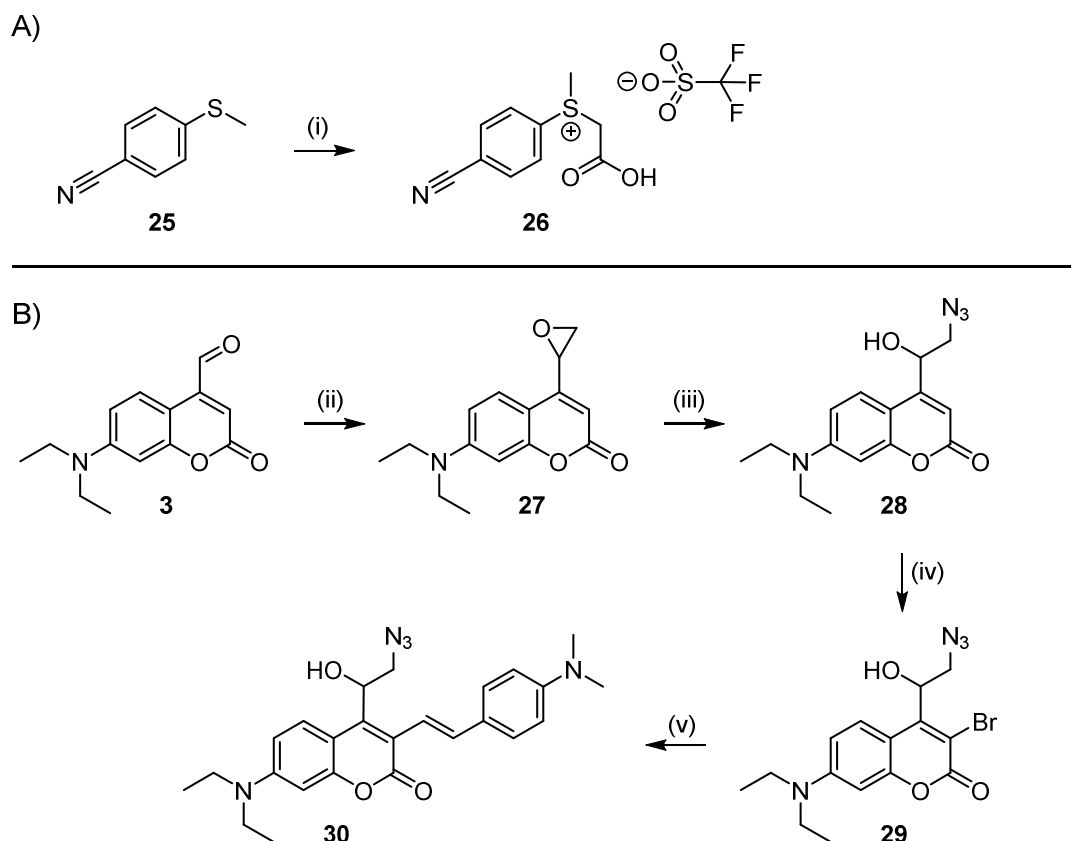


Schéma 31 - A) Synthèse du sel de sulfonium **26** adaptée des travaux de Forbes D. C. et al. ; B) synthèse de la plateforme azoture **30**. (i) Acide iodoacétique, AgOTf, MeCN, TA, 48 h, 56 % estimés ; (ii) Cs₂CO₃, 26, THF, 60 °C, 2 h, 57 % ; (iii) NaN₃, NH₄Cl, EtOH/H₂O (1:1), reflux, 16 h, 65 % ; (iv) NBS, NH₄OAc, MeCN, TA, 30 min, 73 % ;(v) K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1: 3), 105 °C par chauffage au micro-onde avec puissance constante à 5W, 1 h 30, 61 %.

Il existe néanmoins plusieurs problèmes relatifs à cette stratégie de synthèse. En effet, la synthèse du sel de sulfonium **26** est coûteuse (emploi de triflate d'argent en grosse quantité), laborieuse et il n'est pas possible d'en obtenir de grosses quantités. Il a donc fallu explorer d'autres alternatives pour la formation de l'époxyde **27**.

II-4-b.2) Identification d'un sel de sulfonium alternatif et plus approprié

Une méthode plus classique pour obtenir des époxydes est l'utilisation d'ylures de soufre dans des réactions de Corey-Chaykovsky.^{85,86,87} Les ylures sont générés *in situ* par déprotonation d'halogénures de sulfonium à l'aide de bases fortes (Schéma 32). Nous avons donc décidé de travailler avec l'iodure de triméthylsulfonium.

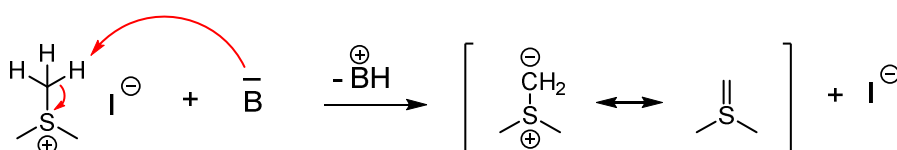


Schéma 32- Mécanisme de formation *in situ* d'ylures de soufre.

Les premiers essais ont été menés avec 1.3 équivalent de NaH et 1.25 équivalent de Me₃SI mais la conversion n'était pas complète et l'analyse RMN ¹H a révélé la présence d'environ 30 % d'aldéhyde (Schéma 33). Cette conversion reste la même, même en augmentant l'échelle de la réaction. Cependant, un autre problème s'est posé concernant l'élimination du DMSO.

Différentes solutions ont été envisagées pour contrecarrer ces obstacles :

- 1) par des extractions H₂O/Et₂O : même avec une petite quantité d'eau, la majorité du produit restait dans la phase aqueuse avec le DMSO,
- 2) par purification sur colonne de silice : un important échauffement local de la silice s'est produit conduisant à une dégradation significative du produit avec seulement 8 % de produit qui ont pu être isolés,
- 3) par chromatographie flash en phase inverse (C18) avec un gradient ACN/H₂O comportant 0.1 % de TFA : 18 % de rendement ont été obtenus mais toujours beaucoup de dégradation visible (de nouvelles taches sur CCM ont été observées). L'époxyde semblait donc sensible à l'acidité,
- 4) en remplaçant le DMSO par de la DMF, les résultats n'ont pas non plus été concluants. La conversion de l'aldéhyde est toujours incomplète et l'halogénure de sulfonium n'était pas parfaitement soluble dans la DMF.

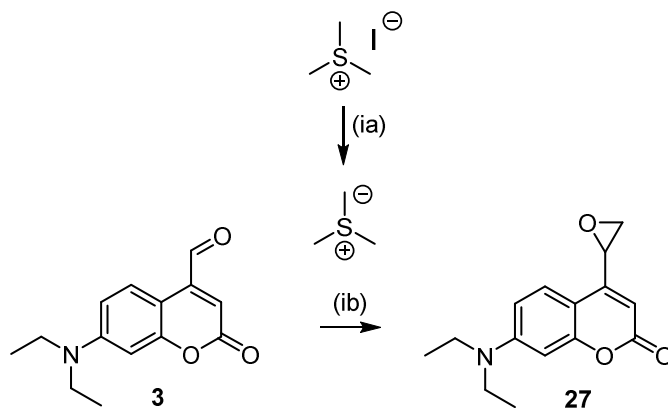


Schéma 33 – Schéma de synthèse de **27** ; (ia) NaH, Me₃SI, DMSO, THF, 0 °C à TA, 2 h ; (ib) ylure, THF, 0 °C à TA, 1 h 30, 66 % de conversion (estimée par RMN ¹H).

Cette méthode plus classique ne fonctionnant pas, nous nous sommes tournés vers la formation d'une bétaine similaire au premier sel de sulfonium **26** synthétisé.

En adaptant les protocoles d'une publication de Forbes D. C. *et al.*,⁸⁴ des tentatives ont été menées pour synthétiser la bétaine aromatique sans utiliser de triflate d'argent (Schéma 34).

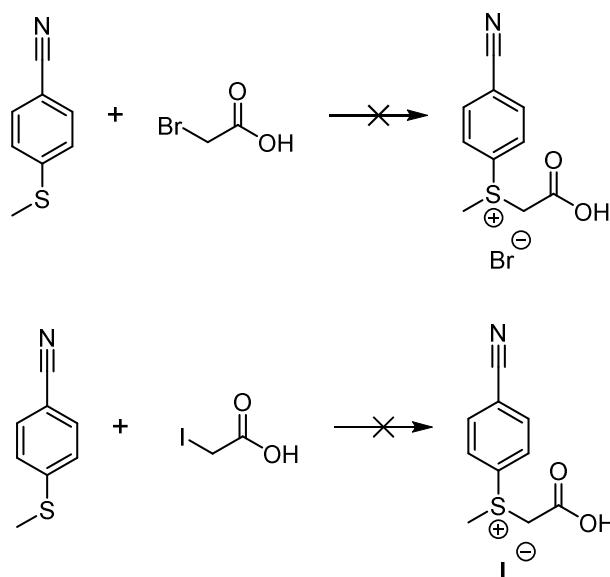


Schéma 34 - Tentatives de synthèse de bromure et d'iodure de sulfonium.

Pour cela, le 4-(méthylsulfanyl)benzonitrile a été mis en réaction avec de l'acide bromoacétique dans de l'acétone distillée, dans un premier temps à température ambiante, mais après 17 h de réaction, aucun produit n'a été formé. Le milieu réactionnel a donc été chauffé à reflux pendant 19 h 30 mais aucune évolution n'a été observé. De même, aucun produit n'a été formé dans ces conditions à partir de l'acide iodoacétique.

Au vu de ces résultats peu encourageants, nous avons sélectionné un autre précurseur d'ylure, l'acétate de méthyloctylsulfonium **33** qui est une bétaine développée par Forbes D. C. *et al.* (Schéma 35).⁸⁸

33 se prépare en 2 étapes avec tout d'abord, l'acide bromoacétique qui réagit avec le 1-méthylsulfanyloctane pour obtenir de sel de sulfonium **32**. Ce composé est ensuite traité par de l'oxyde d'argent fraîchement préparé pour former la bétaine **33**. Cette dernière est alors mise en réaction sans base avec l'aldéhyde **3** pour former l'époxyde **27** qui a été engagé dans l'étape suivante sans purification. Ainsi, l'ouverture de l'époxyde **27** avec l'azoture de sodium conduit au 1,2-azidoalcool **28** avec 43 à 58 % de rendement, mais aussi à son régioisomère à hauteur d'une vingtaine de % de rendement (non isolé mais visible sur les spectres RMN ¹H du brut de réaction).

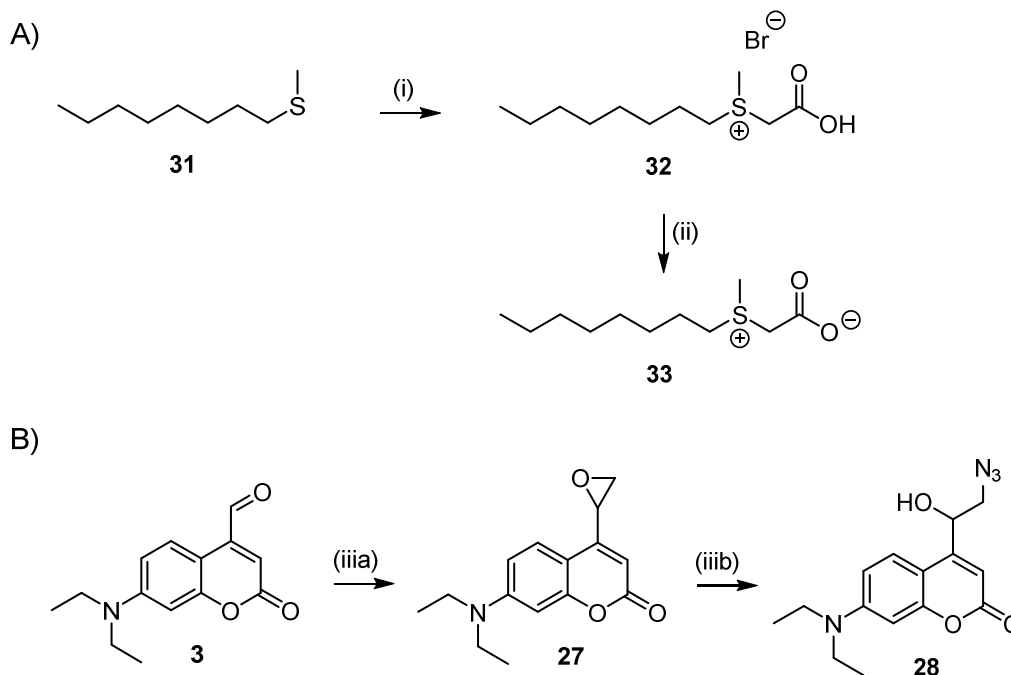


Schéma 35 - A) Synthèse de la bétaine **33** d'après les travaux de Forbes D. C. et al. ;⁸⁸ B) synthèse du 1,2-azidoalcool **28** ; (i) acide bromoacétique, acétone TA, 20 h, 42 % ; (ii) Ag₂O fraîchement préparé, MeOH, TA, 19 h, 92 % ; (iia) **33**, dichloroéthane, 60 °C, 2 h, évaporation ; (iib) NaN₃, NH₄Cl, EtOH/H₂O (1:1), reflux, 18 h, 58 %.

Cette nouvelle méthode de formation de l'azoture permet de l'obtenir en bien plus grande quantité et avec de meilleurs rendements (initialement entre 25 à 37 % contre 43 à 58 % sur deux étapes).

II-4-b.3) Tentatives d'insertion d'un alcyne en série azoture

Après avoir obtenu **28**, divers essais d'oxydation ont été menés (MnO₂, conditions de Swern...) sur cet azidoalcool mais sans succès (Schéma 36). Dans les conditions de Swern employant 5 équivalents de triéthylamine, nous suspicions les conditions basiques d'être en partie la source du problème. Ainsi, nous avons essayé d'effectuer une oxydation plus douce à l'aide du périodinate de Dess-Martin mais sans ajout de base pour neutraliser la libération d'acide acétique au cours de la réaction. L'oxydation a fonctionné avec ce réactif et a conduit à l'obtention de **34** avec 56 % de rendement à petite échelle et à moins de 25 % pour des quantités d'environ 180 mg d'azidoalcool **28** (Schéma 36). De plus, nous avons observé à ce moment-là une très grande sensibilité de cette cétone à la silice. Nous avons ensuite traité **34** par du bromure de propargylzinc fraîchement préparé et le composé **35** a été obtenu avec un bon rendement de 78 %.

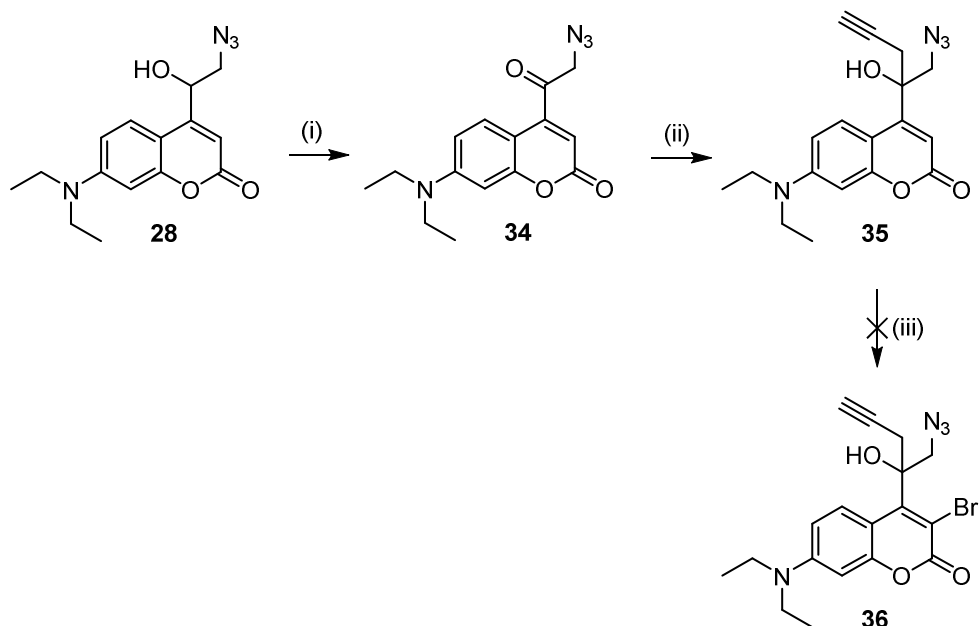


Schéma 36 - Première approche vers une coumarine trifonctionnalisée par un azoture, un alcyne terminal et un alcool. (i) Périodinate de Dess-Martin, CH_2Cl_2 , 0°C à TA, 4 h, 56 % ; (ii) bromure de propargylzinc, THF, 0°C à TA, 1 h 30, 78 % ; (iii) NBS, acétate d'ammonium, MeCN, TA, 40 min.

Malheureusement, la bromation de **35** en position 3 n'a pas fonctionné (Schéma 37). Le traitement de la coumarine par du NBS avec une quantité catalytique d'acétate d'ammonium a conduit à la formation de deux produits et il restait majoritairement du produit de départ. Pour les deux produits formés, un semble bien être une bromation mais sur une autre position de la coumarine.

Nous avons donc souhaité changer l'ordre des réactions, et comme la bromation était effective en position 3 avec l'azidoalcool **28**, nous avons d'abord effectué cette étape, puis sans purification, l'alcool a été oxydé en cétone à l'aide du périodinate de Dess-Martin pour conduire au composé **37**.

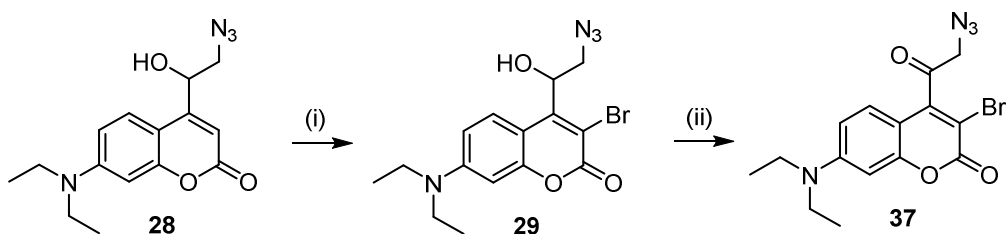


Schéma 37 - Seconde approche vers une coumarine trifonctionnalisée par un azoture, un alcyne terminal et un alcool. (i) NBS, acétate d'ammonium, MeCN, TA, 20 min ; (ii) périodinate de Dess-Martin, CH_2Cl_2 , 0°C à TA, 4 h.

Le produit a clairement été identifié par spectroscopie RMN. Cependant, le brut de réaction a montré des résidus de périodinate.

Diverses tentatives ont été menées afin de s'en débarrasser. Dans un premier temps, des traitements aqueux ont été employés. L'utilisation d'une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 a permis d'enlever l'acide 2-iodobenzoïque mais pas les autres dérivés. Un lavage plus basique à l'aide de Na_2CO_3 dégrade la cétone bromée **37** et a semblé convertir la forme réduite du périodinanone en acide 2-iodobenzoïque alors qu'un lavage avec une solution aqueuse saturée de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a complètement dégradé le produit attendu (confirmé par CCM et analyse RMN ^1H). Nous avons aussi essayé de purifier le produit par chromatographie sur plaque préparative de silice mais nous avons observé une grosse dégradation du produit ainsi qu'une co-élution de l'acide 2-iodobenzoïque. Enfin, un dernier essai a consisté en une filtration rapide sur silice fine mais le produit s'est quasi complètement dégradé (même taches sur CCM qu'avec les traitements aqueux basiques).

Au vu des efforts de synthèse réalisés révélant l'extrême sensibilité de ce composé, il semble que l'insertion d'une triple liaison sur cette position benzylique soit trop compliquée à mettre en place. L'accès à ce type d'analogues a donc pour l'instant été abandonné.

II-5) Conclusion du chapitre

Les coumarines sont des fluorophores dont les modifications ont permis l'élaboration de nouveaux GPPs plus sensibles à 1 et 2 photons. Nous avons donc mis au point dans un premier temps une voie de synthèse plus rapide de la référence **10** décrite par Lin Q. *et al.*,⁵⁹ qui ne nécessite pas de protection/déprotection de l'alcool. Ensuite, nous avons synthétisé de nouveaux GPPs conjugués et plus rigides grâce à des réactions domino consistant en une cyclisation 5-*exo-dig* suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira. Ces composés ont montré des propriétés intéressantes de photolyse qui permet de n'obtenir qu'un seul isomère et une fois couplé avec un groupement partant, ils ont montré une sensibilité à 1 et 2 photons particulièrement prometteuse. L'insertion en position 3 de différents groupements a permis d'observer l'influence de la conjugaison et de la rigidité pour la sensibilité à 2 photons. Pour illustration, le composé **16c** comportant une triple-liaison a en effet une section efficace de libération à 2 photons de 125 GM à 740 nm.

Nous avons ensuite eu l'idée d'insérer un autre groupement fonctionnel afin de rendre ces composés plus solubles ou de les installer sur différents supports/matrices (par exemple des nanoparticules). Cependant, en série alcyne, malgré de nombreuses tentatives, il n'a pas été possible d'insérer un second groupement alcyne. Nous nous sommes donc tournés vers le

développement de coumarines comportant un groupement azoture et nous avons décrit une voie de synthèse plutôt efficace pour la formation de ces composés. Malheureusement, les dérivés cétoniques de ces coumarines se sont révélés être bien trop sensibles pour envisager d'insérer une ancre à cet endroit-là. Au vu de ces résultats, il ne semble pas opportun de travailler davantage sur ces positions pour fonctionnaliser ces dérivés mais plutôt d'envisager la fonctionnalisation sur d'autres positions telles que les atomes d'azote des résidus aniline de la plateforme 2,3-dihydrocyclopentacoumarinyle (Figure 52). A noter que cette fonctionnalisation *via* les atomes d'azote présenterait également l'avantage d'éviter de désymétriser la coumarine dès les premières étapes de synthèse (Figure 52).

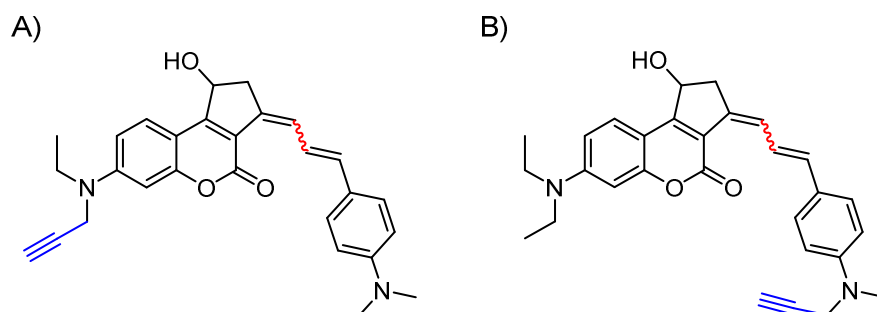


Figure 52 - Structures de deux analogues envisagés comme perspectives de ces travaux.

Chapitre III : Expression Cre-dépendante d'un transgène dans l'œil grâce à un analogue photoactivable du tamoxifène

III – 1) Développement d'outils photochimiques pour des applications biomédicales : traitement de pathologies rétiniennes

III-1-a) La rétinopathie diabétique

III-1-a-1) Deux types de rétinopathies diabétiques

La rétinopathie diabétique est une complication du diabète. Les signes cliniques de la rétinopathie apparaissent souvent après plusieurs années de diabète (Figure 53). On distingue deux types de rétinopathies diabétiques :⁸⁹

- non proliférante : on observe dans ce cas une augmentation de la perméabilité des vaisseaux rétiniens, la présence d'exsudats, un amincissement de la membrane, des micro-hémorragies ...
- proliférante : elle présente des signes cliniques similaires à la rétinopathie diabétique non proliférante mais avec une angiogenèse importante (néovascularisation) et parfois une accumulation de fluides et autres composés acheminés par le sang.

Les complications graves de ce dernier type sont alors l'œdème maculaire (perte de vision centrale), des hémorragies intravitréennes et même un décollement de la rétine. Les patients peuvent donc perdre la vue et souvent les signes cliniques de la pathologie apparaissent de façon brutale.

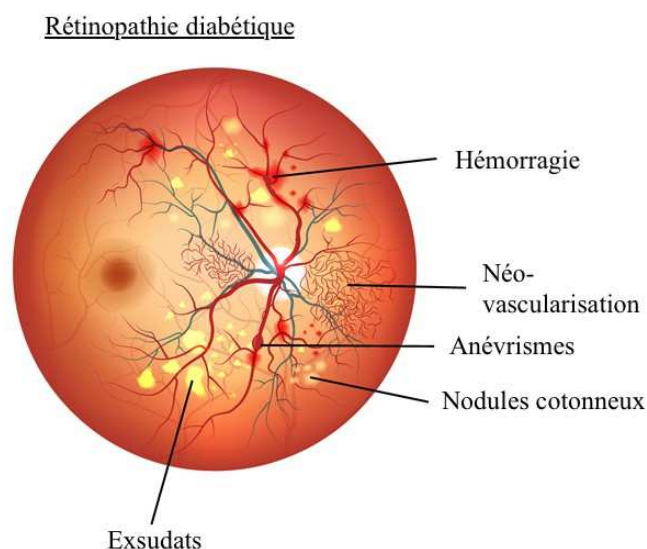


Figure 53 - Principales conséquences de la rétinopathie diabétique (adapté de news-medical.net).

Le dépistage se fait par des fonds d'œil annuels et en complément, il est possible d'effectuer une angiographie par fluorescence.

III-1-a-2) Prévention et traitements

Aux États-Unis, la rétinopathie diabétique est la cause majeure de cécité chez les adultes.⁸⁹ Avec le nombre grandissant de personnes diabétiques, le risque de développer une rétinopathie diabétique est de plus en plus important.

◆ *Contrôle de la glycémie*

Pour prévenir l'apparition de la rétinopathie ou lorsqu'elle est à un stade précoce, souvent un rééquilibrage du diabète et le contrôle d'autres facteurs comme l'hypertension artérielle peuvent être bénéfiques. En effet, une étude clinique a montré que pour les diabètes insulino-dépendants, une thérapie intensive (c'est-à-dire un contrôle maximal sur la glycémie par de nombreuses injections journalières d'insuline ou alors une infusion subcutanée continue d'insuline) réduit le risque après 3 ans de développer une rétinopathie ou que celle-ci progresse.⁹⁰ Cependant, plus le stade de la rétinopathie est avancé, moins les effets bénéfiques d'un contrôle drastique de la glycémie sont importants. Il faut aussi que ce contrôle se fasse dans la durée pour observer un effet positif.

La rétinopathie va donc augmenter la perméabilité des vaisseaux ce qui va provoquer des hémorragies, des exsudats et donc des occlusions de vaisseaux. Ces occlusions vont induire une ischémie (un problème d'oxygénation) de la rétine et ainsi déclencher l'augmentation de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Le VEGF est un vasoperméable et un mitogène puissant qui est libéré par différentes cellules en conditions hypoxiques (un état d'oxygénation insuffisant dans les tissus). Le VEGF est ainsi particulièrement exprimé chez les patients atteints de rétinopathie diabétique et va aider à la formation de capillaires anormaux et peu fonctionnels (néovascularisation).⁹¹

Afin de rétablir un taux d'oxygénation correct au sein de l'œil, différents traitements ont été introduits dans les années 1950 : la vitrectomie et la photocoagulation.⁹²

◆ *Traitement chirurgical*

La vitrectomie est une ablation chirurgicale du corps vitré qui est surtout indiqué lorsqu'il y a des hémorragies intra-vitréennes persistantes ou en cas de décollement de la rétine. Elle va permettre le transport de dioxygène dans les zones ischémiques de la rétine. Ainsi, le taux d'O₂ de la rétine augmente ce qui a pour conséquence d'amoindrir la production de VEGF et donc la néovascularisation.

◆ *La photocoagulation panrétinienne*

C'est un traitement spécifique de la rétinopathie diabétique proliférante réalisé à l'aide de tirs lasers (Figure 54). Cela conduit à une augmentation de la température locale et ainsi dénature les protéines jusqu'à provoquer une coagulation. L'oxygénation est donc plus importante car il n'y a plus de photorécepteurs au niveau des tissus cicatriciels et donc moins de consommation d'O₂ qui peut ainsi diffuser.

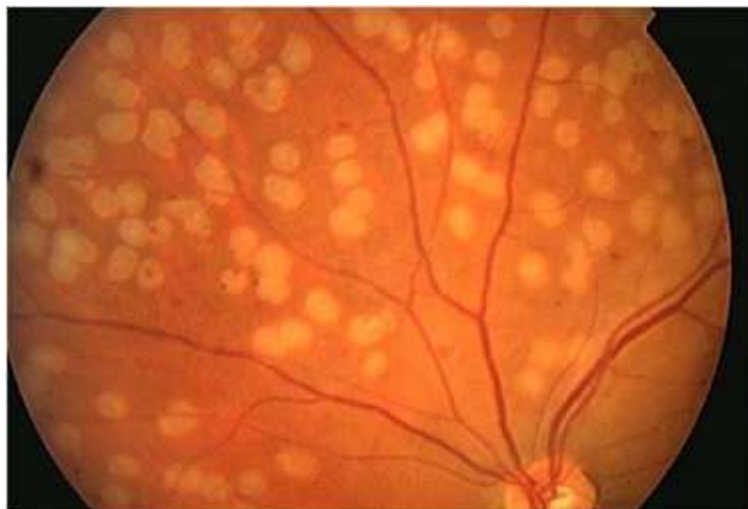


Figure 54 - Photographie de la partie supérieure de la rétine traitée par photocoagulation au laser (0.1 s, 0.18 W).⁹³

Stefansson E. explique aussi que le flux de dioxygène peut se faire à travers ces tissus cicatriciels et provenir de la choroïde, une couche de la paroi du globe oculaire juste derrière la rétine.^{94,95} Une meilleure oxygénation entrainerait ainsi une autorégulation et une constriction des vaisseaux ce qui permet de diminuer par exemple la formation d'œdèmes. De même, comme pour la vitrectomie, l'oxygénation plus importante réduit l'expression du

VEGF et donc aussi la néovascularisation. Cependant, cette méthode a des effets indésirables au niveau de l'acuité visuelle (contraste, vision des couleurs et vision nocturne amoindris mais aussi perte de la vision périphérique).⁹⁶

◆ *Injections rétinienne*

Dans les années 2000, des traitements anti-VEGF ont été développés comme le ranibizumab ou l'aflibercept pour lesquels des études cliniques ont été réalisées respectivement en 2006 et 2011. Ces produits sont injectés dans l'œil mais une seule injection n'est pas suffisante et il faut répéter cette opération à de nombreuses reprises. Ces traitements sont aussi très coûteux et certains patients ne répondent pas à ces derniers.

Une autre possibilité de traitement sont les corticostéroïdes (ou corticoïdes), utilisés depuis au moins les années 1950. Ces corticostéroïdes peuvent être de la cortisone, la dexaméthasone ou la prednisone.⁸⁹ Leur but est de contrôler l'inflammation intraoculaire et ainsi de lutter contre la formation d'œdèmes maculaires par exemple. De plus, certains patients résistant à des traitements anti-VEGF peuvent répondre positivement à des corticostéroïdes car ces derniers agissent sur de multiples cytokines inflammatoires. Cependant, des effets indésirables comme l'ostéoporose ou l'intolérance au glucose ont été observés.

D'autres systèmes ont été étudiés afin de freiner ou stopper le développement de la rétinopathie diabétique comme des vasoconstricteurs, des traitements contre l'hypertension, des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des antibiotiques, des immunosuppresseurs ... Mais bien que certains se montrent prometteurs, il n'existe pour l'instant pas de solution « parfaite ». Des scientifiques se sont donc tournés vers la thérapie génique, et une voie de recherche est basée sur l'expression d'un gène inhibiteur de l'angiogenèse. Le système Cre-LoxP est un des exemples de système d'expression de gènes les plus performants et particulièrement prometteur dans le cadre de traitements par thérapie génique.

III-1-b) Le système Cre-LoxP et ses modifications

III-1-b.1) Définition du système

Afin d'étudier par exemple la fonction d'un gène particulier chez la souris, des outils biologiques ont été mis en place et en particulier le système Cre-LoxP⁹⁷ au début des années 80. Sternberg N. et Hamilton D. ont décrit pour la première fois en 1981 une enzyme recombinante isolée d'un bactériophage P1 : l'enzyme Cre (pour « causes recombination »).⁹⁸ Cette enzyme cible des sites spécifiques de séquences d'ADN, les sites LoxP (locus of crossing over (x), P1). Le site LoxP comporte deux séquences palindromiques de 13 paires de bases qui sont séparées par une autre séquence de 8 paires de bases (Figure 55).⁹⁹

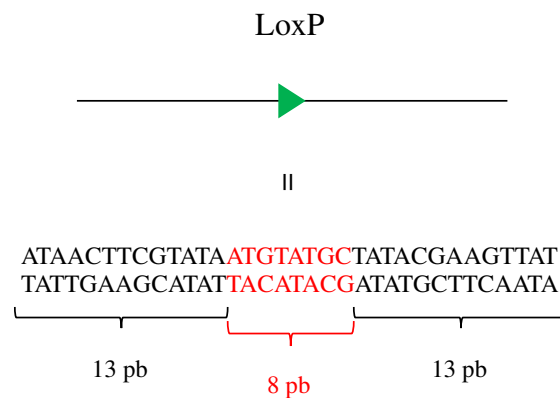


Figure 55 - Séquence des sites LoxP (avec pb = paire de bases).

Ces sites LoxP n'existent pas dans les génomes eucaryotes et il est donc possible de les y ajouter. La recombinase Cre va nécessiter deux de ces sites. Un gène d'intérêt va alors être flanqué de sites LoxP de part et d'autre ; on dit alors qu'il est « floqué » (les sites « Lox » sont « flanquants »). L'action de la recombinase va alors dépendre de leur localisation et de leur orientation dans la séquence d'ADN (Figure 56) :

- dans le cas où les sites LoxP ont la même orientation → délétion d'un gène (Figure 56.1),
- si les sites LoxP sont dans des sens opposés → le segment est inversé (Figure 56.2),
- si les sites LoxP sont sur deux molécules d'ADN → translocation (Figure 56.3).

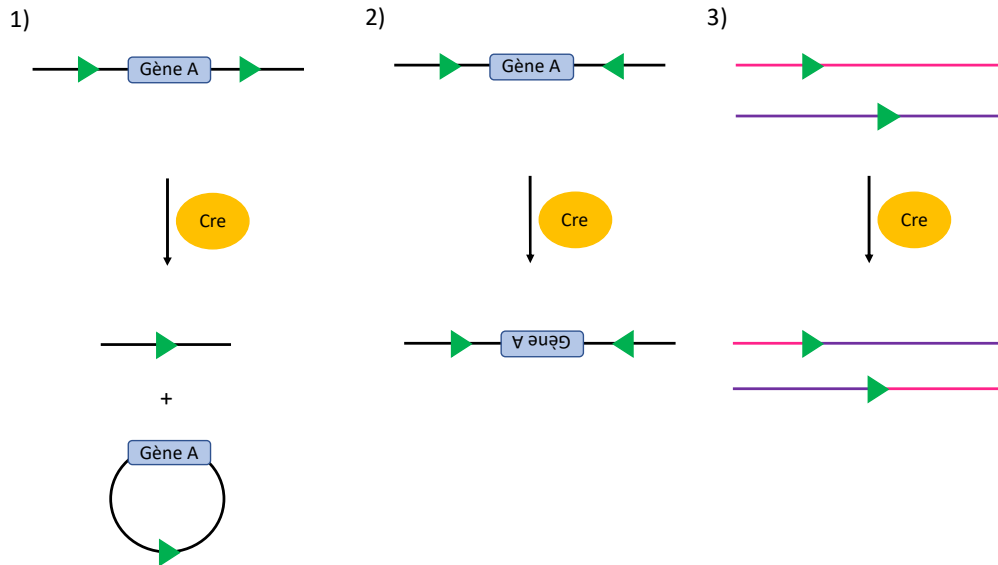


Figure 56- Les différentes actions de la recombinase Cre : 1) délétion d'un gène, 2) inversion, 3) translocation.

III-1-b.2) Application dans des lignées de souris

En premier lieu, il faut générer chez la souris un gène flanqué de deux LoxP par transgénèse. On croise alors cette lignée de souris avec une autre transgénique qui va exprimer l'enzyme Cre dans un tissu donné. Pour n'exprimer cette dernière que dans un tissu particulier, il est nécessaire qu'elle soit sous le contrôle d'un promoteur d'une protéine qui ne s'exprime que dans ce tissu cible. Le croisement des deux lignées va permettre d'obtenir des souris qui possèdent les séquences LoxP et le gène de la recombinase Cre. Ainsi, le gène d'intérêt ne sera exprimé que dans le tissu cible.

Un exemple d'application a été rapporté par Mao X. *et al.*¹⁰⁰ Un allèle rapporteur de EGFP (enhanced green fluorescent protein) est bloqué par un fragment « Stop » floxé (Figure 57). Ils l'ont implémenté sur le locus ROSA26 à partir de cellules souches embryonnaires. Ce locus est omniprésent chez la souris.

Ils ont ciblé l'expression de cette EGFP dans différents tissus. Par exemple, en utilisant le promoteur Lck (Lymphocyte protein tyrosine kinase), l'enzyme Cre n'est alors exprimée que dans certaines cellules immunitaires comme les thymocytes. Ainsi, après l'action recombinante de la Cre, ces cellules vont exprimer la EGFP et ainsi émettre un signal fluorescent.

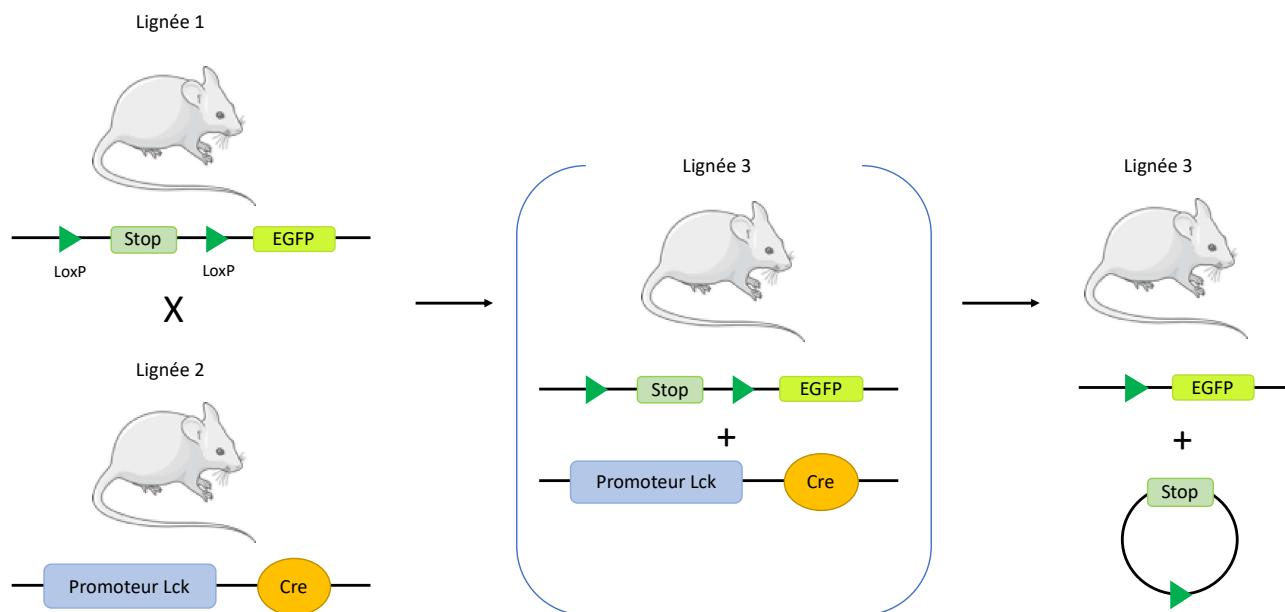


Figure 57 – La lignée 1 comporte la séquence Stop « floxée » bloquant l’expression du gène EGFP. Cette lignée est croisée avec une seconde qui comporte la recombinaise Cre uniquement dans des cellules immunitaires comme le thymocyte, grâce au promoteur Lck. Cela conduit à l’obtention d’une 3^{ème} lignée de souris avec ces séquences. L’enzyme va donc reconnaître les sites LoxP et fait une délétion, éliminant ainsi la séquence « stop ». Une nouvelle séquence est obtenue qui permet la transcription du gène EGFP et donc l’émission d’un signal fluorescent.

III-1-b.3) Modifications du système Cre-LoxP pour un meilleur contrôle temporel

Comme nous venons de le voir, il est possible de localiser l’expression de la Cre dans un tissu à l’aide de promoteurs et donc de cibler la recombinaison. Cependant, avec ce système, il n’est pas possible de contrôler la temporalité de ce processus. De nombreuses modifications ont donc été apportées afin d’y remédier.⁹⁷

◆ Cre-ER-LBD

Metzger D. *et al.* ont démontré que l’activité de la recombinaise Cre peut être contrôlée par l’estradiol (E2) quand elle est reliée à un LBD (ligand-binding domain), un domaine de liaison de ligands des récepteurs œstrogènes.¹⁰¹

La protéine Cre peut être séquestrée hors du noyau cellulaire par la protéine HSP90 (heat shock protein 90).⁹⁷ Cette protéine est fixée sur le système ER-LBD ce qui empêche ce dernier et les protéines reliées d’entrer dans le noyau (Figure 58). Mais lorsqu’une hormone comme l’œstrogène se lie à cet ER-LBD, l’interaction de ce dernier avec la protéine HSP90 est

perturbée et cela permet au système Cre-ER-LBD de rentrer dans le noyau. Cela rend donc possible l'interaction de la recombinaise Cre avec les sites LoxP.

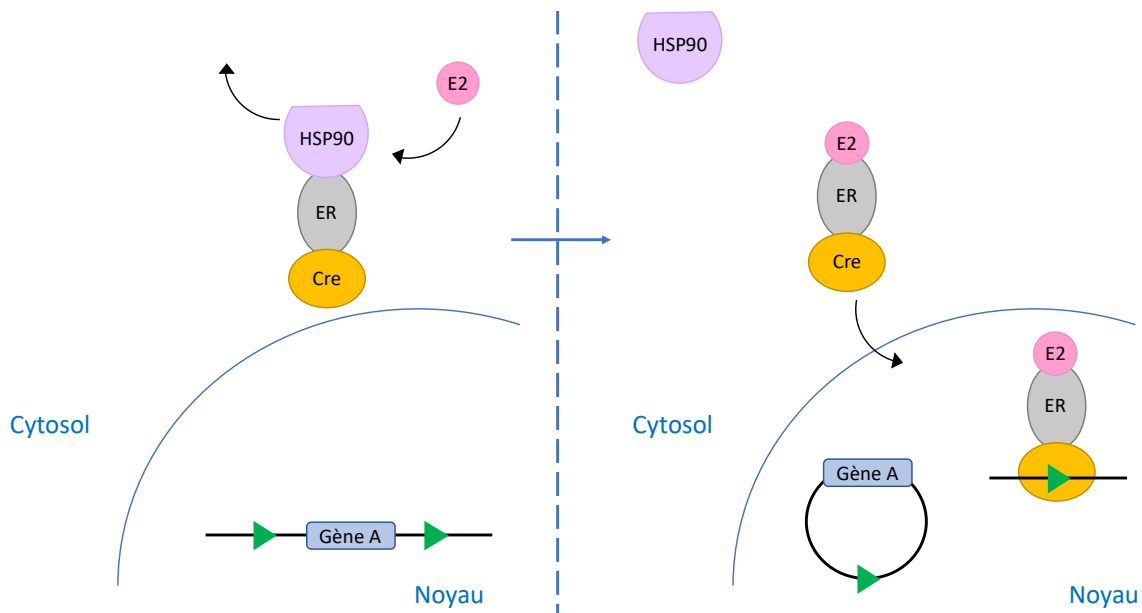


Figure 58 – Principe d'un système Cre-ER-LBD inducible par la présence d'estradiol (E2) : la protéine HSP90 empêche l'entrée de la Cre dans le noyau ; la présence d'estradiol va perturber l'interaction entre le récepteur estrogène et la HSP90 ce qui va entraîner l'internalisation de la Cre dans le noyau. La Cre peut alors effectuer une action recombinante par reconnaissance des sites LoxP.

Pour démontrer ce principe, Metzger D. *et al.* ont, à partir de cellules murines F9 (où la protéine Cre fusionnée au ER-LBD a été intégrée), appliqué de l'E2 pendant 48 h. La recombinaison a été effective entre 30 et 85 %. Cependant, Metzger D. *et al.* expliquent que ce système ER-LBD n'est pas le meilleur domaine inducible par un ligand à utiliser dans les souris car l'œstrogène est présente de manière endogène chez elles. Ils émettent alors l'hypothèse qu'il serait possible de concevoir des LBD mutants qui ne pourraient répondre qu'à des ligands de synthèse comme le 4-hydroxytamoxifène (OHT) et non pas à des ligands endogènes.

◆ Cre-ER^T

La modification suivante a donc été de créer un nouveau système d'expression de gène uniquement inducible en présence d'un composé de synthèse : le tamoxifène.

Ainsi, Feil R. *et al.* ont lié à nouveau la recombinaise Cre à un LBD mais cette fois-ci à un mutant du précédent ER-LBD ;¹⁰² la mutation G521R effectuée sur le récepteur consistait à remplacer la glycine 521 par une arginine. Cet ER-LBD mutant ne se lie pas à l'estradiol (E2) mais aux

ligands synthétiques comme le tamoxifène ou le 4-hydroxytamoxifène (OHT). La protéine chimérique a donc été nommée Cre-ER^T car elle n'est activée que par le tamoxifène et non par l'estradiol.

Il est donc possible de contrôler la temporalité du processus par injection de tamoxifène.

III-1-c) Genèse du projet

Néanmoins, pour être complètement performant dans le cas d'une pathologie rétinienne, l'activation ciblée par la lumière est une application biomédicale des GPPs extrêmement attrayante. En effet, les modifications apportées au système Cre-LoxP ont permis d'exprimer des gènes dans des tissus cibles. Cependant, notre projet a pour but de rendre ce système photoactivable afin d'avoir une meilleure précision spatio-temporelle au sein d'un tissu. Cela nous permettrait de cibler encore plus l'action au sein d'un tissu et nous souhaitons démontrer qu'il serait possible d'exprimer un futur gène « médicament » comme des protéines inhibitrices de l'angiogenèse.

Néanmoins, les systèmes existants cités précédemment, contrôlés par la libération de tamoxifène ou d'hydroxytamoxifène, ne peuvent pas être utilisés car ces molécules se dégradent à la lumière. En effet, seul l'isomère *trans* du tamoxifène est actif.¹⁰³ Or, sous l'action d'une irradiation UV, le tamoxifène peut s'isomériser en le stéréoisomère *cis* (**B**, inactif) puis cycliser pour former le dérivé phénanthrène **D** ou alors directement effectuer une cyclisation et former le dérivé **C** (Schéma 38). Dans tous les cas, ces deux phénanthrènes sont inactifs envers le système Cre-ER^T.

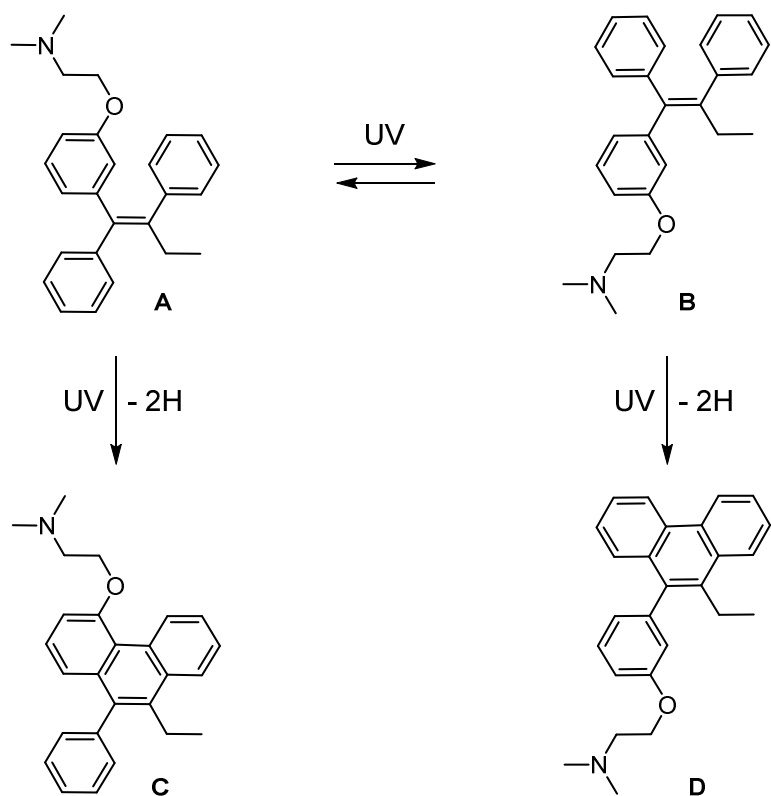


Schéma 38 - Les différents produits après photodégradation du tamoxifène, reproduit à partir de Šalamoun J. et al. ¹⁰³

De plus, coupler un GPP au tamoxifène requiert d'importants efforts de synthèse et est relativement coûteux. Ainsi, l'équipe de Jullien L. a développé un nouveau ligand synthétique similaire au tamoxifène, le 4-hydroxycyclofène, qui ne peut pas s'isomériser ni se dégrader sous l'action de la lumière (Schéma 39).¹⁰⁴ Ce composé est facilement synthétisable en deux étapes à partir de la 4,4'-hydroxybenzophénone.

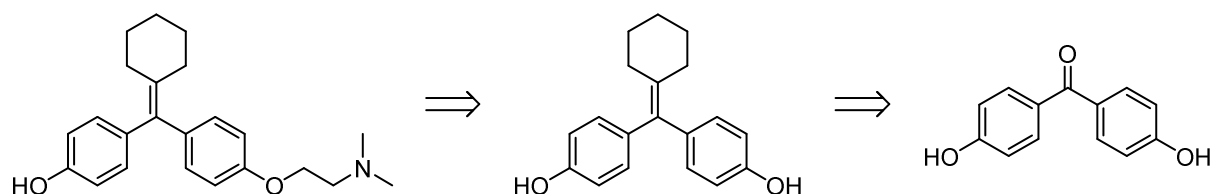


Schéma 39 - Rétrosynthèse du 4-hydroxycyclofène (gauche) à partir de la 4,4'-hydroxybenzophénone (droite).¹⁰⁴

Ce même groupe a ensuite induit par photoactivation l'expression d'une protéine fluorescente rouge (la DsRed) dans des embryons de poissons-zèbres, en utilisant l'hydroxycyclofène cagé.¹⁰⁵

Cependant, l'équipe de Cambridge S., avec qui nous collaborons sur ce projet a testé ce système sur d'autres organes et il semblerait que l'hydroxycyclofène ne soit pas applicable sur

tous les tissus. Ces derniers ont donc testé une bibliothèque d'analogues d'œstrone et ils ont découvert qu'un dérivé d'œstrone synthétique, le 17 α -éthynylestradiol (EE2), était capable d'activer le système Cre-ER^{T2} de façon similaire au tamoxifène (Figure 59).

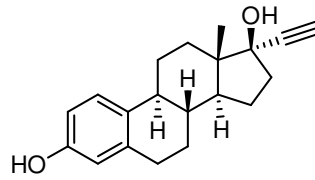


Figure 59 - Structure de l'EE2.

Ils ont d'abord comparé l'EE2 au tamoxifène *in vitro*, sur des cellules d'hippocampes transfectées du système Cre-ER^{T2} et de plasmides de GFP « floxés » (Figure 60). Deux concentrations ont été testées et le nombre de cellules montrant de la fluorescence est compté. Ainsi, l'EE2 active le système Cre-ER^{T2} de façon similaire au tamoxifène.

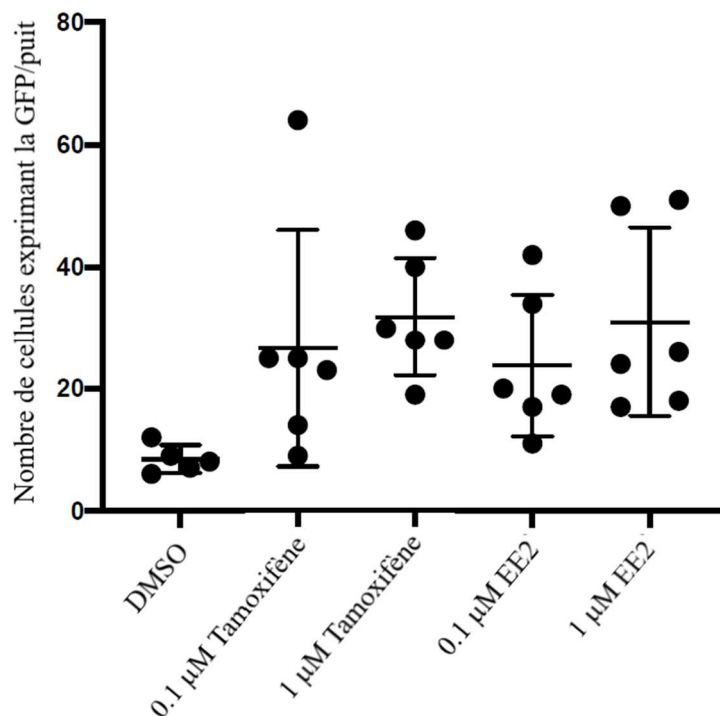


Figure 60 - Expériences *in vitro* sur cellules hippocampiques transfectées avec le système Cre-ER^{T2} et la GFP floxée (one way ANOVA).

Les deux molécules ont ensuite été appliquées *ex-vivo* sur des tranches d'hippocampes prélevées sur des chiots de deux jours (Figure 61). Cette fois-ci, c'est le gène de la tdTomato (protéine fluorescente rouge) qui a été floxé.

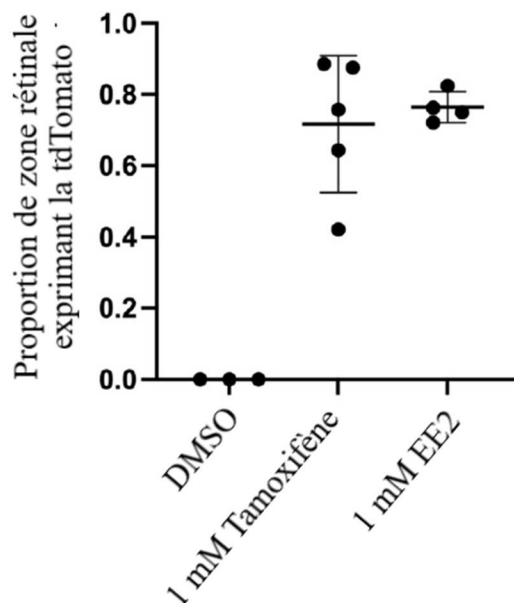


Figure 61 - Expériences ex-vivo sur des tranches d'hippocampes de chiots avec le système Cre-ER^{T2} (promu par la GFAP) et la protéine fluorescente tdTomato floxée (one way ANOVA) ; 1µL dans 1 mL de milieu et 6 jours d'incubation.

Ici aussi les résultats montrent une activation similaire par les deux molécules et il est donc établi que l'EE2 permet bien l'expression du gène fluorescent tdTomato sur des tranches d'hippocampes.

III-2) Synthèse et modifications de GPPs pour l'activation ciblée par la lumière du système Cre-ER^{T2}

III-2-a) Validation de la méthode de photolibération

L'idée est donc de rendre le système photoactivable. Or, pour des questions de réglementation, il n'est pas possible d'utiliser des irradiations inférieures à 450 nm.

Ainsi, nous avons décidé de travailler sur la coumarine décrite par Lin Q. *et al.* car la longueur maximale d'absorbance est de l'ordre de 446 nm.⁵⁹ Les premières étapes de synthèse pour l'obtention plus rapide de **6** ont été décrites au chapitre II (Schéma 18). Une fois l'alcool **6** obtenu, nous avons souhaité le coupler à un marqueur fluorescent, le 1,3-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyl-2(9H)-acridinone (DDAO) **38**, afin de mettre en place le système d'irradiation avec un ophtalmoscope qui sera utilisé par la suite lors d'expériences *in vivo* sur un modèle murin (Figure 62).

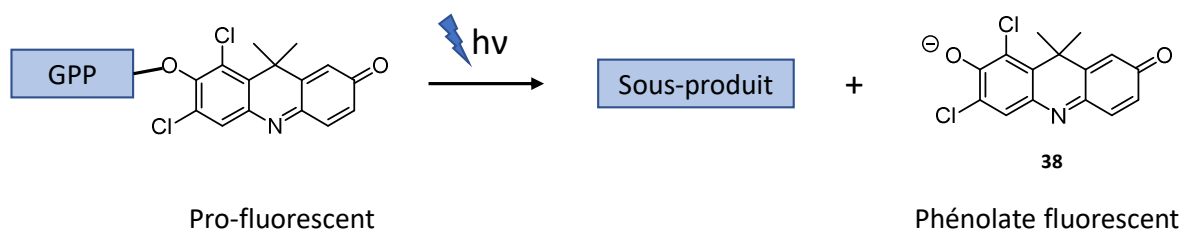


Figure 62 - Principe de photolibération de DDAO, composé fluorescent sous sa forme phénolate.

En effet, le DDAO est un fluorophore qui a la particularité d'émettre de la fluorescence rouge lorsqu'il est sous sa forme phénolate.¹⁰⁶ Cette forme phénolate est obtenue à pH physiologique, ce qui en fait un outil de choix pour permettre de valider notre méthode de photolibération dans l'œil.

La coumarine **6** a donc été liée au DDAO *via* une réaction de Mitsunobu en présence de DIAD et de triphénylphosphine (Schéma 40). Cependant, il a été difficile de purifier **39** à cause de sa trop grande photosensibilité. En effet, bien qu'ayant pris le maximum de précautions, nous avons obtenu un lot comportant tout de même 5 % de DDAO libéré.

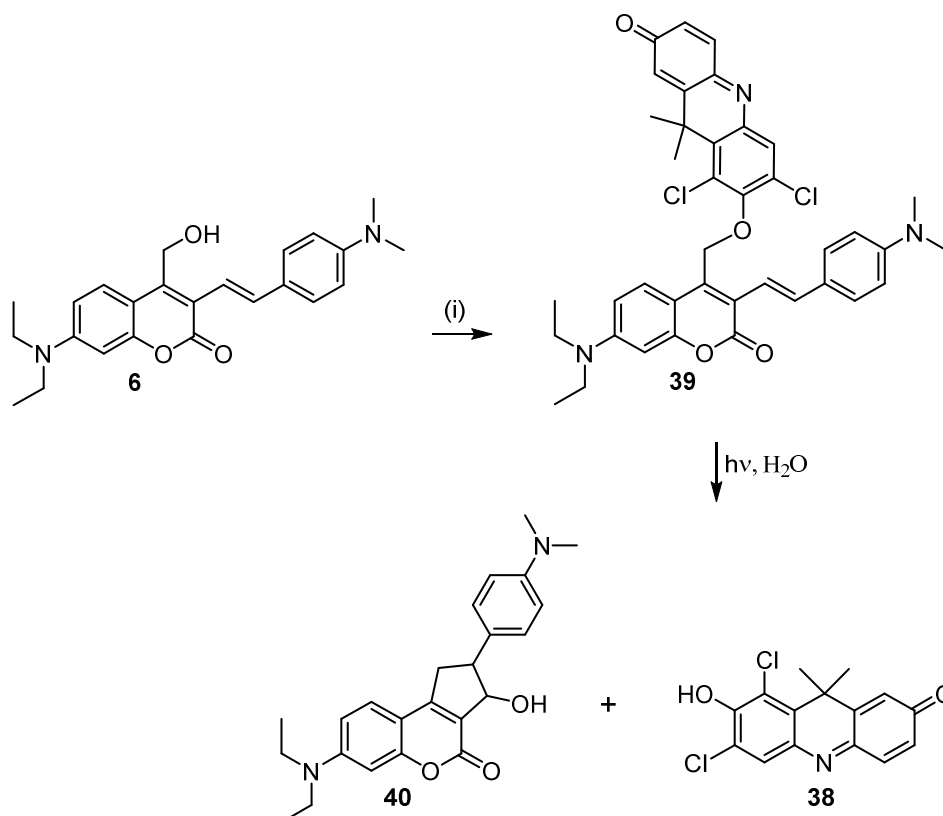


Schéma 40- Synthèse du GGP **6** lié au DDAO et sa photolyse : (i) DDAO **38**, PPh₃, DIAD, toluène, TA, 48 h.

Ce produit a tout de même été envoyé à nos collaborateurs pour qu'ils puissent mettre en place les instruments pour des expériences *in vivo* et notamment le système d'irradiation à l'aide d'un ophtalmoscope.

En parallèle, nous avons essayé de coupler ce GPP à de l'œstrone en faisant réagir l'alcool **6** avec du MsCl en présence de triéthylamine afin de former l'intermédiaire **41** (Schéma 41). Cet intermédiaire a ensuite été directement engagé dans la réaction suivante avec l'œstrone en présence de K₂CO₃.

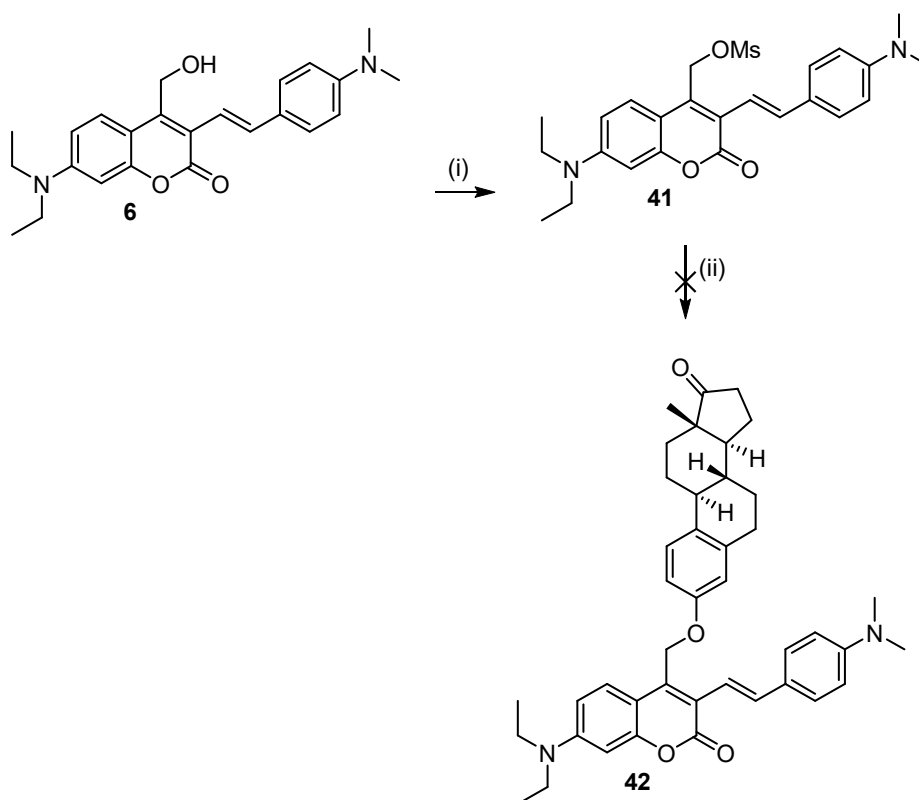


Schéma 41 – Essai de synthèse du composé **42** : (i) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, -5 °C, 2 h ; (ii) œstrone, K₂CO₃, DMF, 0 °C à TA, 7 h, 80 °C, 2 jours.

Cependant, malgré la détection du produit souhaité dans nos analyses, il était clair que le produit obtenu présentait également une trop grande sensibilité à la lumière.

Ces deux couplages ont donc montré que les liaisons de type éther de phénol étaient trop réactives à la lumière et donc cela induisait une trop grande instabilité des molécules pour envisager d'utiliser ce type de lien entre le GPP et les phénols cibles pour des applications *in vivo*.

III-2-b) Modification du GPP pour plus de photostabilité : introduction d'un bras espaceur auto-immolable.

Au vu de cette trop grande photoréactivité, nous avons envisagé l'utilisation de bras espaceurs auto-immolables (Figure 63).¹⁰⁷

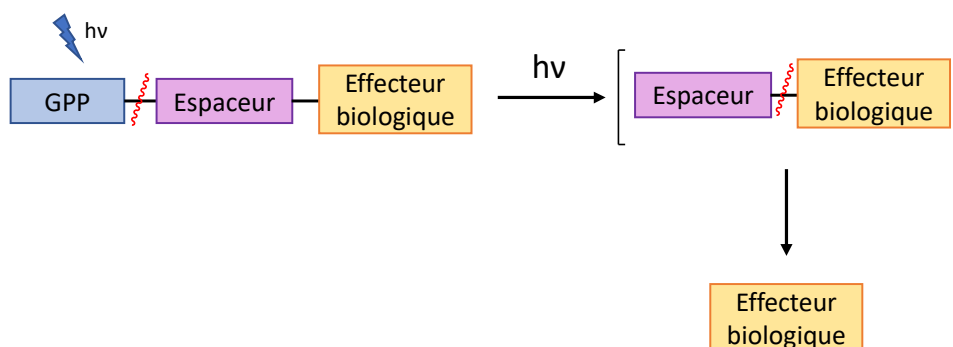


Figure 63 - Principe de fonctionnement du bras espaceur auto-immolable.

Dans un premier temps, une irradiation lumineuse va permettre de rompre la liaison entre le GPP et l'espaceur, puis le second processus implique une cyclisation intramoléculaire qui va permettre de libérer la molécule d'intérêt.

Nous nous sommes tournés vers des bras espaceurs de type dicarbamate afin d'éviter tout risque d'hydrolyses en milieu physiologique (Schéma 42). Dans un premier temps, il est nécessaire d'activer l'alcool benzylique de la coumarine **6** en introduisant un groupement partant de type carbonate de nitrophényle, conduisant à la molécule **43** avec 51 % de rendement. Ensuite, ce groupement partant est substitué par le bras espaceur auto-immolable, la *N,N'*-diméthyléthylènediamine, pour obtenir le composé **44** avec environ 33 % de rendement estimé (le produit a été purifié par chromatographie sur silice mais il était particulièrement instable et a donc été utilisé sans purification supplémentaire). L'amine en bout du bras espaceur a été mis à réagir avec du triphosgène pour conduire à la formation d'un isocyanate qui a ensuite directement réagi avec la fonction alcool de l'EE2 pour obtenir le produit visé **45** avec 61 % de rendement.

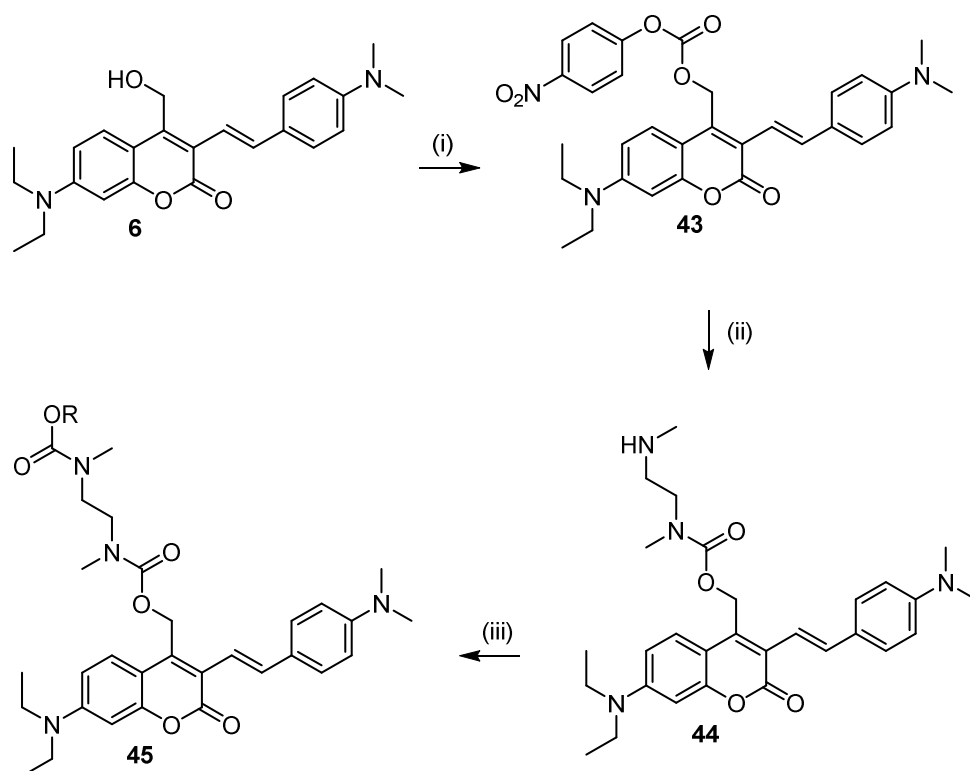


Schéma 42 - Introduction du bras espaceur auto-immolable et formation du composé **45** (R= EE2) ; (i) carbonate de para-nitrophényle, DIPEA, DMF, 20 °C, 16 h, 51 % ; (ii) N,N'-diméthyléthylènediamine, DIPEA, DMAP, THF, 20 °C, 4 h, 33 % (estimé) ; (iii) triphosgène, DIPEA, THF, 20 °C, 1 h, puis EE2, DIPEA, DMAP, THF, 20 °C, 30 h, 61 %.

Sous l'action de la lumière, la liaison C-O va se rompre puis l'acide carbamique résultant se décarboxyle spontanément (Schéma 43). L'amine libérée va ensuite réagir sur le second lien carbamate *via* une 5-*exo-trig*, conduisant à une cyclisation et libérant l'effecteur biologique après élimination.

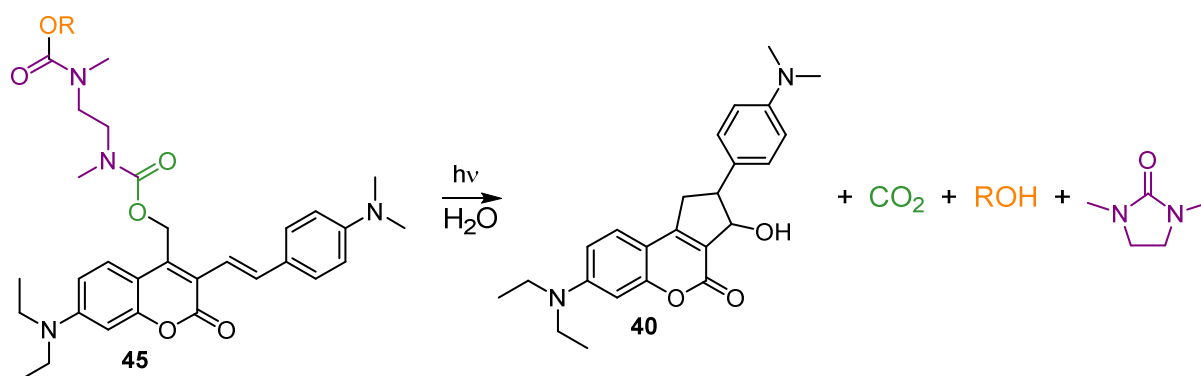


Schéma 43 - Produits de photolyse attendus après irradiation de **45**.

Le mécanisme de photolyse de ce type de coumarine et son réarrangement pour conduire au composé **40** a été proposé par Lin Q. *et al.* (Schéma 44).⁵⁹ Après rupture de la liaison C-O, un carbocation stabilisé est formé, puis la double-liaison de la coumarine s'isomérise suivi d'une

cyclisation pour conduire à l'obtention d'un cycle à 5 atomes de carbone. Enfin, l'addition nucléophile d'une molécule d'eau sur le site carbocationique mène à la formation du sous-produit de photolyse **40**.

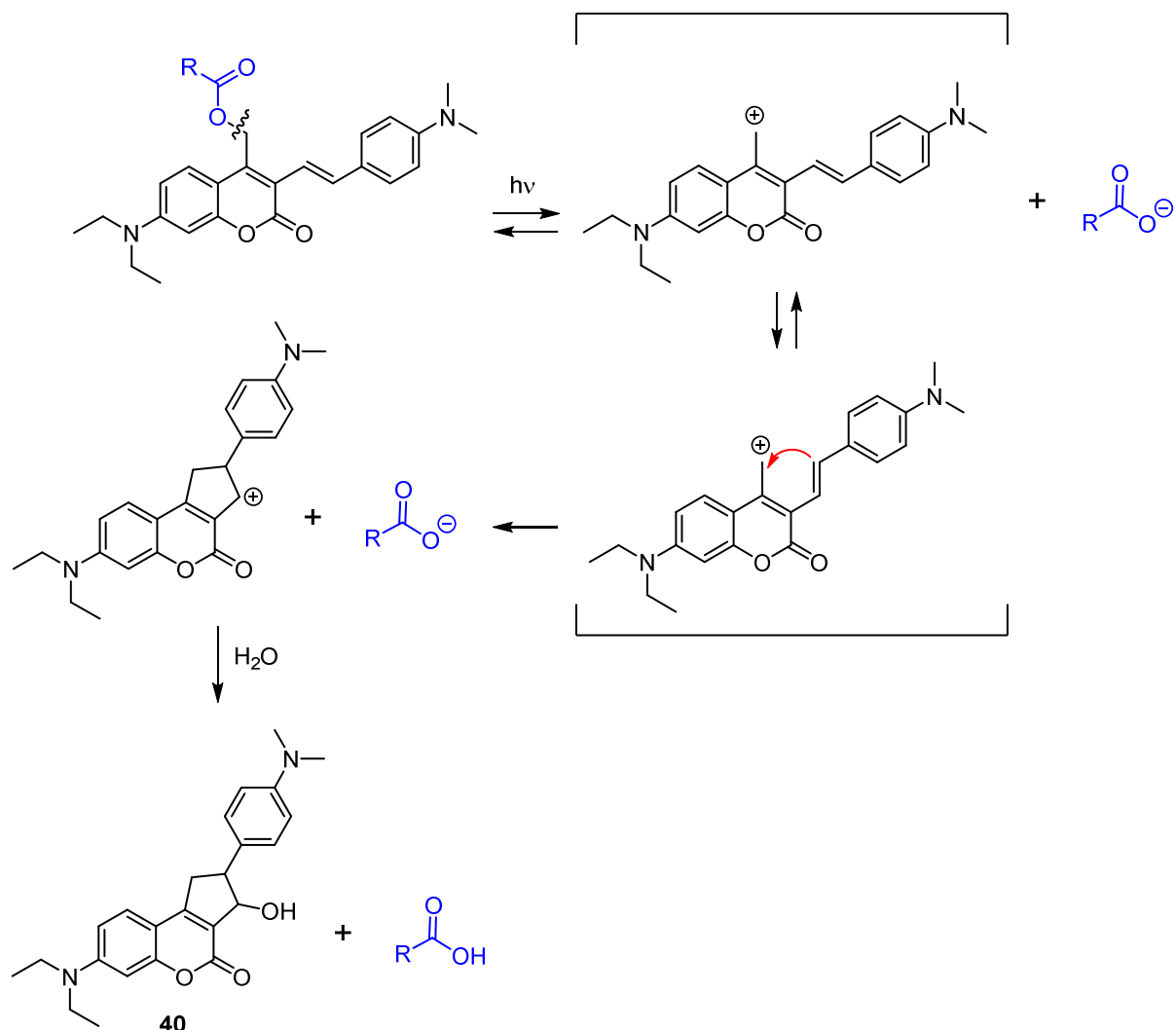


Schéma 44 - Mécanisme de photolyse du GPP à base de coumarine proposé par Lin Q. et al.⁵⁹

Cependant, il est aussi possible que d'autres sous-produits de photolyse soient obtenus si par exemple une autre molécule que de l'eau joue le rôle de nucléophile. A la fin de la synthèse du composé **45**, nous nous sommes rendu compte de la plus grande photostabilité de ce composé par rapport au composé **39** décrit précédemment (Schéma 40). Le suivi UV-visible de la photolyse de **45** a révélé la présence de points isobestiques, ce qui indique une photolyse sélective et homogène (Figure 64).

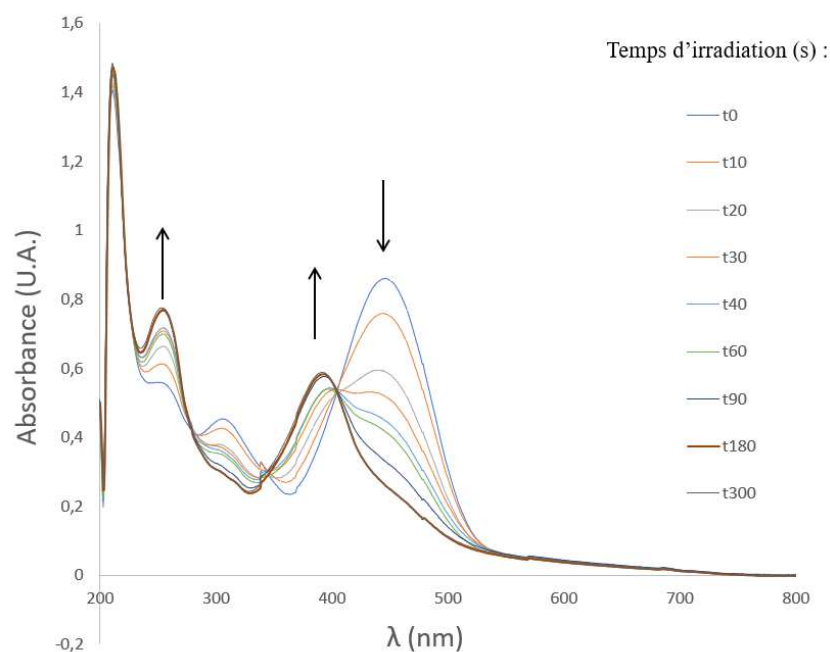


Figure 64 – Suivi UV-visible de la photolyse de **45** conduisant au composé **40** et à la libération de l'EE2 après irradiation à 430 nm (dans un mélange 1:1 en volume de MeOH/PBS).

Le rendement quantique de **45**, évalué en comparaison avec la référence **10** (Figure 65), atteint la valeur de 0.13.

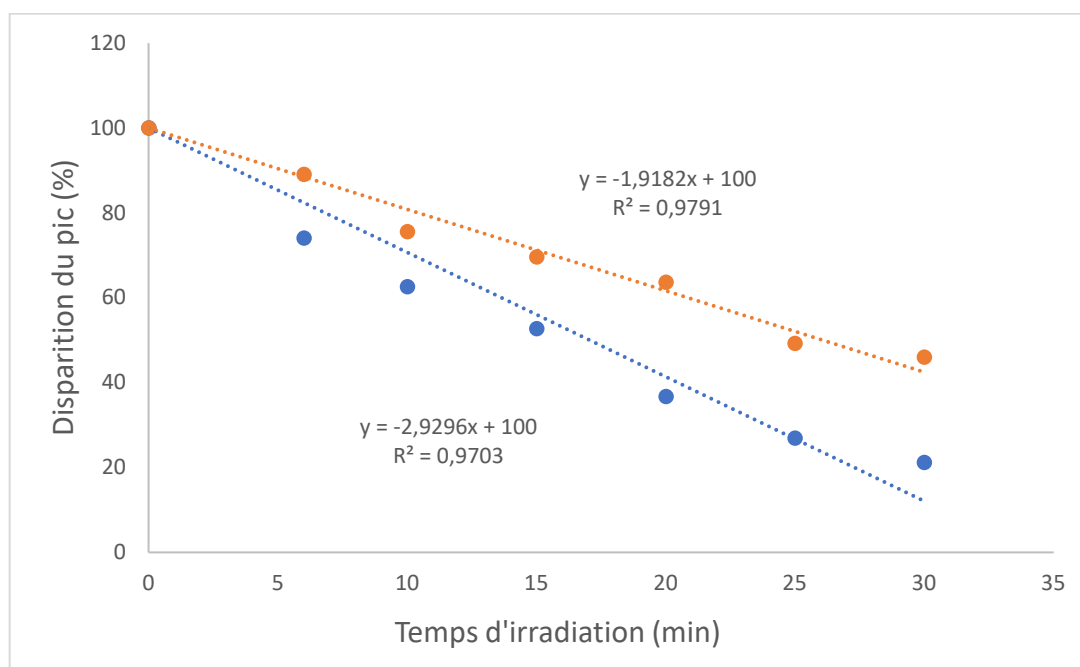


Figure 65 - Détermination du rendement quantique à 1 photon du composé **45** (orange) en comparaison à la référence **10** (bleu) par irradiation à 430 nm (solutions à 23 μ M dans MeOH/H₂O).

Nous avons aussi suivi par HPLC la libération de l'EE2 (Figure 66). Ainsi, cette figure montre clairement la diminution de l'aire du pic correspondant à la coumarine **45** après une irradiation de 300 secondes à 430 nm.

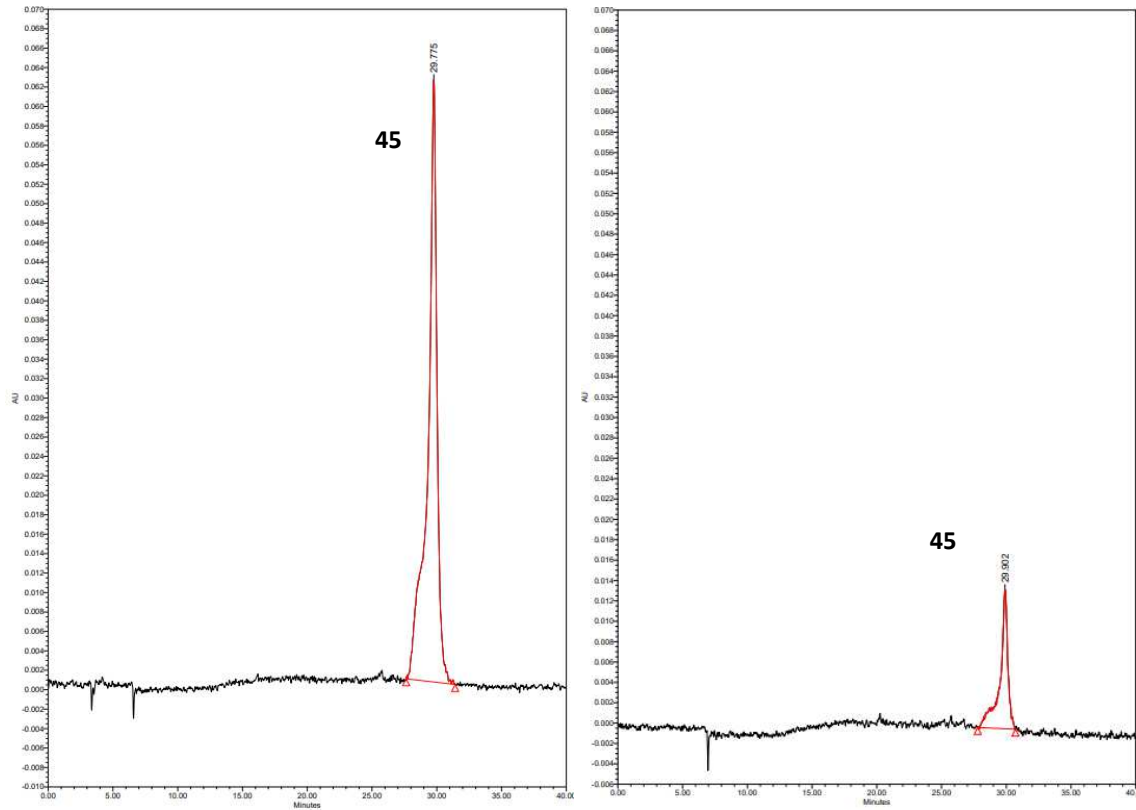


Figure 66 - Analyse HPLC sur phase inverse avec détection à 450 nm ; à gauche, un échantillon non irradié (t_0) montrant le composé **45** et à droite, un échantillon irradié pendant 300 secondes montrant une photolyse quasi-totale (t_{300}).

De plus, la Figure 67 montre bien la libération de l'EE2 qui est visible à 280 nm.

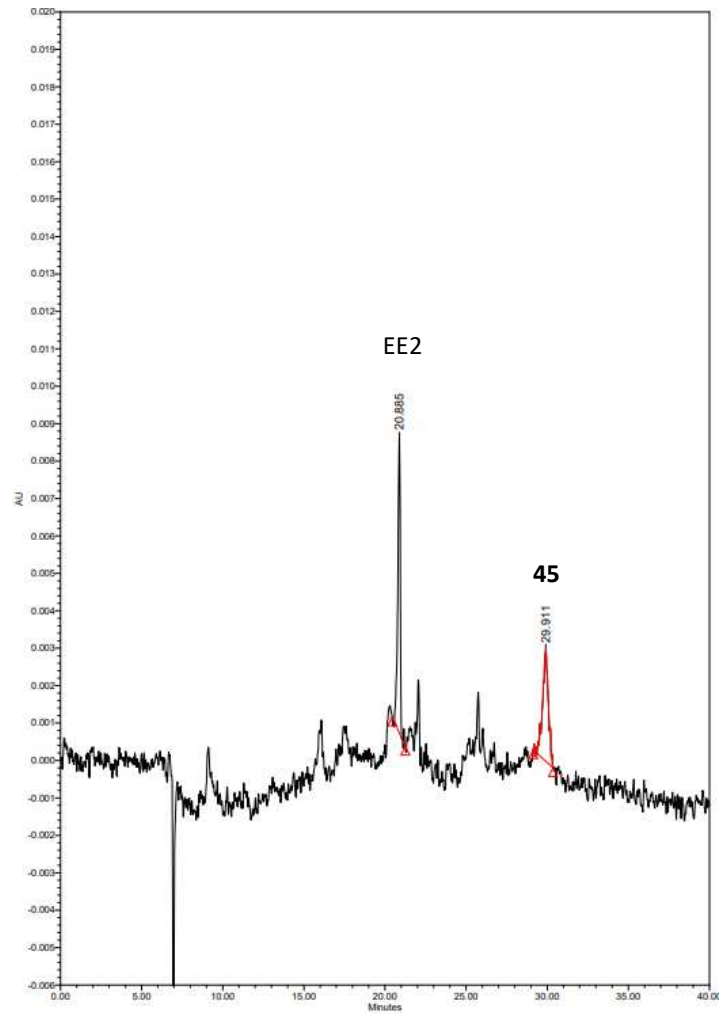


Figure 67 - Analyse HPLC de l'échantillon irradié à 430 nm pendant 300 secondes avec détection à 280 nm montrant la libération de l'EE2 à 20.8 min et un résidu de coumarine 45 à 29.9 min.

Enfin, comme nous l'avons suggéré précédemment, nous pensons qu'il n'existe pas un seul sous-produit coumarinique de photolyse. La Figure 68 montre que deux sous-produits sont formés avec des spectres d'absorption proches (Figure 69). Il est ainsi possible que du méthanol utilisé dans le mélange de solvant pour la photolyse, réagisse avec le carbocation, formant un second sous-produit avec un temps de rétention différent.

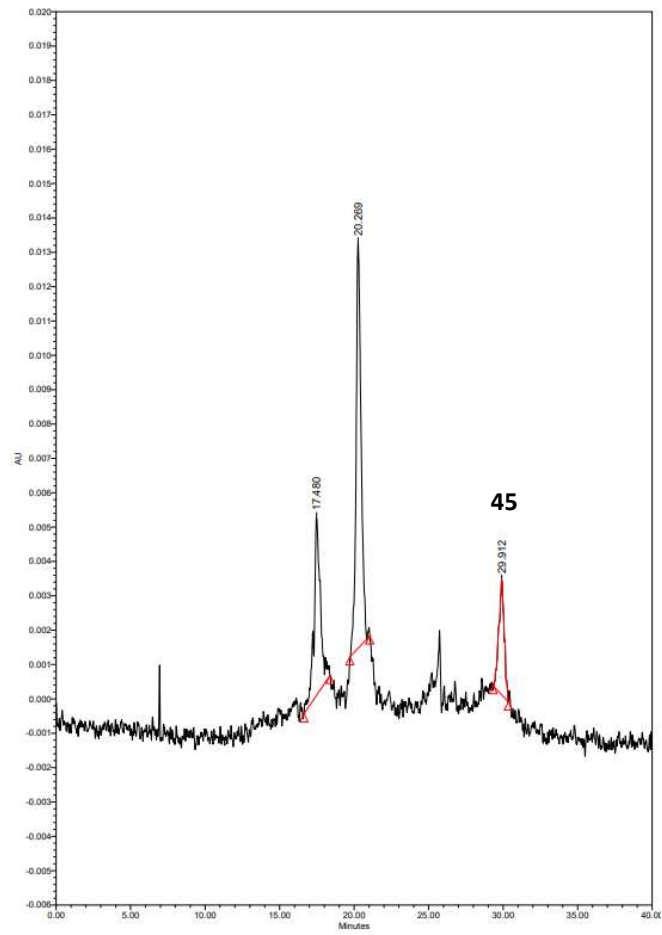


Figure 68 – Analyse HPLC à 380 nm : les deux premiers pics à 17.4 et 20.2 min étant des sous-produits coumariniques de photolyse, le 3^{ème} pic à 29.9 min correspond à une quantité restante de coumarine **45**.

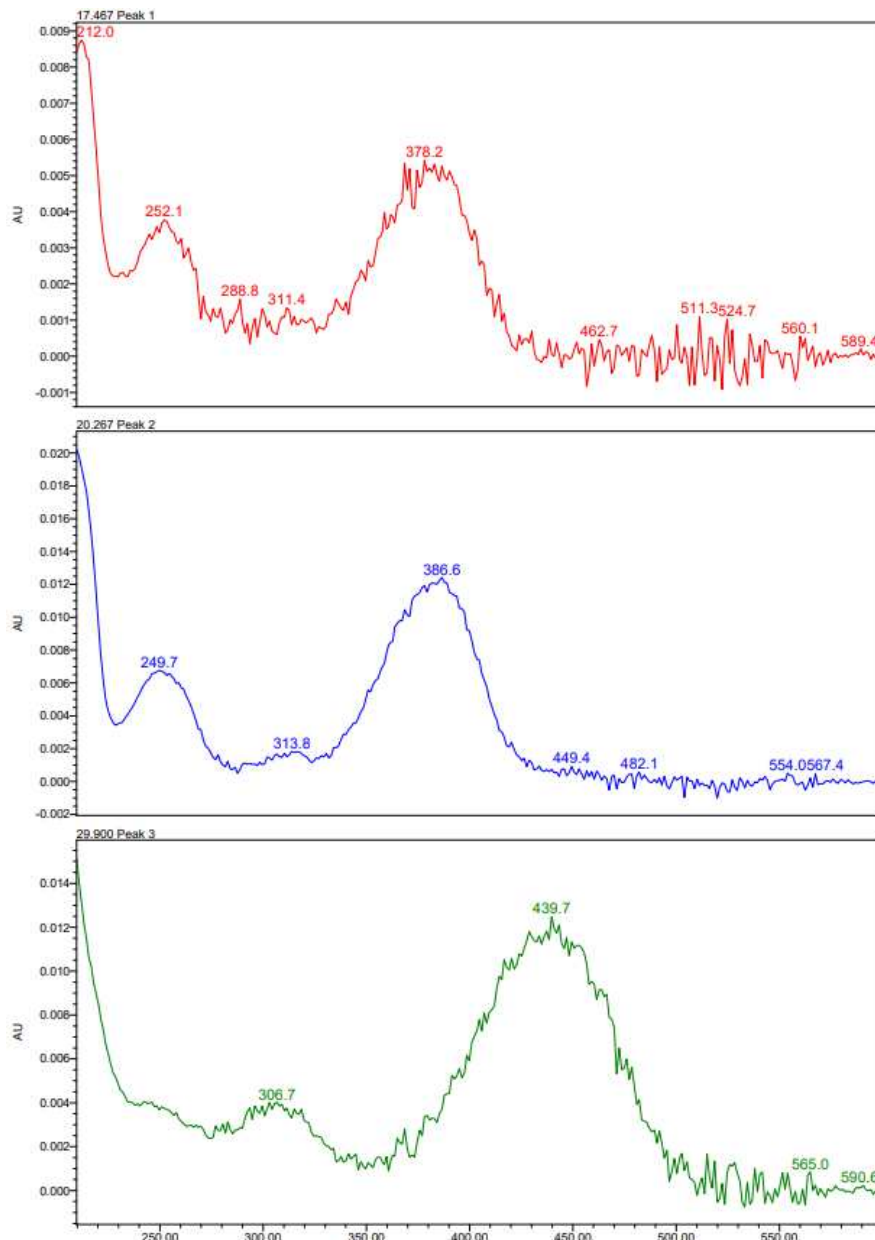


Figure 69 – Spectres d'absorption extraits des pics obtenus en HPLC ; les deux premiers pics correspondent aux sous-produits de photolyse et le 3^{ème} au composé **45** de départ.

Ce composé **45** a donc été envoyé à nos collaborateurs pour être évalué. Des souris mutantes, comportant le système Cre-ER^{T2} dans certains tissus comme la rétine grâce au promoteur GFAP, ont été utilisées. De plus, un gène d'une protéine fluorescente, la tdTomato, a été floxé.

Ensuite, une injection intravitréenne a été effectuée avec l'EE2 cagé. L'équipe de Cambridge S. a donc observé la rétine de ces souris sans irradiation, avec une irradiation globale de tout l'œil ou alors avec une irradiation focalisée sur une partie de la rétine. Les résultats présentés

dans la Figure 70 nous ont été rapportés. Ainsi, nous observons bien une fluorescence après irradiation de l'œil de souris, ce qui signifie que la photolibération de l'EE2 a permis l'activation du système Cre-ER^{T2} et donc l'expression du gène fluorescent.

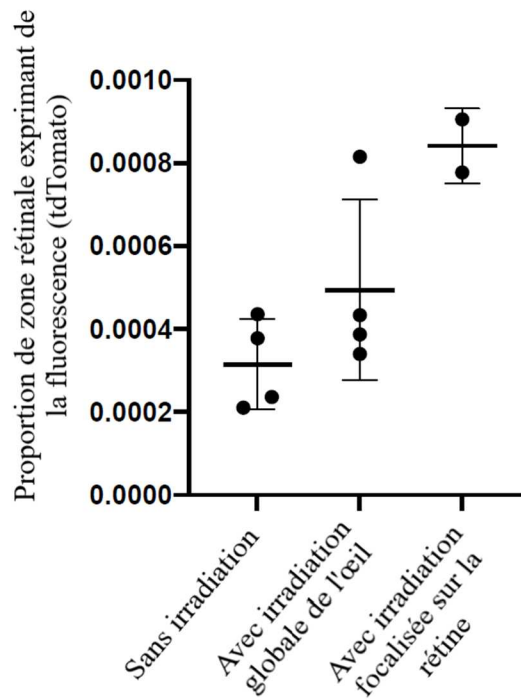


Figure 70 - Expériences *in vivo* sur l'œil de souris comportant le système Cre-ERT2 (promu par la GFAP) et la tdTomato floxée montrant les effets selon les conditions d'irradiation (one way ANOVA).

III-3) Conclusion du chapitre

En conclusion de ces résultats, nous avons pu synthétiser un GPP lié à un effecteur biologique d'intérêt, l'EE2, grâce à un bras espaceur auto-immolable qui lui a conféré plus de photostabilité. Nos collaborateurs ont ensuite utilisé ce système afin d'activer le système Cre-ER^{T2} et exprimer *in vivo* une protéine fluorescente rouge dans la rétine de souris. Cette preuve de concept permet d'envisager l'expression d'un gène « médicament » contrôlée par la lumière, par exemple des protéines inhibitrices de l'angiogenèse, et donc d'obtenir un traitement curatif de différentes pathologies oculaires liées au diabète ou la DMLA.

Chapitre IV : libération photo-induite de principes actifs à l'aide de nanovecteurs à conversion ascendante de photons

IV – 1) L' « upconversion », un processus anti-Stokes prometteur

Comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre introductif, de nombreux travaux de recherche récents visent à développer des outils permettant la libération d'effecteurs biologiques *in vivo* de manière spatio-, tempo-contrôlée et non invasive. En effet, en général, la distribution de l'effecteur biologique se fait indistinctement dans tout le corps, dans les organes ou tissus sains et malades.¹⁰⁸ Il est donc nécessaire de contrôler la concentration, la localisation et la cinétique de libération de l'effecteur biologique pour à terme avoir une meilleure biodisponibilité et moins d'effets secondaires.

Comme déjà mentionné, l'utilisation de la lumière comme stimulus est donc très intéressante et les groupements protecteurs photolabiles (GPPs) sont une excellente piste de recherche. Cependant, comme nous l'avons vu dans l'introduction, la photolyse de la plupart des GPPs nécessite des longueurs d'onde de l'UV-visible qui sont inappropriées pour une application *in vivo*. Comme l'utilisation de l'irradiation à 2 photons n'est effective qu'au point focal du laser pulsé, un autre moyen de délivrance est envisagé dans cette partie, à savoir l'utilisation de nanoparticules à conversion ascendante de photons. En effet, en combinant les énergies de plusieurs photons, la lumière incidente est convertie en une émission de plus grande énergie. Il est ainsi possible de convertir des rayonnements de longueurs d'onde dans le rouge ou NIR en des longueurs d'onde dans le bleu.

IV-1-a) Le phénomène d' « upconversion » ou conversion ascendante de photons

IV-1-a.1) Découverte du phénomène

C'est le Français Auzel F. E. qui, en 1966 lors d'études sur du verre dopé aux ions Yb^{3+} et Er^{3+} , a démontré qu'un transfert d'énergie pouvait être possible entre des états excités.¹⁰⁹ En travaillant sur ce couple Yb^{3+} - Er^{3+} , il a observé une émission de lumière verte à partir d'une excitation IR. Il a observé de manière similaire une émission dans le bleu à partir de matériaux dopés avec des ions Yb^{3+} et Tm^{3+} . Il a ainsi montré qu'en irradiant ce type de matériaux, il est possible que l'énergie des photons absorbés puisse être plus faible que l'énergie des photons

émis, contredisant la loi de Stokes. En réalité, la loi n'est pas vraiment contredite puisque deux photons ou plus sont responsables de l'émission d'un photon de plus haute énergie. L'« upconversion » est donc un exemple de processus dit « anti-Stokes ». Ces expériences ont ainsi confirmé l'hypothèse émise dès 1959 par Bloembergen N., hypothèse qui lui a d'ailleurs permis d'être co-lauréat du Prix Nobel de Physique en 1981.¹¹⁰ Suite à ces travaux, il est donc établi qu'un transfert d'énergie est possible entre deux ions (en particulier de terres rares) à l'état excité, alors qu'avant les années 60, il était communément admis que les transferts d'énergie s'effectuaient d'un ion dans son état excité vers un autre dans son état fondamental. On définit alors les termes de sensibilisateur pour l'entité qui reçoit la lumière NIR et accepteur (émetteur ou encore activateur) pour l'entité qui va émettre.

IV-1-a.2) Les différents mécanismes d'« upconversion »

Il y a en réalité deux types de processus d'« upconversion »¹¹¹ :

- l'émission de photoluminescence par « upconversion » des ions lanthanides comme Er^{3+} , Ho^{3+} , Tm^{3+} ...
- l'« upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet.

◆ *Le cas des lanthanides*

Les travaux d'Auzel F. E. ont donc ouvert la voie du premier processus avec ses matrices cristallines comportant les ions Er^{3+} et Yb^{3+} . Les lanthanides ont été utilisés comme sensibilisateurs et accepteurs car ils ont d'abondantes configurations électroniques 4f et ces niveaux d'énergie ont des durées de vie assez longues (de l'ordre de la ms).

Les ions trivalents de terres rares les plus utilisés pour l'« upconversion » sont Pr^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} car leur configuration 4fⁿ a des niveaux intermédiaires métastables qui peuvent être remplis par absorption de photons NIR.¹¹² A noter qu' Yb^{3+} est souvent utilisé car cet ion a une forte absorption dans les IR et a une efficacité de transfert d'énergie importante envers d'autres ions de terres rares comme Pr^{3+} ou Er^{3+} .

Il existe de nombreux mécanismes d' « upconversion » des ions lanthanides mais 3 grands types se démarquent, à savoir : ¹¹²

- l'absorption à l'état excité (ESA),
- l' « upconversion » par transfert d'énergie (ET),
- l'avalanche de photons (PA).

Le premier type de mécanisme, l'ESA, consiste en l'absorption successive de deux photons par l'accepteur (Figure 71). Celui-ci absorbe un premier photon pour atteindre un niveau excité métastable qui lui-même absorbe un second photon pour atteindre un état encore plus excité. Cependant, pour la plupart des ions de terres rares, une limitation importante est qu'il faudrait deux lasers incidents pour réaliser ces deux excitations successives, un résonant avec la première transition et le second avec la deuxième transition.¹¹² Une autre limitation de ce mécanisme est qu'il faut travailler avec une faible concentration de ces ions pour éviter les pertes par transfert entre deux ions.

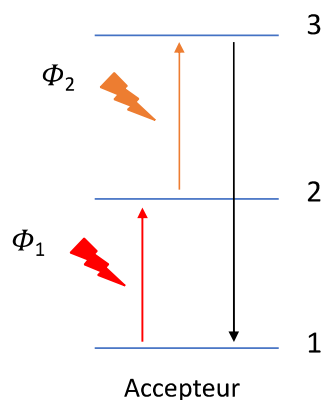


Figure 71 - Principe de fonctionnement de l'ESA, adapté de Joubert M.-F.¹¹²

L' « upconversion » par transfert d'énergie regroupe de nombreux processus comme le transfert d'énergie suivi d'une absorption de photon à l'état excité, les transferts d'énergie successifs, l' « upconversion » par relaxation croisée, la sensibilisation coopérative, la luminescence coopérative (Figure 72) ... L'ensemble de ces processus nécessite la présence de sensibilisateurs et d'accepteurs.

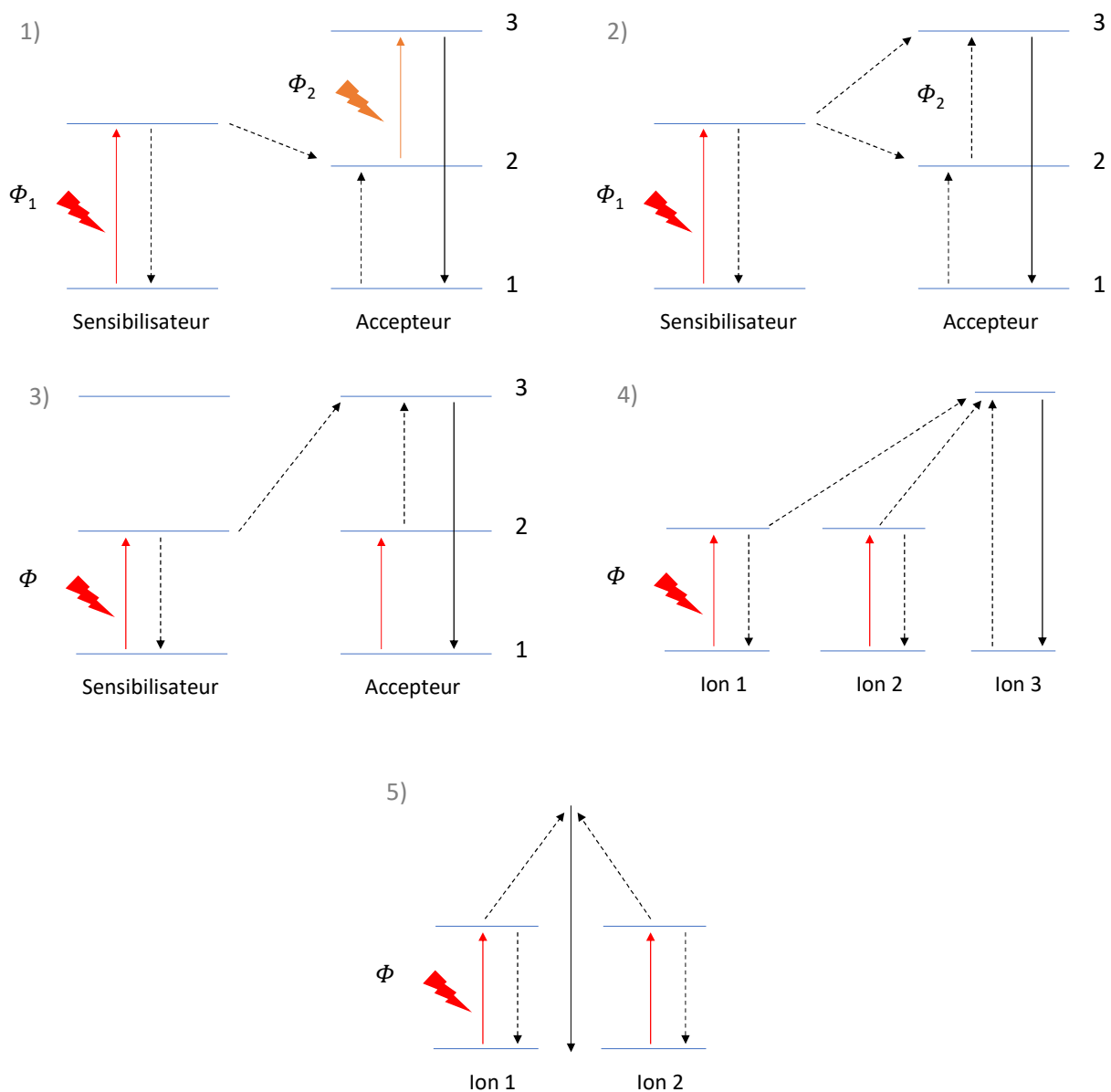


Figure 72 - Différents mécanismes d' « upconversion » par transfert d'énergie : 1) transfert d'énergie suivi de l'ESA, 2) transferts d'énergie successifs, 3) « upconversion » par relaxation croisée, 4) sensibilisation coopérative, 5) luminescence coopérative, adapté de Joubert M.-F. ¹¹²

Concernant le mécanisme par avalanche de photons, tous les ions sont au départ dans leur état fondamental (Figure 73). Un ion va être excité et passe alors dans un état métastable 2. Il est dès lors capable d'effectuer le processus d'ESA et donc d'absorber un photon à partir de cet état excité pour atteindre un état plus haut en énergie 3. A cause de la grande concentration d'ions, on a alors une relaxation croisée : l'ion 1 retombe dans le niveau excité métastable 2 alors que l'ion 2 lui passe de son état fondamental à l'état excité 2. Ainsi, on se

retrouve avec deux ions dans un état excité métastable 2 qui peuvent absorber des photons et effectuer à nouveau ce même processus.

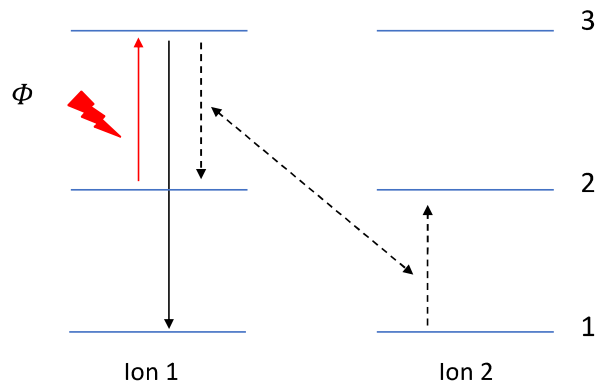


Figure 73 - Principe du processus le plus simple d'avalanche de photons, adapté de Joubert M.-F.¹¹²

Dans ce contexte, les applications se sont tournées vers le développement et l'utilisation d'« upconverting nanoparticles » (UCNPs ou nanoparticules à conversion ascendante de photons) dopées aux lanthanides. Grâce à la possibilité de contrôler leur taille, leur structure, et le niveau de fonctionnalisation à leur surface, le potentiel des UCNPs a été évalué dans différents domaines comme l'imagerie, les biosenseurs, la délivrance d'effecteurs biologiques ...

Comme première illustration, Zhou J. et ses collègues ont développé des sondes luminescentes pour l'imagerie de petits animaux en utilisant des UCNPs.¹¹³ L'avantage des UCNPs est l'utilisation d'un rayonnement NIR peu phototoxique *in vivo*, ainsi que le fait qu'il n'y ait pas d'autofluorescence des composés biologiques à ces longueurs d'onde (ici 980 nm). Ils utilisent l'ion Yb^{3+} car ce dernier a une section efficace d'absorption plus importante à 980 nm que d'autres ions. Yb^{3+} est en effet très souvent utilisé comme co-dopant de matériaux avec Er^{3+} , Tm^{3+} ou Ho^{3+} pour améliorer l'efficacité d'« upconversion ». Il est par exemple possible de visualiser la biodistribution de nanoparticules UCNPs *in vivo* et voir l'influence de la fonctionnalisation de ces nano-objets (coating). Des PAA-UCNPs (des UCNPs fonctionnalisées par des résidus polyacryliques) ont été formulées par Zhou J. *et al.* afin d'observer leur biodistribution à long terme grâce à l'« upconversion ». Les auteurs ont ainsi observé que la majorité des nanoparticules étaient éliminées lentement du foie et de la rate par excrétion hépatobiliaire ce qui différait d'autres expériences menées par exemple par Jalil R. A. *et al.*¹¹⁴ En effet, ces derniers ont observé, pour des nanocristaux de silice/ NaYF_4 dopés

aux ions $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ dépourvus de résidus polyacryliques à leur surface, une rapide accumulation dans le cœur puis les poumons des rats et après 24 h, une faible concentration dans le foie. Les nanoparticules ont dans leur cas été éliminées au travers des urines et excréments des rats. Il est donc possible d'évaluer les temps de rétention de différentes UCNPs *in vivo*, car ils sont directement dépendants du type d'animal, du dosage, de la taille des nanoparticules, de leur agrégation ou encore de leur fonctionnalisation.

Il est également possible de fonctionnaliser les nanoparticules afin de cibler des tumeurs et de les observer par imagerie. Des UCNPs modifiées avec de l'acide folique ont été formulées par Zhou J. *et al.*¹¹³ Comme les récepteurs folates sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs chez l'homme, ce type d'UCNPs (nanocristaux de NaYF_4 dopés aux ions Yb^{3+} et Er^{3+}) modifiées est donc capable de cibler ces tumeurs et permettre de les observer grâce à une émission localisée à 600-700 nm.

Une autre application de ces UCNPs concerne leur potentiel pour la délivrance d'agents thérapeutiques, et en particulier d'anticancéreux. Fedoryshin L. L. *et al.* ont formulé des nanoparticules de $\beta\text{-NaYF}_4$ composé de 4.95 % de Yb et 0.08 % de Tm et dont la surface a été fonctionnalisée avec l'*ortho*-phosphoryléthanolamine (Figure 74).¹¹⁵ La fonction amine libre a ainsi permis d'ancrer *via* une liaison amide un GPP à base *ortho*-nitrobenzyle équipé du 5-fluorouracile, un anticancéreux courant utilisé notamment pour le traitement des carcinomes du système digestif ou de l'appareil reproducteur féminin. Sous irradiation à 980 nm, cette UCNP émet un rayonnement dans l'UV/bleu (365, 455, 485 nm) qui est bien approprié au photoclivage de la liaison entre l'*ortho*-nitrobenzyle et le 5-fluorouracile. Ils ont ainsi obtenu un relargage à 77 % en 10-15 min en comparaison avec une irradiation directe de la nanoparticule dans l'UV.

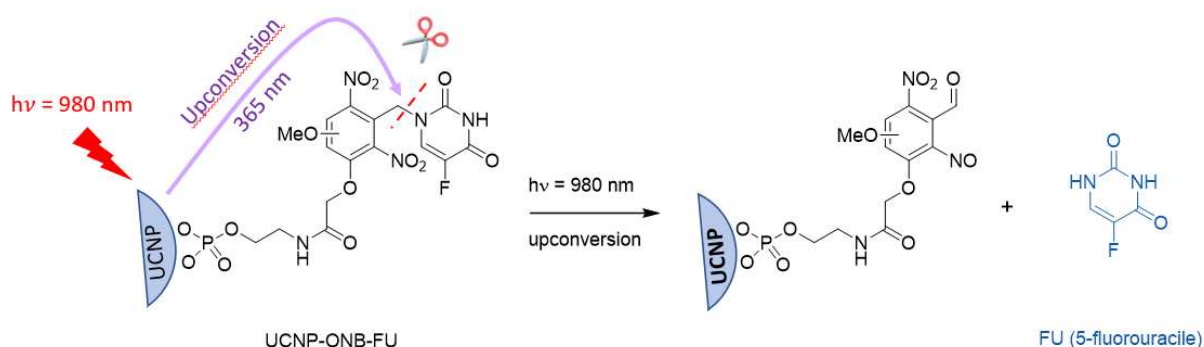


Figure 74 - Principe de fonctionnement de l'UCNP-ONB-FU sous irradiation NIR, adapté de Fedoryshin L. L. *et al.*¹¹⁵

Cependant, les UCNPs présentent quelques limitations, ce qui a freiné leur application en biologie. Tout d'abord, les coefficients d'extinction molaire des ions lanthanides sont plus faibles que les chromophores organiques, ce qui induit une plus faible absorption de la lumière par ces UCNPs (plus particulièrement dans le cas d'UCNPs de petites tailles).¹¹⁶ De plus, l'émission peut être affaiblie par des phénomènes de blanchiment (« quenching ») à la surface de la nanoparticule à cause par exemple de défauts à la surface ou de la vibration des solvants/ligands. Cela limite leur application en biologie, notamment lors de l'utilisation de lasers de faible puissance. De plus, Yb^{3+} est souvent utilisé comme sensibilisateur avec des excitations de l'ordre de 980 nm, longueur d'onde appartenant à la fenêtre d'absorption de l'eau.¹¹⁷ La pénétration de la lumière s'en trouve fortement diminuée à cause donc de sa diffusion dans les tissus biologiques. En outre, il y a un risque d'augmentation de la température et particulièrement sous irradiation continue.

Wang Y. *et al.* soulignent que des efforts ont été concentrés ces dernières années dans le développement d'UCNPs dopés aux ions Nd^{3+} qui permet d'abaisser la longueur d'onde d'irradiation à 808 nm.¹¹⁷ En effet, à cette longueur d'onde, l'absorption de la lumière par l'eau est 20 fois moindre qu'à 980 nm. Selon Xie X. *et al.*, Nd^{3+} a une section efficace d'absorption légèrement supérieure à Yb^{3+} (environ 10^{-19} cm^2 contre 10^{-20} cm^2).¹¹⁸ Nd^{3+} peut alors être utilisé dans des UCNPs co-dopés avec Yb^{3+} . Ainsi, sous irradiation à 808 nm, Nd^{3+} transfère son énergie à Yb^{3+} qui transmet à son tour l'énergie à des ions accepteurs comme Er^{3+} et Tm^{3+} .¹¹⁹ Il est aussi possible d'utiliser uniquement Nd^{3+} comme sensibilisateur mais cela engendre une efficacité moins importante. De plus, Zhao E. *et al.* ont observé dans leur système ($\text{Nd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Pr}^{3+}$) une bien meilleure luminescence à 808 nm (3.5 fois plus importante) en utilisant ce co-dopage qu'avec uniquement l'ion Yb^{3+} comme sensibilisateur à 980 nm.¹²⁰ Cela pourrait s'expliquer par les deux possibilités de mécanisme de transfert d'énergie $\text{Nd}^{3+} \rightarrow \text{Pr}^{3+}$ et $\text{Nd}^{3+} \rightarrow \text{Yb}^{3+} \rightarrow \text{Pr}^{3+}$. Dans tous les cas, la concentration des ions lanthanides dans les UCNPs doit rester faibles (environ 2 mol%) pour éviter les pertes d'énergie par relaxation croisée. Cependant, de faibles concentrations en sensibilisateurs induisent une faible absorption de la lumière. Des travaux ont donc été menés afin de pouvoir augmenter leur concentration dans les nanoparticules en formulant notamment des UCNPs comportant de multiples couches. Mais ce type de nanoparticules peuvent être de tailles trop importantes pour d'éventuelles applications en biologie.

Afin de contrecarrer ces limitations, une autre alternative a émergé, à savoir l' « upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet.

◆ L' « upconversion » par annihilation triplet-triplet

Ce deuxième processus a été introduit dans les années 60 par Parker C. A. et Hatchard C. G.¹²¹ Ils ont travaillé sur des couples de chromophores organiques comme phénanthrène/naphthalène ou proflavine/anthracène.

Le phénomène d' « upconversion » par annihilation triplet-triplet fonctionne de la manière suivante (Figure 75) : le sensibilisateur atteint tout d'abord son état excité singulet ($^1S^*$) par absorption d'un rayonnement rouge ou proche IR, puis passe à l'état triplet ($^3T^*$) plus stable par un croisement inter-système (ISC). A ce stade, le sensibilisateur effectue un transfert d'énergie triplet-triplet (TTT) envers l'accepteur qui passe de son état fondamental à son état excité triplet. Lorsque deux accepteurs dans leur état triplet vont alors se rencontrer, l'un revient à l'état fondamental pendant que l'autre passe dans un état excité encore plus haut en énergie : c'est l'annihilation triplet-triplet (TTA).

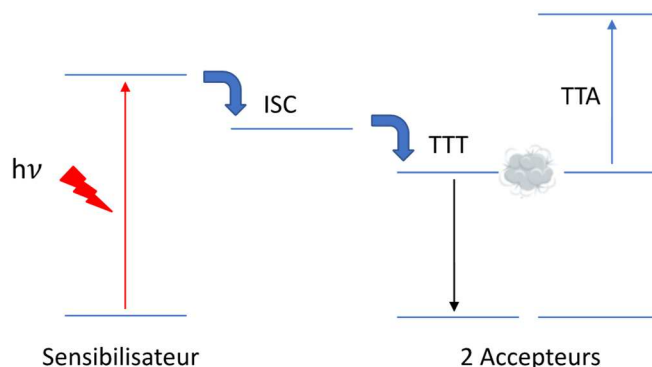


Figure 75 - Principe de l' « upconversion » par annihilation triplet-triplet.

Le fait que les chromophores utilisés dans le phénomène de TTA-UC ont des coefficients d'extinction molaires largement supérieurs aux lanthanides, conduit à la possibilité d'irradier les échantillons avec une puissance moindre (0.1 W. cm^{-2} vs $> 1 \text{ W.cm}^{-2}$).¹²²

Cependant, ce processus est limité par la présence d'oxygène ce qui a pour l'instant limité le développement d'applications notamment en biologie. Cet aspect sera détaillé ultérieurement à la partie IV-3-c.

IV-1-b) Applications de l' « upconversion » pour la délivrance d'effecteurs biologiques

Ces dernières années, différentes stratégies employant l' « upconversion » dans des nanoparticules ont émergé. L'une d'elle consiste en la déstabilisation, grâce à la lumière « upconvertie », de la structure du vecteur comportant un principe actif. Une seconde stratégie repose sur l'utilisation de la lumière émise par un système d' « upconversion » afin d'effectuer une photolyse et libérer un principe actif. Nous allons détailler ces deux stratégies avec des exemples de la littérature dans les sous-parties suivantes.

IV-1-b.1) L' « upconversion » afin de déstabiliser le nanovecteur et libérer le principe actif

La première stratégie que nous allons décrire est l'utilisation du principe d' « upconversion » afin de perturber la structure des vecteurs transportant des principes actifs. Pour cela, des composés photoactivables sont incorporés dans des vecteurs et il est ainsi possible d'induire des réactions photochimiques comme l'isomérisation, la dimérisation ou la photolyse afin de déstabiliser la structure tridimensionnelle de la matrice.¹²³ En effet, les modifications induites par voie photochimique peuvent être de diverses natures comme un changement de l'équilibre hydrophile/hydrophobe, une photoréticulation réversible, la photolyse de blocs de polymères ou des désintégrations induites par la lumière. Afin d'envisager une application *in vivo* d'une telle stratégie, il est nécessaire de pouvoir irradier les systèmes par de la lumière NIR ce qui a conduit à l'utilisation de systèmes d' « upconversion » au sein des nanoparticules formulées.

Un premier exemple rapporté par Yan B. *et al.* repose sur l'utilisation d'UCNPs (NaYF₄:TmYb) dans des micelles formulées à partir de copolymères à blocs photosensibles (Figure 76A).¹²³ Ces copolymères à blocs sont composés d'une partie hydrophile à base de polyéthylène glycol et d'une autre hydrophobe à base polyméthacrylate équipée de GPP du type *ortho*-nitrobenzyle (Figure 76B).

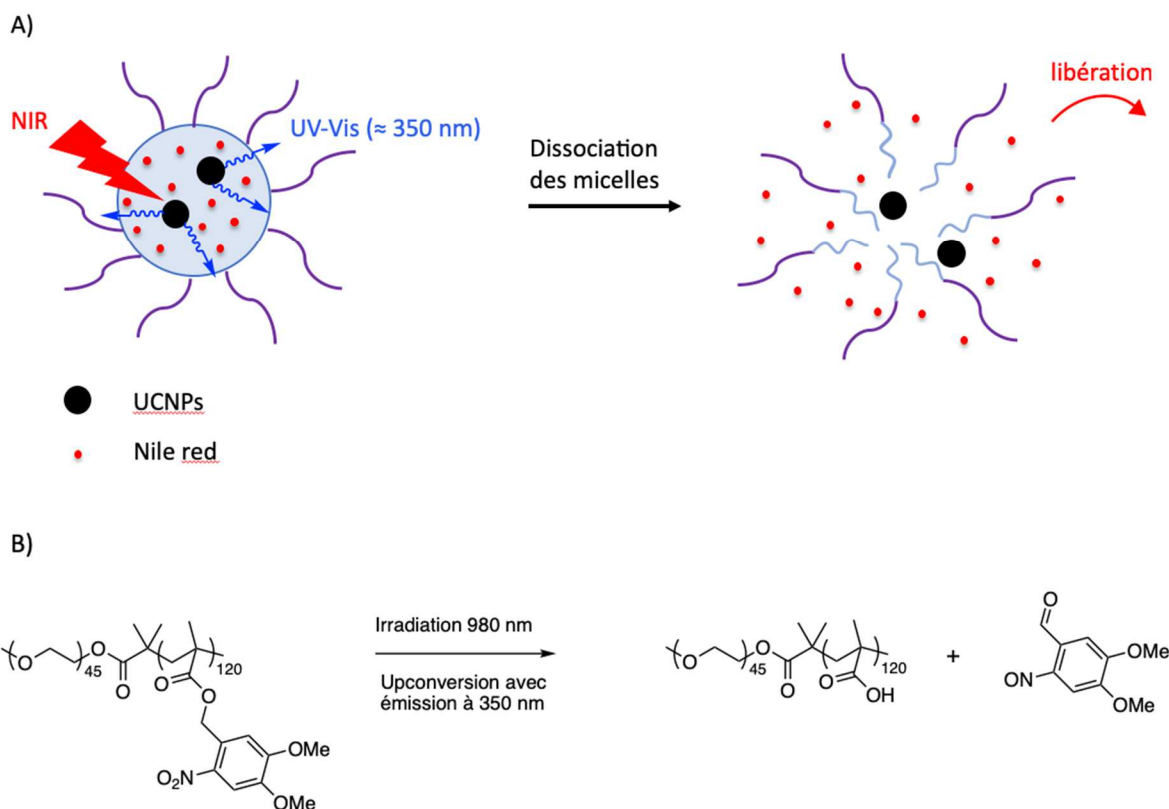


Figure 76 – A) Principe de libération de Nile Red par déstabilisation de copolymères à blocs photosensibles (micelles) suite à une irradiation NIR d’UCNPs ; B) réaction de photolyse induite par une irradiation à 980 nm convertie en une de plus haute énergie à 350 nm par les UCNPs.¹²³

Sous irradiation NIR à 980 nm, différentes émissions sont produites par l’ « upconversion » des lanthanides et notamment une à 350 nm. Le GPP *ortho*-nitrobenzyle choisi comporte deux groupes méthoxyles afin de décaler sa longueur d’onde d’absorption vers 350 nm. La lumière émise par les lanthanides est donc absorbée par le GPP, induisant une photolyse au niveau de la fonction ester. La formation du sous-produit de photolyse, le nitrosobenzaldéhyde, convertit le bloc natif hydrophobe en acide polyméthacrylique hydrophile ce qui modifie l’équilibre hydrophile/hydrophobe du vecteur et déstabilise les micelles.

Yan B. *et al.* ont ensuite incorporé du Nile Red dans leur formulation. Lorsque le système est irradié à 980 nm, les micelles se dissocient, libérant plus rapidement le Nile Red. Les auteurs ont suivi la libération du Nile Red par fluorescence à 640 nm avec une excitation à 550 nm. Néanmoins, les temps d’irradiation sont relativement longs (libération toujours incomplète après 240 min) malgré des puissances d’irradiation importantes (5 W). De plus, sans irradiation, une légère fuite du colorant a été rapportée.

Un autre exemple notable est celui des travaux de Jalani G. *et al.* qui ont formulé des UCNP $\text{LiYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ qu'ils ont enrobées d'une couche de SiO_2 pour les rendre hydrophiles (Figure 77).¹²⁴ Ces particules ont ensuite été traitées avec du (3-glucodyloxypropyl)triméthoxysilane (GPS) pour introduire à la surface des fonctions réactives de type époxydes qui ont ensuite été ouverts par $\text{S}_\text{N}2$ impliquant les amines libres de chitosane. A ce stade, un agent réticulant photoclivable nommé PhL est ajouté et va régir, *via* ses résidus succinimidyliques, avec les amines du chitosane qui n'avaient pas réagi à l'étape précédente. Enfin, un dérivé fluorescent d'albumine de sérum bovin (FITC-BSA), employé ici comme protéine médicament modèle, a été piégé à la surface de l'UCNP avant que la nanoparticule ne soit finalement traitée avec du bis-azoture de polyéthylène glycol (PEGBA), les azotures réagissant avec les résidus alcynyles libres en bout des PhL.

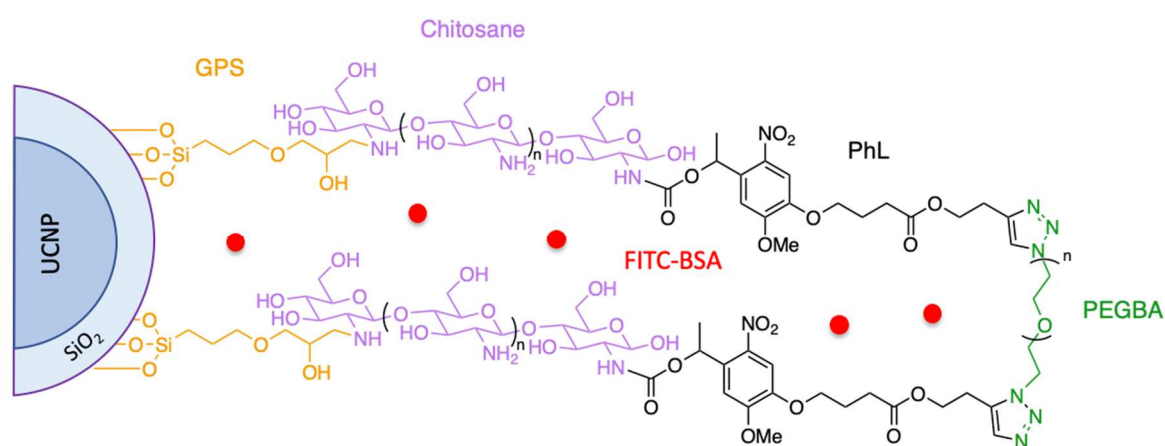


Figure 77 - Structure de la surface des UCNP développées par Jalani G. *et al.*¹²⁴

Les nanoparticules ainsi préparées ont alors été irradiées à 980 nm à une intensité de 1.8 W/cm^2 et se sont montrées capables de convertir le rayonnement incident en un rayonnement UV (347 et 362 nm) qui est absorbée par les PhL ($\lambda_{\text{max}} = 348 \text{ nm}$) et qui a conduit à la photolyse visée. Cette photolyse va donc rompre les réticulations qui permettaient de maintenir l'enveloppe de chitosane et entraîner la dissociation partielle de l'hydrogel. Cette dissociation va ainsi permettre la libération graduelle du FITC-BSA encapsulé.

Ainsi, après une irradiation de 9 min à 1.8 W/cm^2 , un plateau a été atteint avec une libération de 92 % du FITC-BSA initialement incorporé. Jalani G. *et al.* ont observé qu'avec des puissances moindres, l'enveloppe de chitosane n'était pas complètement dégradée même après 12 min d'irradiation. Les auteurs ont aussi remarqué que le revêtement composé de SiO_2 et de

chitosane autour des UCNPs diminue l'intensité de l'émission des UCNPs *via* un effet possible de « quenching » dû à leur large énergie vibrationnelle.

Lors de cette application, aucune fuite du médicament modèle n'a été observé lorsque les nanoparticules ne sont pas irradiées, exceptés néanmoins 5 % de relargage qui pourraient être dus à l'adsorption de FITC-BSA à la surface du système (et non encapsulé).

Ils ont ensuite voulu vérifier la biocompatibilité des UCNPs sur des cellules bovines et ils ont observé une bonne viabilité de ces dernières malgré les irradiations et la présence des particules ce qui pourrait permettre d'envisager une application *in vivo*.

Cependant, les puissances d'irradiations utilisées restent trop élevées et le relargage de FITC-BSA sans irradiation, même faible, n'est pas souhaitable.

IV-1-b.2) L' « upconversion » et la photolyse pour libérer le principe actif

L'autre stratégie de libération de principe actif en utilisant l' « upconversion » est d'induire une photolyse au niveau du principe actif qui est covalamment lié à une nanoparticule.

Cette dernière décennie, Askes S. H. C. *et al.* ont rapporté les premiers exemples de TTA-UC dans la bicouche lipidique de liposomes neutres afin de libérer une prodrogue à base de ruthénium (II).¹²⁵ Alors que des complexes de platine, avec le cisplatine comme exemple le plus courant, sont déjà connus pour leur pouvoir anticancéreux, le ruthénium est actuellement considéré comme une alternative prometteuse au platine.¹²⁶ Toutefois, pour être activé, le ruthénium nécessite d'être irradié par des rayonnements de longueurs d'onde de l'ordre de 400-500 nm et donc en dehors de la fenêtre thérapeutique. C'est pourquoi Askes S. H. C. *et al.* ont proposé l'utilisation de l' « upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet combinée à des liposomes fonctionnalisés par des complexes au ruthénium. Deux couples de fluorophores organiques sont présentés comme sensibilisateurs et accepteurs (Figure 78) :

- octaéthylporphyrine de platine (II) ($\lambda = 536 \text{ nm}$) / 9,10-diphénylanthracène
- tétraphényltétrabenzoporphyrine de palladium (II) ($\lambda = 628 \text{ nm}$) / pérylène

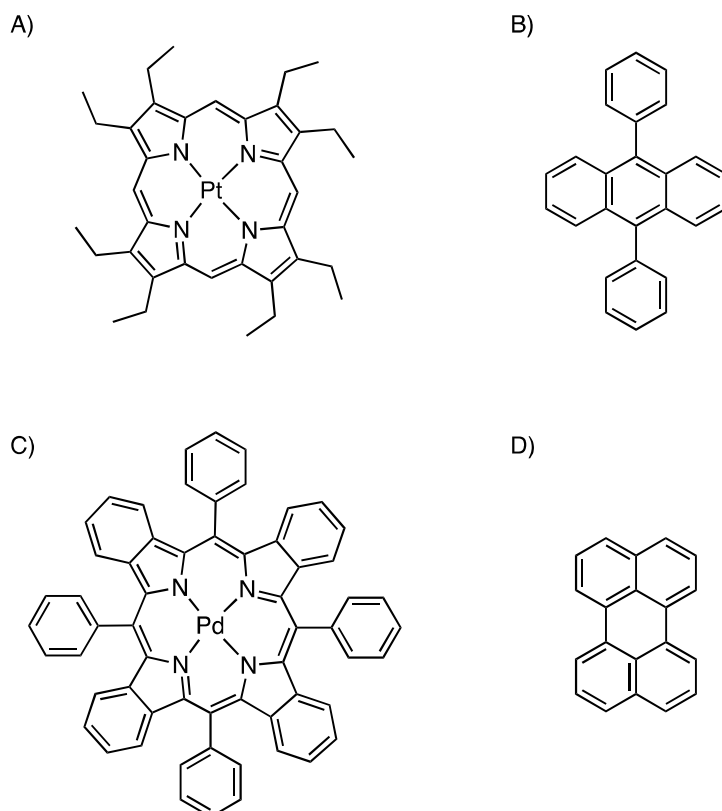


Figure 78 - Exemples de sensibilisateurs (A = octaéthylporphyrine de platine (II) , C= tétraphényltétrabenzoporphyrine de palladium (II)) et d'accepteurs organiques (B =9,10-diphénylanthracène, D = pérylène).

Etant apolaires, ces composés vont se placer dans l'intérieur lipophile de la bicouche lipidique du liposome. Les liposomes ont été formulés à partir de 1,2-dimyristoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DMPC) et un dérivé pégylé du 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DSPE-MPEG-2000) pour atteindre une taille autour de 130-170 nm. Les deux couples sensibilisateur/accepteur ont été testés avec des irradiations respectivement de 532 et 630 nm et des échantillons désoxygénés. Une luminescence bleue a bien été observée dans les deux cas et pourraient donc être utilisés pour activer des prodrogues photoactivables.

Comme prodrogue modèle, le complexe $[Ru(tpy)(bpy)(SRR')]^{2+}$ a été choisi car seule la liaison Ru-S est sensible à la lumière (Schéma 45). Sous l'effet de la lumière, ce complexe se convertit en le complexe $[Ru(tpy)(bpy)(H_2O)]^{2+}$ via un échange de ligands. Comme groupement SRR', un ligand thioéther substitué par un résidu cholestérol a été choisi car il permet d'ancrer le complexe à la bicouche lipidique.

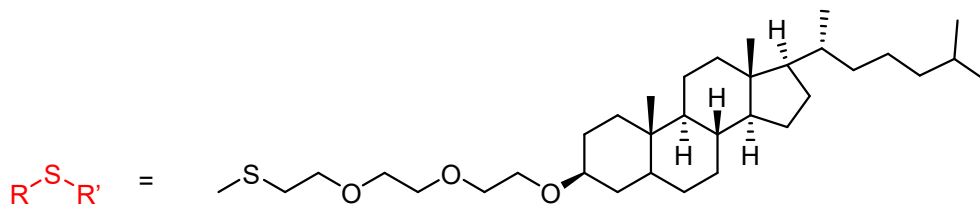
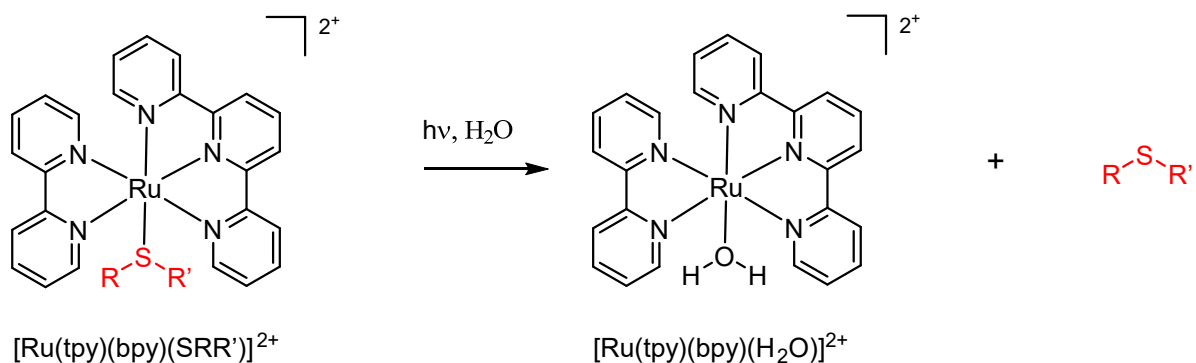


Schéma 45 - Evolution de la prodrogue choisie par Askes S. H. C. sous l'action de la lumière.

Les auteurs ont ensuite mélangé les liposomes convertissant la lumière rouge en lumière bleue (impliquant le second couple sensibilisateur/accepteur) avec des liposomes comportant à leur surface la prodrogue à base de ruthénium à leur surface (ratio 1:1 en volume ; Figure 79). Après désoxygénation, l'échantillon a été irradié à 630 nm à 298 K avec une intensité de 2.3 W.cm^{-2} . La libération du complexe de $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ a été suivie au cours du temps et un plateau a été atteint au bout de trois heures.

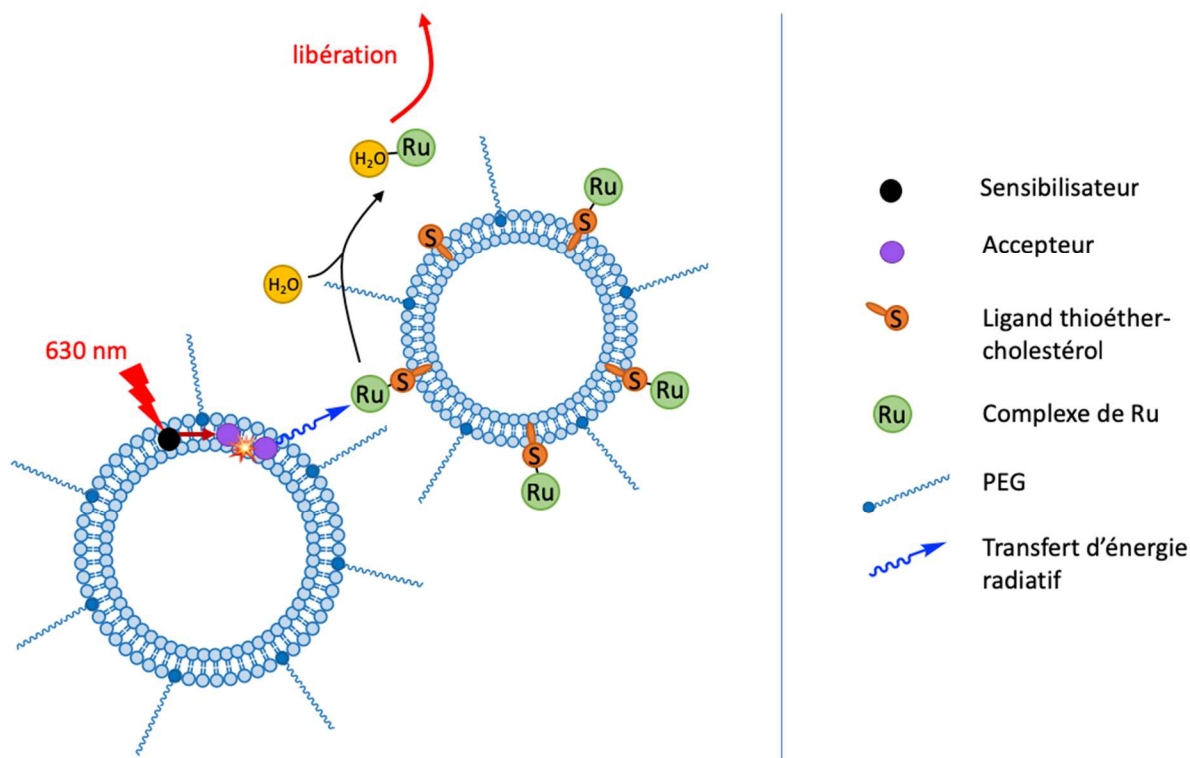


Figure 79 – Principe de libération du complexe de ruthénium par l'utilisation de deux types de liposomes : l'un comportant le système d'« upconversion » dans sa bicouche lipidique, l'autre comportant la prodrogue ancrée à la surface de la nanoparticule, adapté de Askes S. H. C. et al..¹²⁵

Cependant, avant de pouvoir être appliqué *in vivo*, il subsiste quelques limitations comme l'intensité d'irradiation qui reste élevée (2.3 W.cm^{-2}) ou la sensibilité de l'« upconversion » à l'oxygène. De plus, la question se pose quant à la pertinence de l'utilisation de deux liposomes distincts, l'un pour le système d'« upconversion » et l'autre supportant la prodrogue photoactivable : les liposomes comportant le système d'« upconversion » peuvent-ils se retrouver trop éloignés des prodrogues et donc ne pas transmettre les photons de manière efficace pour leur activation ?

Un second exemple plus récent de cette stratégie a été rapporté par Huang L. *et al.* qui ont quant à eux choisi comme couple d'« upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet un dimère de bore-dipyrométhène (BODIPY), le BDP-F, et le 9-(phényléthynyl)anthracène (PEA) (Figure 80).¹²⁷ Dans ce cas, il est possible d'irradier le système avec une excitation à 650 nm pour obtenir une émission à 432 nm. Ce couple sensibilisateur/accepteur a été encapsulé dans des particules de silices mésoporeuses, avant que les particules n'aient finalement été enrobées d'une couche de prodrogue photoactivable coumarine-chlorambucil (Schéma 46).

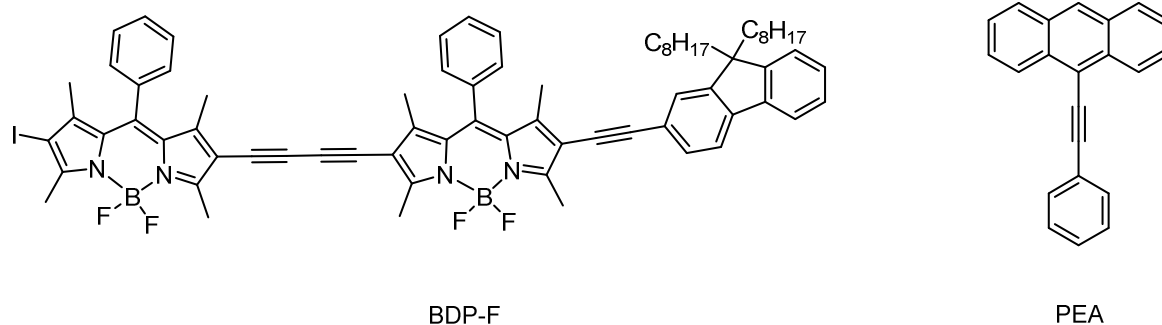


Figure 80 – Couple d' « upconversion » à base BODIPY (BDP-F) et anthracène (PEA) utilisé par Huang L. et al.¹²⁷

Ce qui est notable dans cet exemple est l'utilisation d'intensités plus faibles de l'ordre 100 mW.cm^{-2} . Après une heure d'irradiation à 650 nm, plus de 80 % de chlorambucil ont été libérés (Schéma 46). Cependant, sans irradiation, une légère fuite d'environ 4 % de chlorambucil a été observée après 24 heures.

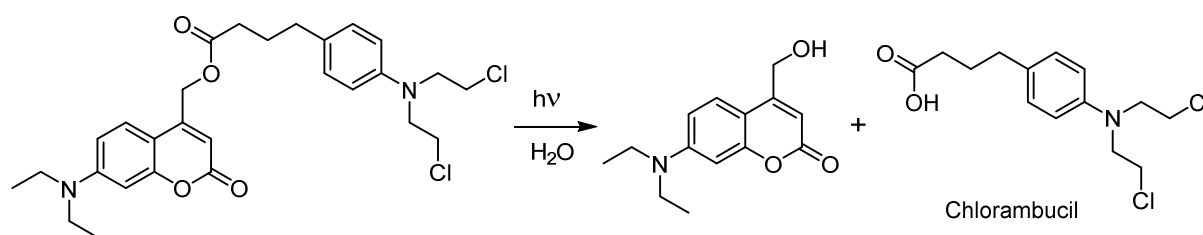


Schéma 46 – Photolibération du chlorambucil installé sur une plateforme photoactivable de la série 4-méthylcoumarinyle.

Ce système a ensuite été testé sur des modèles de cellules cancéreuses, HeLa et 4T1. En l'absence d'irradiation, Huang L. et al. n'ont pas observé d'effets significatifs de la nanoparticule en elle-même, qu'elle contienne ou non la prodrogue photoactivable. Cependant, sous irradiation, une toxicité significative a été observée pour les deux types de cellules, avec des valeurs d' IC_{50} de $235 \pm 5.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $320 \pm 6.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. Enfin, des souris comportant des tumeurs 4T1 ont été traitées par ces nanoparticules. Le contrôle, traitement d'une souris par les nanoparticules en l'absence d'irradiation, n'a révélé aucune réduction de la croissance de la tumeur alors qu'avec irradiation, la croissance a été stoppée et le tissu tumoral a montré des nécroses. Les chercheurs ont également vérifié qu'il n'y avait pas de perte de poids pour les souris et pas de dommages notables sur d'autres organes (la vérification a été faite après mise à mort des souris et récolte des organes).

Afin d'améliorer l'efficacité de libération d'une prodrogue tout en utilisant le principe d' « upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet, une approche évaluée par Askes S. H. C. *et al.* a été de rapprocher le système d' « upconversion » et la prodrogue photoactivable.¹²⁸ Ces auteurs ont ainsi décrit en 2015 un des premiers exemples de liposomes, contenant à la fois le système d' « upconversion » et une prodrogue photosensible à base de ruthénium(II), qui utilise le transfert d'énergie FRET afin de libérer ce complexe de ruthénium et le rendre cytotoxique. Dans ce cas, de bien meilleures efficacité et vitesse de relargage ont été observées. Nous allons donc décrire ce phénomène de transfert d'énergie (FRET) non radiatif dans la partie suivante.

IV-2) Le FRET : un transfert d'énergie non radiatif

Le FRET, pour Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer, est un processus électrodynamique découvert dans les années 50 par Theodor Förster.¹⁸ C'est un transfert d'énergie qui se fait sans émission de photon ; il est dit « non radiatif ». Un fluorophore est en effet assimilé à un dipôle oscillant qui peut échanger de l'énergie avec un second ayant une fréquence de résonance similaire. Le FRET diffère donc des transferts d'énergie radiatifs qui consistent en l'émission puis la réabsorption d'un photon.

Pour avoir un transfert d'énergie FRET efficace entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur, il faut que certaines conditions soient respectées : ¹²⁹

- il faut que le spectre d'émission du donneur se superpose avec le spectre d'absorption de l'accepteur,
- la distance entre le donneur et l'accepteur doit être comprise entre 1 et 10 nm et donc se rapprocher de la distance de Förster (R_0). Cette dernière est définie comme la distance entre le donneur et l'accepteur à laquelle la moitié de l'énergie d'excitation du donneur est transmise à l'accepteur alors que l'autre moitié est dissipée par d'autres processus comme l'émission de photons.¹³⁰ Plus la distance entre les deux chromophores s'éloigne de la distance de Förster et plus l'efficacité de FRET diminue,
- l'orientation relative des dipôles de transition de l'accepteur et du donneur doit être favorable,
- le donneur de FRET doit avoir un rendement quantique de fluorescence important.

Expérimentalement, la détermination de l'efficacité de FRET (E) peut s'effectuer de différentes manières. Cheung H. C. *et al.* expliquent qu'il est possible de déterminer E soit par les rendements quantiques relatifs (ou par les intensités de fluorescence) soit par les durées de vie du donneur déterminées en la présence et l'absence de l'accepteur.¹³⁰ On pose alors l'équation suivante :

$$E = 1 - \frac{F_{da}}{F_d}$$

avec F_{da} étant l'intensité de fluorescence du donneur à une longueur d'onde λ donnée en l'absence de l'accepteur et F_d en présence de l'accepteur.

De même, il est possible d'écrire l'équation suivante :

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d}$$

avec τ_{da} et τ_d étant les durées de vie du donneur en présence ou absence de l'accepteur.

Cependant, si l'accepteur est aussi fluorescent, il est possible d'utiliser son émission à l'aide de l'équation suivante :

$$E = \frac{\varepsilon_{ad}(\lambda_1)}{\varepsilon_{da}(\lambda_1)} \cdot \left[\frac{F_{ad}(\lambda_2)}{F_a(\lambda_2)} - 1 \right]$$

Dans cette équation, ε_{ad} est l'absorbance de l'accepteur en présence du donneur et ε_{da} est l'absorbance du donneur dans le même échantillon. Ces deux valeurs sont mesurées à une longueur d'onde λ_1 à laquelle le donneur absorbe fortement. F_{ad} est l'intensité de fluorescence de l'accepteur en présence du donneur et F_a celle de l'accepteur en l'absence du donneur. Ces deux intensités sont obtenues par excitation à la longueur d'onde du donneur λ_1 et mesurées à la longueur d'onde λ_2 de l'accepteur.

Mais l'efficacité de FRET peut aussi s'écrire de la façon suivante :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

avec R la distance entre le donneur et l'accepteur et R_0 la distance de Förster.

Cette dernière équation a été largement utilisée dans les premières applications du FRET afin de déterminer la distance entre deux points A et B, c'est-à-dire entre deux chromophores.

Pour illustration, Latt S. A. *et al.* ont utilisé en 1965 deux chromophores, un accepteur et un donneur, rattachés aux extrémités d'un « bistéroïde » de dimension connue (18.5 Å) par des liens esters (Figure 81).¹³¹

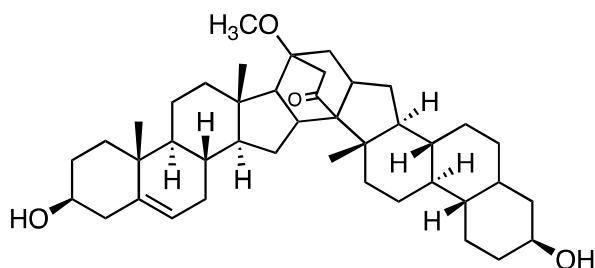


Figure 81 – « Bistéroïde » utilisé par Latt S. A. *et al.* ¹³¹

Ils ont démontré que le FRET observé était en adéquation avec les équations prédites par Förster. Ils ont notamment étudié le couple *para*-méthoxyphénylacétyle (D)/1-naphtoyle (A) (Figure 82). Ils ont ainsi modélisé une distance théorique de 21.3 ± 1.6 Å et expérimentalement, ils ont obtenu une distance de 21.8 ± 2.0 Å avec une moyenne linéaire et 19.2 ± 2.0 Å avec une moyenne en $\left(\frac{1}{R^6}\right)^{-6}$. Ces deux données sont très proches de celle calculée par les équations de Förster ce qui démontre que cet outil permet d'estimer correctement la distance entre deux points (un donneur et un accepteur de FRET).

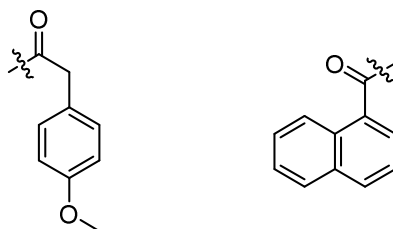


Figure 82 - Structure des groupes *para*-méthoxyphénylacétyle (donneur, à gauche) et 1-naphtoyle (accepteur, à droite).

En 1995, Selvin P. R. explique que cette technique de mesure de distance a ensuite été appliquée avec succès en chimie des polymères, biochimie ou biologie structurale et notamment pour observer des processus dynamiques comme la « polymérisation » de l'actine, « l'assemblage » de nucléosomes ou l'activité de la protéase VIH.¹³²

Dans ce contexte, nous proposons, en collaboration avec l'équipe 3Bio de notre UMR dirigée par les Drs Frisch B. et Kichler A., l'élaboration de nouvelles nanoparticules capables d'effectuer de la conversion ascendante de photons pour la libération *in vivo* d'un effecteur biologique.

IV-3) Le projet LightInDR

IV-1-b) Contexte

Ce projet de recherche vise à concevoir des nanovecteurs capables de libérer un principe actif par une excitation lumineuse proche de l'infrarouge. Ces nanoparticules vont contenir des sensibilisateurs et des accepteurs afin de pouvoir effectuer une conversion ascendante de photons, c'est-à-dire de réémettre un photon vers 450 nm après une excitation à 630 nm (Figure 83). L'énergie sera alors transmise à un GPP par FRET et ce dernier conduira après photolyse, à la libération d'un principe actif.

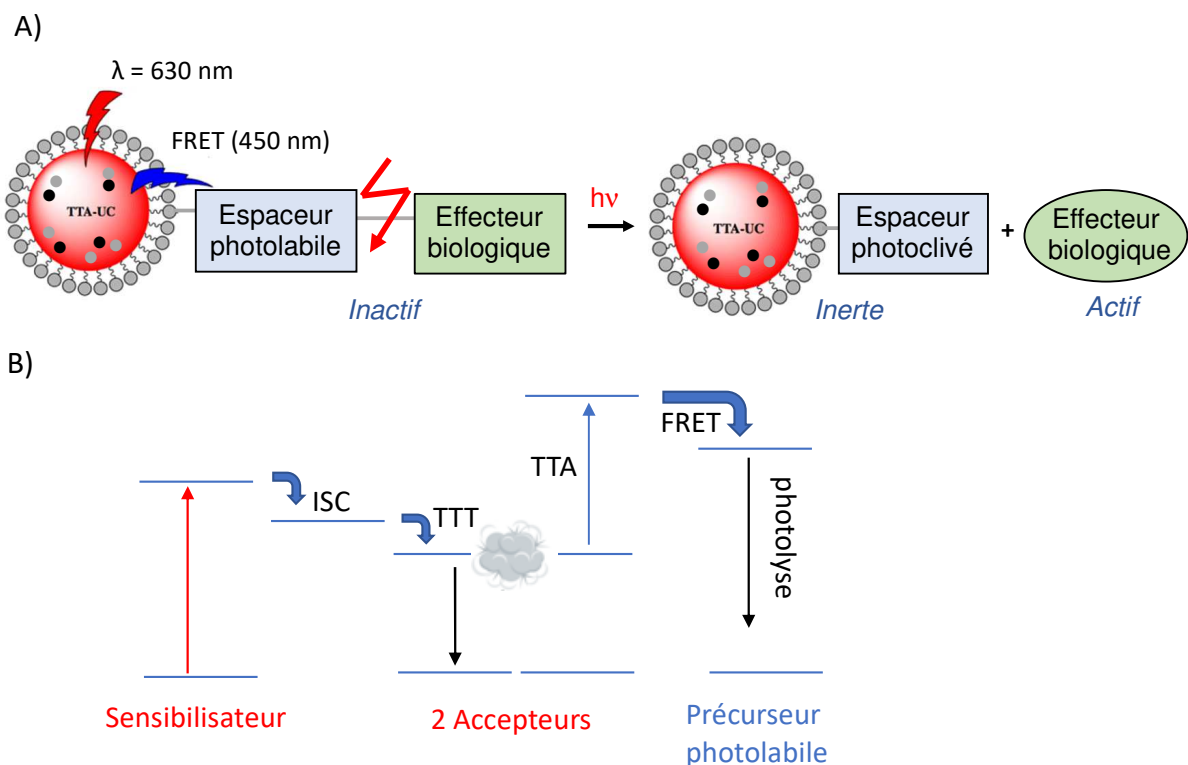


Figure 83 – A) Principe du projet : libération photo-induite d'un effecteur biologique à l'aide de nanovecteurs à conversion ascendante de photons. B) Diagramme de Jablonski résumant les phénomènes impliqués dans le TTA-UC.

L'utilisation des nanoparticules va permettre d'avoir un meilleur contrôle spatio-temporel de la libération de l'effecteur biologique et par conséquent un meilleur contrôle de sa concentration locale, une meilleure biodisponibilité et moins d'effets secondaires.

De plus, les nanoparticules envisagées vont permettre une meilleure internalisation de la biomolécule pour une meilleure efficacité.

IV-3-b) Les nanoparticules

IV-3-b.1) les liposomes

Le premier type de nanoparticules auquel nous nous sommes intéressés sont les liposomes. La première formulation de liposomes a été effectuée en Angleterre dans les années 60 par Bangham A. D. qui a observé que les phospholipides en formaient spontanément lorsqu'ils étaient dispersés dans l'eau.^{133, 134} En effet, ces phospholipides forment des sphères fermées car ils sont composés d'une tête hydrophile d'un côté et d'une hydrophobe de l'autre. Les têtes hydrophiles font ainsi des interactions avec l'eau, formant des systèmes multilamellaires ou unilamellaires.¹³⁵

Ces sphères fermées sont composées d'une bicouche lipidique qui entoure une partie du tampon environnant lors de sa formulation.

Les liposomes sont thermodynamiquement instables et leur méthode de préparation va influencer sur leur structure physique, conduisant à des tailles comprises entre 20 nm et plusieurs μm . A noter que les liposomes sont classés selon leur taille, le nombre de lamelles et leur méthode de préparation (Figure 84¹³⁶) : ¹³⁴

- les ULV (Unilamellar Vesicles) qui comprennent les LUV (Large Unilamellar Vesicles) ayant une seule membrane bicouche de taille supérieure à 100 nm, et les SUV (Small Unilamellar Vesicles) qui ont une taille inférieure à 100 nm,
- les MLV (Multilamellar Vesicles) qui sont des liposomes composés de plusieurs bicouches lipidiques concentriques,
- les MVV (Multivesicular Vesicles) qui sont des nanoparticules composées de plusieurs vésicules encapsulées dans une seule bicouche lipidique.

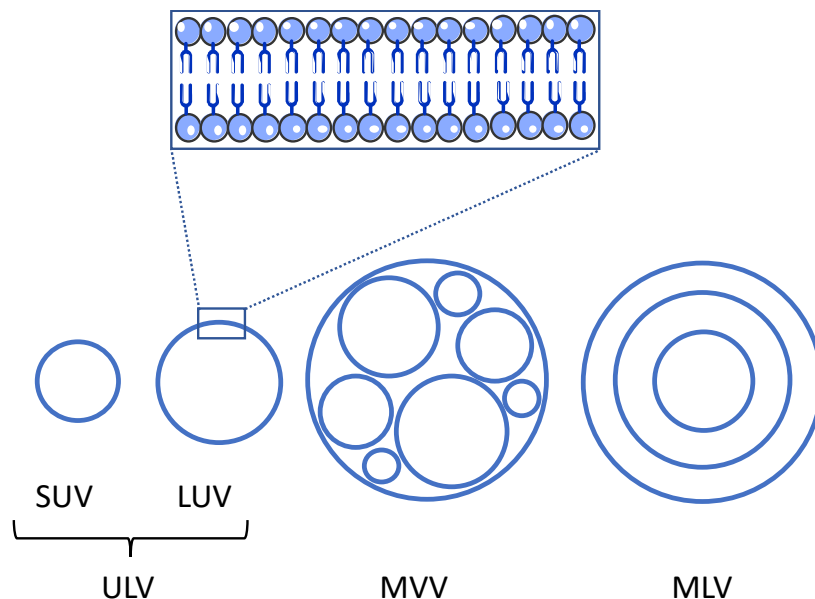


Figure 84 – Schématisation des différents types de liposomes pouvant être obtenus, adapté de Demirci M. et al. ¹³⁶

Les liposomes sont plutôt efficaces pour la délivrance d'effecteurs biologiques dans des cellules, avec de nombreux exemples d'applications déjà rapportés dans la littérature. Les exemples les plus récents sont très variés allant du ciblage de tumeurs, à la thérapie génique, en passant par les vaccins, la thérapie immunomodulatrice, la délivrance d'anticorps ou de médicaments, l'imagerie etc... Les liposomes sont également utilisés dans les industries agroalimentaire et cosmétique. ¹³⁴

Nous nous intéressons plus particulièrement aux nanoliposomes car ils ont des temps de circulation plus longs dans le sang sans être reconnus par les macrophages. De plus, ils ont une facilité d'accès plus importante dans les tissus car ils peuvent passer dans les capillaires ou à travers les membranes biologiques.

Pour information, le Dr Brion A. de l'équipe 3Bio formule les SUV de la façon suivante (Figure 85)¹³⁷ : les composants de la formulation des liposomes (phosphatidylcholine 14:0, phosphatidyléthanolamine-PEG2000) sont solubilisés dans un mélange chloroforme/méthanol (9:1) dans un tube en pyrex et évaporés complètement à l'évaporateur rotatif pour obtenir un film lipidique au fond du tube. Ce film est ensuite réhydraté avec un tampon à pH 7.1 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, en présence d'un antioxydant) et agité pour obtenir des vésicules multilamellaires en suspension. Ces dernières sont finalement passées aux ultrasons à température ambiante afin d'obtenir des SUV.

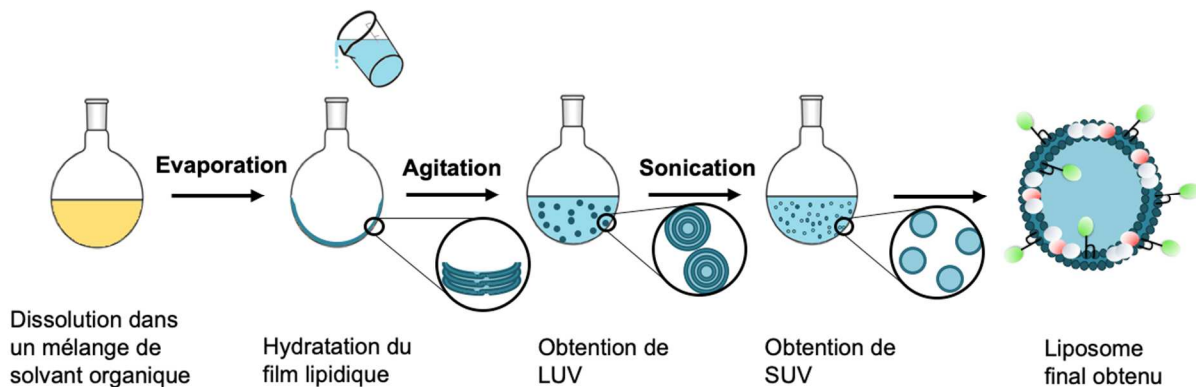


Figure 85 – Principe de formulation des liposomes (SUV) obtenus par hydratation d'un film lipidique et sonication.

Cependant, il existe certains inconvénients à l'utilisation de liposomes. Dans notre cas, comme nous le verrons ultérieurement, lors de la formulation nous incorporons notre bras espaceur photolabile couplé à une ancre lipidique pégylée. De ce fait, le bras espaceur photolabile peut se retrouver de façon indifférente à l'intérieur du liposome ou à l'extérieur (Figure 86). Ainsi, nous perdons inévitablement de l'efficacité lors de la photolibération de la biomolécule.

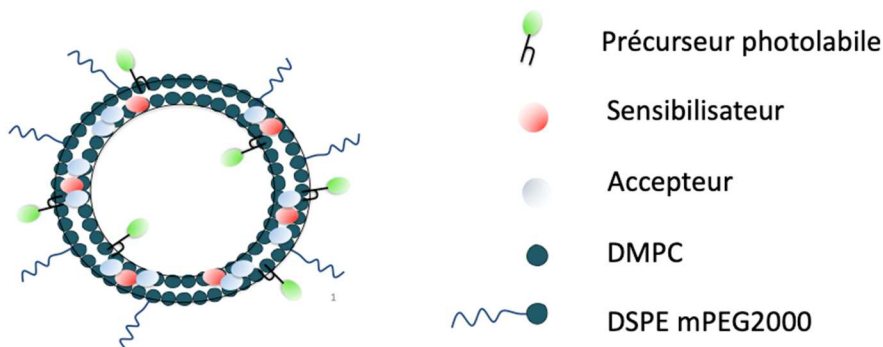


Figure 86 – Structure du liposome type obtenu par formulation dans notre projet (DMPC = 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine ; DSPE-Mpeg2000 = N-(Carbonyl-méthoxypolyéthylène glycol 2000)-1,2-distéaroyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine).

De plus, de nombreux articles rapportent une certaine instabilité¹³⁸ et ainsi une libération incontrôlée du médicament (fuite) avec certains liposomes.

Par exemple, Vemuri S. *et al.* ont pu montrer que les lipoprotéines de haute densité (HDL) présentes dans le sang sont capables de déstabiliser certains petits liposomes (formulés à partir de phosphatidylcholine/phosphatidylglycérol/cholestérol) en attaquant les phospholipides sur la partie externe de la bicouche lipidique.¹³⁹ Il en résulte ainsi une fuite de l'effecteur biologique. C'est pourquoi l'incorporation de lipides pégylés a été étudiée car ces

derniers permettent l'augmentation du temps de résidence des liposomes dans le sang ($t_{1/2}$ de quelques heures à 45 h).¹⁴⁰ En effet, la présence de chaînes PEG, grâce à l'encombrement stérique, diminue la vitesse d'attaque des HDL, mais ne l'empêche pas totalement (Figure 87).

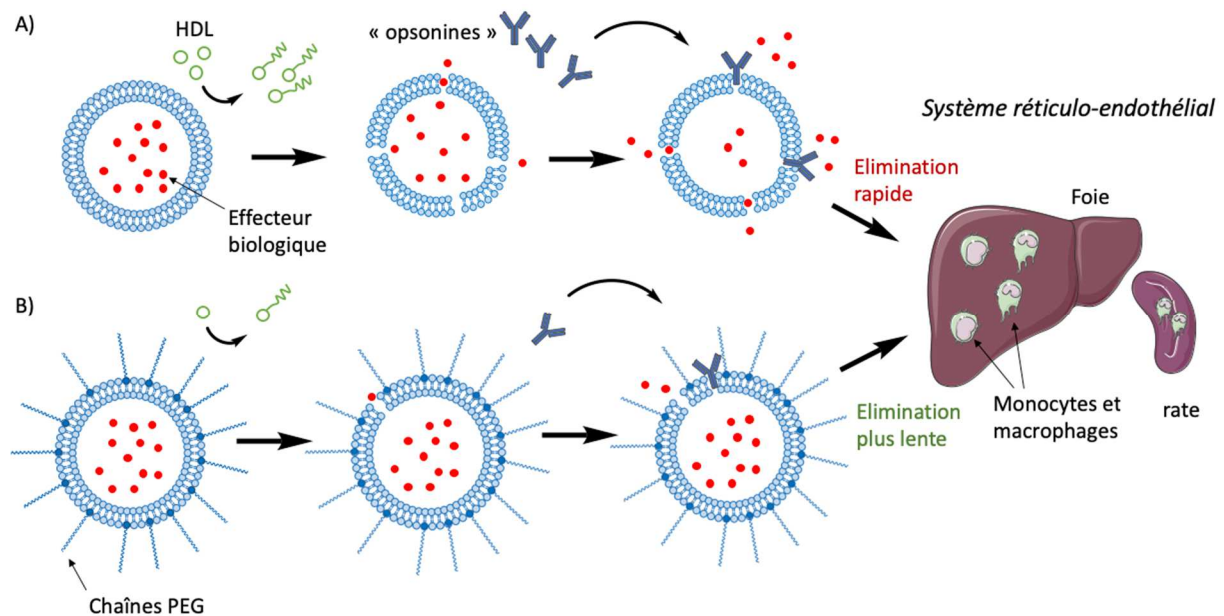


Figure 87 – Déstabilisation des liposomes par les HDL suivi de leur élimination par le système réticulo-endothélial et effet des chaînes PEG sur la stabilité des liposomes ; reproduit à partir de Zamboni W. C.¹⁴⁰

De même, nos liposomes formulés sont utilisés sur une période allant jusqu'à dix jours après leur formulation pour être sûr de leur intégrité.

Enfin, la formulation des liposomes peut se révéler plus complexe avec des composés photosensibles.

IV-3-b.2) Les nanocapsules

Pour toutes ces raisons, nous nous sommes tournés vers une autre alternative : les nanocapsules. Les nanocapsules sont intéressantes car elles ont un cœur huileux entouré par une couche de lécithines et de surfactants pegylés ce qui rend leur taille plus facilement modulable (Figure 88).

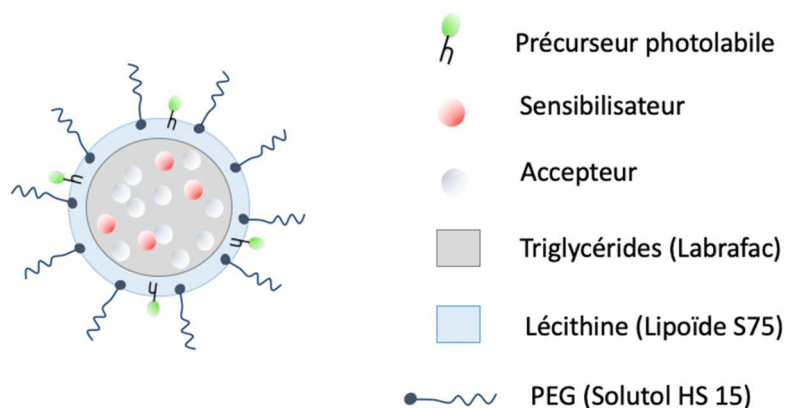


Figure 88 – Structure des nanocapsules formulées dans notre projet (solutol HS 15 = 12-hydroxystéarate de Polyéthylène glycol).

Il existe déjà quelques exemples d'application de ces nanocapsules *in vivo*, notamment pour de l'« upconversion » en imagerie. Pour illustration, Liu Q. *et al.* ont réussi à encapsuler différents couples d'« upconversion » qui ont ensuite été appliqués *in vivo* afin de faire de l'imagerie de ganglions lymphatiques de souris.¹⁴¹

Les nanoparticules que nous utilisons dans ce projet sont formulées par une méthode d'inversion de phase développée et brevetée par Heurtault B. *et al.* (No WO02688000).¹⁴² Cette méthode de formulation est facile à mettre en place, sans solvant (ce qui est un avantage pour des expériences *in vivo*), transposable à grande échelle et permet de moduler à souhait la taille des nano-objets formés.

Pour ce faire, des triglycérides (Labrafac), le tampon aqueux initial et le surfactant (solutol HS 15) sont mélangés dans un vial et mis à chauffer sur une plaque chauffante. Ensuite, 3 cycles de chauffage progressif à des températures comprises entre 60 et 90 °C et de refroidissement (à environ 30 °C) sont alors effectués (Figure 89). A la phase d'inversion de température du dernier cycle, un choc thermique est induit en ajoutant du tampon froid (0 °C, pH 7.1, HEPES 20 mM, NaCl 150 mM dans de l'eau mQ). La suspension est ensuite agitée lentement avec un barreau aimanté pendant 5 min et les nanocapsules sont finalement récupérées par filtration sur des membranes de 0.2 µm.

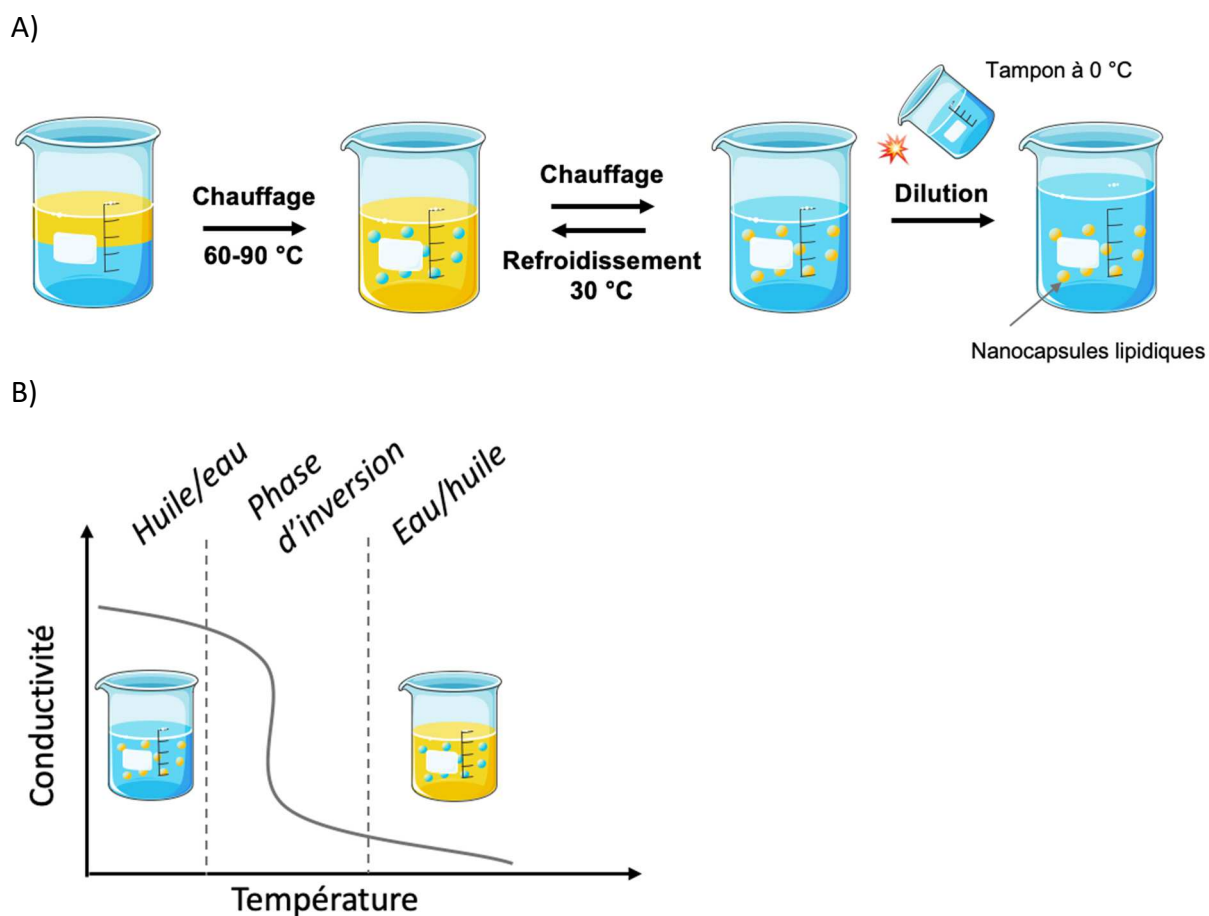


Figure 89 – A) Principe de formulation des nanocapsules par une méthode d'inversion de phase. B) Courbe de la conductivité en fonction de la température expliquant la composition des phases selon la température.

Pour encapsuler le couple d' « upconversion », il suffit de le solubiliser dans un mélange méthanol/chloroforme et d'attendre l'évaporation complète des solvants. Ensuite à ce résidu sont ajoutés les composants de la formulation des nanocapsules et les étapes précédentes sont appliquées (Figure 89A). L'avantage de ces nanoparticules est que notre groupement espaceur photolabile couplé au médicament se retrouve en dehors de la couche externe, maximisant les quantités d'effecteurs biologiques possiblement libérés.

Ces nanoparticules sont ensuite caractérisées (propriétés physicochimiques et profil d'absorption des chromophores) avant utilisation. A noter que les deux types de nanoparticules formulées avaient des tailles similaires avec un diamètre moyen de 62 ± 9 nm pour les liposomes et 76 ± 6 nm pour les nanocapsules.

IV-3-c) Nanoparticules à conversion ascendante de photons pour l'application *in vivo* en milieu aérobie

Afin d'obtenir des nanoparticules capables d'effectuer de la conversion ascendante de photons de manière efficace, notre choix du couple d'« upconversion » s'est tourné vers l'utilisation d'un couple de chromophores organiques. Comme déjà mentionné précédemment, ce choix a été guidé par le fait que les chromophores organiques possèdent de meilleures propriétés d'absorption de la lumière que les ions lanthanides. En nous basant sur des travaux précédents d'Askes S. H. C. *et al.*, nous avons décidé d'utiliser un couple d'« upconversion » commercial : le pérylène comme accepteur et le complexe de tétraphényltétrabenzoporphyrine palladium (PdTPBP) comme sensibilisateur (Figure 90).¹²⁵

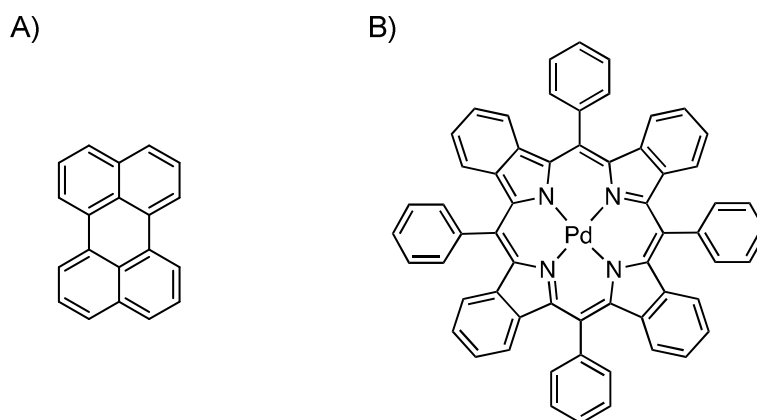


Figure 90 – Couple d'« upconversion » envisagé dans le cadre de notre projet : A) Pérylène, B) PdTPBP.

En terme de caractéristiques importantes, le PdTPBP a un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = (1.05 \pm 0.07) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 626 nm,¹⁴³ et le pérylène a une bande d'émission à 450 nm ce qui permet d'envisager un FRET efficace avec un GPP judicieusement choisi.

Nous avons donc incorporé ce couple à nos formulations avec un ratio 1:10 (sensibilisateur/accepteur), qui semble être le ratio optimal admis par la littérature. Dans notre cas, nous avons néanmoins observé que l'intensité du signal d'« upconversion » émis s'effondrait et était relativement faible. En effet, comme avancé précédemment par Ye C. *et al.*, le pérylène a tendance à former des dimères excités (excimères) et donc réduit l'efficacité de l'« upconversion ».¹⁴⁴

L'idée a alors été d'utiliser du tétra-*tert*-butylpérylène (TBPe) qui est plus encombré, empêchant ainsi une agrégation et donc la formation indésirable d'excimères (Figure 91). En effet, nous avons pu observer une bien meilleure performance d' « upconversion » en passant du pérylène à son analogue encombré TBPe.

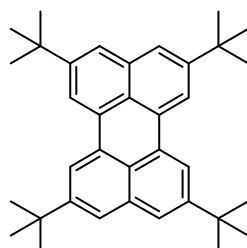
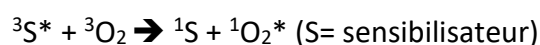


Figure 91 – Structure du TBPe.

Néanmoins, un second problème se pose : la sensibilité du système d' « upconversion » au dioxygène. Le dioxygène triplet (état fondamental du dioxygène) peut effectivement nuire au phénomène de conversion ascendante de photons car il peut réagir avec l'état triplet du sensibilisateur pour former de l'oxygène singulet :



Puisque l'état triplet du sensibilisateur est éteint (quenché) par l'oxygène, cela empêche la formation en quantité suffisante d'accepteur dans leur état excité triplet et donc d'effectuer l'annihilation triplet-triplet.

Diverses solutions ont été étudiées et notamment l'utilisation de matrices polymériques qui permettraient de limiter la diffusion du dioxygène. Askes S. H. C. *et al.* ont notamment formulé des liposomes recouverts d'une couche de silice.¹⁴⁵ La couche de silice est inerte, biocompatible, insensible au pH, transparente et sa surface peut être fonctionnalisée. Bien que prometteuses, aucune de ses formulations n'a permis d'empêcher le passage du dioxygène.

C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'incorporation d'un antioxydant dans nos nanoparticules. De nombreux articles utilisent des ions sulfites comme antioxydants,¹⁴⁶ ce que nous avons testé avec nos formulations. Nous avons vu leur efficacité après une irradiation de 3 minutes mais il n'est pas possible d'envisager des applications *in vitro* ou même *in vivo* avec

ce type d'antioxydant. Nous avons donc essayé différentes alternatives classiques et observé les résultats suivants (du plus au moins efficace) : acide ascorbique \approx ions sulfites > Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique, un analogue de la vitamine E) \approx palmitate d'ascorbyle \gg α -tocophérol (Figure 92).

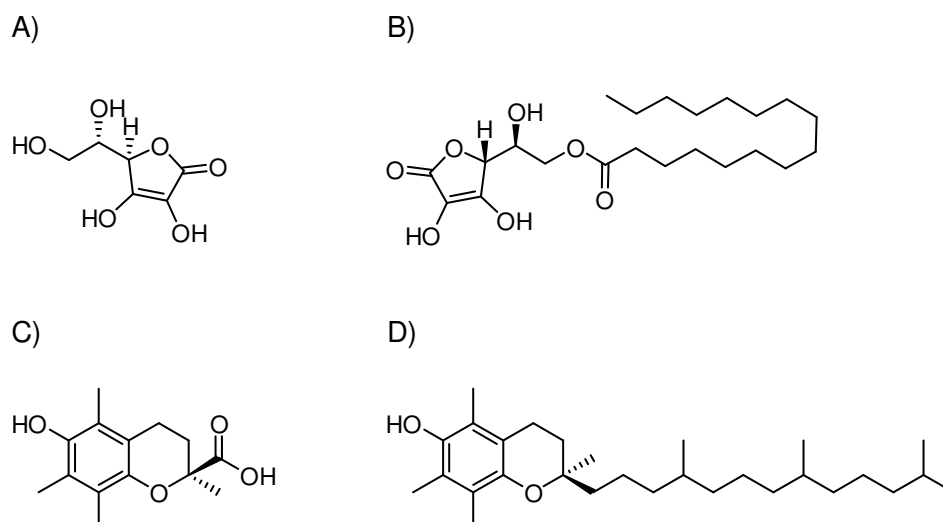


Figure 92 – Structures des différents antioxydants testés : A) acide ascorbique, B) palmitate d'ascorbyle, C) Trolox, D) α -tocophérol.

Lors de ces tests, seul l'acide ascorbique a été capable de neutraliser aussi efficacement l'oxygène singulet que les ions sulfites (Figure 93).

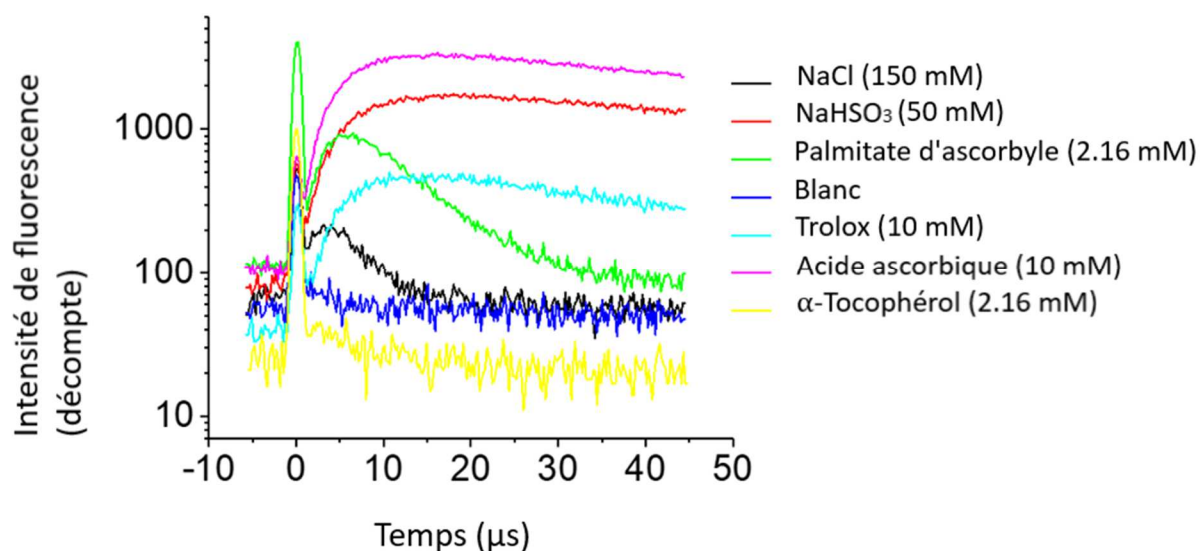


Figure 93 – Intensité de fluorescence (décompte) du TBPe excité par le PdTPBP en fonction du temps dans des liposomes formulés avec différents antioxydants. Enregistrements effectués avec une irradiation à 630 nm, 500 Hz, sur 50 μ s dans une fenêtre comprise entre 446 et 538 nm.

Afin de les comparer, nous avons dès lors formulé des nanocapsules ainsi que des liposomes en présence d'acide ascorbique. Des spectres d'émission de ces nanocapsules et liposomes chargés du couple d' « upconversion » et irradiés à 630 nm ont été enregistrés à t=0 et après une minute (Figure 94).

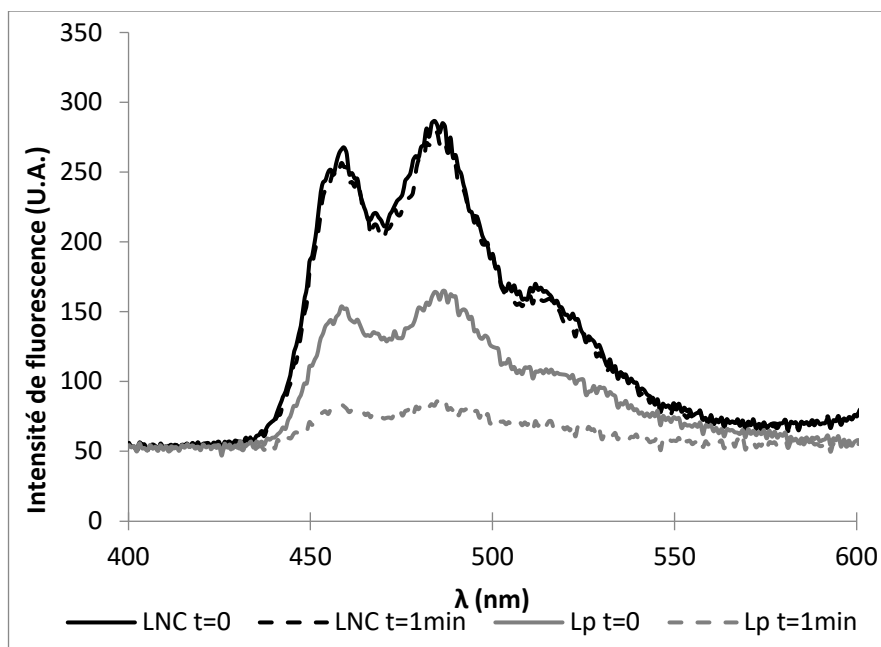


Figure 94 – Intensité de fluorescence émise par le TBPe suite à l' « up-conversion » (irradiation à 630 nm) ; trait plein noir : fluorescence émise à t=0 par les nanocapsules (LNC), trait en pointillé noir : fluorescence émise à t=1 min par les nanocapsules (LNC), trait plein gris : fluorescence émise à t=0 par les liposomes (Lp), trait en pointillé gris : fluorescence émise à t=1 min par les liposomes (Lp).

Alors qu'il a été constaté que l'intensité de la fluorescence émise par les nanocapsules était stable dans le temps, l'effet n'est pas le même avec les liposomes avec une intensité du signal émis qui a été divisé par environ 1.8 après une minute d'irradiation. De plus, l'intensité pour les nanocapsules est déjà environ 1.7 fois plus importante que celle des liposomes à t=0. Askes S. H. C. *et al.* ont rapporté un rendement quantique d' « upconversion » de 0.005 (déterminé grâce à une sphère d'intégration) pour ce couple d' « upconversion » dans des liposomes.¹²⁵ A partir de là, nous pouvons en déduire que le rendement quantique d' « upconversion » de nos nanocapsules est de l'ordre de 0.0085. Cette efficacité d' « upconversion » plus importante pour les nanocapsules (visible à l'œil nu, Figure 95) pourrait être expliquée par la possibilité plus importante de mouvements en 3 dimensions des sensibilisateurs et accepteurs comparée à la bicouche lipidique des liposomes. Cela augmenterait ainsi les possibilités de collision des chromophores excités et donc la probabilité d' « upconversion » assistée par

annihilation triplet-triplet. De plus, la stabilité de la fluorescence émise par les nanocapsules peut être due à la possible diffusion plus faible de l'oxygène dans le cœur lipidique des nanocapsules.

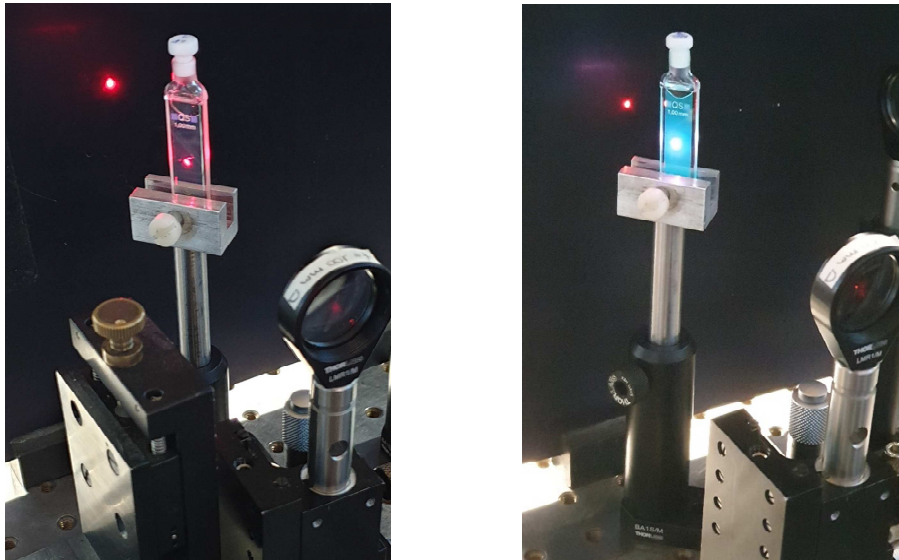


Figure 95 – Photos des échantillons irradiés à 630 nm et effectuant l' « upconversion » : à gauche un échantillon de liposomes, à droite un échantillon de nanocapsules.

En bref, les nanocapsules ont montré une plus grande stabilité ainsi qu'une plus grande efficacité de conversion ascendante de photons assistée par annihilation triplet-triplet.

IV-3-d) Transfert d'énergie à la surface des nanoparticules

Après avoir validé le phénomène d' « upconversion » par annihilation triplet-triplet au sein de nos nanoparticules, nous nous sommes focalisés ensuite sur la possibilité de transmettre cette énergie à un GPP afin de libérer un effecteur biologique.

Afin d'obtenir la meilleure efficacité de FRET possible, il existe deux conditions à respecter pour choisir un GPP approprié : 1) les spectres d'absorption de l'accepteur de FRET et d'émission du donneur doivent se recouvrir et 2) une distance de Förster courte de l'ordre d'une dizaine de nanomètres est requise.

Dans ce cadre, nous avons sélectionné le GPP publié par Lin Q. *et al.* qui présente un maximum d'absorption autour de 450 nm,⁵⁹ soit similaire à l'émission du donneur de FRET, le TBPe, qui est également de l'ordre de 450 nm. Le GPP va néanmoins devoir être modifié afin d'y insérer

un résidu réactif additionnel permettant d'installer le GPP sur nos nanoparticules. Pour cela et comme le montre la Figure 96, notre choix s'est porté sur un alcyne vrai permettant d'envisager l'installation sur la nanoparticule par chimie alcyne/azoture dite « click » (Figure 96).

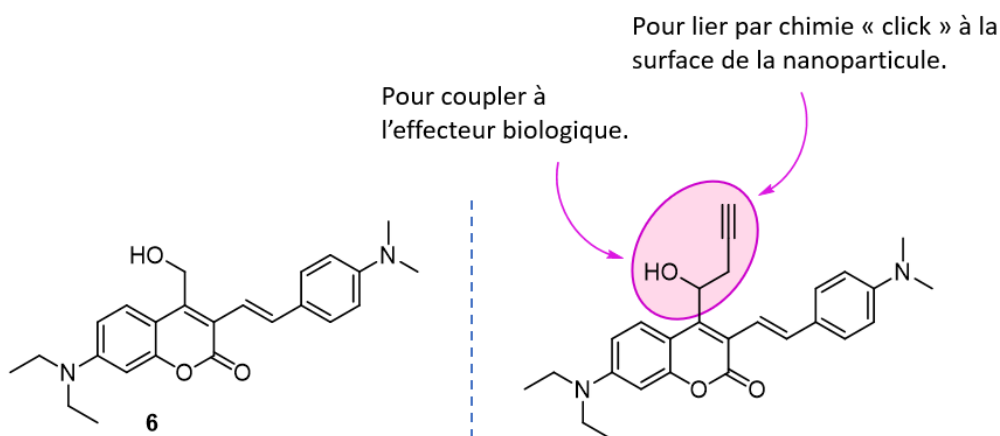


Figure 96 – A gauche le produit synthétisé par Lin Q. et al.⁵⁹ et à droite le GPP envisagé dans notre projet.

La première stratégie de synthèse pour le GPP envisagé consistait en la protection de l'aldéhyde de la coumarine **3** sous forme de 1,3-dioxolane avec 95 % de rendement (Schéma 47). Le composé **46** est ensuite bromé en position 3 grâce à du NBS en présence d'une quantité catalytique d'acétate d'ammonium pour conduire à **47** avec 81 % de rendement. Ensuite, un couplage de Suzuki-Miyaura a été réalisé avec l'ester boronique **9** pour obtenir la coumarine conjuguée **48** avec 83 % de rendement. Des conditions acides standard de déprotection ont alors été employées mais hélas, il n'a pas été possible d'isoler l'aldéhyde **49** à cause de sa trop grande sensibilité. Nous avons donc essayé d'échanger ces deux dernières étapes et commencé par la déprotection de **47** pour conduire à **50** avec des rendements plutôt décevants compris entre 23 et 41 %. De plus, il n'a pas été possible d'obtenir le produit du couplage de Suzuki-Miyaura **49**.

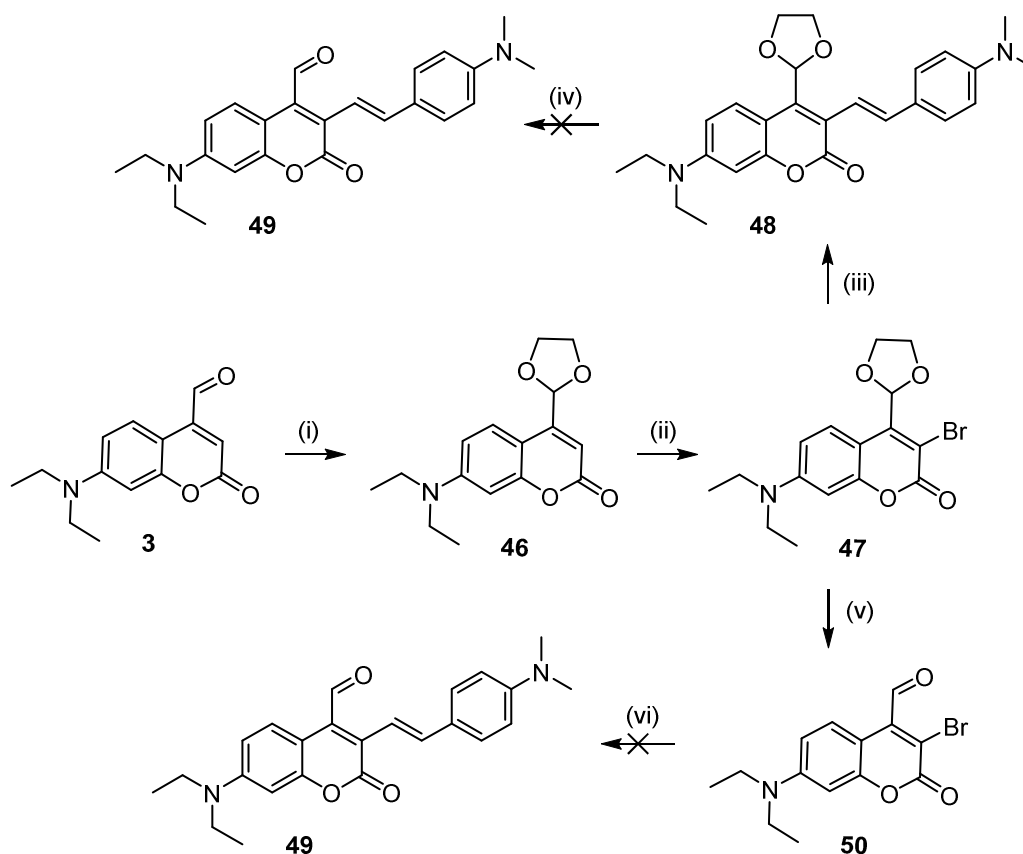


Schéma 47 – Deux voies de synthèses menées pour obtenir l'aldéhyde conjugué **49** : (i) TsOH, éthylène glycol, toluène, reflux avec Dean-Stark, 16 h, 95 % ; (ii) NBS, NH₄OAc, MeCN, TA, 45 min, 81 % ; (iii) **9**, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 45 min, 83 % ; (iv) TsOH, H₂O/toluène (1:1), reflux, 21 h ; (v) TsOH, H₂O/MeCN, 80 °C, 23 h, 41 % ; (vi) **9**, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 45 min.

Au vu de ces résultats témoignant de l'instabilité de ce type d'aldéhydes, nous avons envisagé une autre stratégie de synthèse employant à nouveau **3** comme substrat mais consistant à insérer le groupement propargyle en premier. Pour cela, l'aldéhyde **3** est traité par du bromure de propargylzinc pour conduire à **11** avec 86 % de rendement qui est ensuite bromé en position 3 avec 93 % de rendement (Schéma 48). Ensuite, comme il n'est pas possible d'effectuer le couplage de Suzuki-Miyaura directement en position 3 (processus domino privilégié, cf chapitre II), il a fallu d'abord fonctionnaliser l'alcyne avant de réaliser le couplage pallado-catalysé. Nous avons donc effectué une cycloaddition alcyne/azoture assistée au cuivre (CuAAC) entre l'alcyne vrai de la coumarine **12** et une chaîne grasse pegylée pour conduire au produit **51** avec un excellent rendement de 92 %. Enfin, le couplage de Suzuki-Miyaura avec l'ester boronique **9** a conduit au bras espaceur photosécable (BEP) cible **52** avec 83 % de rendement.

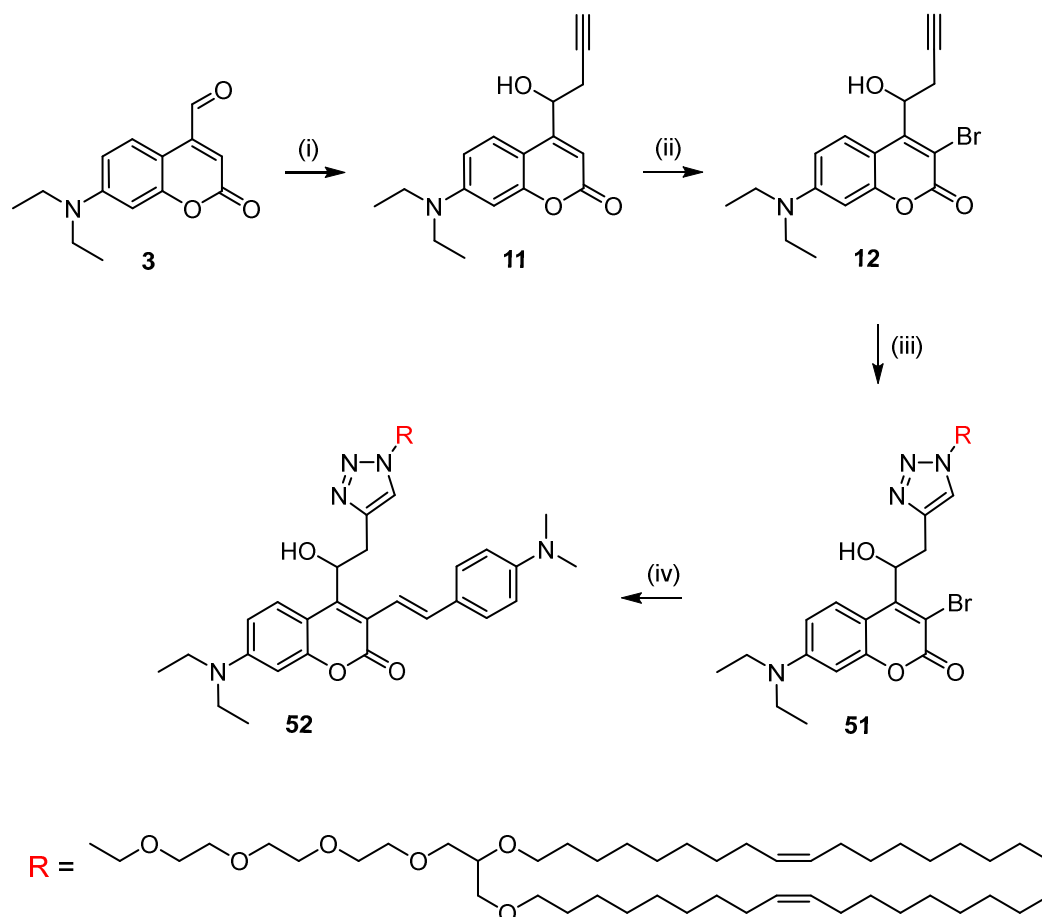


Schéma 48 – Synthèse du BEP **52** relié à une ancre lipidique : (i) bromure de propargylzinc, THF, TA, 1 h 30, 86 % ; (ii) NBS, NH₄OAc, MeCN, TA, 30 min, 93 %, (iii) R-N₃, acide ascorbique, tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine, Cu(CH₃CN)₄PF₆, CH₂Cl₂, TA, 19 h, 92 % ; (iv) **9**, K₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, H₂O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 1 h 20, 83 %.

Comme ce bras espaceur photosécable (BEP) **52** a montré des propriétés de fluorescence intéressantes (Figure 97), nous avons exploité cette fluorescence pour évaluer l'efficacité de FRET entre le système d' « upconversion » et le BEP **52**. Pour chaque type de nanoparticules (nanocapsules et liposomes), différentes formulations ont été préparées :

- le système d' « upconversion » comme référence (PdTPBP 20 μM, TBPe 200 μM),
- le système d' « upconversion » + l'accepteur de FRET (PdTPBP 20 μM, TBPe 200 μM, BEP **52** 280 μM),
- un contrôle sans l'accepteur d' « upconversion » (PdTPBP 20 μM, BEP **52** 280 μM).

Ces échantillons ont été irradiés à 630 nm et l'émission de fluorescence des nanoparticules a alors été enregistrée (Figure 98 et Figure 99). Sans l'accepteur TBPe et comme attendu, aucune émission de fluorescence n'a été détectée. Il n'y a donc pas de transfert d'énergie directe entre le complexe de palladium donneur et le bras espaceur photosécable (courbe

grise). La courbe bleue montre bien l'émission du TBPe, c'est-à-dire que l' « upconversion » est bien effective dans les deux types de nanoparticules. Enfin l'irradiation du système complet avec l'accepteur de FRET (BEP) a conduit avec succès à l'émission du BEP. En effet le signal de fluorescence du BEP est clairement visible sur les deux spectres (courbe orange). A noter que nous avons néanmoins observé une émission résiduelle du TBPe dans le cas des nanocapsules, ce qui montre que l'efficacité de ces dernières est légèrement moindre que celle des liposomes.

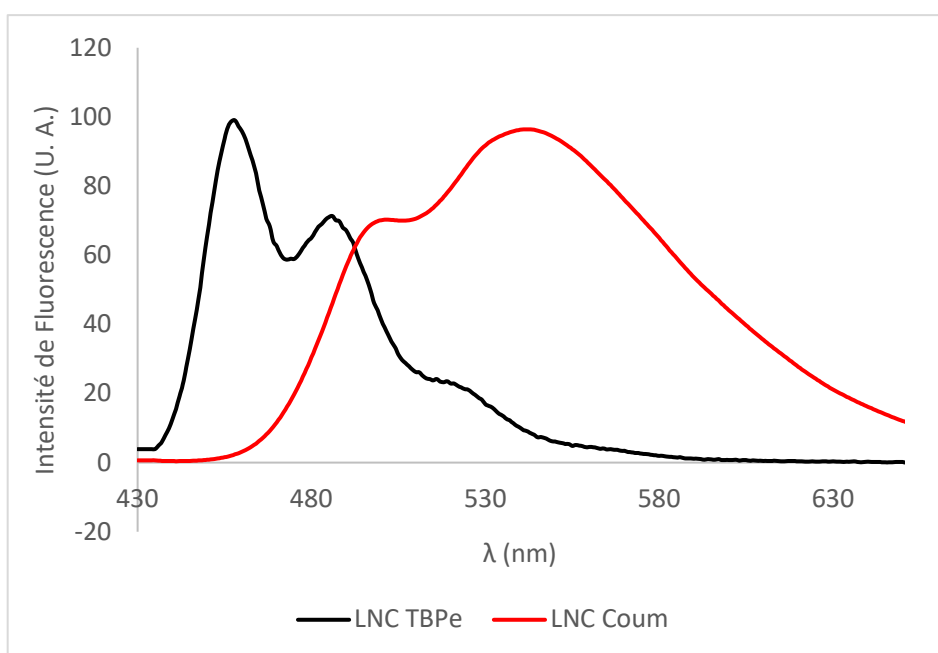


Figure 97 – Spectre d'émission des nanocapsules chargées de TBPe (noir, excitation à 410 nm) ou du BEP 52 (= coum, rouge, excitation à 440 nm).

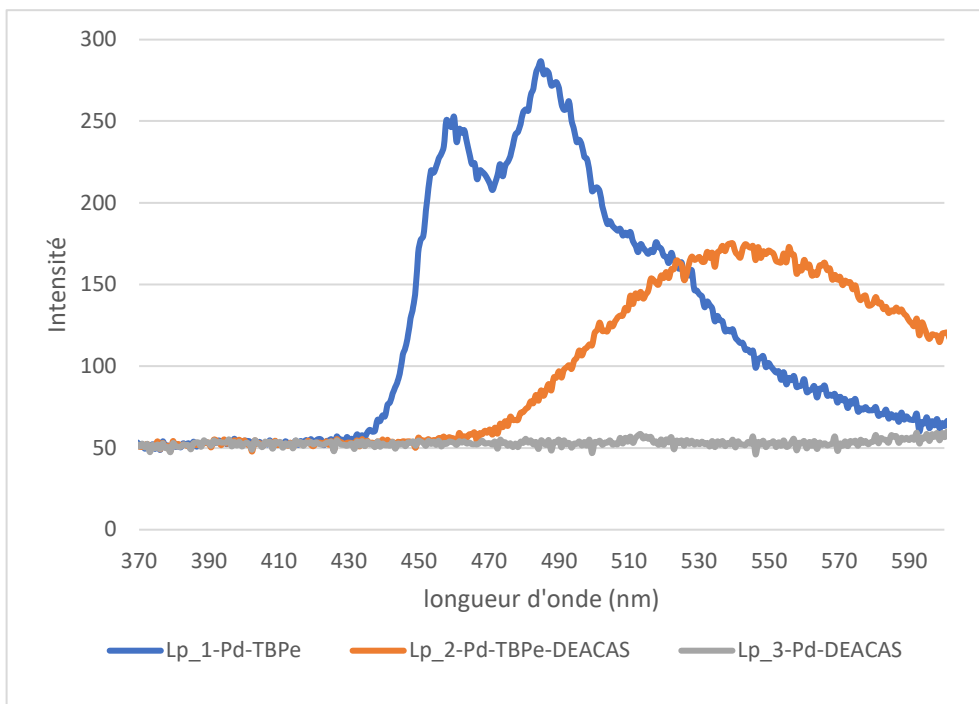


Figure 98 - Spectre d'émission de divers liposomes (excitation à 630 nm) : en bleu = chargés avec PdTPBP et TBPe ; en orange = chargés avec PdTPBP, TBPe et 52 (= DEACAS), en gris = chargés avec PdTPBP et 52 (DEACAS).

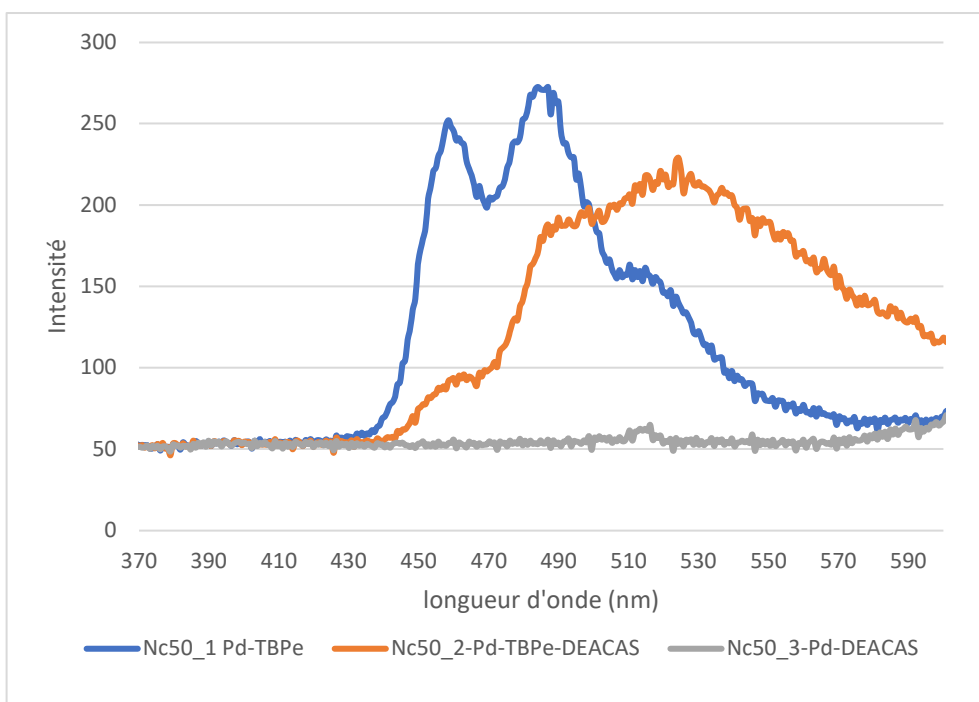


Figure 99 - Spectre d'émission de diverses nanocapsules (excitation à 630 nm) ; en bleu = chargées avec PdTPBP et TBPe ; en orange = chargées avec PdTPBP, TBPe et 52 (= DEACAS), en gris = chargées avec PdTPBP et 52 (DEACAS).

Pour calculer l'efficacité de FRET, comme les spectres d'émission du TBPe et de la coumarine se recouvrent partiellement, nous utilisons les spectres d'absorbance et d'excitation des différentes nanoparticules formulées.

Nous avons ainsi déterminé des rendements de FRET de l'ordre de 57 % et 46 % pour les liposomes et les nanocapsules respectivement. Cette différence peut être expliquée par le fait que le FRET dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur. Or, dans les nanocapsules le système d'« upconversion » se trouve dans le cœur lipidique et certains accepteurs d'upconversion (donneur de FRET) peuvent donc se retrouver un peu plus éloignés de l'accepteur de FRET (le BEP 52) qui est à la surface de la nanoparticule. Dans les liposomes, les donneurs de FRET se trouvent dans la bicouche lipidique et sont donc plus proches de l'accepteur de FRET (BEP 52).

Néanmoins, au regard de leur grande stabilité, de leur facilité de formulation, d'une excellente efficacité d'« upconversion » et d'une bonne efficacité de FRET, les nanocapsules lipidiques semblent être les nanoparticules les plus intéressantes et ont été privilégiées pour la suite du projet par rapport aux liposomes.

IV-3-e) Libération d'un anticancéreux par photolyse TTA-UC

Notre premier choix d'effecteur biologique a été la doxorubicine.

La doxorubicine, ou adriamycine, est un produit naturel de la famille des anthracyclines qui a été isolé dans les années 70 de streptomyces *peucetius var. caesius* (Figure 100). Ce produit naturel s'est révélé être un excellent anticancéreux et a rapidement été développé comme médicament indiqué dans le traitement de différents cancers, notamment du sein, du poumon, des ovaires, de la thyroïde, de sarcomes ou encore certains cancers pédiatriques.¹⁴⁷

La doxorubicine aurait deux mécanismes d'action principaux : ¹⁴⁷

- en s'intercalant dans l'ADN et en perturbant la réparation de l'ADN par le biais des topoisomérases II,
- en générant des radicaux libres (ROS) qui endommagent les membranes cellulaires, l'ADN, des protéines ...

Ces mécanismes conduisent donc à la mort cellulaire. Cependant la doxorubicine a des effets secondaires et induit notamment une cardiotoxicité. C'est pourquoi il serait intéressant de pouvoir contrôler la localisation de sa libération, sa concentration, et l'utilisation de nanoparticules est donc particulièrement attrayante.

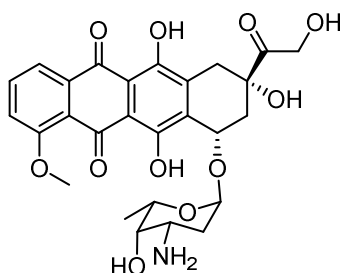


Figure 100 – Structure de la doxorubicine.

Dans un premier temps et afin de vérifier que la libération de l'anticancéreux était effective, nous avons décidé d'installer la doxorubicine sur un GPP simple, à savoir **6** (Schéma 49) plutôt que directement sur **52** (Schéma 48).

Pour cela, l'alcool de **6** a tout d'abord été activé avec du carbonate de bis(4-nitrophényle) en présence de DIPEA pour former l'intermédiaire **53** (Schéma 49). Deux molécules photoactivables ont ensuite été formées à partir de cet intermédiaire **53** : la DEACAS-DOX **54** obtenue avec 15 % de rendement et la DEACAS-benzylamine **55** avec 45 % de rendement. Cette dernière comporte le groupement 4-méthoxybenzylamine qui servira de modèle pour la libération d'un effecteur biologique. Nous avons fait le choix d'un lien carbamate entre la coumarine et les amines afin d'éviter d'éventuelles hydrolyses en milieu physiologique.

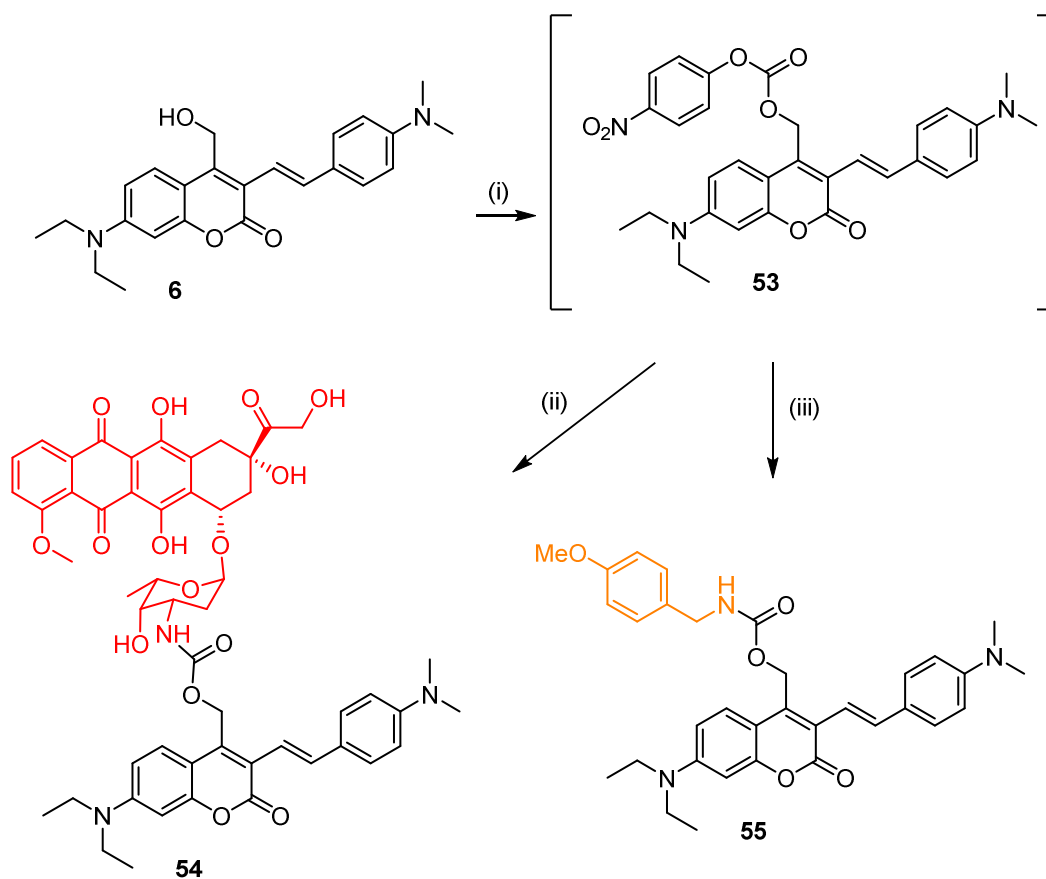


Schéma 49 – Synthèse des deux analogues photoactivables **55** et **54** ; (i) carbonate de bis-(4-nitrophényle), DIPEA, DMF, TA, 18 h ; (ii) Doxorubicine-HCl, DIPEA, DMAP, DMF, TA, 4 h, 15 % ; (iii) 4-méthoxybenzylamine, DIPEA, DMAP, DMF, TA, 5 h, 45 %.

Nous avons ensuite irradié à 430 nm ces deux échantillons solubilisés dans un mélange MeOH/H₂O (9:1) (Figure 101 et Figure 102). Bien que la photolyse se soit avérée effective pour la DEACAS-DOX **54**, elle était bien plus lente que pour la benzylamine utilisée comme contrôle (environ 14 min pour **54** contre 2 min 15 s pour **55**). De plus, nous avons observé un phénomène de photodégradation de la doxorubicine qui a été peu rapportée dans la littérature récente.

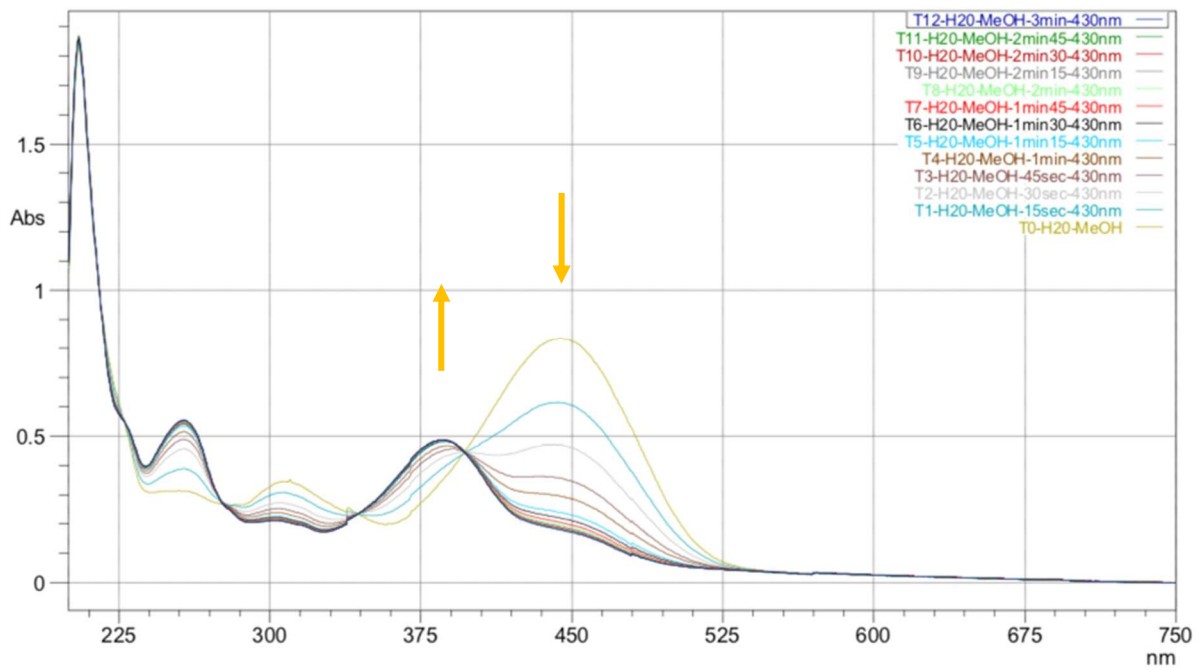


Figure 101 – Suivi UV-visible de l'irradiation à 430 nm de 55 au cours du temps.

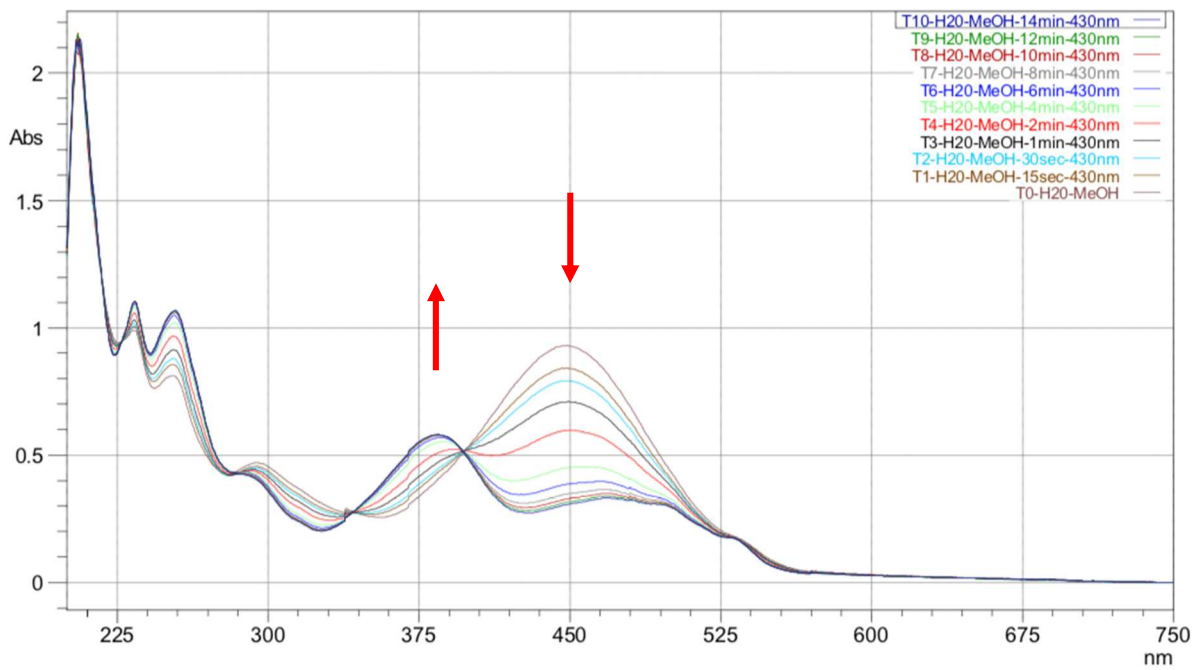


Figure 102 – Suivi UV-visible de l'irradiation à 430 nm de 54 au cours du temps.

Elle a néanmoins été décrite dès les années 80, avec Tavoloni N. *et al.* qui ont été parmi les premiers à observer la perte des propriétés de fluorescence de la doxorubicine quand elle est exposée à la lumière.¹⁴⁸ Les auteurs ont également montré que la photodégradation était exacerbée lorsque le solvant utilisé était de l'eau.

Williams B. A. *et al.* ont aussi remarqué que lorsque la doxorubicine était irradiée à 366 nm, l'anticancéreux perd ses propriétés cytotoxiques envers les cellules S180.¹⁴⁹

De même, Wood M. J. conseille de protéger les solutions de doxorubicine de la lumière à tout instant si elles sont utilisées pour des études de stabilité ou pour des expériences *in vitro*.¹⁵⁰

Pour vérifier cela, nous avons nous-même enregistré des spectres de la doxorubicine en solution à différents intervalles d'irradiation à 430 nm (Figure 103).

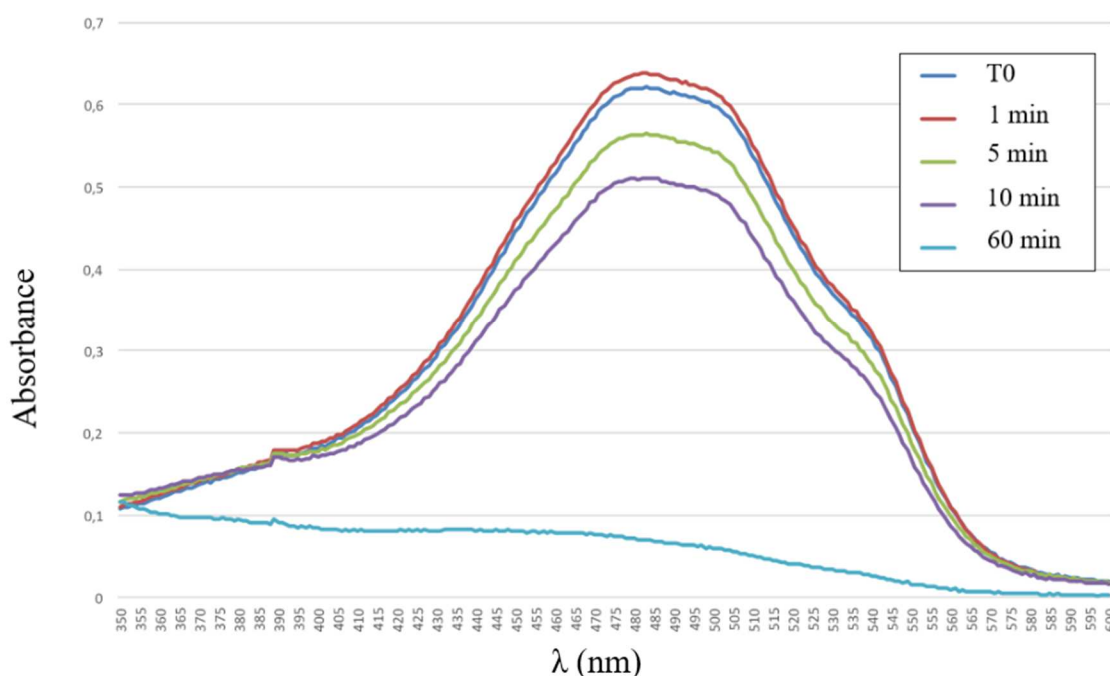


Figure 103 – Evolution du spectre d'absorption de la doxorubicine après différents temps d'irradiations à 430 nm (50 μ M dans un tampon).

L'utilisation de la doxorubicine dans ces premiers essais a ainsi révélé l'importance de critères pour le choix de la molécule cytotoxique. Ainsi, elle doit respecter les conditions suivantes :

- la molécule doit posséder une fonction amine pour permettre son installation sur le GPP,
- l'activité de la molécule doit être masquée lorsqu'elle est reliée au GPP,
- cette molécule ne doit pas absorber vers 440 nm ou du moins rester stable après irradiation dans ce domaine de longueurs d'onde.

Notre choix s'est donc ensuite porté sur le melphalan, un anticancéreux qui respecte les critères cités précédemment (Figure 104). Le melphalan possède effectivement une fonction amine qui permet de le lier à notre bras espaceur photosécable et il n'absorbe pas à 440 nm.

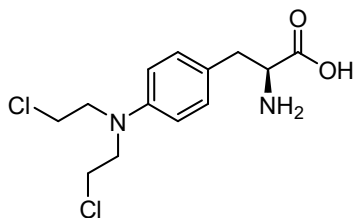


Figure 104 – Structure du melphalan.

Le melphalan est un agent alkylant du groupe des moutardes azotés et a été développé par Bergel F. et Stock J. A. en 1954, son énantiomère L étant le plus actif.¹⁵¹ Il a longtemps été utilisé dans le traitement de lymphomes, leucémies et différents types de tumeurs comme le neuroblastome, le mélanome, le sarcome ou encore le cancer des ovaires. Toutefois, de nos jours, il est principalement utilisé dans le traitement du myélome multiple.¹⁵² Son mécanisme d'action consiste en l'établissement de liaisons covalentes avec les groupements nucléophiles des brins d'ADN (notamment guanine), empêchant la réplication et donc la division cellulaire.¹⁵³

Il est important ici de préciser que le melphalan a également des effets secondaires : ¹⁵¹

- il est toxique envers la moelle osseuse et il faut donc prélever de la moelle au patient avant traitement pour ensuite effectuer une greffe (pour les traitements à forte concentration de melphalan),
- il a des effets gastro-intestinaux, ce qui cause des vomissements, nausées et diarrhées au patient,
- il a aussi montré une toxicité envers le foie, les reins et les poumons.

C'est pour toutes ces raisons qu'il nous a paru intéressant d'utiliser des nanocapsules photoactivables afin de cibler les cellules tumorales, d'améliorer son internalisation dans ces cellules et donc de limiter les effets secondaires.

La molécule photoactivable **57** a alors été synthétisée à partir de l'alcool **52** avec 82 % de rendement sur les deux étapes (Schéma 50).

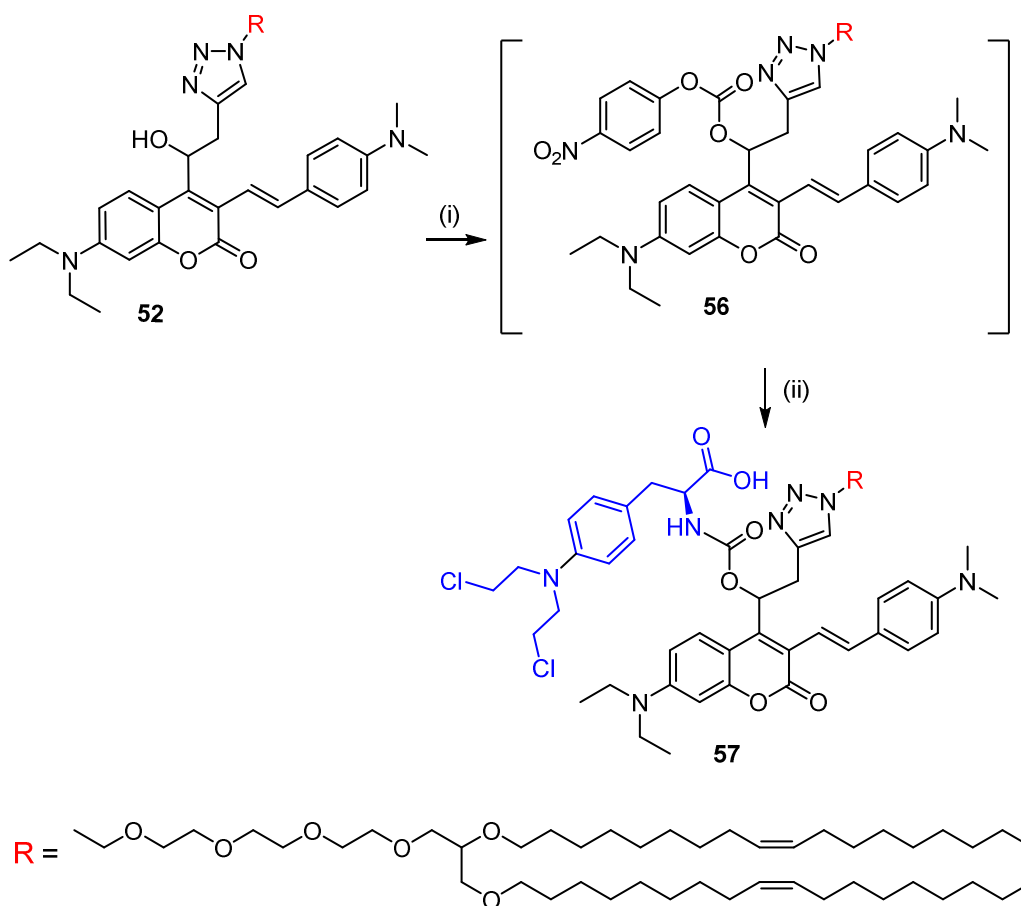


Schéma 50 – Synthèse du BEP relié au melphalan ; (i) carbonate de bis-(4-nitrophényle), DIPEA, DMF, TA, 8 h ; (ii) melphalan, DIPEA, DMAP, DMF, TA, 4 h 30, 82 % sur les deux étapes.

Des nanocapsules d'environ 76 nm ont alors été formulées avec la molécule photoactivable **57**. Afin de vérifier la photolibération du melphalan, les nanocapsules ont été irradiées à 430 nm ce qui permet de s'affranchir du phénomène d' « upconversion » et d'irradier directement **57** afin de conduire à sa photolyse. Cependant, il n'est pas possible de suivre directement la libération de la molécule cytotoxique par HPLC. Il a donc fallu imaginer une alternative pour réaliser ce suivi. Pour cela, les nanocapsules irradiées ou non ont été séparées à l'aide d'un concentrateur centrifuge Vivaspin® (Figure 105, inspirée de Lin M. *et al.*¹⁵⁴) : il est ainsi possible de collecter le filtrat (partie basse du système) contenant le tampon et le melphalan s'il y a libération.

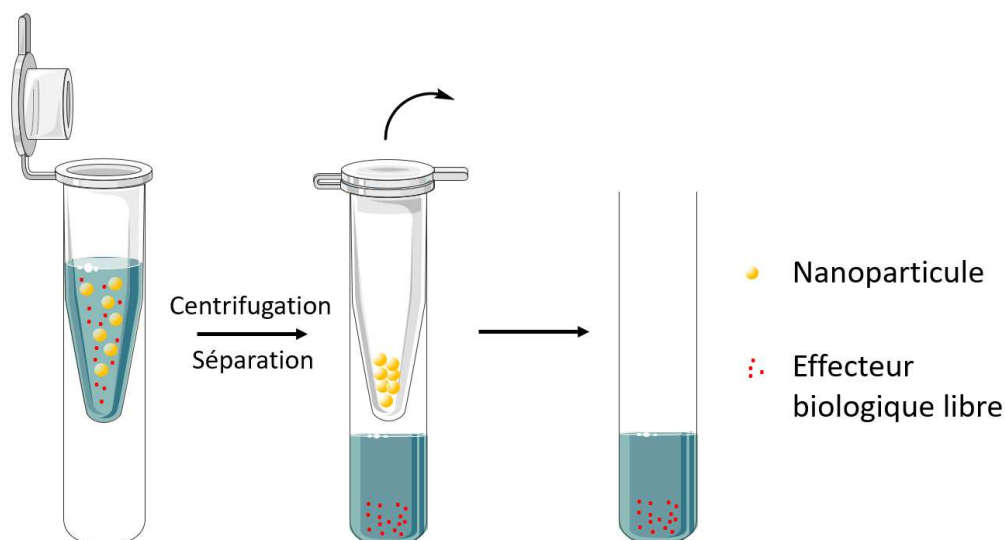


Figure 105 – Principe de la séparation à l'aide d'un concentrateur centrifuge Vivaspin®, inspiré de Lin M. et al.¹⁵⁴

Le filtrat a alors été analysé par spectrophotométrie UV-visible ou par HPLC. Les premiers résultats obtenus sont décrits dans la Figure 106.

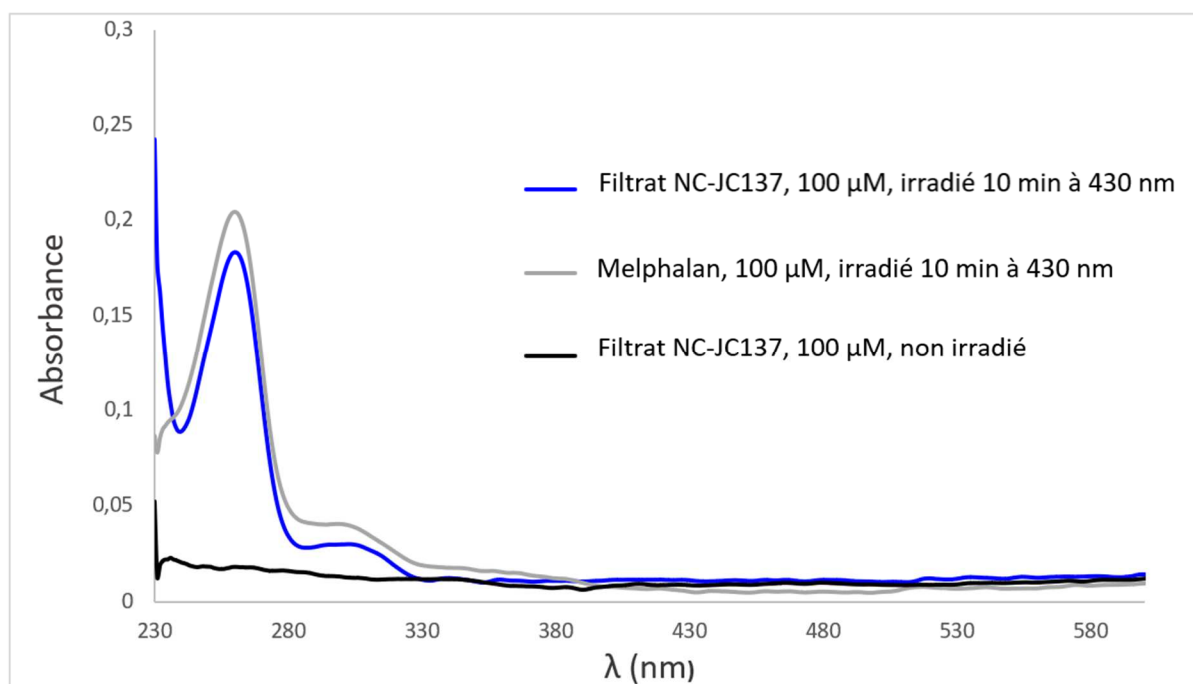


Figure 106 – Spectre d'absorption des différents filtrats obtenus après séparation à l'aide d'un concentrateur centrifuge Vivaspin®.

Le spectre d'absorption du filtrat de l'échantillon non irradié ne montre pas de présence de melphalan contrairement à celui irradié à 430 nm. Afin de comparer, le spectre du melphalan

à la concentration attendue a été enregistré. Cette expérience a pu montrer clairement le relargage de l'anticancéreux.

Nous avons également appliqué différents temps d'irradiation à nos échantillons et effectué cette même séparation avant d'enregistrer les spectres d'absorption (Figure 107). L'évolution du pic d'absorption du melphalan montre bien la libération de ce dernier au cours de l'irradiation et nous avons également constaté que le relargage est quasiment terminé après 2 minutes d'irradiation.

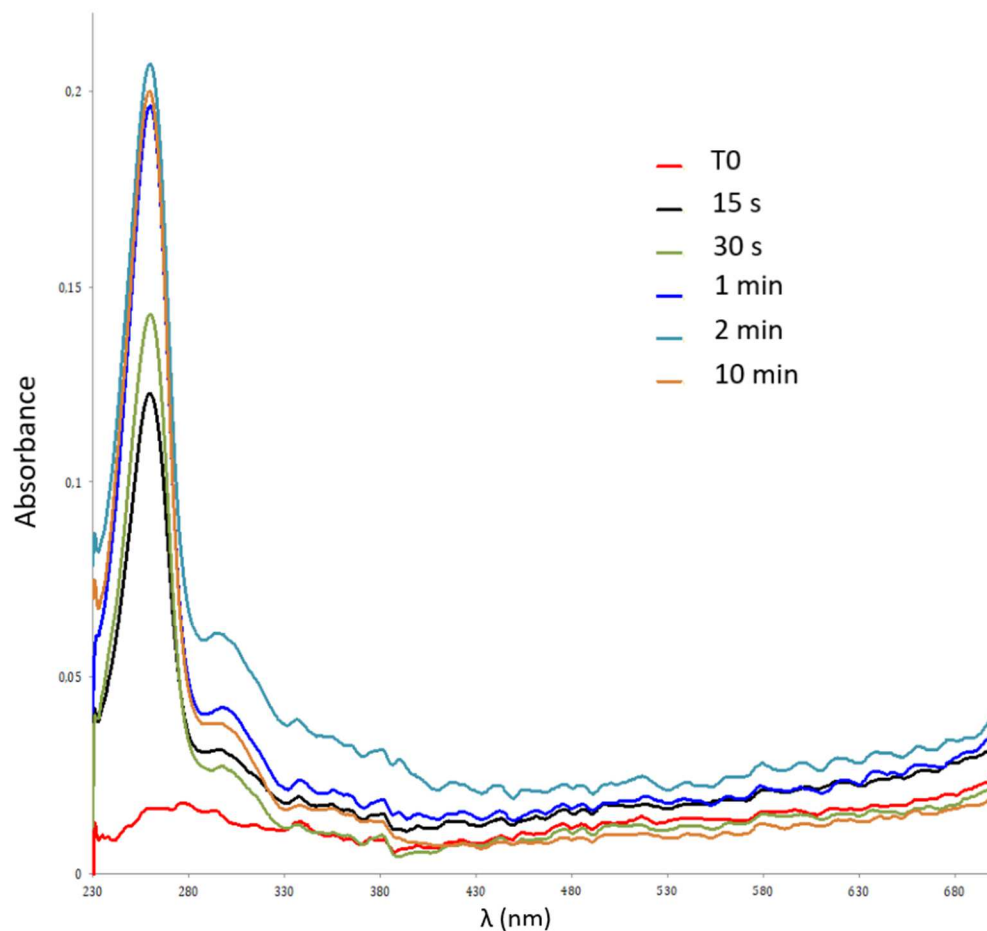


Figure 107 – Superposition des spectres d'absorption des filtrats après différents temps d'irradiation à 430 nm des nanocapsules comportant le BEP relié au melphalan.

Nous avons donc quantifié le pourcentage de photolibération du melphalan au cours du temps lorsque nos nanocapsules sont irradiées à 430 nm. Nous avons donc réalisé une gamme d'étalonnage grâce à des injections HPLC de solutions à différentes concentrations de melphalan (Figure 108).

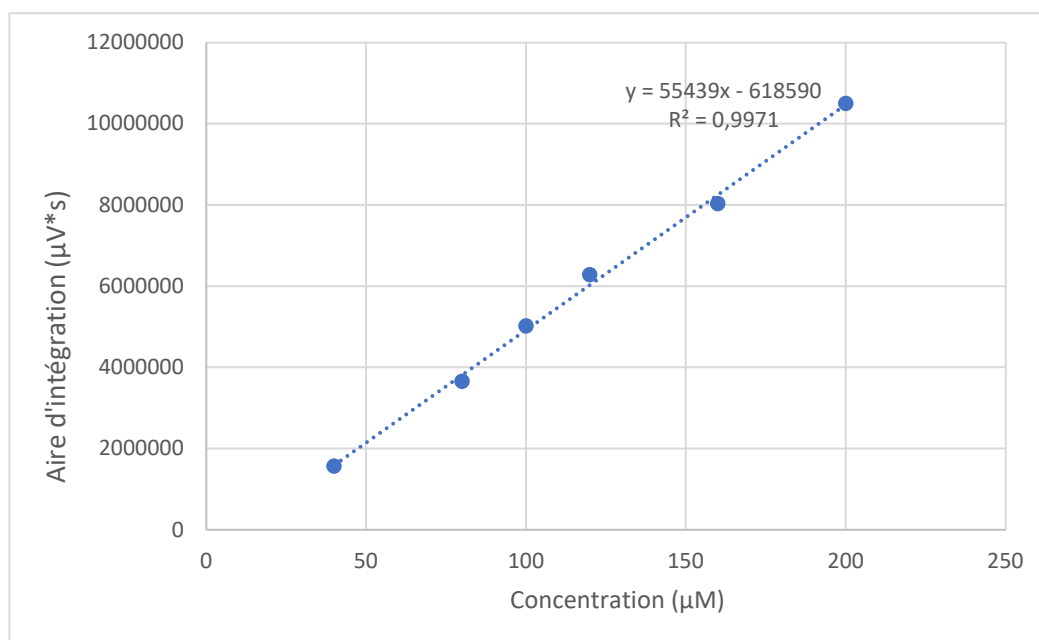


Figure 108 - Courbe d'étalonnage du melphalan par analyse HPLC.

Des nanocapsules sont ensuite irradiées à 430 nm sur différents intervalles de temps et filtrées sur concentrateur centrifuge Vivaspin®. Le filtrat est ensuite injecté sur HPLC et l'aire d'intégration du pic correspondant au melphalan permet de calculer le pourcentage de libération de ce dernier (Tableau 7). Ainsi, après 2 minutes d'irradiation à 430 nm, environ 89 % de melphalan est libéré et après 10 minutes, la totalité du melphalan a été libéré.

Tableau 7 - Résultats des rendements de photolibération du melphalan selon différents temps d'irradiation à 430 nm.

Temps d'irradiation à 430 nm (s)	Rendement de photolibération (%)
0	Non détecté
30	46.7 ± 0.7
120	89.2 ± 1.1
600	100.4 ± 0.6

Le rendement quantique de photolibération a ensuite été déterminé par méthode compétitive avec la référence **10** de Lin Q. *et al.* ($\epsilon_{ref}=41000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\Phi_{ref}=0.2$) dans un mélange de solvants MeOH/H₂O. L'évolution de l'absorbance à 450 nm a été tracée (Figure 109, Figure 110, Figure 111 et Figure 112) et le rendement quantique a été déterminé grâce à la formule suivante :

$$\frac{k_{ech}}{k_{ref}} = \frac{\epsilon_{ech} * \Phi_{ech}}{\epsilon_{ref} * \Phi_{ref}}$$

Dans ces conditions, un rendement quantique de photolibération de 0.2 a été déterminé pour la molécule **57** dans un mélange MeOH/PBS (1:1 ; 2 μ M).

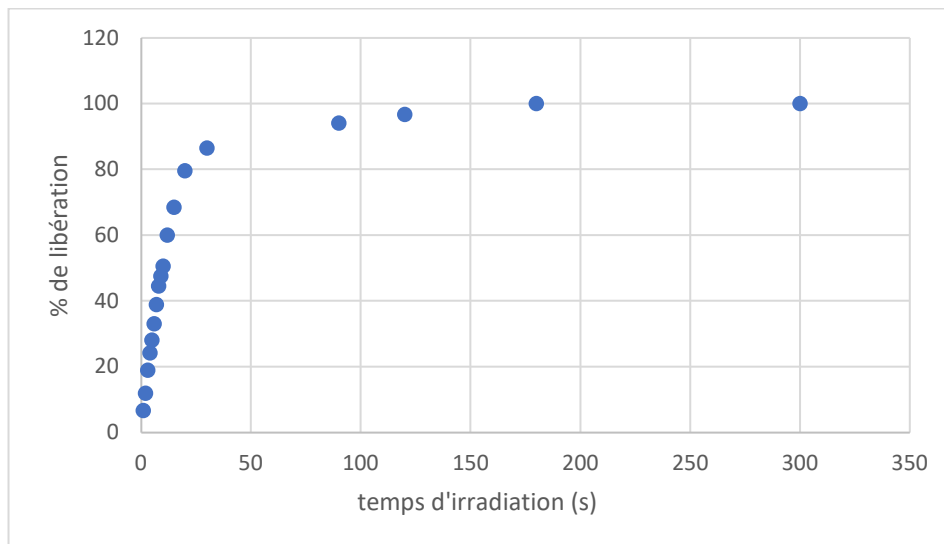


Figure 109 – Suivi cinétique de la photolibération de la référence **10** (décroissance à 450 nm).

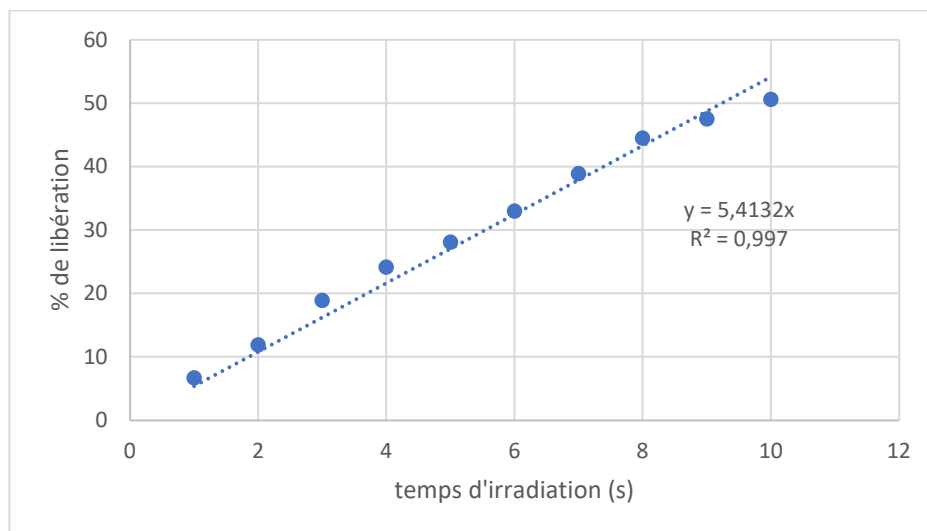


Figure 110 – Partie linéaire du suivi cinétique de la photolibération de la référence **10** (décroissance à 450 nm).

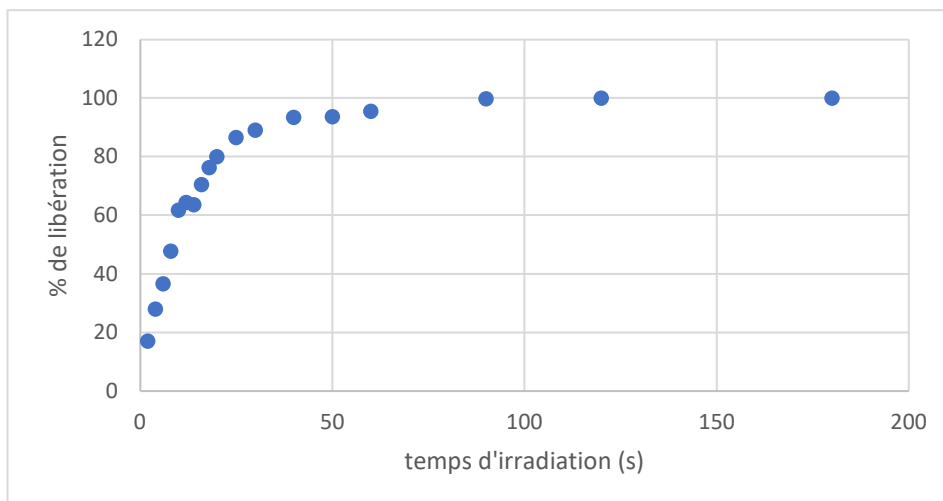


Figure 111 - Suivi cinétique de la photolibération du composé **57** dans un mélange MeOH/PBS (1:1 ; 2 μ M ; décroissance à 450 nm).

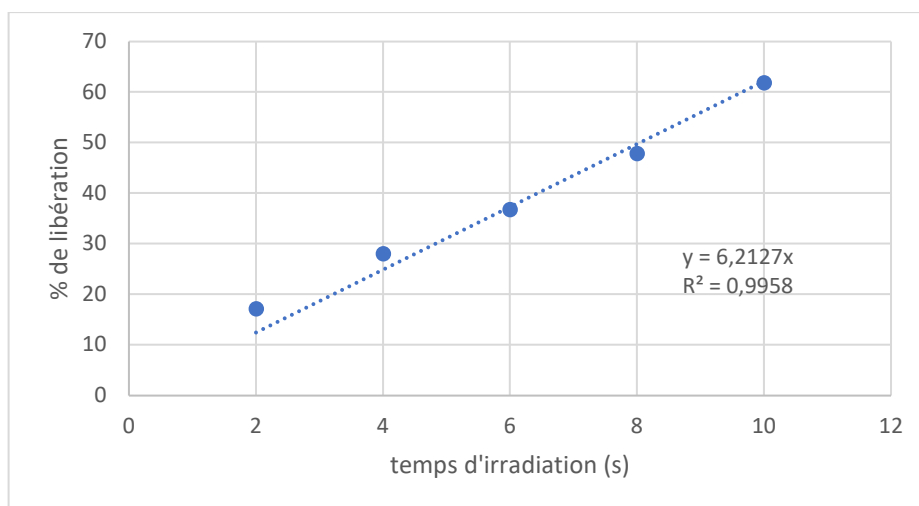


Figure 112 - Partie linéaire du suivi cinétique de la photolibération du composé **57** dans un mélange MeOH/PBS (1:1 ; 2 μ M ; décroissance à 450 nm).

De même, le rendement quantique de photolibération de **57** a été directement déterminé à partir de nanoparticules formulées et une valeur similaire de 0.23 a été obtenue (Figure 113 et Figure 114).

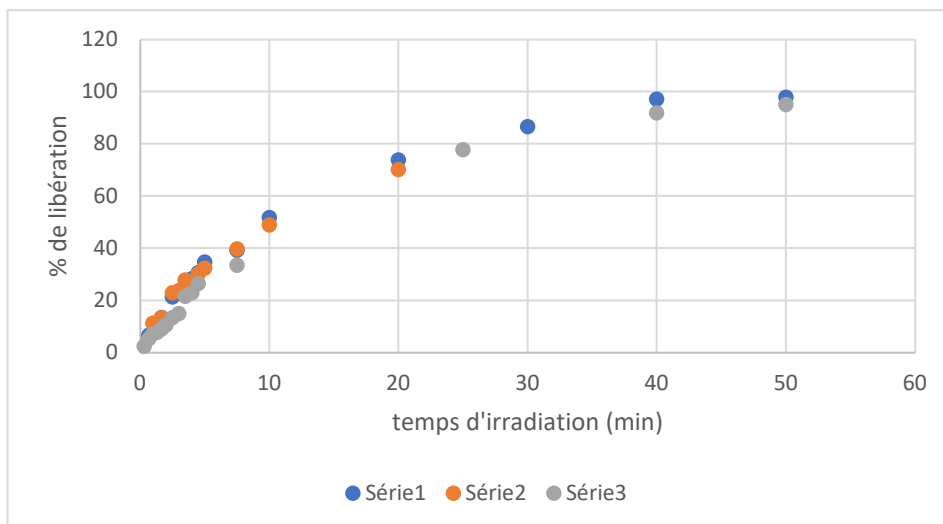


Figure 113 - Suivi cinétique de la photolibération du composé **57** incorporé à la formulation des nanocapsules (décroissance à 450 nm).

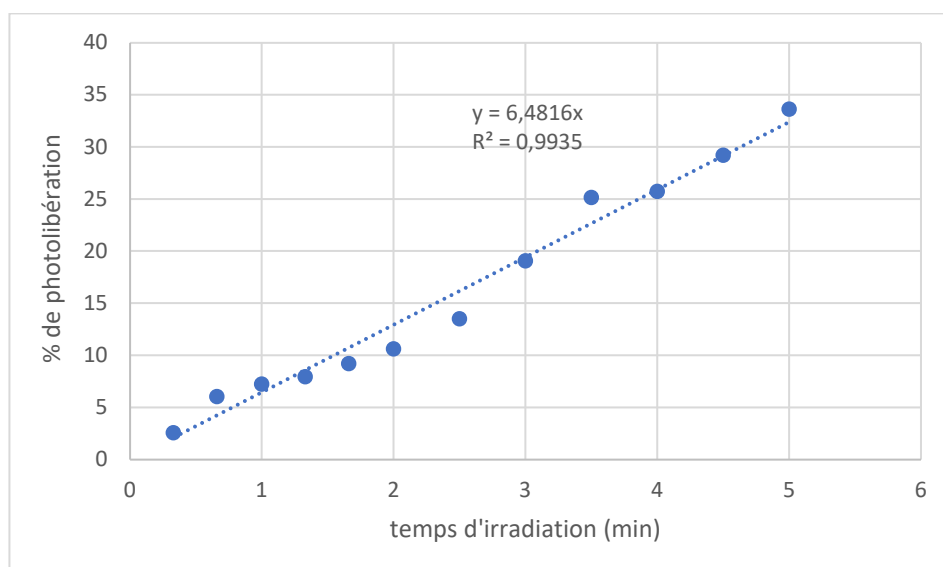


Figure 114 - Partie linéaire du suivi cinétique de la photolibération du composé **57** incorporé à la formulation des nanocapsules (décroissance à 450 nm).

Suite à ces résultats particulièrement prometteurs, nous avons néanmoins obtenu un résultat pour le moins inattendu. Lorsque nous avons changé le mélange de solvants pour un ratio 9:1 MeOH/H₂O, le rendement quantique de photolibération de **57** a drastiquement chuté pour atteindre $\Phi_u = 0.005$ (Figure 115 et Figure 116).

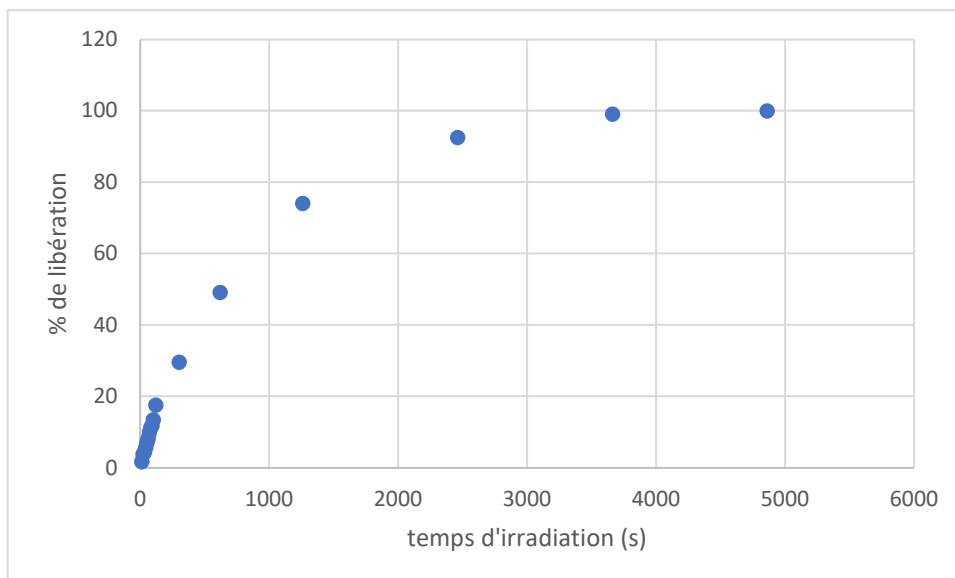


Figure 115 - Suivi cinétique de la photolibération du composé **57** dans un mélange MeOH/H₂O (9:1 ; 2 μM ; décroissance à 450 nm).

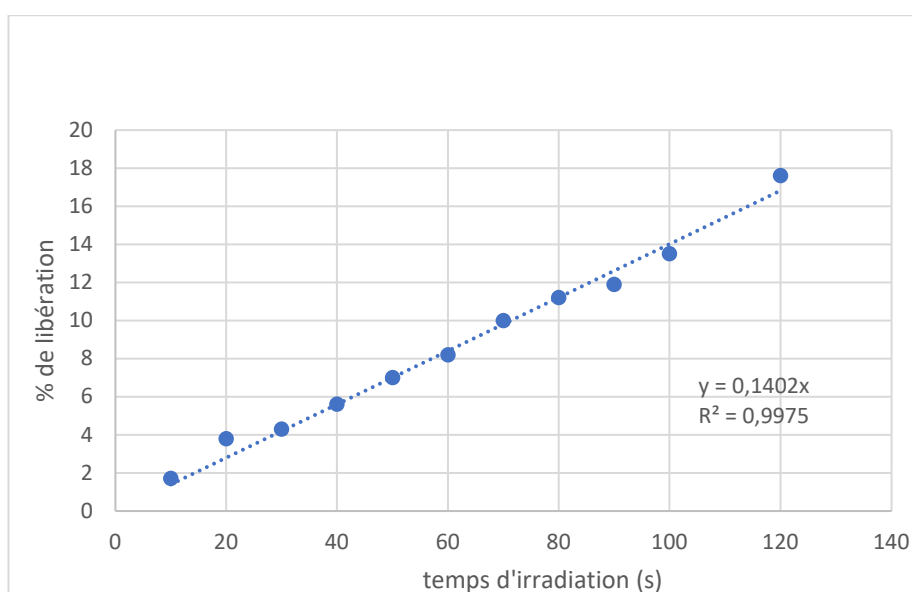


Figure 116 - Partie linéaire du suivi cinétique de la photolibération du composé **57** dans un mélange MeOH/H₂O (9:1 ; 2 μM ; décroissance à 450 nm).

Il semblerait donc à première vue qu'en « solution », la photolyse ne soit pas efficace et à l'inverse lorsque la molécule s'organise en nanoparticules, le rendement quantique est similaire à la référence. Afin de vérifier que cette chute de rendement quantique ne soit pas due à un autre paramètre, plusieurs analogues ont été synthétisés puis étudiés.

Tout d'abord, le composé **61** comportant une chaîne OEG a été synthétisé *via* la même séquence que pour obtenir **52** (Schéma 51). Le choix de cette chaîne OEG a été guidé par le fait qu'elle permet une meilleure solubilisation du composé mais aussi car il est possible d'injecter le produit en HPLC.

Ainsi, l'alcyne **12** a été engagé dans une réaction CuAAC avec l'azoture oegylé pour conduire à **58** avec 38 % de rendement. Le couplage de Suzuki-Miyaura est ensuite effectué en position 3 à l'aide de l'ester boronique pinacolique **9** pour obtenir **59** avec 46 % de rendement. Ensuite, l'alcool est activé en introduisant un groupement carbonate de *para*-nitrophényle qui est substitué par le melphalan dans une deuxième étape pour obtenir l'analogue **61** visé avec 47 % de rendement sur les deux étapes.

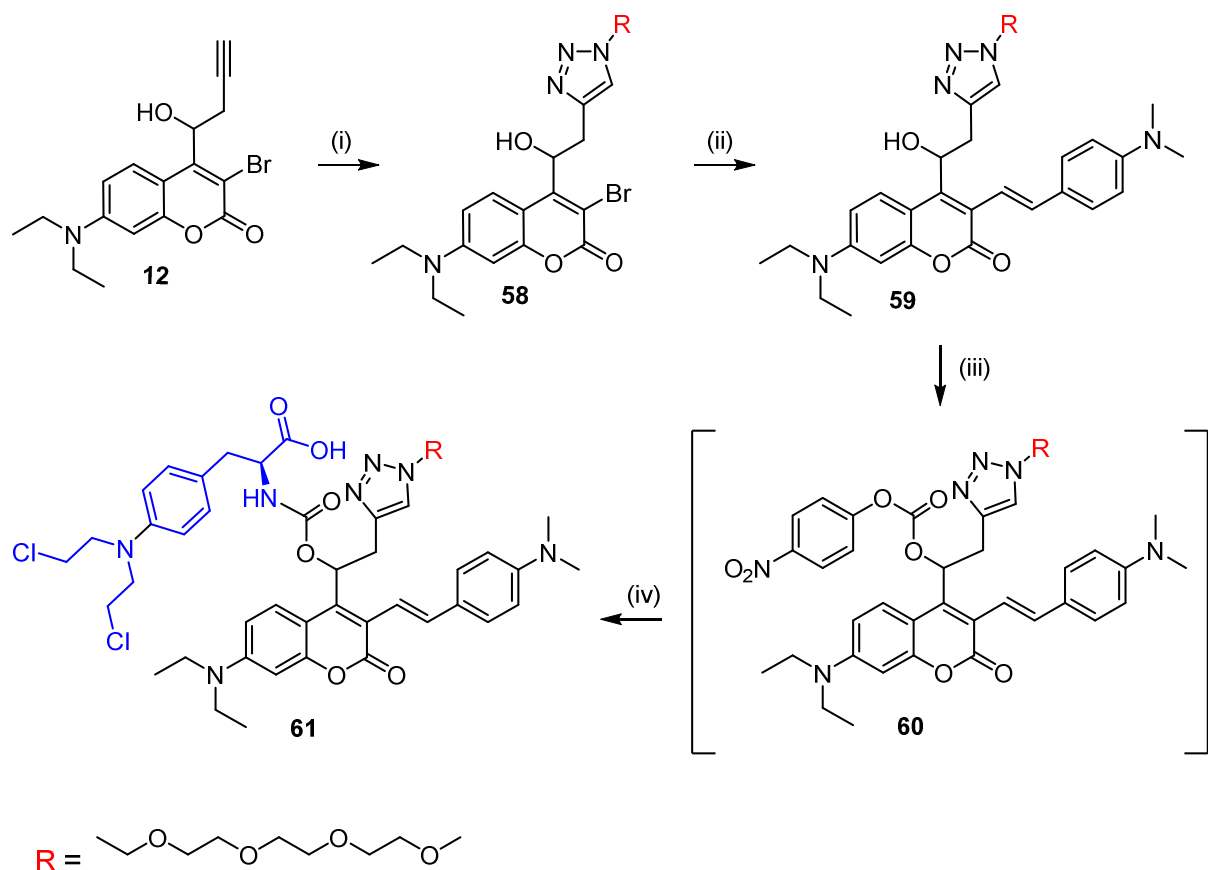


Schéma 51 – Synthèse de l'analogue photoactivable **61** ; (i) $R-N_3$, acide ascorbique, tris(3-hydroxypropyltriazyloyméthyl)amine, $Cu(CH_3CN)_4PF_6$, CH_2Cl_2 , TA, 22 h, 38 % ; (ii) **9**, K_2CO_3 , $Pd(PPh_3)_4$, H_2O/DME (1:3), chauffage au micro-onde à 105 °C, 1 h 20, 46 % ; (iii) carbonate de bis-(4-nitrophényle), DIPEA, DMF, TA, 22 h ; (iv) melphalan, DIPEA, DMAP, DMF, TA, 4 h, 47 % sur les deux étapes.

Pour **61**, un rendement quantique de 0.004 a été obtenu dans le mélange 1:1 MeOH/PBS pour une concentration de 20 μ M, ce qui est similaire au rendement quantique obtenu pour le composé **57** en « solution ».

Dans un second temps, nous avons voulu vérifier que l'orientation du triazole n'influe pas sur ce rendement quantique. En effet, des recherches effectuées au laboratoire quelques années auparavant avaient montré que des coumarines moins conjuguées et comportant le groupement triazole dans son autre orientation avaient de bons rendements (0.21 pour la 9-(PEG7-DEACMamino)doxycycline).¹⁵⁵

Le développement de la coumarine porteuse d'un groupe azoture **30** précédemment détaillé au chapitre II nous a ainsi permis de synthétiser l'analogue **64** présentant une orientation différente au niveau du triazole (Schéma 52). L'alcool **28** est donc bromé en position 3 pour conduire au composé **29** avec 73 % de rendement puis un couplage de Suzuki-Miyaura est effectué pour obtenir **30** avec 61 % de rendement. L'azoture **30** est ensuite engagé dans une CuAAC avec un alcyne-Peg4 pour obtenir la plateforme **62** avec 85 % de rendement. La coumarine conjuguée **62** est alors couplée au melphalan en deux étapes pour conduire à l'analogue **64** avec 37 % de rendement sur ces deux étapes.

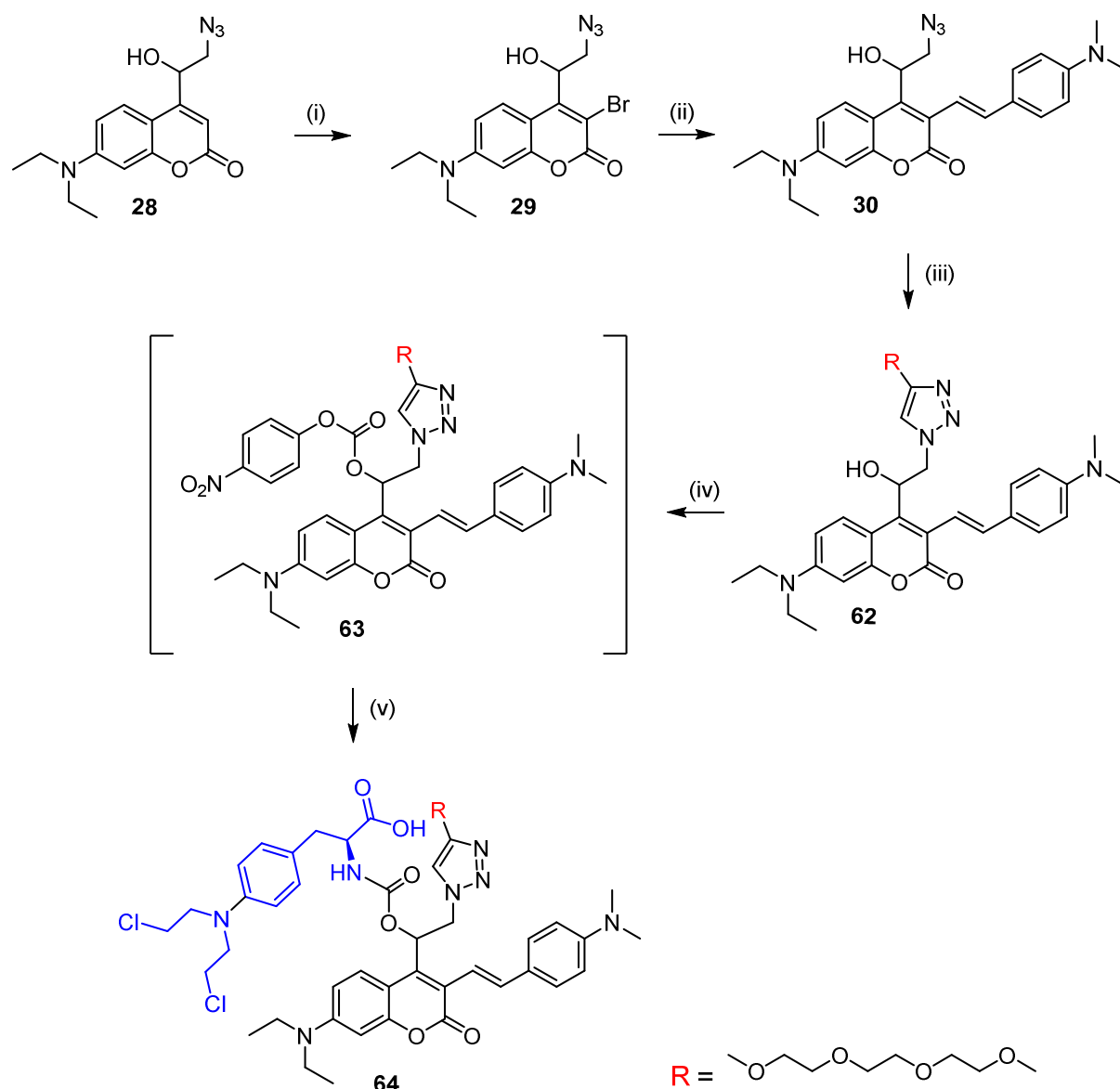


Schéma 52 – Synthèse de l’analogue photoactivable **64** ; (i) NBS, NH_4OAc , MeCN, TA, 30 min, 73 % ; (ii) K_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$ (1:3), 105 °C par chauffage au micro-onde avec puissance constante à 5 W, 1 h 30, 61 % ; (iii) 2,5,8,11-tétraoxatétradéc-13-yne, L-proline, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, acide ascorbique, DMF/t-butanol/ H_2O (1:10:1), 60 °C, 2 jours, 85 % ; (iv) carbonate de bis-(4-nitrophényle), DIPEA, DMF, TA, 19 h ; (v) melphalan, DIPEA, DMAP, DMF, TA, 4 h, 47 % sur les deux étapes.

A nouveau, le rendement quantique de cette molécule **64** s’est révélé être très faible, bien que légèrement supérieur à son analogue **61** : $\Phi_u = 0.02$.

L’orientation du lien triazole ne semble donc pas être à l’origine de ce faible rendement quantique de photolibération. Un dernier contrôle a alors été entrepris afin de vérifier que le melphalan n’a pas d’influence sur le rendement quantique.

Un simple acide carboxylique, l’acide 4-méthoxybenzoïque a été mis à réagir pour former l’ester **65** avec un rendement de 71 % (Schéma 53).

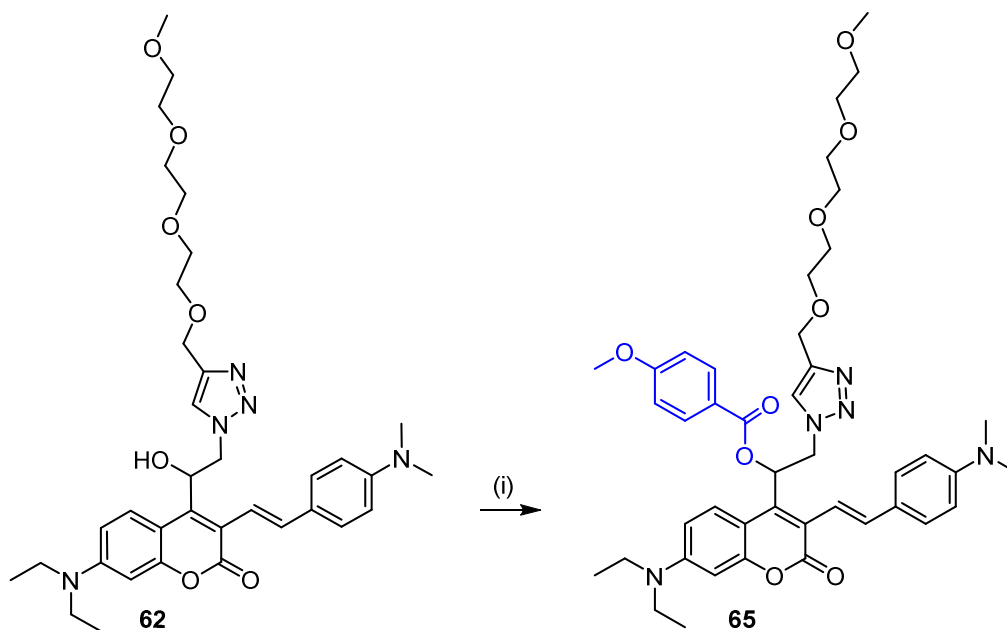
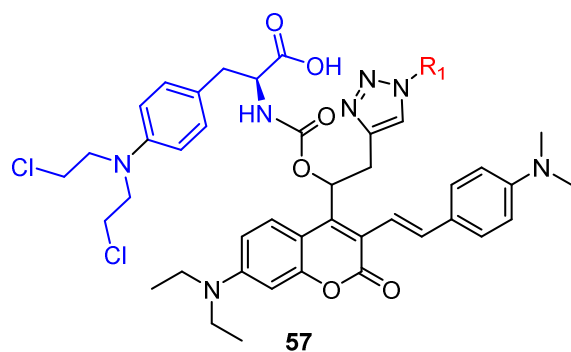


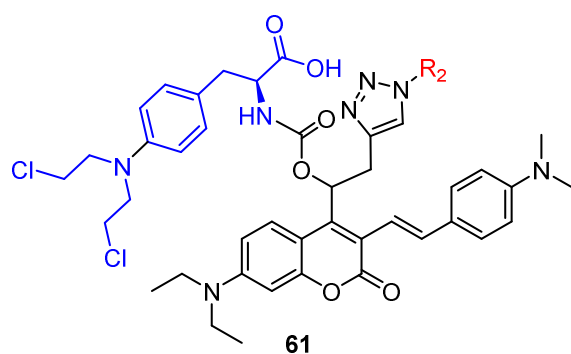
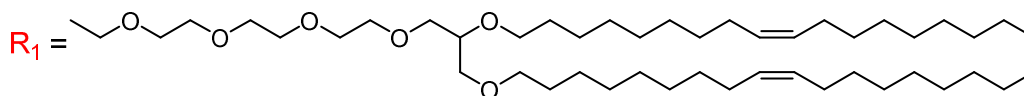
Schéma 53 – Synthèse de l'analogue **65** : (i) acide 4-méthoxybenzoïque, DIC, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 3 jours, 71 %.

Néanmoins, un rendement quantique similaire au précédent a été obtenu.

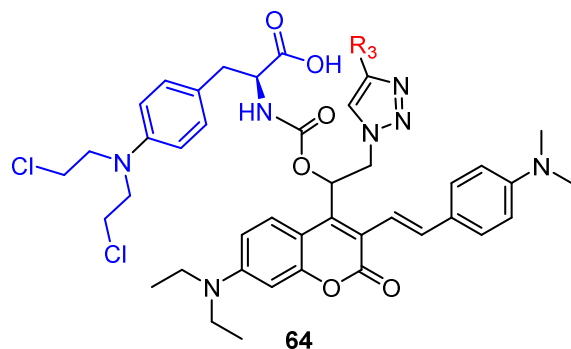
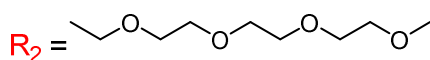
Les rendements quantiques de photolibération obtenus pour les différentes molécules **57**, **61** et **64** sont résumés dans la Figure 117.



$\Phi_u = 0.2$ (MeOH/PBS, 1:1),
 $\Phi_u = 0.23$ (dans les nanocapsules)
 et
 $\Phi_u = 0.005$ (MeOH/H₂O, 9:1)



$\Phi_u = 0.004$ (MeOH/PBS, 1:1)



$\Phi_u = 0.02$ (MeOH/PBS, 1:1)

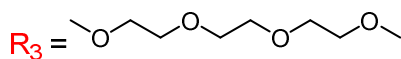


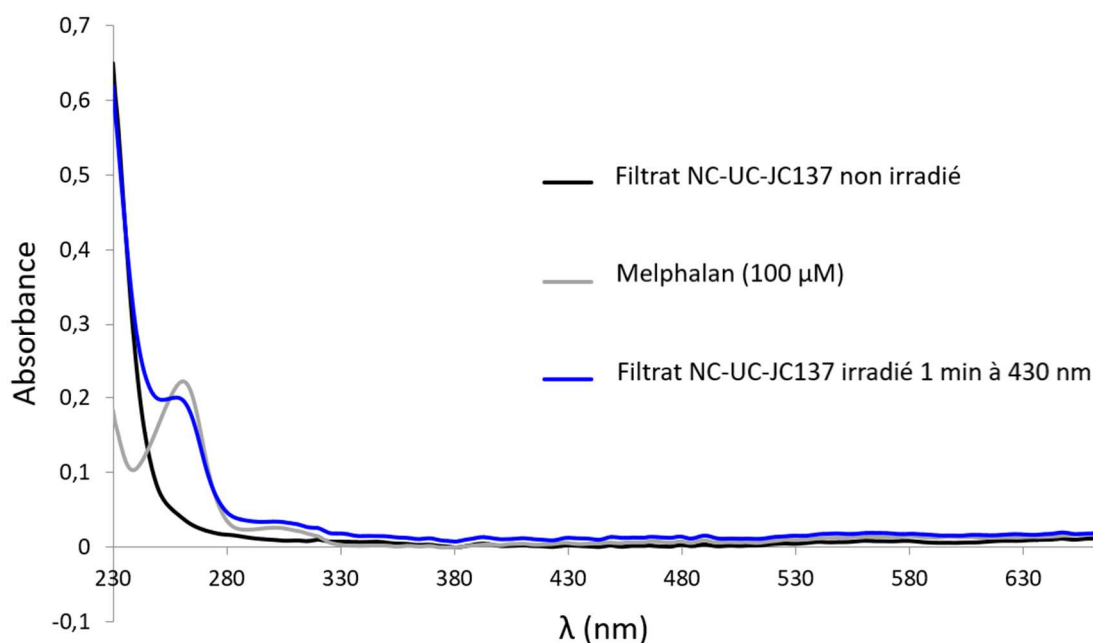
Figure 117 - Résumé des structures des différents analogues synthétisés (**57**, **61** et **64**) avec leurs rendements quantiques de photolibération.

Il semblerait donc que l'orientation spatiale que prend le bras espaceur photolabile **57** lorsqu'il est dans la formulation d'une nanoparticule soit bénéfique pour la vitesse de libération d'un effecteur biologique.

Nous avons ensuite évalué la stabilité de nos nanocapsules afin de vérifier qu'il n'y ait pas d'éventuelles fuites de l'anticancéreux, contrairement à certains systèmes rapportés dans la littérature.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la stabilité dans le temps des nanocapsules. Des formulations comportant le système d' « upconversion », le BEP couplé au melphalan (JC137) et l'antioxydant (ions sulfites pour les expériences avec enregistrements de spectres UV-visible et acide ascorbique pour celles avec suivi HPLC) ont été stockées pendant un mois à 4 °C. Des échantillons ont été irradiés à 430 nm pendant 1 minute ou non, puis filtrés à l'aide du concentrateur centrifuge Vivaspin®. Le filtrat a été collecté puis analysé par spectroscopie UV-visible (Figure 118).

L'échantillon non irradié montre qu'il n'y a pas eu de libération de melphalan après une conservation des nanocapsules lipidiques au réfrigérateur pendant 1 mois. Le spectre d'absorption du filtrat de l'échantillon irradié montre bien que le melphalan a été libéré et que donc les nanoparticules conservent leur capacité de photolibération après cette durée de conservation.



Nous avons réitéré nos tests de stabilité avec une expérience légèrement différente : des nanocapsules comportant le système complet (PdTPBP, TBPe, BEP et melphalan) et des nanocapsules comportant juste le PdTPBP et le BEP relié au melphalan (sans le TBPe) ont été formulées.

La Figure 119 montre qu'aucune des deux formulations n'a libéré de melphalan suite à une conservation à 4 °C pendant 6 semaines.

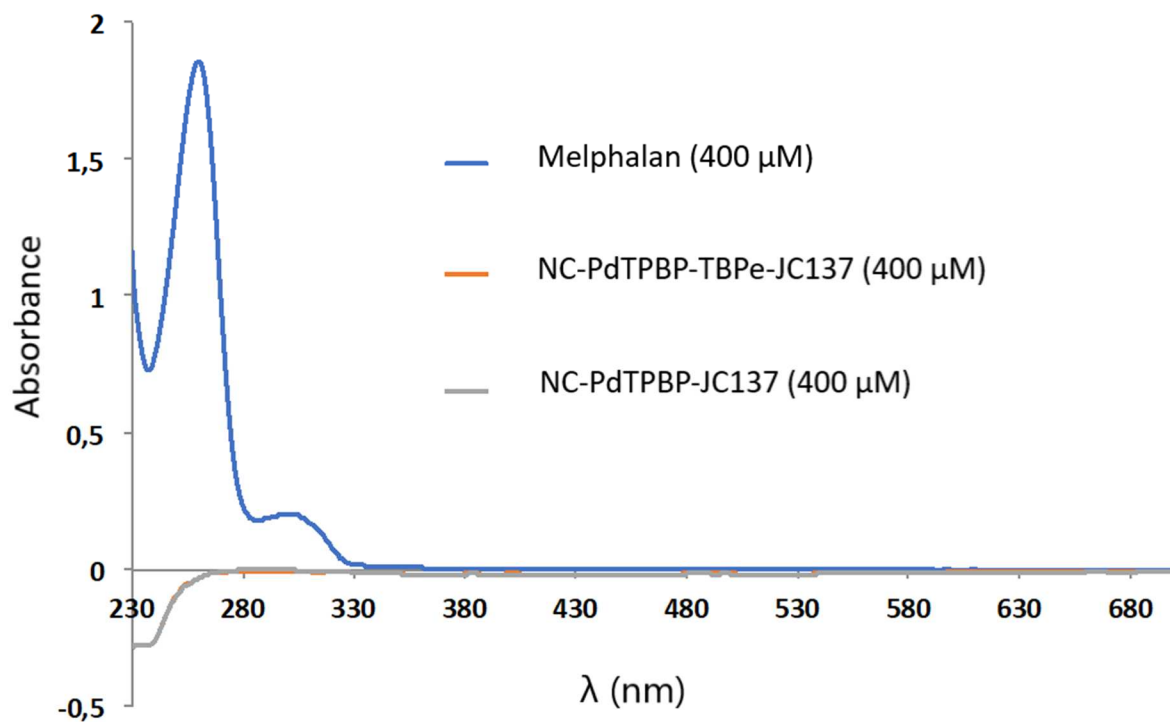


Figure 119 - Spectres d'absorption des filtrats des échantillons de nanocapsules stockés pendant 6 semaines à 4 °C et du melphalan à une concentration de 400 µM.

Comme nous envisageons d'effectuer des expériences *in vivo*, nous devons également contrôler la stabilité de nos nanocapsules à 37 °C.

Des nanocapsules avec le système complet ont été conservées à 37 °C pendant 48 h. Un échantillon a ensuite été irradié à 430 nm pendant 10 min alors que l'autre échantillon a été conservé dans le noir (Figure 120).

Le spectre d'absorption de ce dernier ne montre aucune libération de melphalan contrairement à l'échantillon irradié. Les nanocapsules sont donc stables à 37 °C pendant 48 h et restent fonctionnelles.

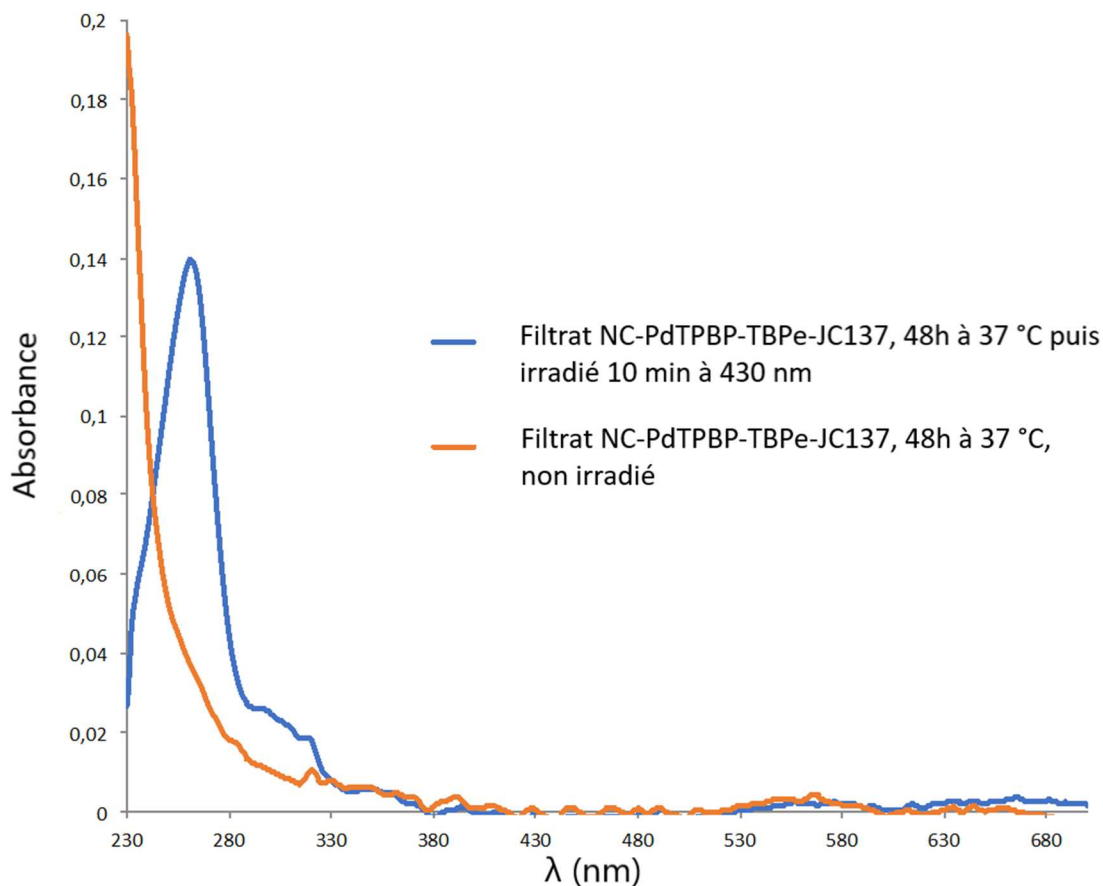


Figure 120 - Spectres d'absorption des filtrats des échantillons de nanocapsules incubés 48 h à 37 °C puis irradiés ou non à 430 nm.

Cette stabilité et cette absence de fuite est un réel avantage comparé aux systèmes déjà décrits dans la littérature. Cela montre que nos nanocapsules permettent une libération vraiment contrôlée du principe actif.

La libération du melphalan après une irradiation à 630 nm a ensuite été étudiée. Pour cela, un échantillon comportant le PdTPBP, le TBPe, et le BEP relié au melphalan ainsi qu'un second sans le TBPe (donc sans possibilité de faire de l' « upconversion » assistée par annihilation triplet-triplet) ont été irradiés 1 h à 630 nm avec une puissance de 5 mW (Figure 121). Les particules non irradiées ou sans le TBPe ne montrent pas de libération de melphalan, contrairement aux nanocapsules comportant le système complet irradiées, ce qui montre que le TTA-UC est effectif et fournit suffisamment d'énergie par FRET à la coumarine pour déclencher la photolyse souhaitée.

Il est donc possible d'irradier les nanocapsules avec des LEDs de faible puissance pour obtenir la libération de principe actif, ce qui est particulièrement attrayant pour des applications en biologie.

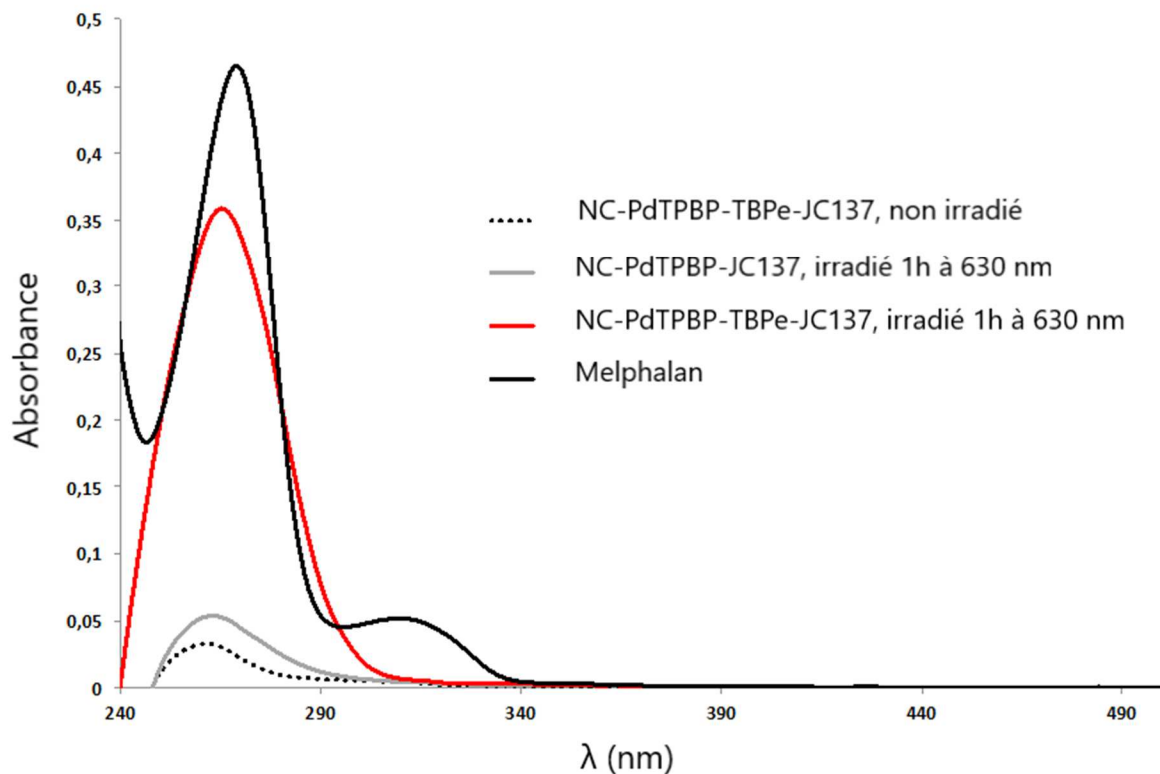


Figure 121 - Spectres d'absorption des filtrats des échantillons de nanocapsules non irradié, irradié 1 h à 630 nm, et du melphalan.

De même, le rendement de photolibération de melphalan suite à une irradiation de 630 nm a été quantifiée par HPLC. Ainsi 95.4 ± 0.7 % de melphalan a été libéré après une irradiation d'une heure à 630 nm (5 mW).

Comme déjà mentionné, l'avantage d'une irradiation à 630 nm est que ce type de rayonnement pénètre mieux dans la peau que des irradiations UV-visible proche. Nous avons donc effectué des expériences similaires à celles d'Askes S. H. C.¹⁵⁶ En effet, nous avons placé des tranches de viande de différentes épaisseurs devant nos cuves comportant les échantillons de nanocapsules qui ont été ensuite irradiées à 630 nm avec une puissance de 200 mW/cm^2 pendant une heure (Figure 122). La libération de melphalan a alors été quantifiée par spectroscopie UV-visible et HPLC. Cette expérience montre seulement des résultats préliminaires et devra être reproduite pour obtenir des pourcentages de libération

de melphalan plus précis et représentatifs. Néanmoins, des pourcentages de libération de melphalan autour de 65 % ont été obtenus pour des tranches de porc de 1 et 3 mm et autour de 80 et 70 % respectivement pour des tranches de volaille de 1 et 3 mm.

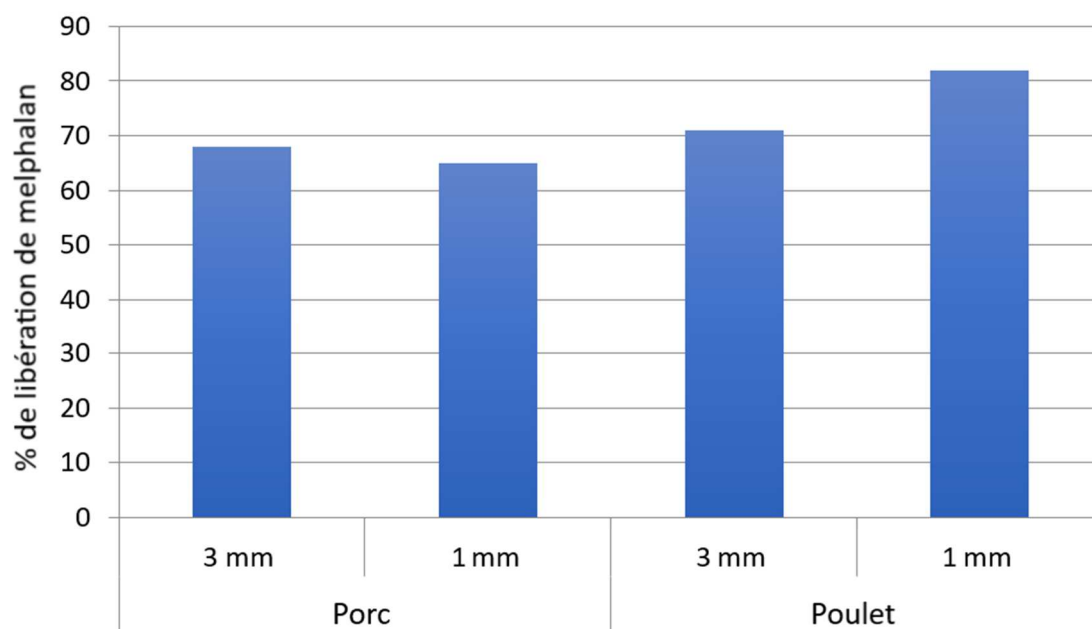


Figure 122 – Irradiation des nanocapsules à travers des tranches de viande de différentes épaisseurs (630 nm, 1 h, 200 mW/cm²).

IV-3-f) Expériences *in vitro*

Des essais ont d’abord été menés sur des cellules MDA-MB-231, une lignée cellulaire du cancer du sein (Figure 123 et Figure 124). 12 puits ont étéensemencés le 1^{er} jour avec environ 16000 cellules/mL/puit et le 2^{ème} jour traité avec différentes conditions : les nanocapsules vides (BLK), le melphalan, le système complet (PdTPBP, TBPe, le BEP-melphalan= JC137), le système sans TBPe (donc sans possibilité de TTA-UC) et des nanocapsules vides comportant juste le BEP relié au melphalan en surface (JC137). Après 4 h, les échantillons sont irradiés à 630 nm à 5 mW pendant une heure. Le 8^{ème} jour, la viabilité des cellules cancéreuses est évaluée.

Les résultats obtenus sont compilés sur les Figure 123 et Figure 124. Tous d’abord, nous avons observé que les nanocapsules dopées n’ont pas d’effet toxique sans irradiation. De plus, celles sans TBPe (donc de TTA-UC) et celles qui comportent juste le BEP couplé au melphalan (JC137)

n'ont pas de toxicité particulière envers les cellules. Il n'y a donc pas de melphalan libéré et l'activité de ce dernier est bien masquée lorsqu'il est relié au BEP sur la nanoparticule.

Enfin, les nanocapsules avec le système complet n'induisent pas de réduction de la viabilité des cellules MDA lorsqu'elles ne sont pas irradiées, alors qu'une viabilité moyenne de 10 % a été déterminée après irradiation. En plus d'induire la toxicité souhaitée, il est important de noter que la viabilité est bien plus faible par traitement avec notre formulation photoactivable que par traitement avec du melphalan libre ($\approx 50\%$) (Figure 123 et Figure 124). Il apparaît donc clairement que les nanocapsules permettent une meilleure internalisation dans les cellules du melphalan et donc une fois libéré, une meilleure efficacité.

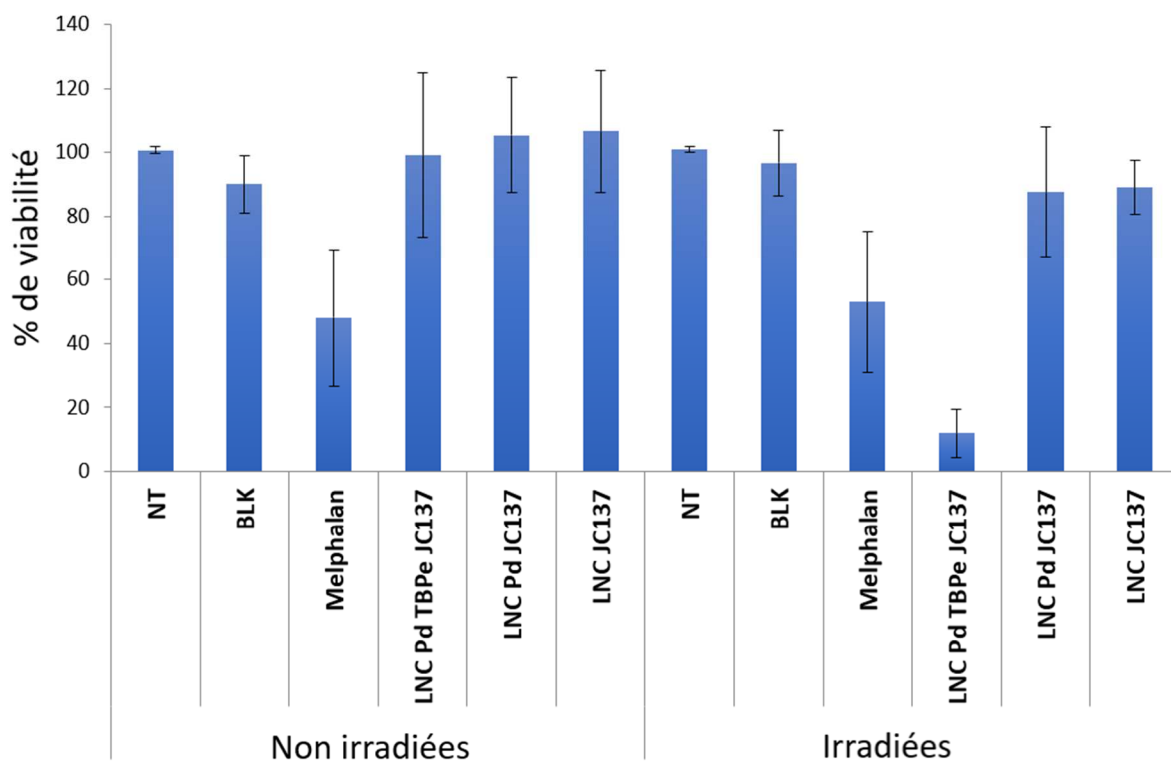


Figure 123 – Viabilité des cellules MDA-MB-231 après traitement aux nanocapsules avec ou sans irradiation à 630 nm (5 mW/cm², 1 h).

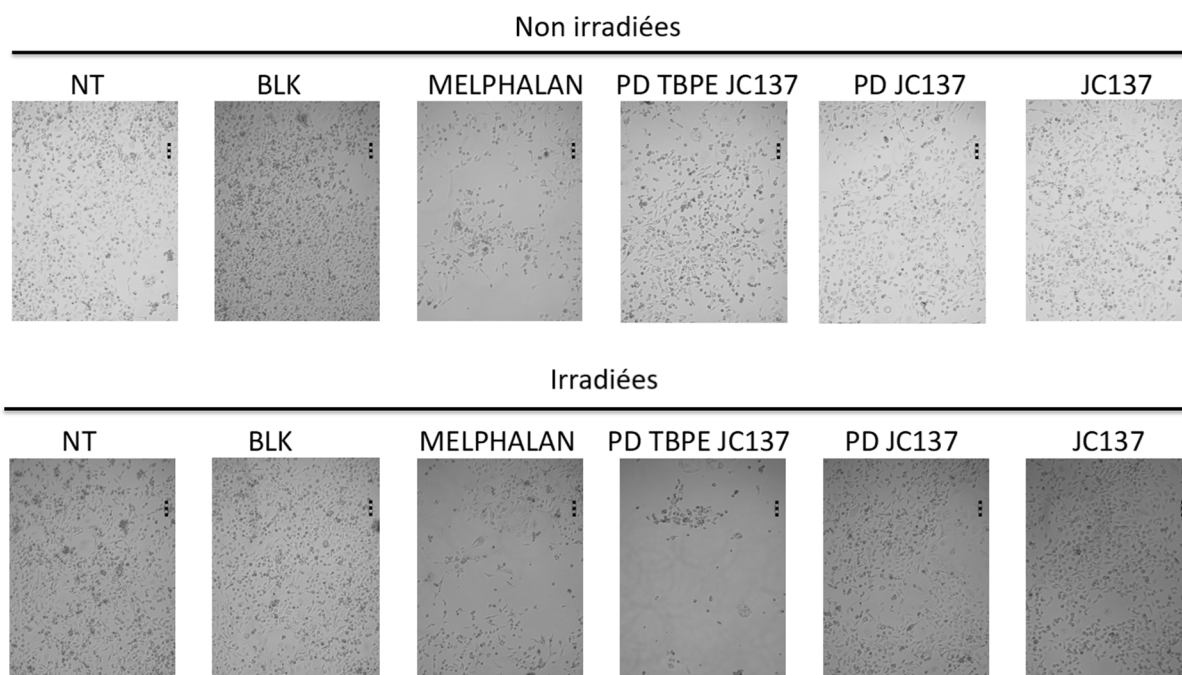


Figure 124 – Images obtenues par microscopie des cellules MDA-MB-231 après traitement aux nanocapsules avec ou sans irradiation à 630 nm (5 mW/cm², 1 h).

Par la suite, ces résultats ont été confirmés sur d'autres lignées cellulaires comme PC3 (cancer de la prostate) et THP1 (leucémie).

IV-3-g) Expériences *in vivo*

Des premières expériences ont été menées par la plateforme de chimie biologique intégrative de Strasbourg afin de trouver les bonnes conditions d'irradiation ainsi que d'obtenir des premiers résultats de l'activité antitumorale de nos nanocapsules photoactivables (comportant le melphalan comme molécule cytotoxique) sur des souris Balb/c-nude ayant développé des tumeurs. Pour cela, des xéno greffes hétérotopiques ont été implantées en sous-cutané grâce à des injections de cellules MDA-MB-231 dans les deux flancs des souris (5 millions de cellules/100 µL par flanc). Les souris sont ensuite traitées une fois que le volume moyen des tumeurs ont atteint environ 100 mm³. Le suivi de la croissance des tumeurs est effectué 3 fois par semaine par mesure à l'aide d'un pied à coulisse.

Le premier traitement a été effectué le 19^{ème} jour. Le groupe 2 a reçu une injection du système complet (traitement A = nanocapsules avec PdTPBP, TBPe, BEP-Melphalan) dans les deux tumeurs et seule celle située sur le côté gauche a été irradiée avec une lampe à 630 nm (1 h,

200 mW, au contact de la peau). Le deuxième groupe a lui reçu dans la tumeur droite une injection de nanocapsules seulement dopées avec le système d' « upconversion » mais sans le BEP relié au melphalan (traitement B) et une injection d'un tampon (traitement C) dans la tumeur gauche. Les premiers résultats ont montré qu'une forte diminution de la taille de la tumeur était observée avec les nanocapsules irradiées (traitement A + irradiation) alors qu'avec les autres traitements (absence d'irradiation, tampon, nanocapsules dopées avec le couple d' « upconversion »), les tumeurs ont continué à croître (Figure 125).

Cependant, l'application de la lumière au contact de la peau pendant 1 h n'était pas optimale pour le bien-être des souris. Un deuxième essai a donc été mené cette fois-ci en irradiant la tumeur à 1 cm de la surface de la peau pendant 15 minutes à 100 mW suivi d'une pause de 10 min et enfin d'une nouvelle irradiation de 15 minutes. Ce second traitement a montré une nouvelle fois que l'application des nanocapsules comportant le système complet permet, après irradiation dans le rouge, une réduction significative de la taille des tumeurs.

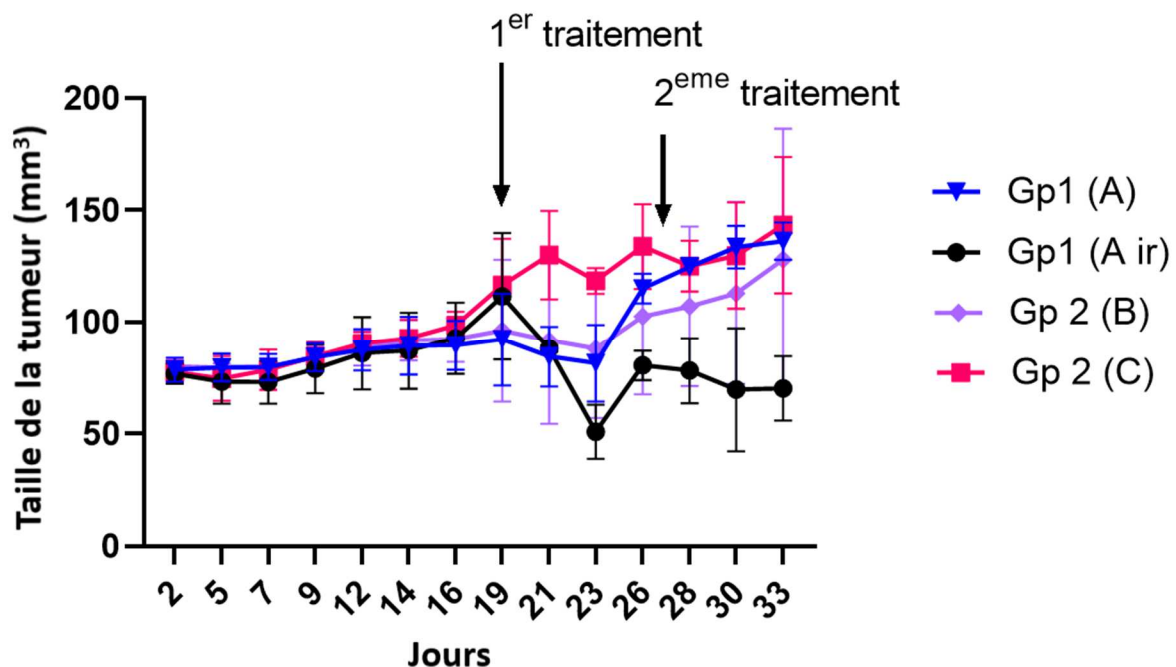


Figure 125 – Mesures de la taille de la tumeur sous-cutanée avant et suite aux traitements (A = nanocapsules avec PdTPBP, TBPe, BEP-Melphalan ; B = nanocapsules dopées au PdTPBP, TBPe ; C = tampon) ; 1^{er} traitement : irradiation 1 h à 630 nm à 200 mW au contact de la peau ; 2^{ème} traitement : irradiation à 630 nm à 1 cm de la surface de la peau pendant 15 minutes à 100 mW suivi d'une pause de 10 min et enfin d'une nouvelle irradiation de 15 minutes.

Enfin, un troisième protocole a été testé : cette fois-ci, l'irradiation est faite pendant 15 minutes à 200 mW sous ventilation, suivi d'une pause d'une minute, puis à nouveau d'une irradiation de 15 minutes à 1 cm de la surface de la peau des souris. La zone irradiée a été limitée exclusivement à la zone de la tumeur en protégeant la peau autour. Selon ce protocole, deux souris ont été traitées avec le traitement A sur les deux flancs avec irradiation uniquement sur le côté gauche, deux souris avec le traitement A non irradié et trois souris avec le traitement B (nanocapsules + couple d' « upconversion ») dont seul le flanc gauche a été irradié (Figure 126). Les résultats montrent bien à nouveau une réduction de la taille de la tumeur pour le traitement A avec irradiation tandis que le traitement B ne réduit pas la taille des tumeurs.

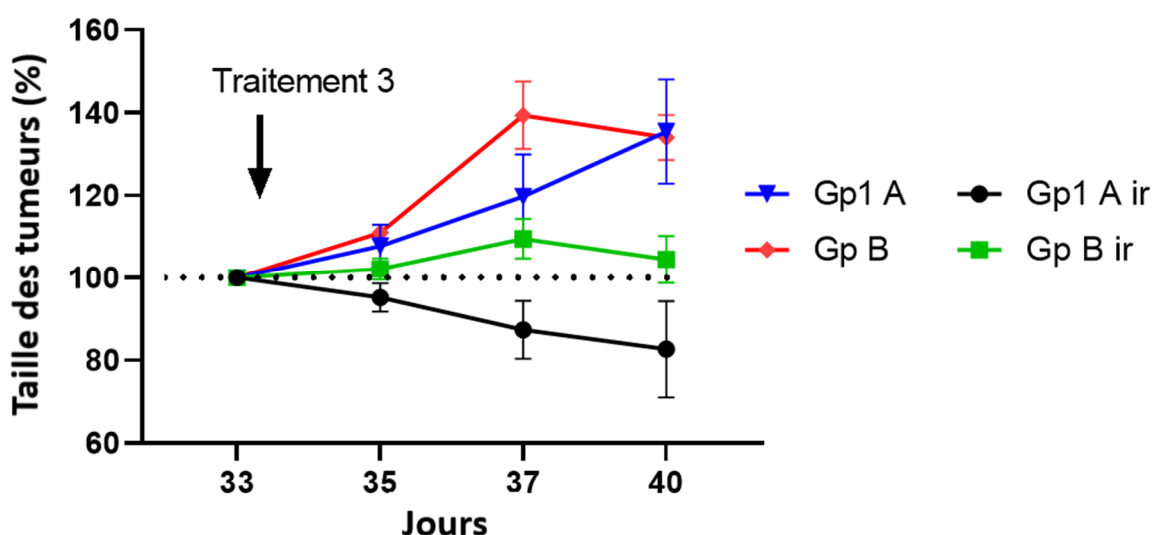


Figure 126 - Mesures de la taille de la tumeur sous-cutanée avant et suite aux traitements avec irradiation ou non (A = nanocapsules avec PdTPBP, TBPe, BEP-melphalan ; B = nanocapsules dopées au PdTPBP, TBPe) ; 3^{ème} traitement = 15 minutes à 200 mW sous ventilation, suivi d'une pause d'une minute, puis à nouveau d'une irradiation de 15 minutes à 1 cm de la surface de la peau sur une zone limitée à la tumeur.

Ces résultats doivent donc être reproduits dans une seconde campagne d'expérimentations puisque le protocole optimal d'irradiation sans douleur et sans effet néfaste sur la souris a été mis en place. D'autres contrôles seront aussi établis (injection seule de melphalan, tampon ...). Néanmoins, ces résultats sont particulièrement encourageants et vont dans le sens des résultats obtenus sur cellules.

IV-4) Décaler les longueurs d'onde d'irradiation encore plus dans le NIR

IV-4-a) Changement de sensibilisateur

Comme nos nanocapsules sont facilement modulables, nous avons également envisagé de changer le sensibilisateur de notre couple de chromophores capables d'effectuer le TTA-UC, ceci afin de décaler la longueur d'onde d'irradiation encore plus dans le NIR. Sasaki Y. *et al.* ont rapporté en 2019 un complexe d'osmium ($\text{Os}(\text{peptpy})_2^{2+}$) pouvant être excité à 720 nm et être utilisé avec le TBPe comme accepteur.¹⁵⁷ Le résultat nous a paru particulièrement intéressant car l'utilisation de ce complexe d'osmium comme donneur nous permettrait de conserver à l'identique le reste du système de nos nanocapsules et de modifier donc uniquement la nature du sensibilisateur.

Pour cela, il a fallu entreprendre la synthèse de ce complexe d'osmium (Schéma 54). Sur la base des travaux de Sasaki Y. *et al.*, nous avons ainsi essayé de reproduire la première étape de synthèse qui consistait en un couplage de Suzuki-Miyaura entre le dérivé terpyridine bromé **66** et un ester boronique comportant un groupement pérylène (Schéma 54). Cependant, il n'a pas été possible de purifier le composé **67** obtenu et de le séparer des réactifs de départ non convertis, même en filtrant à chaud ou par recristallisation. Le produit souhaité a été détecté mais s'est révélé trop impur pour pouvoir être engagé dans la formation du complexe d'osmium. A noter également que nous avons remarqué à ce stade une très faible solubilité de **67** dans le CDCl_3 (et même le DMSO-d_6) qui est pourtant le solvant utilisé pour l'analyse RMN décrite dans cet article.

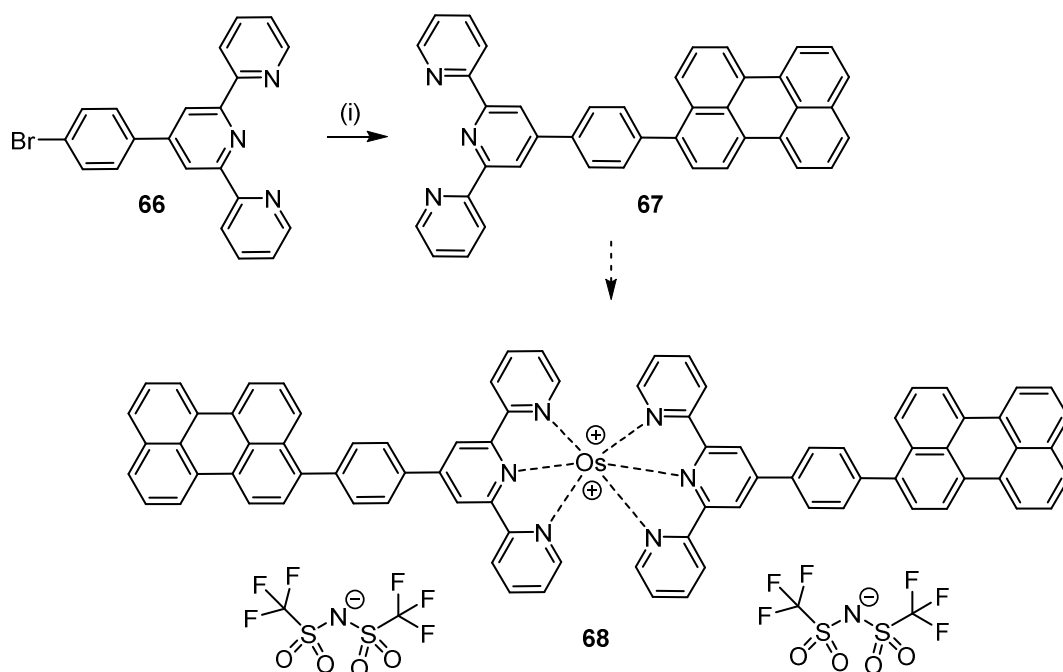


Schéma 54 – Tentative de synthèse du complexe d'osmium **68** selon les travaux de Sasaki Y. et al. ;¹⁵⁷ (i) K_2CO_3 , ester pinacolique de l'acide (3-pérylène)boronique, H_2O , THF, toluène, $Pd(PPh_3)_4$, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h.

Nous avons donc décidé d'inverser les étapes en commençant par la formation du complexe **69** qui pourrait être ensuite employé comme partenaire bromé du couplage de Suzuki-Miyaura afin d'accéder au ligand visé (Schéma 55). Le composé **66** a ainsi été engagé dans l'étape de complexation avec $OsCl_3$ comme source d'osmium, pour former le complexe d'osmium **69** obtenu avec 34 % de rendement calculé (produit pur avec quelques traces d'éthylène glycol). Un couplage de Suzuki-Miyaura, impliquant le complexe **69** et l'ester boronique requis comme partenaires de couplage, a alors été effectué afin d'obtenir le complexe d'osmium désiré **70**.

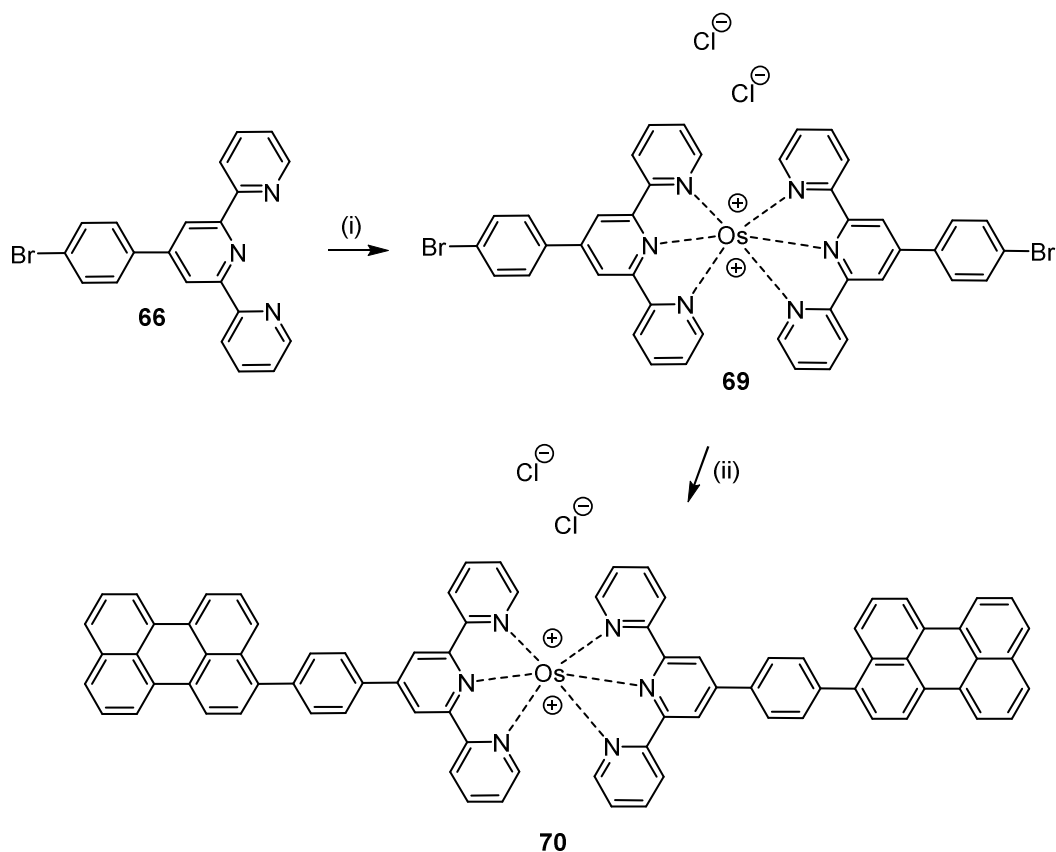


Schéma 55 – Stratégie alternative pour la synthèse de **70** : (i) $\text{OsCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, éthylène glycol, 200°C par chauffage micro-onde, 1 h, 34 % (estimé par RMN ^1H) ; (ii) K_2CO_3 , 4,4,5,5-tétraméthyl-2-(3-pérylène)-1,3,3-dioxaborolane, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{H}_2\text{O}/\text{DME}$ (1:3), 105°C par chauffage micro-onde, 1 h.

Dans les conditions de Suzuki-Miyaura employées, une poudre noire violacée a été obtenue. Cependant, la cinétique de solubilisation du produit était très lente et la solubilité très faible dans beaucoup de solvants. Alors qu'il n'a pas été possible d'obtenir un spectre RMN clair du composé **70**, la masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse était en accord avec les prédictions (BR-MS, ESI, mode positif, $[\text{M}]^{2+}$ calculée : 1310,37, trouvée : 1310,37). Avec cette poudre en main, nous avons donc souhaité effectuer une métathèse d'anions en substituant les ions chlorures par des ions bistriflimidates (TFSI⁻).

Pour cela, deux protocoles de métathèse d'ions ont été testés (Schéma 56) ; le premier essai a été effectué dans un mélange MeOH/solution aqueuse de LiTFSI (100 équivalents, 1M) et le mélange résultant a été agité pendant 19 h à température ambiante avant d'être transféré dans un tube de type falcon™, puis centrifugé pour retirer le surnageant. Le solide a été ensuite lavé à l'eau puis séché.

Le second protocole a consisté en la dissolution du solide dans de l'éthylène glycol à chaud (60°C) pendant trois jours avant de ne récupérer que la solution (des particules solides étaient

encore présentes). Cette solution a ensuite été traitée par une solution aqueuse de LiTFSI (10 équivalents, ≈ 0.04 M) puis chauffée à 60 °C pendant 21 h. Après extraction à l'aide de dichloroéthane (non miscible à l'eau ni à l'éthylène glycol) et lavage à l'eau, le solide obtenu a été séché.

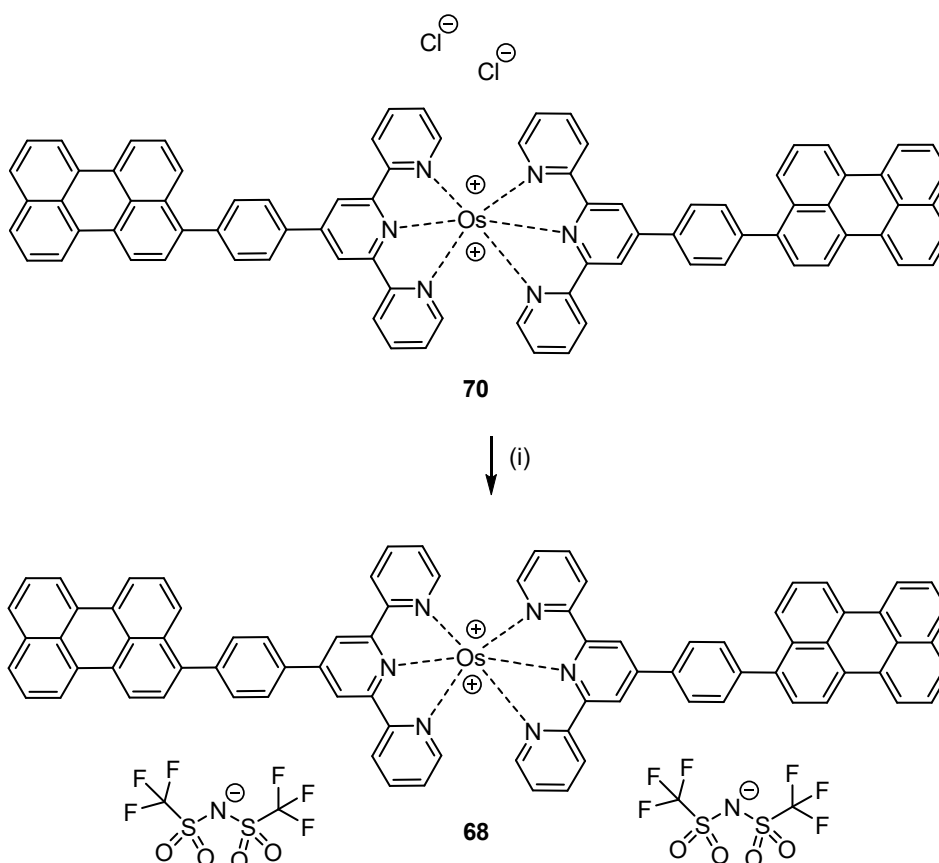


Schéma 56 – Métathèse d'anions entre des ions chlorures et des ions bistriflimates ; 1^{er} protocole : solution aqueuse de LiTFSI (100 éq., 1M), MeOH, TA, 19 h ; 2^{ème} protocole : éthylène glycol, 60 °C, 3 jours, filtration, solution aqueuse de LiTFSI (10 éq., ≈ 0.04 M), 60 °C, 21 h.

Pour ces deux protocoles, les spectres RMN obtenus étaient quasiment identiques : le produit **68** étant très peu soluble et s'organisant probablement par « stacking », les spectres RMN n'étaient pas interprétables. Nous avons tout de même essayé de faire des expériences de spectroscopie RMN ^1H à chaud (323 K, 358 K, 373 K) et nous avons vu une influence de la température sur les spectres ^1H , mais ils n'en étaient pas moins simplifiés.

Nous avons tout de même donné ce produit à nos collaborateurs pour essayer de les intégrer à nos formulations des nanocapsules. Malheureusement, le complexe d'osmium **68** s'est révélé insoluble dans le Labrafac, l'huile utilisée dans les formulations, et ceci malgré un

chauffage sur plusieurs jours. Les particules solides de complexe n'ont donc pas pu être encapsulées, ne nous permettant donc pas d'aller plus loin avec ce complexe.

Nous nous sommes alors tournés vers un autre complexe d'osmium plus simple, $\text{Os}(\text{bptpy})_2^{2+}$, également décrit par le groupe de Sasaki Y.¹⁵⁸

Le complexe **69** a ainsi été formé au micro-onde puis le produit a été transféré dans un ballon et traité par une solution aqueuse de LiTFSI ($\approx 0.5 \text{ M}$, 20 équivalents) et chauffé à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 h (Schéma 57). Après extraction au dichloroéthane et lavage à l'eau, le produit **70** est séché puis trituré au toluène pour enlever les dernières impuretés. Ce composé a été obtenu avec 73 % de rendement sur ces deux étapes et à la différence de **68**, ce complexe a pu être caractérisé par RMN. Hélas tout comme **68**, ce produit s'est également révélé être insoluble dans le Labrafac.

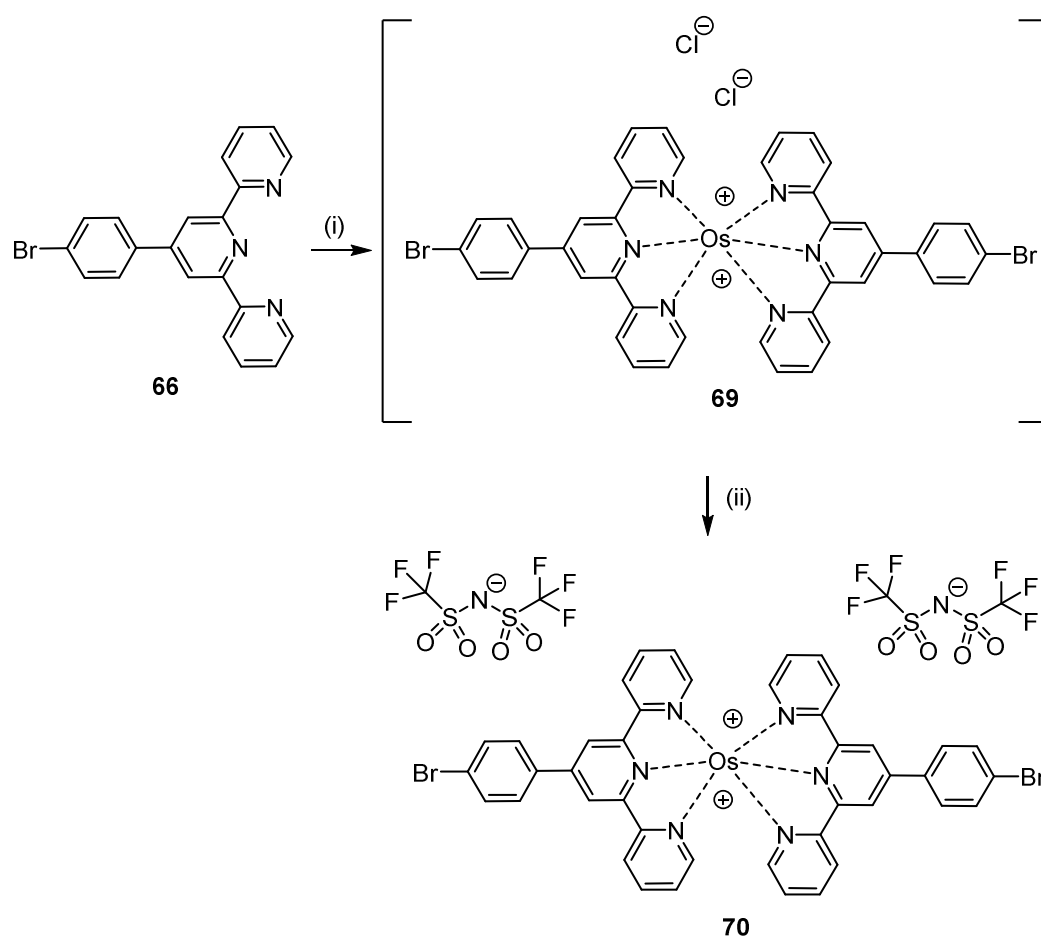


Schéma 57 – Synthèse d'un complexe d'osmium plus simple **70** : (i) $\text{OsCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, éthylène glycol, $200 \text{ }^\circ\text{C}$ par chauffage micro-onde, 1 h ; (ii) solution aqueuse de LiTFSI (20 éq., $\approx 0.5 \text{ M}$), éthylène glycol, $60 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 h, 73 %.

Comme le groupe de Sasaki Y. *et al.* semble être le seul à avoir travaillé avec ce type de complexes d'osmium et qu'à notre connaissance aucune application n'a été rapportée à ce jour, nous avons décidé de suspendre les expériences sur ces complexes au vu de leur très faible et lente solubilisation.

IV-4-b) Changement du couple d' « upconversion » et modifications de la coumarine

Toujours dans l'optique d'utiliser une source d'irradiation la moins énergétique possible, une autre idée a alors émergé. Il est possible d'envisager l'utilisation d'un autre couple d' « up-conversion » décrit dans la littérature : un complexe de tétraanthraporphyrine de palladium (II) (PdTAP) et le rubrène (Figure 127).¹⁵⁹

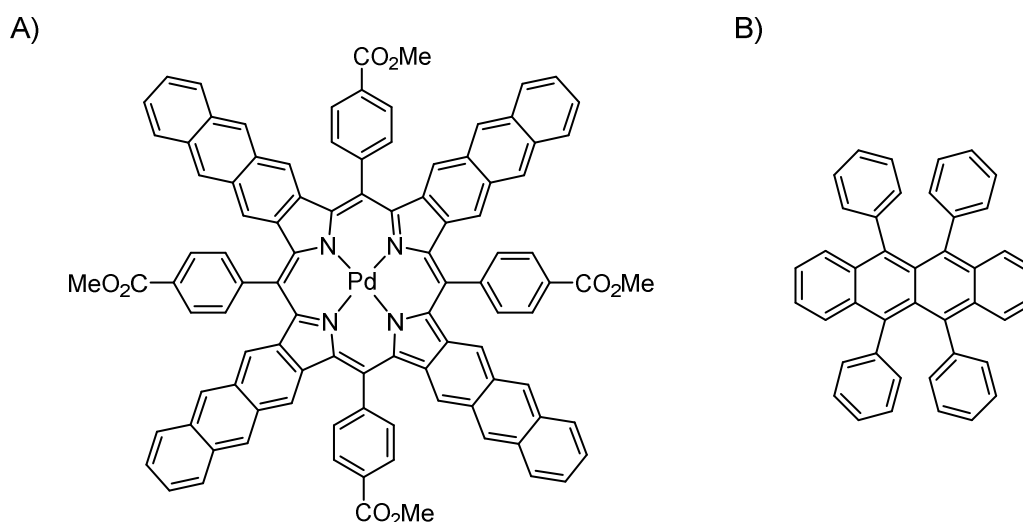


Figure 127 – Structures d'un autre couple d' « up-conversion » : A) PdTAP, B) rubrène

Grâce à ce couple alternatif, il apparait effectivement possible d'irradier les nanocapsules avec des longueurs d'onde de l'ordre de 780 nm. Cependant, comme le rubrène émet vers $\lambda = 560$ nm (Figure 128), cela demande de concevoir des coumarines pouvant absorber autour de 500 nm (leur pic d'absorption étant très large, même si le FRET est un peu moins efficace, il sera tout de même effectif).

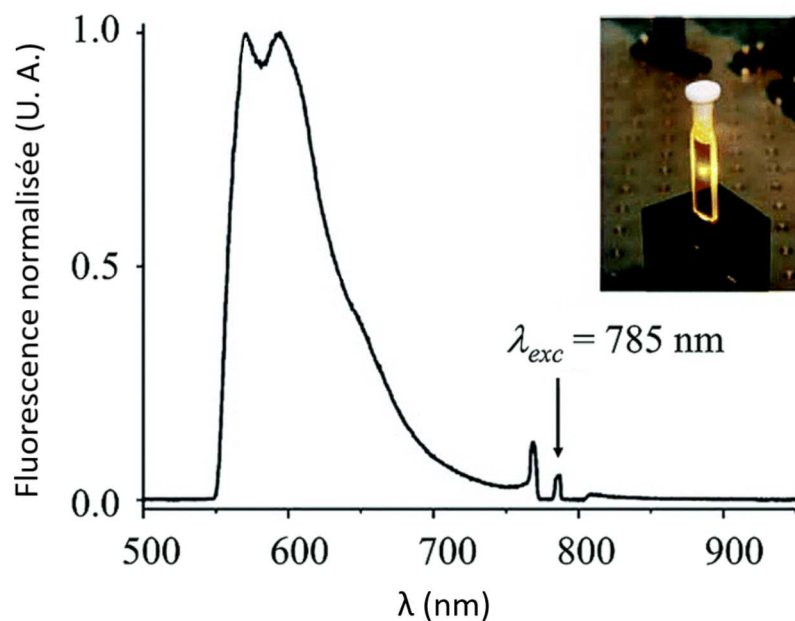


Figure 128 - Fluorescence normalisée du rubrène excité dans un système d' « up conversion » à TA dans le toluène ($I = 250 \text{ mW/cm}^2$, $P = 10 \text{ mW}$, $\lambda = 785 \text{ nm}$) (adapté de Yakutkin V. et al.).¹⁴³

Dans ce cadre et d'après les travaux de Lin Q. *et al.*, il a été observé que le fait de substituer le groupe carbonyle en position 2 d'une coumarine par un groupe thiocarbonyle provoque un déplacement bathochromique de 50 nm vers le rouge.⁵⁹ En transposant cela au BEP optimisé précédemment, nous passerions donc de 446 nm à environ 496 nm, donc une longueur d'onde appropriée à l'emploi du rubrène comme donneur de FRET (Figure 129).

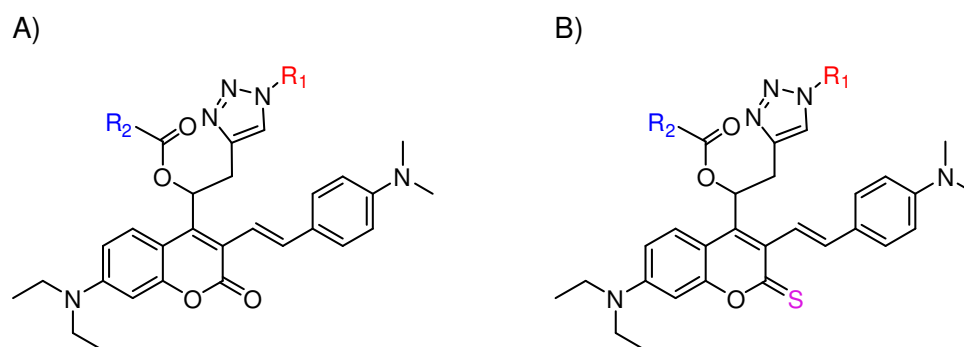


Figure 129 – A) Structure du BEP déjà optimisée dans notre projet ; B) structure d'un analogue soufré envisagé.

Afin d'accéder à ce type d'analogue soufré, la coumarine **1** a dans un premier temps été traitée par le réactif de Lawesson dans du toluène distillé pour conduire à **71** avec 83 % de rendement (Schéma 58). L'étape suivante consistant en la formation de l'énamine n'a malheureusement pas fonctionné.

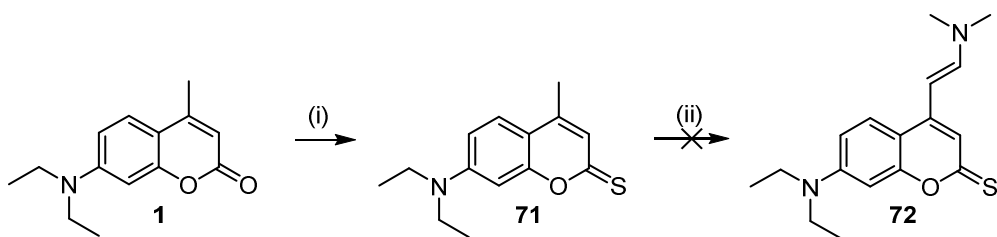


Schéma 58 – Essai d'obtention de la coumarine **72** soufrée : (i) réactif de Lawesson, toluène, 100 °C, 18 h, 83 % ; (ii) DMF-DMA, DMF, reflux, 19 h.

Comme l'aldéhyde **3** est de base très sensible, il semblait préférable de substituer l'oxygène en C2 par un atome soufre plus en aval dans la stratégie de synthèse, c'est-à-dire après l'introduction du groupement propargyle. Il a donc fallu trouver un groupe protecteur adapté pour la fonction alcool. Or nous avons vu au fil des précédentes synthèses que l'alcool était peu réactif en milieu basique et notamment la protection de **12** par un groupement silylé (TBDMS) n'était pas très efficace (56 % de rendement). Nous avons donc souhaité privilégier l'utilisation de conditions acides pour l'étape de protection et c'est pour cela que nous sommes tournés vers le groupe 2-tétrahydropyranyle (THP).

L'alcool **11** a ainsi été mis à réagir avec du dihydropyrane (DHP) en présence d'une quantité catalytique de TsOH, pour obtenir le composé protégé **73** avec un excellent rendement de 93 % (Schéma 59). Toutefois, le traitement de **73** par le réactif de Lawesson a conduit à un mélange de produits (au moins 4) dont le produit de départ protégé **73** et déprotégé **11**.

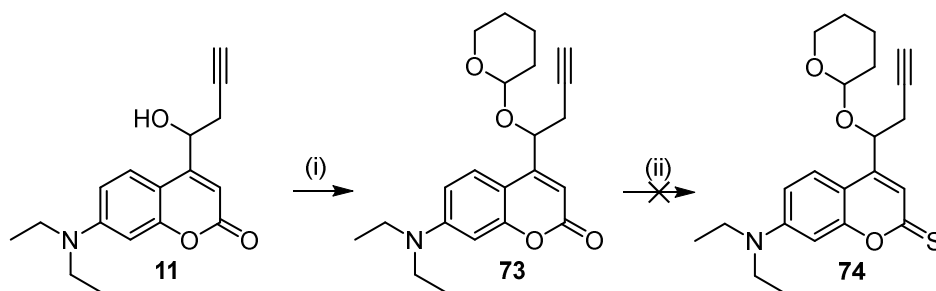


Schéma 59 – Protection de l'alcool **11** et tentative de thionation : (i) DHP, TsOH, CH₂Cl₂, 0 °C à TA, 24 h, 93 % ; (ii) réactif de Lawesson, toluène, 100 °C, 8 h.

Comme le groupe THP s'est avéré sensible aux conditions de Lawesson, cette réaction a aussi été testée directement sur l'alcool **11** mais sans obtenir de façon propre le produit souhaité.

Ces résultats montrent donc que l'alcool interagit avec le réactif de Lawesson et qu'il est nécessaire de trouver une protection qui est simple à introduire et à enlever tout en étant

stable lors de la réaction de Lawesson. L'introduction d'une protection de type éther semble être plus facile que l'utilisation de silanes et une autre option qui n'a malheureusement pas pu être explorée, serait d'employer le groupe méthoxyméthyle (MOM) comme groupe protecteur.

IV-5) Conclusion du chapitre

Pour cet ambitieux projet pluridisciplinaire, nous avons pu développer de nouvelles nanoparticules permettant la photolibération d'une molécule cytotoxique grâce à des irradiations de longueurs d'onde dans le rouge (630 nm). Pour cela, un gros travail de synthèse a été effectué afin d'obtenir un BEP relié à l'effecteur biologique qui a été incorporé avec succès dans les formulations.

Les nanocapsules développées en collaboration avec l'équipe 3Bio ont l'avantage d'être particulièrement stables dans le temps contrairement aux liposomes. De plus, elles ne présentent pas de fuite des espèces encapsulées et sont formulées plus aisément. La conversion ascendante de photons assistée par annihilation triplet-triplet est également beaucoup plus efficace dans les nanocapsules que dans les liposomes. De par sa composition comportant un cœur huileux, les BEP reliés à l'anticancéreux se positionnent tournés vers l'extérieur de la nanocapsule alors que les liposomes qui ont un cœur aqueux ont 50 % de ces BEP dirigés vers l'intérieur, perdant donc en efficacité.

Le potentiel thérapeutique de ces nanocapsules a été évalué sur des lignées cellulaires cancéreuses comme les MDA-MB-231. Le traitement avec nos nanocapsules, permettant une photolibération contrôlée du melphalan, a réduit la viabilité de ces cellules cancéreuses bien plus efficacement qu'un traitement direct avec une solution de melphalan. En effet, la nanocapsule permet une meilleure internalisation du melphalan ce qui conduit à une meilleure efficacité. Des tests *in vivo* sont aujourd'hui réalisés et les résultats préliminaires sont très encourageants. En effet, après chaque traitement par injection cutanée de nanocapsules suivie d'une irradiation à 630 nm, la taille des tumeurs a régressé. Ces résultats doivent être confirmés par des expériences supplémentaires.

Nous avons dès lors envisagé de moduler notre système d' « upconversion » afin de pouvoir utiliser des excitations encore plus décalées dans le NIR. Le groupe de Sasaki Y. *et al.* ont développé des complexes d'osmium pouvant être utilisés avec le pérylène et permettant des irradiations à 720 nm. Cependant, les deux complexes synthétisés se sont révélés insolubles dans le Labrafac, huile utilisée dans la formulation des nanocapsules. Nous avons donc décidé de stopper nos investigations sur ce type de complexes. Une seconde stratégie envisagée est d'utiliser un couple d' « upconversion » commercial, PdTAP/Rubrène, permettant des irradiations de l'ordre de 780 nm. Néanmoins, afin d'utiliser ce couple, il est nécessaire d'effectuer des modifications sur la structure de la coumarine utilisée comme GPP, par exemple la substitution du groupe carbonyle de la coumarine par un groupe thiocarbonyle afin d'obtenir un décalage d'environ 50 nm de la longueur d'onde d'absorption de la coumarine. Toutefois, les premiers essais menés en ce sens n'ont pas donné les résultats escomptés et il faudra envisager d'autres protections de l'alcool benzylique dans le futur.

V) Conclusion et perspectives

Ces dernières années, la recherche et le développement de nouveaux outils photochimiques se sont multipliés. La lumière est en effet un stimulus non invasif permettant un contrôle spatial et temporel très précis dans le cadre de la libération d'effecteurs biologiques. Au cours de cette thèse, notre contribution dans ce domaine a alors consisté dans un premier temps en la conception et la synthèse de nouveaux GPPs sensibles dans le bleu et à des excitations bi-photoniques dans l'IR. Cette série de GPPs très rigides a été élégamment obtenue grâce à un processus domino original impliquant une cyclocarbopalladation 5-*exo-dig* suivie d'un couplage de Suzuki-Miyaura ou de Sonogashira avec le partenaire arylique approprié (Schéma 60). Cette approche a permis l'accès à des coumarines hautement fonctionnalisées et conjuguées, avec d'excellents rendements quantiques (jusqu'à 57 % pour un des composés) mais aussi d'excellentes sensibilités à l'excitation bi-photonique avec des sections efficaces de photolibération jusqu'à 125 GM à 740 nm.

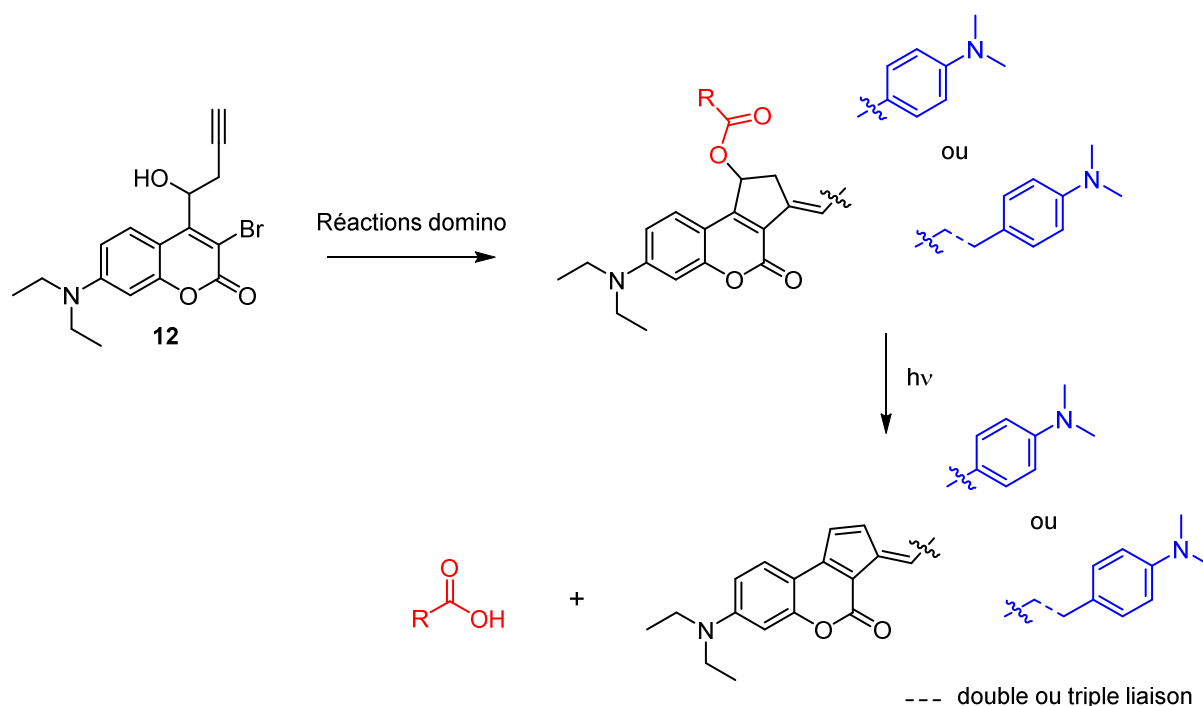


Schéma 60 – Nouveaux GPPs coumariniques avec des cycles rigides et enrichis en électrons, sensibles à 1 et 2 photons et obtenus par un processus domino original.

Il semblerait également que le déplacement bathochromique observé lors de la photolyse (jusqu'à 100 nm) soit l'un des seuls exemples de la littérature. En effet, le produit de photolyse

est un fulvène encore plus conjugué qui ne présente néanmoins pas de fluorescence notable, contrairement au composé avant photolyse.

Ce nouveau GPP ouvre la perspective de futurs développements pour l'utilisation de l'excitation biphotonique notamment dans le domaine des neurosciences. Malgré les différentes tentatives d'introduction d'un résidu propargyle supplémentaire en position benzylique afin d'envisager l'introduction d'une ancre ou d'un groupement solubilisant, il semblerait que cette position soit trop sensible. Il est néanmoins possible d'envisager cette fonctionnalisation sur une autre position de la plateforme comme au niveau du groupe amino de l'aniline en position 3. Cet alcyne permettrait de considérer ces nouveaux GPPs pour des applications en biologie.

L'un des seuls tissus où il n'est pas nécessaire d'utiliser des irradiations dans le rouge est l'œil. Néanmoins, des réglementations requièrent des longueurs d'onde d'irradiation supérieures à 450 nm. C'est pourquoi et afin de rendre photoactivable l'expression ciblée d'un gène (ici l'expression de la tdTomato comme modèle), notre choix s'est porté sur les coumarines.

Cependant, une fois couplée, la coumarine choisie était particulièrement instable, mettant en avant la trop grande sensibilité à la lumière des éthers de phénols. Nous avons donc dû apporter de nouvelles modifications en employant un bras espaceur auto-immolable qui a conféré une plus grande stabilité à la molécule. Ainsi, un œstrogène, l'EE2, a été installé et testé *in vivo* dans l'œil de souris pour l'activation du système modifié Cre-ER^{T2} (Figure 130).

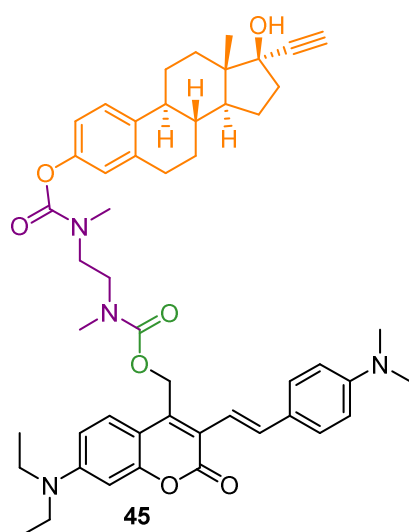


Figure 130 – Composé photosensible permettant la libération d'EE2 à la suite d'une irradiation à 450 nm.

Nos collaborateurs à l'université de Heidelberg continuent à ce jour les expériences *in vivo* mais les premiers résultats montrent bien l'expression de la tdTomato grâce à une irradiation ciblée dans l'œil. Nous pourrions alors envisager d'exprimer un inhibiteur de l'angiogenèse comme « gène médicament » et avoir ainsi une solution de traitement pour des pathologies oculaires induites par le diabète ou la DMLA. En effet, à ce jour, aucun traitement n'existe à part des injections répétées de principes actifs de types anti-VEGF ou de la photocoagulation panrétinienne qui a de nombreux désavantages.

Enfin, mon projet principal consistait en la conception et la synthèse d'un GPP pour une utilisation dans une nanoparticule capable d'effectuer une conversion ascendante de photons. Ces nanoparticules formulées ont l'avantage de pouvoir être irradiées par des lumières dans le rouge sans avoir besoin de trop grandes puissances ni de lasers coûteux. La lumière rouge est alors convertie en un rayonnement de plus grande énergie par conversion ascendante assistée par annihilation triplet-triplet. Les nanocapsules développées par nos collaborateurs ont présenté une meilleure efficacité d'« upconversion » comparée aux liposomes. Cependant, le phénomène d'« upconversion » est sensible à la présence d'oxygène. Il a donc fallu trouver un antioxydant capable de neutraliser l'oxygène singulet produit et c'est l'acide ascorbique qui s'est révélé être l'antioxydant biocompatible le plus efficace. L'énergie convertie est ensuite transférée par FRET à un BEP qui, une fois excité, effectue une photolyse et a été capable dans notre cas de libérer un anticancéreux, le melphalan. Un important travail de synthèse a été nécessaire pour parvenir au BEP idéal à la fois lié à une ancre lipidique et à l'agent cytotoxique (Figure 131).

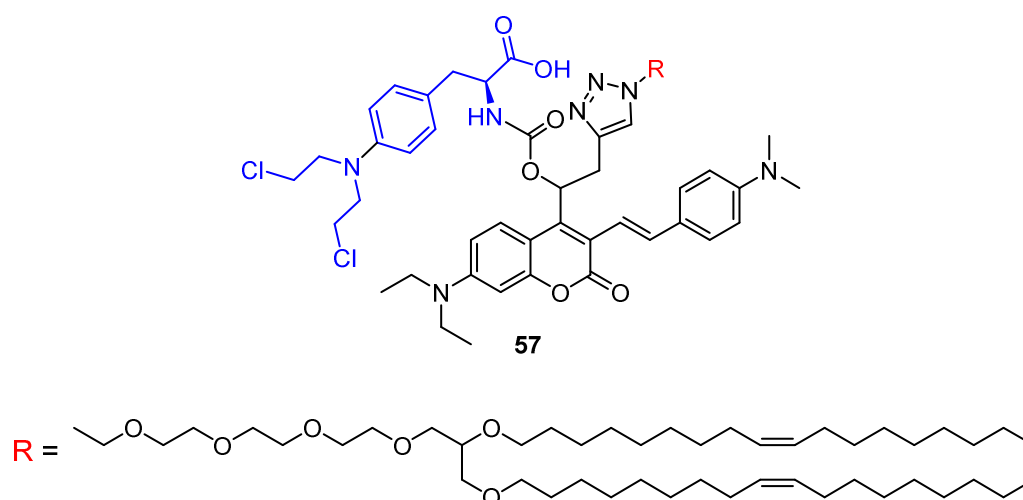


Figure 131 – Bras espaceur photolabile synthétisé dans le projet LightInDR et incorporé à la formulation de nanocapsules.

Le rendement quantique de la photolyse lorsque le BEP est incorporé dans la nanocapsule est de l'ordre de 0.2. Étonnamment, ce rendement chute drastiquement lorsqu'il est en solution (MeOH/H₂O, 1 :1). Plusieurs contrôles ont été menés pour trouver une explication quant à ce faible rendement mais ni l'orientation du triazole, ni l'effecteur biologique ne sont en cause. Les nanocapsules se sont révélées être des nanoparticules de choix de par leur simplicité de formulation et surtout de par leur stabilité dans le temps et en conditions physiologiques. En effet, il semblerait qu'elles soient le premier exemple dans la littérature ne présentant aucune fuite de l'effecteur biologique.

Ces nanocapsules ont été testées par nos collaborateurs sur des cellules MDA-MB-231, montrant une diminution très importante de la viabilité. Elles permettent donc une meilleure internalisation du melphalan par rapport à une application directe de ce dernier, induisant donc une bien meilleure efficacité.

Le système d'irradiation a ensuite été testé à travers différentes tranches de viande afin de simuler l'épaisseur de peau et la photolyse est bien effective malgré une diminution d'efficacité lorsque l'épaisseur devient trop importante. Enfin, la plateforme de chimie biologique intégrative de Strasbourg est actuellement engagée dans la mise en place d'expériences *in vivo* sur des souris. Malgré le besoin d'effectuer plus d'expériences et de contrôles, les premiers résultats ont montré l'activité des nanocapsules irradiées sur des tumeurs sous-cutanées. Une deuxième campagne d'expériences *in vivo* est donc en cours pour confirmer ces résultats.

Ce projet a donc permis la libération photo-induite d'un principe actif *in vivo* à l'aide de nanovecteurs à conversion ascendante de photons. Ces résultats permettent d'envisager de futurs traitements ciblés de tissus tumoraux afin d'améliorer l'efficacité de traitement et de limiter les effets secondaires pour les patients. Nous avons dans l'idée de décaler encore plus dans le rouge les longueurs d'onde d'irradiation en changeant le sensibilisateur, mais les essais menés ont montré une trop faible solubilité dans le Labrafac des sensibilisateurs testés ce qui a rendu leur encapsulation impossible. Un autre couple d'« upconversion » commercial est envisagé mais cela nécessitera de modifier le BEP en substituant par exemple le groupe carbonyle de notre GPP par un groupe thiocarbonyle.

VI) Liste des publications

- Abou Nakad E., Chaud J., Morville C., Bolze F., Specht A., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2020**, *19*, 1122-1133; <https://doi.org/10.1039/D0PP00169D>
- Morville C., Chaud J., Bolze F., Specht A., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2021**; <https://doi.org/10.1007/s10847-021-01071-9>
- Chaud J., Morville C., Bolze F., Garnier D., Chassaing S., Blond G., Specht A., *Org. Lett.* **2021** ; <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c02778>

VII) Partie expérimentale / Experimental part

VII-1) General

All manipulations of light-sensitive compounds (reactions, purification, photophysical studies) were performed in the dark with a RGB LED projector MEIKEE (25W) set on the red light (~ 630 nm) and without parasitic light in particular from computer screens.

The reagents and anhydrous solvents used for the synthesis were purchased from Sigma-Aldrich, TCI EUROPE, Acros Organics or Alfa Aesar. All commercial reagents were used without any further purification except dichloromethane (distilled over CaH₂ under an argon atmosphere) and THF (distilled over sodium/benzophenone under an argon atmosphere) before use.

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded at 400, 500 or 700 and 100, 125 or 175 MHz, respectively using the following NMR Bruker instruments: a 400 MHz spectrometer equipped with an Avance III console and a BBO H/F z-gradient probe; a 500 MHz spectrometer equipped with an Avance III console and either a BBO H/F or a TBI probehead, both with z-gradients; or a 700 MHz spectrometer equipped with a TCI z-gradient cryoprobe and an Avance III-HD console. Chemical shifts (δ) are indicated in ppm with respect to the NMR solvent residual signals (CDCl₃: 7.26 ppm, CD₂Cl₂: 5.32 ppm for ¹H NMR and CDCl₃: 77.16 ppm, CD₂Cl₂: 54.00 ppm for ¹³C NMR). The attributions are given in the following manner: chemical shift followed by the multiplicity in parenthesis (s, br, d, t, q, m, dd, dq corresponding respectively to singlet,

broad, doublet, triplet, quadruplet, multiplet, doublet of a doublet, doublet of a quadruplet, number of protons, and coupling constant in Hz).

The LC-MS mass spectra were carried out using an Agilent LC 1200 series/QToF 6520 spectrometer. The LC system was run using a ZORBAX RRHD SB-C18 2.1 mm id × 50 mm, 1.8- μ m threaded column and acetonitrile + 0.05% formic acid/mQ H₂O + 0.05% formic acid as the elution system. Spectra were acquired by ESI+ ionization ($T_{\text{source}} = 340\text{ }^{\circ}\text{C}$, $V_{\text{cap}} = 4000\text{ V}$).

Thin Layer Chromatography (TLC) analyses were realized using aluminum plates covered with silica gel 60 F254 Merck. Column chromatographies were done on silica gel (230-400 mesh, 0.040-0.063 mm) Merck. Some purifications were performed using thin layer chromatography plates from Miles Scientific (Silica gel GF, UV254, 20x20 cm, 1500 micron).

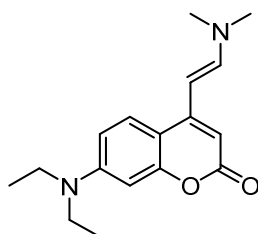
HPLC analyses were realized on a high-performance chromatography system from Waters® (Waters 1525 pump with Waters 2996 detector) equipped with a Thermo Betabasics 5-micron (4.6, 250 nm) analytical column. Analyses were done using a gradient starting from 100% mQ H₂O acidified with 0.01% of TFA and reaching 100% acetonitrile in 30 min. HPLC purifications were realized using a high-performance chromatography Waters system, i.e. Waters 600 double body pump with Waters 2996 detector, equipped with a Thermo Betabasics 5-micron (10, 250 mm) column. The HPLC purifications were done using a gradient starting from 100% mQ H₂O acidified with 0.01% of TFA and reaching 100% acetonitrile in 30 min.

For the microwave heated reactions, a Monowave 300 from Anton Paar was used.

For the isomerization, the source of irradiation was a Lumos 43 from Atlas Photonics based on UV-Led technology, with a typical output of 200 mW/cm² and the wavelength of irradiation was set to 430 nm.

VII-2) Synthesis

(*E*)-7-(Diethylamino)-4-(2-(dimethylamino)vinyl)-2*H*-chromen-2-one (2)



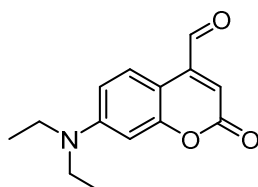
Protocol adapted from Elamri I. *et al.*:⁷⁹

Under Ar, to a solution of 7-(diethylamino)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one **1** (5 g, 21.6 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (50 mL) was added DMF-DMA (5.8 mL, 43.2 mmol, 2 eq.). The yellowish solution was heated at reflux under Ar during 19 h. NaHCO₃ was added and the aqueous phase was extracted 3 times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to afford the titled product **2** as an amorphous yellow solid (6.19 g, quant.).

R_f = 0.30 (EtOAc/CH₂Cl₂ 3:7 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 6.54 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.22 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.99 (s, 6H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.⁷⁹

7-(Diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromene-4-carbaldehyde

(3)



50 mL of a mixture of THF/H₂O (1:1) were added to the previously formed enamine **2** (6.19 g, 21.6 mmol, 1 eq.). NaIO₄ (13.87 g, 64.9 mmol, 3 eq.) was added slowly at 0 °C and a brownish suspension was obtained. It was stirred at 0 °C during 10 min and then the cold bath was removed. Few minutes later, a dark precipitate was obtained. The reaction was stopped after

1 h. The precipitate was filtered over a pad of celite and rinsed with CH₂Cl₂. The solvent was evaporated under vacuum.

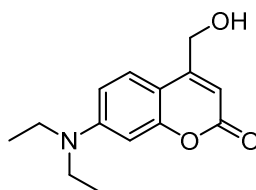
The residue was taken up with CH₂Cl₂, saturated solution of NaHCO₃ was added to the dark reddish solution and the organic phase was separated. The aqueous phase was extracted four times with CH₂Cl₂. The combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum.

The dark reddish oil was rapidly filtered on a thin pad of silica with CH₂Cl₂ to afford the titled compound **3** as a dark reddish solid (4.11 g, 78%).

R_f = 0.45 (CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.03 (s, 1H), 8.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 3.43 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.⁷⁹

7-(Diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one

(4)

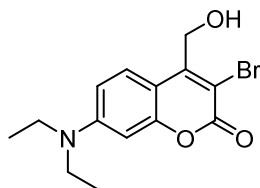


A solution of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde **3** (990 mg, 4.02 mmol, 1 eq.) in THF (20 mL) was cooled to 0 °C, treated with NaBH₄ (304 mg, 8.04 mmol, 2 eq.) and stirred for 3 h at room temperature. Subsequently, a saturated aqueous NaHCO₃ solution was added and the organic layer was separated. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic phases were washed with brine and dried over MgSO₄. After filtration and evaporation under vacuum, the product was purified by column chromatography (20 to 100% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title compound **4** as an amorphous yellow solid (700 mg, 70%).

R_f = 0.3 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.31 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.26 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.83 (dd, *J* = 6.1, 1.4 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.24 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.⁵⁹

3-Bromo-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one

(5)

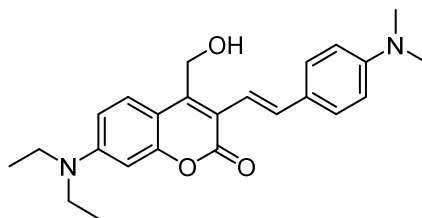


7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **4** (894 mg, 3.62 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (18 mL) previously dried on 4 Å molecular sieves. After addition of NBS (707.8 mg, 3.98 mmol, 1.1 eq.) and ammonium acetate (27.9 mg, 0.36 mmol, 0.1 eq.) under Ar, the solution turned immediately dark brown. After 40 min stirring, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography (0 to 50% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title compound **5** as an amorphous yellow solid (951 mg, 81%).

R_f = 0.61 (EtOAc/heptane 6:4 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 4.95 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.34 (s, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 158.5, 155.3, 151.1, 151.0, 126.6, 109.5, 107.7, 105.4, 97.5, 61.8, 45.0, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₇BrNO₃: 326.0386, found: 326.0392; *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₁₄H₁₆BrNO₃Na: 348.0206, found: 348.0197.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one

(6)



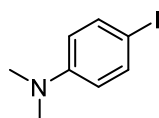
Under Ar, a microwaved tube was filled with 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **5** (100 mg, 0.31 mmol, 1 eq.), *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (109 mg, 0.4 mmol, 1.3 eq.) and K₂CO₃ (42 mg, 0.307 mmol, 1 eq.). To this was added distilled water (1 mL) and DME (3 mL). The tube was degassed by three "freeze pump thaw" cycles before adding Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 6.1 mmol,

0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition. The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 45 min. The solution turned dark brownish/reddish. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified on preparative TLC (50% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title product **6** as an amorphous orange solid (95.6 mg, 79%).

$R_f = 0.35$ (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.64 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.61 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 3.40 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.98 (s, 6H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.⁵⁹

4-Iodo-*N,N*-dimethylaniline

(8)

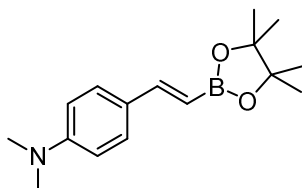


Under Ar, *N,N*-dimethylaniline (0.42 mL, 3.3 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry acetonitrile (16.5 mL). The mixture was cooled down to 0 °C. NIS (817 mg, 3.63 mmol, 1.1 eq.) and ammonium acetate (25.4 mg, 0.33 mmol, 0.1 eq.) were added. The mixture was stirred 20 min, until complete conversion of the starting material. NaHCO_3 was then added and the phases were separated. The aqueous phase was extracted 3 times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to afford the title compound as a purple solid (815 mg, quant.).

$R_f = 0.71$ (EtOAc/heptane 1:4 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.47 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 2.92 (s, 6H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.¹⁶⁰

(E)-N,N-Dimethyl-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline

(9)

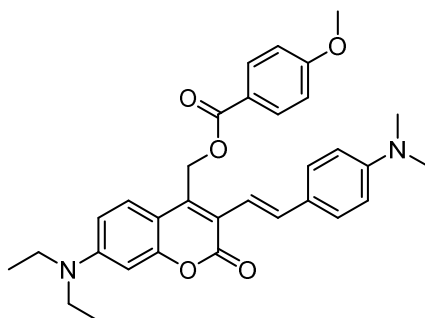


To a solution of 4-iodo-*N,N*-dimethylaniline (500 mg, 2.02 mmol, 1 eq.) in anhydrous toluene (15 mL), was added $i\text{Pr}_2\text{NH}$ (1.14 mL, 8.1 mmol, 4 eq.) and vinylboronate pinacol ester (436.4 mg, 2.83 mmol, 1 eq.). The mixture was degassed by three “freeze-pump-thaw” cycles before adding $\text{Pd}[\text{P}(t\text{-Bu})_3]_2$ (103.4 mg, 0.20 mmol, 0.1 eq.) and one of these cycles was done again. Once the flask reached room temperature, it was directly heated at 95 °C. The reaction was stopped after 2 h 30. The reaction was quenched with NH_4Cl and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried on Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The product was washed with heptane over a silica plug (2 cm) and eluted with EtOAc. An amorphous brownish solid was obtained after a long period of drying under reduced pressure (444 mg, 80% estimated). The product was used without further purification.

$R_f = 0.49$ (AcOEt/heptane 25:75 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.43–7.38 (m, 2H), 7.35 (d, $J = 18.3$ Hz, 1H), 6.69–6.62 (m, 2H), 5.94 (d, $J = 18.3$ Hz, 1H), 2.97 (s, 6H), 1.31 (s, 12H). The analyses were consistent with the ones described in the literature.¹⁶¹

(E)-(7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl 4-methoxybenzoate

(10)

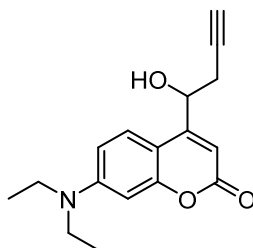


In a dark room, 7-(diethylamino)-3-[(E)-2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl]-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **6** (24 mg, 0.06 mmol, 1 eq.), 4-methoxybenzoic acid (11.2 mg, 0.07 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (0.8 mg, 6 μ mol, 0.1 eq.) were dissolved in distilled dichloromethane (1.7 mL). DIC (19 μ L, 0.12 mmol, 2 eq.) was added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 18 h, some starting materials were still seen on TLC. Hence, again, 4-methoxybenzoic acid (5 mg, 0.03 mmol, 0.5 eq.) and DIC (5 μ L, 0.03 mmol, 0.5 eq.) were added at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and the cold bath was removed. After 3 h 30 stirring, the reaction was completed as revealed by TLC analysis. The volatiles were removed under reduced pressure. The product was purified by preparative HPLC to afford the title compound **10** as an amorphous dark reddish solid (19 mg, 59%).

HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{32}H_{34}N_2O_5Na$: 549.2360, found: 549.2365.

7-(Diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one

(11)



Zn dust (2 g) was washed with diluted HCl (2M), H₂O (3x), EtOH (2x) and anhydrous diethylether (x2).

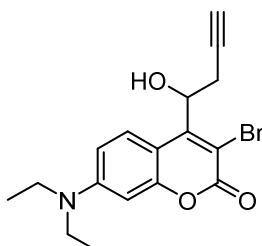
Under Ar, the activated zinc (1.79 g, 27.3 mmol, 6.4 eq.) was suspended in dry THF (14.3 mL) and propargyl bromide (80 wt. % solution in toluene) 1.27 mL, 11.4 mmol, 2.7 eq.) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h 30. Then a solution of propargylzinc bromide in THF (14.5 mL, 2.5 eq.) was added to the corresponding aldehyde **3** (1.05 g, 4.27 mmol, 1 eq.). After completion of the reaction (1 h 30), the mixture was quenched by adding a saturated aqueous NH₄Cl solution and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (0 to 40% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title compound **11** as an amorphous yellow solid (1.05 g, 86%).

R_f = 0.52 (CH₂Cl₂/EtOAc 8:2 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.29 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 5.13 (dtd, *J* = 7.7, 4.2, 1.0 Hz, 1H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.83 (ddd, *J* = 17.0, 4.2, 2.6 Hz, 1H), 2.68 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.63 (ddd, *J* = 17.0, 7.7, 2.6 Hz, 1H), 2.17 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.¹⁶²

3-Bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one

(12)

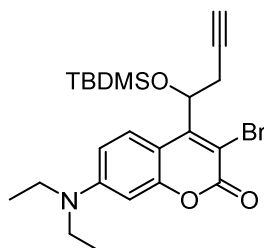


7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **11** (250 mg, 0.88 mmol, 1eq.) was dissolved in distilled acetonitrile (4.2 mL). NBS (171.5 mg, 0.96 mmol, 1.1 eq.) and

ammonium acetate (6.8 mg, 0.1 mmol, 0.1 eq.) were added under Ar. After 30 min stirring, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The product was purified by column chromatography (25% EtOAc/ heptane in vol.) to afford the title compound **12** as an amorphous yellow solid (297 mg, 93%).

R_f = 0.82 (CH₂Cl₂/EtOAc 8:2 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.60 (dd, *J* = 9.2, 5.1 Hz, 1H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.91 (ddd, *J* = 16.8, 9.2, 2.6 Hz, 1H), 2.75 (ddd, *J* = 16.8, 5.1, 2.6 Hz, 1H), 2.13 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 158.3, 155.4, 152.8, 150.6, 127.8, 108.9, 106.4, 104.3, 97.5, 79.6, 73.8, 71.7, 44.9, 26.1, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₇H₁₉BrNO₃: 364.0543, found: 364.0530.

3-Bromo-4-(1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)but-3-yn-1-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one
(13)

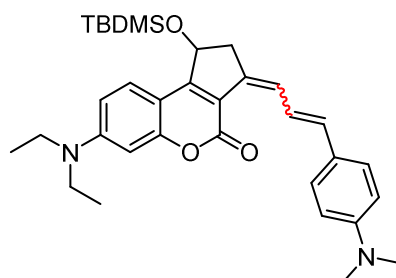


To a solution of 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **12** (100 mg, 0.27 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (3.5 mL) was added TBDMSCl (62 mg, 0.41 mmol, 1.5 eq.) and imidazole (28 mg, 0.41 mmol, 1.5 eq.). After 2 h stirring at room temperature, the mixture was heated at 50 °C. After 22 h, the solution was cooled down to room temperature before adding another batch of TBDMSCl (62 mg, 0.41 mmol, 1.5 eq.) and imidazole (28 mg, 0.41 mmol, 1.5 eq.). The mixture was heated again at 50 °C during 23 h. The solution was cooled down to room temperature and the volatiles were removed by rotary evaporation. The crude was then purified on preparative TLC with 40% EtOAc/heptane in vol. as eluent to yield the title compound **13** as a yellow oil (73.2 mg, 56%).

R_f = 0.56 (35% EtOAc/heptane in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J* = 9.4, 2.7 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.59 (dd, *J* = 8.4, 5.5 Hz, 1H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.86 (ddd, *J* = 16.7, 8.5, 2.7 Hz, 1H), 2.68 (ddd, *J* = 16.7, 5.5, 2.7 Hz, 1H), 2.03 (t, *J* = 2.7 Hz,

1H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.87 (s, 9H), 0.17 (s, 3H), -0.03 (s, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 158.3, 155.4, 153.8, 150.5, 128.3, 108.6, 106.3, 104.1, 97.4, 80.0, 75.04, 71.10, 44.83 (CH_2Cl_2), 27.2, 25.8, 18.2, 12.6, -4.8, -4.9; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{BrNO}_3\text{Si}$: 478.1408, found: 478.1418.

1-((*Tert*-butyldimethylsilyloxy)-7-(diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-2,3-dihydrocyclopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-one
(14'a (Z/E) / 14a (E/E))



To a dry microwave tube were added under Ar a solution of 3-bromo-4-(1-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)but-3-yn-1-yl)-7-(diethylamino)-2*H*-chromen-2-one **13** (100 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) in 3 mL of DME, K_2CO_3 (28.9 mg, 0.21 mmol, 1 eq.) and *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (74.2 mg, 0.27 mmol, 1.3 eq.). To this was added 1 mL of distilled water. The tube was degassed by three "freeze-pump-thaw" cycles before adding $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (4.8 mg, 4 μmol , 0.02 eq.), and one of these cycles was done again after the addition. The flask was allowed to warm up to room temperature and then heated up to 105 $^\circ\text{C}$ and stirred during 45 min in the microwave. The solution took a dark brownish color. An HPLC analysis showed both diastereoisomer **14'a** (*Z/E*) and **14a** (*E/E*) with a 8:2 ratio. The solution was poured into NaHCO_3 and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum.

The NMR analysis was performed in a solution of dimethyl fumarate (as internal standard) in CDCl_3 giving a calculated yield of 77% for **10'a/10a** (ratio: 86/14).

The product was purified by column chromatography (10% EtOAc/heptane in vol.) to afford **14'a/14a** as an amorphous dark orange/red solid (60.5 mg, 53%, ratio **14'a/14a**: 62/38)

$R_f = 0.52$ (35% EtOAc/heptane in vol.); HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_3\text{Si}$: 545.3194, found: 545.3179.

14'a (Z/E diastereoisomer):

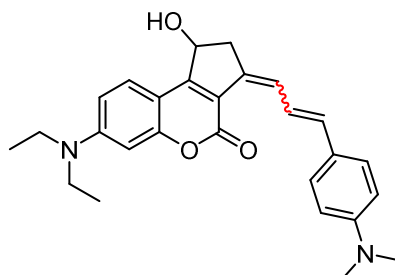
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 8.19 (dd, $J = 15.4, 11.5$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.59-6.54 (m, 1H), 6.53 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.43 (dd, $J = 7.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.46-3.39 (m, 4H), 3.14-3.08 (m, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.86-2.80 (m, 1H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.94 (s, 9H), 0.25 (s, 3H), 0.18 (s, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 159.4, 159.3, 157.1, 150.6, 149.9, 132.8, 132.3, 127.8, 127.3, 126.7, 125.1, 124.1, 119.9, 112.7, 108.7, 107.6, 97.3, 73.1, 45.9, 44.9, 40.6, 26.0, 18.1, 12.7, -3.6, -4.5.

14a (E/E diastereoisomer):

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.61 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 15.4, 11.3$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 6.59-6.54 (m, 2H), 5.54 (dd, $J = 7.7, 3.9$ Hz, 1H), 3.45-3.40 (m, 4H), 3.33 (ddd, $J = 16.6, 7.7, 2.0$ Hz, 1H), 2.97 (s, 6H), 2.79-2.74 (m, 1H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 0.95 (s, 9H), 0.29 (s, 3H), 0.22 (s, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 159.3, 156.5, 155.7, 150.3, 150.1, 135.7, 133.2, 127.6, 126.7, 126.2, 123.4, 122.7, 120.1, 112.6, 108.7, 107.6, 97.7, 73.7, 44.9, 40.7, 39.2, 26.0, 18.1, 12.7, -3.5, -4.4.

The spectra of the crude product showed the presence of the *Z* isomer with the *E* (probably induced by ambient light) and the boronic acid pinacol ester derivative.

7-(Diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one
(15'a (Z/E) / 15a (E/E))



1st method:

To a solution of 1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-7-(diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one **14'a/14a** (60 mg, 0.11 mmol, 1 eq.) in distilled THF (5.5 mL) was added slowly under argon atmosphere, at room temperature, a solution of 1 M TBAF in THF (0.13 mL, 0.13 mmol, 1.2 eq.). After 30 min, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified on preparative TLC (50% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title compounds **15'a/15a** as a reddish solid (19.4 mg, 41%, ratio **15'a/15a**: 59/41).

2nd method:

Under Ar, a microwave tube was filled with (*E*)-*N,N*-dimethyl-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline **9** (91 mg, 0.33 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (35.3 mg, 0.26 mmol, 1 eq.), and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **12** (93 mg, 0.26 mmol, 1 eq.). To this was added DME (3 mL) and distilled water (1 mL). The mixture was degassed by three “freeze-pump-thaw” cycles before adding Pd(PPh₃)₄ (3.5 mg, 3 μmol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition. The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 45 min. The solution turned dark brownish. The reaction mixture was poured into NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified on preparative TLC (50% EtOAc/heptane in vol.) to afford the title compounds **15'a/15a** as an amorphous reddish solid (42.5 mg, 39%).

R_f = 0.38 (1:1 EtOAc/heptane in vol.); HR-MS (ESI, positive mode): m/z [M+H]⁺ calculated for C₂₇H₃₁N₂O₃: 431.2329, found: 431.2310.

15'a (Z/E diastereoisomer):

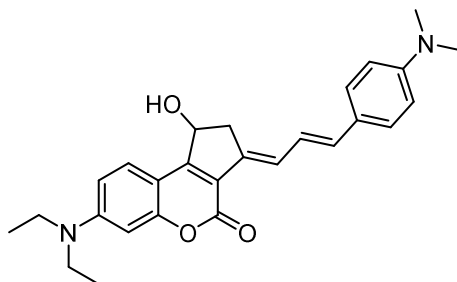
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (dd, *J* = 15.4, 11.5 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.54 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.30 (dd, *J* = 7.6, 4.0 Hz, 1H), 3.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.20 (dd, *J* = 16.7, 7.6 Hz, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.80–2.75 (m, 1H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

15a (E/E diastereoisomer):

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 6.73–6.66 (m, 3H), 6.59 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.54–6.49 (m, 2H), 5.46 (dd, *J* = 7.9, 2.9 Hz, 1H), 3.38–3.30 (m, 5H), 2.97 (s, 6H), 2.82 (m, 1H), 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H);

¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 159.5 (2C), 156.5, 155.1, 150.4, 150.0, 135.4, 133.3, 127.7, 126.1, 124.0, 122.6, 120.1, 112.7, 109.3, 107.2, 97.7, 72.8, 44.9, 40.7, 29.8, 12.7.

(E)-7-(Diethylamino)-3-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one
(15a (E/E))

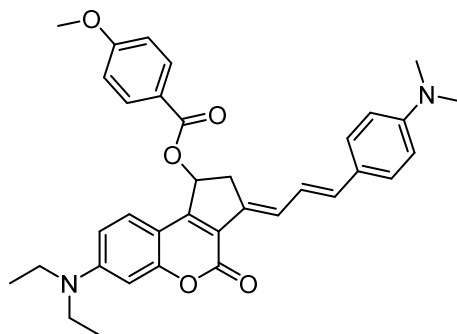


The mixture of **15'a/15a** (42.5 mg) was dissolved in either CHCl₃ or CH₂Cl₂ and transferred in a 20 mL test tube with a magnetic stir bar. The solution was stirred and irradiated at 430 nm during 1 h. The solution was then transferred back to a flask, concentrated under reduced pressure and analyzed by NMR to confirm the complete conversion into the **15a** diastereomer.

R_f = 0.38 (1:1 EtOAc/heptane in vol.); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 6.73–6.66 (m, 3H), 6.59 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.54–6.49 (m, 2H), 5.46 (dd, *J* = 7.9, 2.9 Hz, 1H), 3.38–3.30 (m, 5H), 2.97 (s, 6H), 2.82 (m, 1H), 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.5 (2C), 156.5, 155.1, 150.4, 150.0, 135.4, 133.3, 127.7, 126.1, 124.0, 122.6, 120.1, 112.7, 109.3, 107.2, 97.7, 72.8, 44.9, 40.7, 29.8, 12.7; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$: 431.2329, found: 431.2310.

(*E*)-7-(Diethylamino)-3-((*E*)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[*c*]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate
(16a)

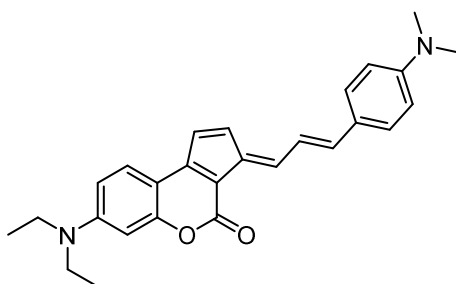


In a dark room, (*E*)-7-(diethylamino)-3-((*E*)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-one **15a** (29.5 mg, 0.069 mmol, 1 eq.), 4-methoxybenzoic acid (12.5 mg, 0.08 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (0.8 mg, 7 μmol , 0.1 eq.) were dissolved in distilled dichloromethane (3 mL). DIC (21 μL , 0.14 mmol, 2 eq.) was added at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ during 30 min and the cold bath was removed. After 18 h, some starting materials were still seen on TLC. Additional 4-methoxybenzoic acid (5 mg, 0.03 mmol, 0.5 eq.) and DIC (5 μL , 0.03 mmol, 0.5 eq.) were added again at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ during 30 min and the cold bath was removed. After 4 h 30 stirring, some starting materials were still seen on TLC hence, again, 4-methoxybenzoic acid (10.4 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) and DIC (10.7 μL , 0.07 mmol, 1 eq.) were added at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was further stirred at 0 $^\circ\text{C}$ during 30 min and the cold bath was removed. After 19 h stirring, the reaction was completed as revealed by TLC analysis and the volatile compounds were removed under reduced pressure. The product was purified by preparative HPLC to give the title compound **16a** as a dark reddish solid (26 mg, 67%).

R_f = 0.74 (EtOAc/heptane 1:1 in vol); ^1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.77 (m, 1H), 6.67 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.64–6.60 (m, 2H), 6.59–6.56 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.60–3.53 (m, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.96 (s, 7H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H);

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (176 MHz, CD_2Cl_2): δ 166.2, 164.3, 159.1, 156.9, 152.1, 151.0, 150.7, 136.1, 134.0, 132.3, 128.0, 126.5, 126.1, 124.3, 122.7, 122.6, 122.2, 114.3, 112.8, 109.8, 107.2, 97.9, 74.4, 56.1, 45.3, 40.7, 37.0, 12.8; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$: 565.2697, found: 565.2701.

(E)-7-(Diethylamino)-3-((E)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)allylidene)cyclopenta[c]chromen-4(3H)-one
(17a)

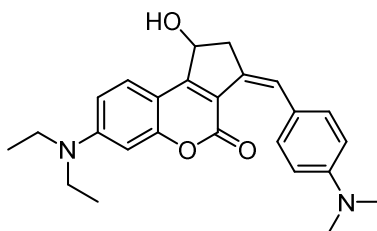


A solution of **16a** in CH_2Cl_2 was poured in a 20 mL test tube with a magnetic stirrer and the tube was irradiated at 430 nm during 1 h. The solution was transferred in a flask and the volatile products were removed under reduced pressure.

^1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.01 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.40–7.35 (m, 2H), 7.10 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 7.05–7.01 (m, 1H), 6.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.67 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 3.45 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.04 (s, 6H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (176 MHz, CD_2Cl_2) δ 159.3, 157.1, 152.0, 150.7, 150.6, 144.0, 141.0, 138.5, 130.4, 129.9, 125.6, 125.0, 123.6, 121.8, 112.5, 109.4, 108.7, 107.5, 98.5, 45.3, 40.5, 12.9; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$: 207.1148, found: 207.1150.

(Z)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one

(15'b)

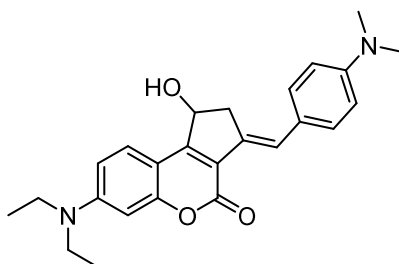


Under Ar, a microwave tube was filled with (*E*)-*N,N*-dimethyl-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline **9** (97 mg, 0.4 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (41.7 mg, 0.302 mmol, 1 eq.) and 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2*H*-chromen-2-one **12** (110 mg, 0.302 mmol, 1 eq.). To this was added DME (3 mL) and distilled water (1 mL). Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding Pd(PPh₃)₄ (7 mg, 6 μmol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition. The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 45 min. The solution turned dark brownish. The reaction mixture was poured into NaHCO₃ and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The product was purified by preparative TLC (EtOAc/Heptane 6:4 in vol.) to afford the title compound **15'b** as an amorphous reddish solid (27.6 mg, 23%).

R_f = 0.31 (1:1 EtOAc/heptane in vol.); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.61 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.43 (dd, *J* = 7.0, 5.1 Hz, 1H), 3.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.29 (ddd, *J* = 14.6, 7.0, 1.5 Hz, 1H), 2.94 (s, 6H), 2.87–2.82 (m, 1H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 159.8, 157.3, 157.2, 150.7, 149.4, 130.4, 130.1, 126.5 (2 C) 123.4, 119.8, 111.5, 109.0, 106.8, 97.5, 72.8, 46.9, 45.0, 40.7, 12.7; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₅H₂₉N₂O₃: 405.2173, found: 405.2176.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one

(15b)

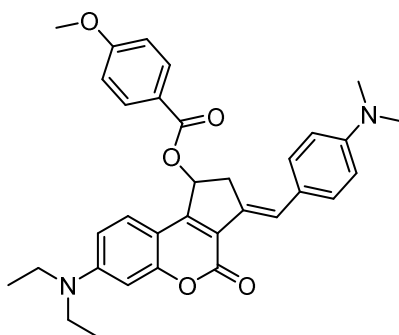


The compound **15'b** (27.6 mg) was dissolved in either CHCl_3 or CH_2Cl_2 and transferred in a 20 mL test tube with a magnetic stir bar. The solution was stirred and irradiated at 430 nm during 1 h. The solution was then transferred back to a flask, concentrated under reduced pressure and analyzed by NMR to confirm the complete conversion into the **15b** diastereomer.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.59 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.46 (dd, $J = 7.9, 3.1$ Hz, 1H), 3.47 (ddd, $J = 17.1, 7.9, 2.1$ Hz, 1H), 3.38 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.96 (s, 6H), 2.94-2.93 (m, 1H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 159.7, 156.4, 154.0, 150.3, 149.1, 132.8, 130.0, 127.0, 126.1, 123.8, 120.8, 112.5, 109.2, 107.2, 97.7, 73.5, 44.9, 41.2, 40.6, 12.7.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate

(16b)



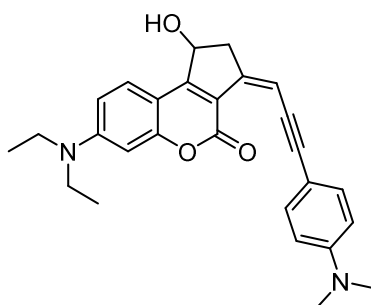
In a dark room, (*E*)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1*H*)-one **15b** (54 mg, 0.13 mmol, 1 eq.), 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DMAP (1.6 mg, 0.013 mmol, 0.1 eq.) were dissolved in

distilled dichloromethane (4.5 mL). DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) was added at 0 $^{\circ}$ C. The mixture was stirred at 0 $^{\circ}$ C during 30 min and the cold bath was removed. After 18 h stirring, some starting materials were still seen on TLC. Therefore, 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) were added at 0 $^{\circ}$ C. The mixture was stirred at 0 $^{\circ}$ C during 30 min and the cold bath was removed. After 6 h 30 stirring, some starting materials were still seen on TLC and 4-methoxybenzoic acid (24.4 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq.) and DIC (42 μ L, 0.27 mmol, 2 eq.) were again added at 0 $^{\circ}$ C. The mixture was stirred at 0 $^{\circ}$ C during 30 min and the cold bath was removed. After 64 h stirring, the reaction was completed as revealed by TLC analysis. The volatile compounds were removed under vacuum. The product was purified by preparative HPLC to give the title compound **16b** as a dark reddish solid (14.1 mg, 20%)

R_f = 0.67 (1:1 EtOAc/heptane in vol.); ^1H NMR (700 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.97 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.56 (br s, 1H), 7.41 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.94–6.90 (m, 4H), 6.64 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.60–6.57 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.70–3.65 (m, 1H), 3.42 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 3.10–3.05 (m, 1H), 3.01 (s, 6H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (176 MHz, CD_2Cl_2): δ 166.1, 164.3, 159.2, 156.9, 151.6, 151.1, 147.8, 135.1, 132.3, 130.5, 126.1, 123.5 (br, 2C), 122.6, 122.5, 114.9, 114.3, 109.8, 107.0, 97.8, 74.8, 56.0, 45.4, 42.2, 38.9, 12.8; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$: 270.1312, found: 270.1312; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$: 539.2540, found: 539.2562.

(Z)-7-(Diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-yn-1-ylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[c]chromen-4(1H)-one

(15'c)



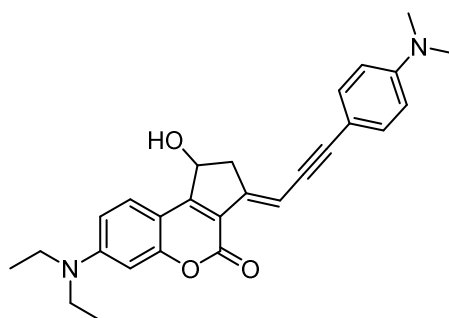
In a microwave vial was added under Ar 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **12** (32.0 mg, 88 μ mol, 1 eq.), 4-ethynyl-*N,N*-dimethylaniline (19.4 mg,

0.13 mmol, 1.5 eq.) and 3 mL of distilled diisopropylamine. Then 2 “freeze-pump-thaw” cycles were carried out and PdCl₂(PPh₃)₂ (6.2 mg, 8.8 μmol, 0.1 eq.) and CuI (3 mg, 17.6 μmol, 0.2 eq.) were added and a last degassing cycle was performed. The solution was heated at 120 °C for 1 h. The reaction mixture was allowed to cool at room temperature and a saturated aqueous solution of NH₄Cl was added and extracted three times with dichloromethane. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The product was then dissolved in EtOAc and the resulting mixture was filtered. The solvent was removed under vacuum to give the crude product which was purified using TLC prep (1:1 Heptane/AcOEt in vol.) to afford the title compound **15’c** in pure forms (17 mg, 45%).

R_f = 0.55 (4:6 Heptane/AcOEt in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.50–7.44 (m, 2H), 6.65–6.60 (m, 2H), 6.58 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.76 (m, 1H), 5.35 (dd, *J* = 7.4, 3.9 Hz, 1H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.25 (ddd, *J* = 16.4, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.81 (ddd, *J* = 16.4, 3.9, 2.0 Hz, 1H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 159.5, 157.6, 157.6, 151.1, 150.0, 142.8, 132.8, 127.0, 118.9, 112.0, 111.6, 109.1, 106.6, 101.6, 97.6, 97.3, 87.2, 72.0, 45.0, 44.5, 40.4, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+2H]²⁺ calculated for C₂₇H₃₀N₂O₃: 215.1123, found: 215.1117, *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₇H₂₉N₂O₃: 429.2173, found: 421.2176.

(*E*)-7-(Diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-yn-1-ylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-one

(15c)

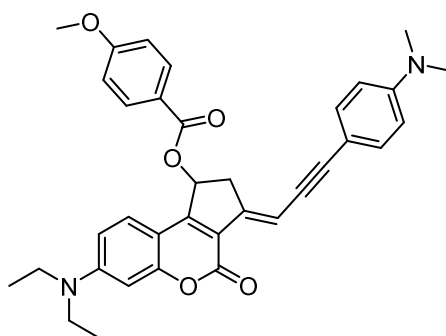


The mixture of **15’c** (17 mg) was dissolved in either CHCl₃ or CH₂Cl₂ and transferred in a 20 mL test tube with a magnetic stir bar. The solution was stirred and irradiated at 430 nm during 1 h. The solution was then transferred back to a flask, concentrated under reduced pressure and analyzed by NMR to confirm the complete conversion into the **15c** diastereomer.

^1H NMR (700 MHz, CDCl_3): δ 7.70 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.34–7.32 (m, 2H), 6.69 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.66–6.63 (m, 2H), 6.62 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 3.50 (ddd, $J = 18.0, 7.7, 2.3$ Hz, 2H), 3.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 2.98 (s, 3H), 2.93–2.89 (m, 2H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (176 MHz, CDCl_3): δ 159.0, 157.1, 157.0, 151.0, 150.1, 146.4, 132.6, 126.6, 119.0, 112.0 (2x), 109.3, 106.8, 102.9, 97.8, 87.1, 72.5, 45.0, 41.1, 40.4, 12.6.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-yn-1-ylidene)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[c]chromen-1-yl 4-methoxybenzoate

(16c)

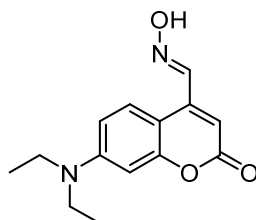


To a solution of (*E*)-7-(diethylamino)-3-(3-(4-(dimethylamino)phenyl)prop-2-yn-1-ylidene)-1-hydroxy-2,3-dihydrocyclopenta[*c*]chromen-4(1*H*)-one **15c** (24.0 mg, 56 μmol , 1.0 eq.) in 1 mL of freshly distilled dichloromethane were added 4-methoxybenzoic acid (9.4 mg, 62 μmol , 1.1 eq.), distilled $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ (20 μL , 0.12 mmol, 2.2 eq.) and DMAP (2.1 mg, 17 μmol , 0.5 eq.). Then EDC (9 mg, 62 μmol , 1.1 eq.) was added at 0 $^\circ\text{C}$ and the solution was stirred at this temperature for 30 min. Then the solution was allowed to warm at room temperature and the solution was stirred 48 h. The reaction conversion was monitored using HPLC and EDC, $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ and 4-methoxybenzoic acid were added until complete conversion with a total amount of 3.3 eq., 6.6 eq., and 3.3 eq. respectively. Then the solution was washed using a pH 5 aqueous solution of acetic acid and extracted using CH_2Cl_2 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 , filtered and solvent was evaporated under vacuum. The crude product was purified using HPLC prep (75:25 Acetonitrile/water in vol. and 0.1% of TFA) to afford the title compound **16c** in pure forms (12 mg, 37%).

$R_f = 0.25$ (Heptane/AcOEt 7:3 in vol); $^1\text{H NMR}$ (700 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.04–8.01 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.36–7.33 (m, 2H), 6.98–6.95 (m, 2H), 6.71 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.69–6.65 (m, 3H), 6.64–6.61 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.64 (ddd, $J = 18.4, 7.7, 2.3$ Hz, 1H), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.05 (m, 1H), 3.01 (s, 6H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (176 MHz, CD_2Cl_2) δ 165.5, 163.8, 158.4, 156.7, 154.1, 151.1, 150.1, 146.7, 132.4, 131.8, 126.0, 122.0, 120.3, 113.7, 111.7, 110.3, 109.4, 106.3, 102.2, 97.9, 97.4, 86.6, 73.0, 55.5, 44.8, 40.0, 38.2, 12.2; HR-MS (ESI, positive mode) m/z $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$: 282.1307, found: 282.1314; m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_5$: 563.2541, found: 563.2527.

(E)-7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde oxime

(20)



Protocol reproduced from Brubacker A. N.:⁸³

Under Ar, sodium acetate trihydrate (244.1 mg, 1.79 mmol, 1 eq.) and hydroxylamine hydrochloride (124.6 mg, 1.79 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in distilled water (2 mL). A solution of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde (400 mg, 1.63 mmol, 1 eq.) in ethanol (11 mL) was added. The reddish mixture was stirred under reflux during 1 h.

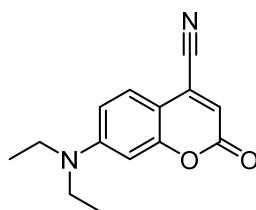
An orange/brownish precipitate was seen. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and was diluted with distilled water. The solid was filtered and washed with water and pentane to afford the tittle product as an orange solid (365 mg, 86%).

$R_f = 0.50$ (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6): δ 11.29 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.71 (dd, $J = 9.2, 2.6$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.51 (q, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, Acetone- d_6): δ 161.7, 158.0, 151.9, 147.7, 145.4, 128.6, 109.7, 109.5, 106.5, 98.4, 45.3, 12.9; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: 261.1234, found: 261.1231.

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸³

7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbonitrile

(21)



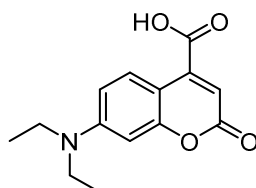
(*E*)-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde oxime **20** (239 mg, 0.92 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetic anhydride (7 mL) and the mixture was stirred at reflux during 17 h. The volatiles were removed under vacuum and the titled product was obtained without further purification as a reddish solid (223 mg, quant.).

$R_f = 0.50$ (EtOAc/heptane 3:7 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.49 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 3.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 159.6, 156.6, 152.1, 127.1, 126.7, 114.3, 114.0, 109.7, 105.3, 97.7, 45.1, 12.5; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$: 243.1128, found: 243.1126.

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸³

7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carboxylic acid

(19)



To 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbonitrile **21** (222 mg, 0.92 mol, 1 eq.) was added a solution of 50% aqueous H_2SO_4 (8 mL). The mixture was heated at 100 °C and the solution took a brownish color.

After 17 h, the reaction was allowed to cool down to room temperature. HPLC and TLC showed the completion of the reaction. The mixture was diluted in 40 mL of water and extracted with

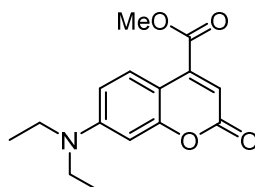
EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to afford the title compound as a dark solid (185 mg, 77%).

R_f = 0 (EtOAc/heptane 3:7 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.63 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 3.44 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 167.9, 161.7, 157.3, 151.0, 141.5, 127.9, 112.6, 109.5, 105.1, 98.0, 45.0, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₆NO₄: 262.1074, found: 262.1077.

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸³

Methyl 7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromene-4-carboxylate

(23)

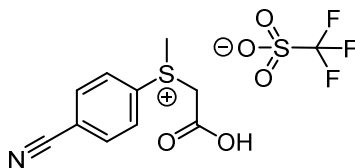


In a flask was added under Ar, 7-(diethylamino)-2-oxo-2*H*-chromene-4-carboxylic acid **19** (70 mg, 0.27 mol, 1 eq.), DMAP (3.3 mg, 0.03 mmol, 0.1 eq.) and 1 mL of distilled methanol. Then DIC (83 μL, 0.54 mmol, 2 eq.) was added slowly at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C during 30 min and then the cold bath was removed. The mixture was stirred overnight. After 20 h, the volatiles were removed under vacuum and the crude was then purified on preparative TLC with 30% EtOAc/heptane in vol. as eluant. The title compound was obtained as an orange solid (53.8 mg, 73%).

R_f = 0.45 (EtOAc/heptane 3:7 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.99 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.59 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 165.3, 161.7, 157.2, 150.9, 142.7, 127.8, 111.5, 109.3, 105.2, 97.8, 53.0, 44.9, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₅H₁₈NO₄: 276.1230, found: 276.1233; *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₁₅H₁₇NO₄Na: 298.1050, found: 298.1054.

(Carboxymethyl)(4-cyanophenyl)(methyl)sulfonium trifluoromethanesulfonate

(26)



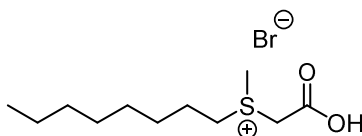
Under Ar, iodoacetic acid (904.6 mg, 4.87 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (9 mL) followed by the addition of 4-cyanothioanisole (1.08 g, 7.3 mmol, 1.5 eq.) in one portion at room temperature. In another flask, silver triflate (1.3 g, 5.06 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (9 mL). The silver triflate solution was added dropwise at room temperature *via* syringe to the solution of sulfide and iodoacetic acid. A white and then yellowish precipitate was seen. After 48 h, the media was filtered on filter paper to remove AgI and rinsed with acetonitrile. A maximum of acetonitrile was removed by rotary evaporation without external heat. The residue was then triturated with diethyl ether and CH₂Cl₂ to afford the title compound as a sticky green powder (972 mg, 56% estimated).

R_f = 0 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ 8.16-7.97 (m, 4H), 7.61 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.68-4.54 (m, 2H), 3.26 (s, 3H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸⁴

(Carboxymethyl)(methyl)(octyl)sulfonium bromide

(32)



Acetone was freshly distilled before use. Under Ar, in a first oven-dried flask, 1-(methylsulfanyl)octane (3.54 mL, 18.7 mmol, 1 eq.) was dissolved in distilled acetone (10 mL). In a second oven-dried flask, bromoacetic acid (2.86 g, 20.6 mmol, 1 eq.) was dissolved in distilled acetone (10 mL). This latter solution was added dropwise to the first solution.

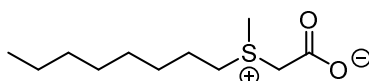
After 20 h, the solvent was removed by rotary evaporation and the residue was triturated several times with TBME and dried at reduced pressure to afford the product as a white powder (2.34 g, 42%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.71 (br s, 1H), 5.17–4.94 (m, 2H), 3.81–3.65 (m, 2H), 3.26 (s, 3H), 1.90–1.75 (m, 2H), 1.54–1.45 (m, 2H), 1.40–1.21 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸⁸

2-(Methyl(octyl)sulfonio)acetate

(33)



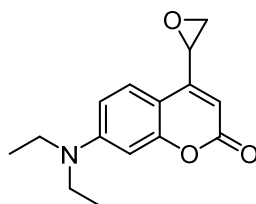
Under Ar, the previously formed (carboxymethyl)(methyl)(octyl)sulfonium bromide **32** (2338.6 mg, 7.81 mmol, 1 eq.) was dissolved in anhydrous MeOH (48 mL). Freshly prepared Ag_2O (2.72 g, 11.7 mmol, 1.5 eq.) was added portionwise. A white precipitate is rapidly formed. The suspension was stirred during 19 h under Ar. The suspension was then filtrated and washed with MeOH. The filtrate was then concentrated under vacuum and triturated with TBME to afford the title compound as a silverish powder (1.57 g, 92%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 4.23–4.09 (m, 2H), 3.52–3.42 (m, 1H), 3.27–3.15 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 1.81–1.72 (m, 2H), 1.51–1.42 (m, 2H), 1.38–1.21 (m, 8H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.⁸⁸

7-(Diethylamino)-4-(oxiran-2-yl)-2H-chromen-2-one

(27)



7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde **3** (500 mg, 2.03 mmol, 1 eq.) and Cs_2CO_3 (1.13 g, 3.47 mmol, 1.7 eq.) were dissolved in distilled THF (7.5 mL) and heated at 60 °C for 10 min. A suspension of (carboxymethyl)(4-cyanophenyl)methylsulfanium trifluoromethanesulfonate **26** (1.24 g, 3.47 mmol, 1.7 eq.) in THF (9.6 mL) was slowly added to the reaction mixture and the reaction mixture was heated for 2 h. The solution was cooled to room temperature, filtered through celite, concentrated and dried under reduced pressure.

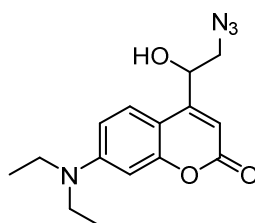
The crude was purified by column chromatography with 0 to 20% in vol. of EtOAc/heptane, to afford the title compound as a brownish solid (300 mg, 57%).

$R_f = 0.31$ (EtOAc/heptane 3:7 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.46 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 5.98 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 4.02 (ddd, $J = 4.2, 2.5, 0.9$ Hz, 1H), 3.38 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.19 (dd, $J = 6.0, 4.2$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz, 1H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.¹⁶³

4-(2-Azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one

(28)



The optimized protocol with two steps (without the purification of the intermediate **27**):

Under Ar, 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde **3** (100 mg, 0.408 mmol, 1 eq.) was dissolved in distilled dichloroethane (4 mL). This solution was heated at 60 °C.

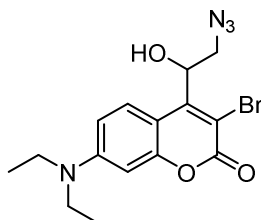
In another flask, the previously formed 2-(methyl(octyl)sulfonio)acetate **33** (180 mg, 0.82 mmol, 2 eq.) was dissolved in distilled dichloroethane (8 mL). This latter solution was added dropwise to the aldehyde **3** over 30 min at 60 °C. After the addition, the mixture was stirred at 60 °C during 2 h. The product was concentrated under vacuum and used as it is for next step.

To the mixture of so-obtained epoxyde **27** (105 mg, 0.41 mmol, 1 eq.) in EtOH (1.2 mL) was added NaN_3 (31.6 mg, 0.49 mmol, 1.2 eq.), NH_4Cl (22.3 mg, 0.42 mmol, 1 eq.) and then water (1.2 mL). The mixture was stirred at reflux for 18 h. EtOH was removed by rotary evaporation. H_2O was added and the solution was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 and concentrated by rotary evaporation. The resulting oil was then purified on preparative TLC with 1:1 EtOAc/heptane in vol. as eluent to yield the expected product as a yellow solid (70.4 mg, 58%).

$R_f = 0.51$ (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.27 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 6.50 (dd, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 5.15–5.08 (m, 1H), 3.49–3.38 (m, 3H), 3.32 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.¹⁶³

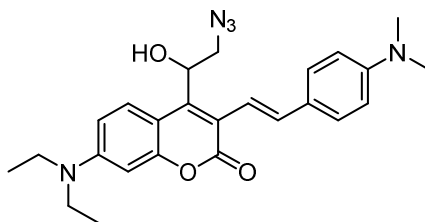
4-(2-Azido-1-hydroxyethyl)-3-bromo-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one
(29)



4-(2-Azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **28** (131 mg, 0.43 mmol, 1 eq.) was dissolved in distilled acetonitrile (2.2 mL). NBS (85.2 mg, 0.48 mmol, 1.1 eq.) and ammonium acetate (3.4 mg, 43.5 μmol , 0.1 eq.) were added under Ar. The reaction was monitored by TLC and stopped after 30 min. The mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The resulting oil was purified by column chromatography with 0 to 18% EtOAc/heptane in vol. as eluent to yield the expected product as a bright yellow solid (120 mg, 73%).

$R_f = 0.59$ (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.26 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 9.3, 2.7$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.60 (dt, $J = 9.1, 3.7$ Hz, 1H), 3.79 (dd, $J = 12.9, 9.1$ Hz, 1H), 3.47 (dd, $J = 12.9, 3.7$ Hz, 1H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.16 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 158.3, 155.3, 151.5, 150.7, 127.9, 109.1, 106.9, 104.1, 97.4, 75.4, 54.5, 44.9, 12.6; LR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{BrN}_4\text{O}_3$: 381.0557, found: 381.021.

(E)-4-(2-Azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one
(30)



Under Ar, a microwaved tube was filled with (*E*)-*N,N*-dimethyl-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline **9** (46 mg, 0.17 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (17.9 mg, 0.13 mmol, 1 eq.), and a solution of 4-(2-azido-1-hydroxyethyl)-3-bromo-7-(diethylamino)-2*H*-chromen-2-one **29** (150 mg, 0.13 mmol, 1 eq.) in DME (3 mL). To this was added distilled water (1 mL). The mixture was degassed by three “freeze-pump-thaw” cycles before adding Pd(PPh₃)₄ (3 mg, 2.6 μmol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition.

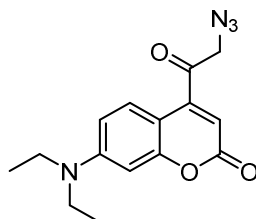
The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved with constant power at 5 W at 105 °C during 1 h 30.

The mixture was poured into NaHCO₃ and was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified on preparative TLC (EtOAc/heptane 4:6 in vol.) to afford the title product as a reddish solid (30.8 mg, 61%).

R_f = 0.66 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (dd, *J* = 9.3, 2.6 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.60 (dd, *J* = 9.0, 3.9 Hz, 1H), 3.94 (dd, *J* = 13.0, 9.0 Hz, 1H), 3.43 (dd, *J* = 13.0, 3.9 Hz, 1H), 3.37 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.01 (s, 6H), 1.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.6, 154.9, 149.9, 148.0, 146.8, 134.7, 130.1, 128.1, 127.7, 117.9, 116.6, 114.9, 109.0, 107.5, 97.6, 70.7, 55.5, 44.9, 42.2, 12.7; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₅H₃₀N₅O₃: 448.2343, found: 448.2361; *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₂₅H₂₉N₅O₃Na: 470.2163, found: 470.2168.

4-(2-Azidoacetyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one

(34)

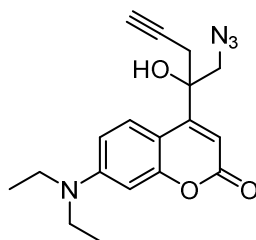


To a solution of 4-(2-azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **28** (59.5 mg, 0.2 mmol, 1 eq.) in distilled CH₂Cl₂, was added under Ar and at 0 °C, DMP (167 mg, 0.39 mmol, 2 eq.). After 10 minutes, the cold bath was removed. After 4 h, the volatiles were removed and the product was purified by preparative TLC with EtOAc/heptane 1:1 in vol. as eluent to afford the expected product, a reddish solid (33.3 mg, 56%).

R_f = 0.63 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.15 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 3.42 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 195.7, 161.2, 157.4, 151.4, 147.3, 127.3, 109.6, 108.5, 103.8, 98.0, 56.8, 45.0, 12.5; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₅H₁₇N₄O₃: 301.1295, found: 301.1309; *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₁₅H₁₆N₄O₃Na: 323.1115, found: 323.1120.

4-(1-Azido-2-hydroxyprop-4-yn-2-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one

(35)



Activation of Zn: dust Zn (2 g) was washed with diluted HCl (2M), H₂O (3x), EtOH (x2) and anhydrous diethylether (x2).

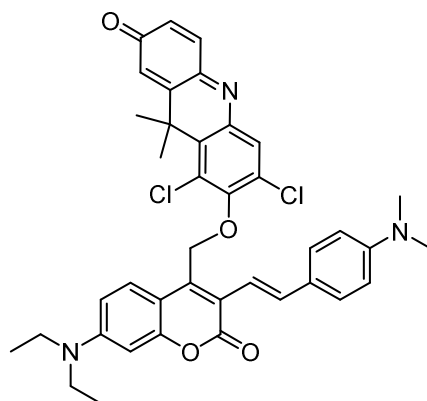
Under Ar, activated Zn (1.91 g, 29.21 mmol, 162.5 eq.) was suspended in dry THF (7 mL) and propargylbromide (1.36 mL, 12.23 mmol, 68 eq.) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C for 1 h 30 then a solution of 3-bromopropyne zinc in THF (0.31 mL,

2.5 eq.) was added on a solution of 4-(2-azidoacetyl)-7-(diethylamino)-2*H*-chromen-2-one **34** (54 mg, 0.18 mmol, 1 eq.) in THF (2 mL). After completion of the reaction (1 h 30), the mixture was stopped by adding an aqueous NH₄Cl saturated solution and extracted with dichloromethane (3x). The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The product was purified by preparative TLC with EtOAc/heptane 1:1 in vol. as eluent to afford a brownish oil (47.7 mg, 78%).

R_f = 0.53 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.97 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 9.3, 2.8 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 3.89 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.75 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.32 (s, 1H), 3.01 (dd, *J* = 17.1, 2.7 Hz, 1H), 2.95 (dd, *J* = 17.1, 2.7 Hz, 1H), 2.14 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 7H); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.9, 157.0, 154.3, 150.2, 127.8, 108.6, 108.5, 105.8, 98.4, 78.1, 77.4, 77.2, 76.9, 76.4, 73.8, 57.7, 44.7, 29.1, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₁₈H₂₀N₄O₃Na: 363.1428, found: 363.1427.

(*E*)-6,8-Dichloro-7-((7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)methoxy)-9,9-dimethylacridin-2(9*H*)-one

(39)



In the dark and under Ar, DDAO (24 mg, 0.076 mmol, 1.5 eq.) and (*E*)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(hydroxymethyl)-2*H*-chromen-2-one **6** (20 mg, 0.06 mmol, 1 eq.) were dissolved in distilled toluene (1.5 mL). In a second flask, PPh₃ (22 mg, 0.815 mmol, 1.6 eq.) was dissolved in distilled toluene (0.5 mL). DIAD (17 μL, 0.815 mmol, 1.6 eq.) was

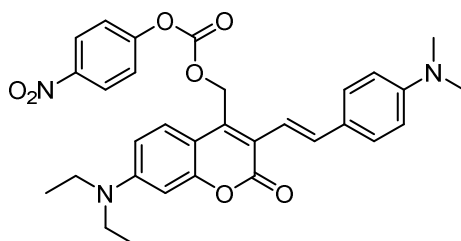
added and the mixture was stirred until the yellowish color disappeared. This latter solution was then added dropwise to the first one. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. Starting materials were still seen on TLC, hence PPh₃ (0.5 eq.) and DIAD (0.5 eq.) were added and the mixture was stirred for additional 24 h. Again PPh₃ (22 mg, 0.815 mmol, 1.6 eq.) was dissolved in distilled toluene (0.5 mL). DIAD (17 μL, 0.815 mmol, 1.6 eq.) was added and the mixture was stirred until the yellowish color disappeared. This latter solution was then added dropwise to the reaction media. The mixture was stirred overnight. The volatiles were then removed and the crude was purified by semi-preparative HPLC (RP-HPLC C18 using a mixture of solvent A: TFA (0.1%) in H₂O and solvent B: acetonitrile, 90-10%, FR: 4 mL/min⁻¹) to afford the title compound as a dark solid (8 mg, 15%).

R_f = 0.55 (EtOAc/heptane 75:25 in vol.); HR-MS (ESI, positive mode): m/z [M+2H]²⁺ calculated for C₃₉H₃₉Cl₂N₃O₄: 342.6227, found: 342.6229.

The compound was too instable for NMR analysis.

(E)-(7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate

(43)

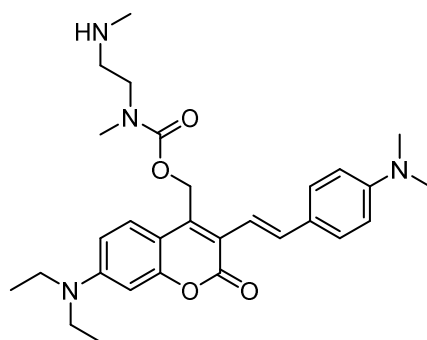


To a solution of *para*-nitrophenyl carbonate (294 mg, 1.1 eq.) dissolved in anhydrous DMF (10 mL) was added a solution of (E)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **6** (347 mg, 1 eq.) and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) (0.440 mL, 3 eq.) dissolved in anhydrous DMF (2 mL). This mixture was stirred at 20 °C for 16 h in the dark and evaporated to dryness. The residue was dissolved in EtOAc (100 mL) and washed with saturated NaHCO₃ solution (2 × 50 mL). The organic phase was collected, dried over Na₂SO₄, filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography with EtOAc/heptane 4:6 in vol. yielding the title compound as an orange oil (252 mg, 51%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 8.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 18.0 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.55 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 2H), 6.45 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 3.37 (q, J = 6.4 Hz, 4H), 2.96 (s, 6H), 1.18 (t, J = 6.4 Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 162.8, 161.8, 155.6, 155.2, 154.4, 150.5, 149.9, 145.2, 139.3, 136.1, 128.1, 126.1, 125.8, 119.9, 115.8, 115.8, 112.3, 109.4, 108.5, 97.4, 62.8, 44.7, 40.4, 12.4.

(E)-(7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl methyl(2-(methylamino)ethyl)carbamate

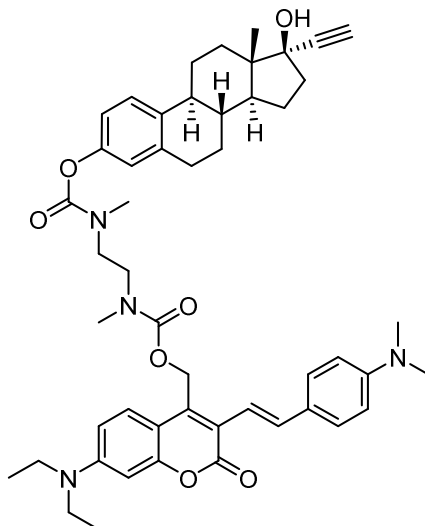
(44)



(E)-(7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl (4-nitrophenyl) carbonate **43** (140mg, 1 eq.) was dissolved in 10 mL of anhydrous THF. Then, *N,N'*-dimethylethylenediamine (40.5 μL , 1.5 eq.) and DIPEA (62 μL , 1.5 eq.) was added dropwise. Finally, DMAP (31 mg, 1 eq.) was added to the solution at 0 °C. After 4 h at 20 °C, the solution was dissolved in EtOAc and washed with saturated NaHCO_3 solution. The organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 in vol. yielding the title compound contaminated with 0.6 eq. of *para*-nitrophenol, however this compound was not purified further due to his instability (49 mg, 33% estimated).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.58–7.52 (m, 1H), 7.42 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.60 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz 2H), 6.49 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 5.43 (m, 2H), 3.41 (q, J = 6.4 Hz, 4H), 3.34 (br s, 3H), 2.98 (s, 6H), 2.89 (br s, 3H), 2.60 (s, 2H), 2.24 (s, 2H), 1.20 (t, J = 6.4 Hz, 6H).

**(7-(Diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl
((8R,9S,13S,14S,17R)-17-ethynyl-17-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-
decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl) ethane-1,2-diylbis(methylcarbamate)**
(45)



To a cold solution of (*E*)-(7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl methyl(2-(methylamino)ethyl)carbamate **44** (49 mg with 0.6 eq. of *p*-nitrophenol, 1 eq.) dissolved in anhydrous CH₂Cl₂ (3mL) in an ice-water bath was added DIPEA (41.2 μL, 3 eq.) and triphosgene (25 mg, 1 eq.). The mixture was stirred at 5 °C for 1 h, concentrated in vacuum. The residue was dissolved in anhydrous DMF (3mL) and DIPEA (41.2 μL, 3 eq.) and EE2 (37 mg, 1.5 eq.) was added dropwise. Then DMAP (5mg, 0.5 eq.) was added to the solution at 20 °C. This mixture was stirred at 20 °C for 30h in the dark and evaporated to dryness. The residue was purified by semi-preparative HPLC (RP-HPLC C18 using a mixture of solvent A: TFA (0.1%) in H₂O and solvent B: acetonitrile, 90-10%, FR: 4 mL/min⁻¹, t_R: 17min) to afford the title compound as an orange oil (45 mg, 61%).

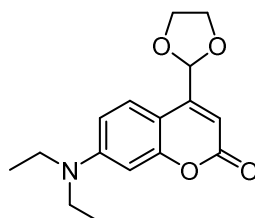
For the mixture of the two diastereoisomers (57:43 in ratio):

¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆): δ = 7.50 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.33 and 7.30 (2d, *J* = 8.0 Hz, 2H for the two diastereoisomers), 7.13–6.96 (m, 2H), 6.70–6.61 (m, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.60–6.51 (m, 1H), 6.57 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.37 and 6.33 (2d, *J* = 2.5 Hz, 1H for the two diastereoisomers), 5.39 (br s, OH), 5.34 and 3.32 (2s, 2H for the two diastereoisomers), 3.63–3.34 (m, 7H), 3.36 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 2.92 (br s, 2H), 2.86 (s, 6H), 2.85

(s, 2H), 2.83 (s, 2H), 2.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.71 (br s, 1H), 2.20–2.05 (m, 1H), 1.65–1.57 (m, 4H), 1.35–1.13 (m, 6H), 1.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 0.74 (s, 3H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 160.4, 154.7, 154.4, 154.3, 150.0, 149.9, 149.8, 141.7, 137.6, 136.8, 127.9, 126.5, 126.4, 125.9, 121.9, 119.0, 117.0, 113.0, 109.2, 108.6, 96.8, 88.4, 78.8, 73.6, 59.3, 49.4, 47.0, 46.3, 44.3, 43.9, 40.2, 39.3, 39.2, 30.1, 34.1, 32.8, 27.1, 26.2, 22.6, 12.4, 12.0; LR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{59}\text{H}_{61}\text{N}_4\text{O}_7$: 829.45, found: 829.40.

7-(Diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one

(46)

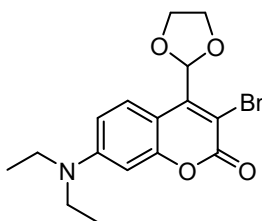


In a round bottom flash were added 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde **3** (1.58 g, 6.45 mmol, 1 eq.), toluene (30 mL), ethylene glycol (0.43 mL, 7.75 mmol, 1.2 eq.) and TsOH (111 mg, 0.65 mmol, 0.1 eq). The mixture was heated up overnight and the water was removed by a Dean Stark apparatus. After 16 h, the mixture was concentrated under vacuum to remove toluene and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 and poured into water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by column chromatography (8:2 to 9:1 CH_2Cl_2 /heptane in vol.) to afford the title compound **46** as an amorphous brownish solid (1.77 g, 95%).

$R_f = 0.58$ (5% EtOAc / CH_2Cl_2 in vol.); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.58 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.08 (s, 4H), 3.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 162.3, 156.8, 150.6, 150.5, 126.2, 108.6, 106.1, 105.7, 99.8, 97.7, 65.3, 44.7, 12.4; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_4$: 290.1387, found: 290.1391; m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Na}$: 312.1206, found: 312.1212.

3-Bromo-7-(diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one

(47)



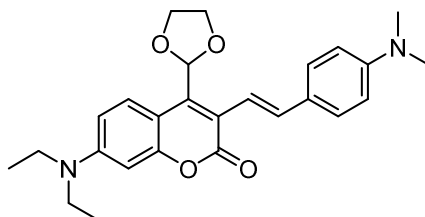
Acetonitrile was dried over molecular sieves overnight. 7-(Diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one **46** (1.65 g, 5.71 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (28 mL) under Ar. NBS (1.12 g, 6.28 mmol, 1.1 eq.) and ammonium acetate (44 mg, 0.57 mmol, 0.1 eq.) were added. The mixture was stirred at room temperature. After 45 min, the dark brownish mixture was poured into water and the aqueous phase was extracted 4 times with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, drier over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum.

The residue was purified by column chromatography (30 to 100% CH₂Cl₂/heptane in vol.) to afford the title compound **47** as an amorphous yellowish solid (1.702 g, 81%).

R_f = 0.58 (CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.57 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.38–4.28 (m, 2H), 4.19–4.10 (m, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 158.0, 155.3, 150.3, 145.9, 126.7, 109.0, 107.6, 106.2, 104.2, 97.4, 65.4, 44.8, 12.4; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₁₉NO₄: 368.0492, found: 368.0507.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one

(48)



To a dry microwave tube was added under Ar, 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one **47** (52.1 mg, 0.14 mmol, 1 eq.), K₂CO₃ (19.6 mg, 0.14 mmol, 1 eq.), and

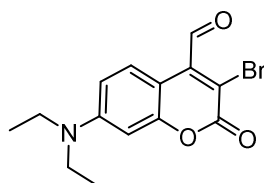
a solution of *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (58 mg, 0.21 mmol, 1.5 eq.) in 1.5 mL of DME. To this was added 0.5 mL of water. Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding Pd(PPh₃)₄ (3.3 mg, 0.003 mmol, 0.02 eq.), and one of these cycles was done again after the addition.

The flask was allowed to warm up to room temperature and then heated up to 105 °C and stirred during 45 min in the microwave. The solution was poured into water and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by column chromatography with EtOAc/Heptane 4:6 in vol.. The title compound was obtained as an orange solid (50.7 mg, 82%)

R_f = 0.27 (EtOAc/CH₂Cl₂ 0.2:10 in vol.), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.78 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.55 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.36–4.26 (m, 2H), 4.10–4.03 (m, 2H), 3.40 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 2.99 (s, 6H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 161.9, 155.0, 150.6, 149.6, 140.5, 136.7, 128.2, 127.3, 125.8, 122.0, 116.2, 112.4, 108.7, 107.1, 101.7, 97.6, 65.5, 65.3, 65.2, 44.8, 40.5, 12.7; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₆H₃₁N₂O₄: 435.2270, found: 435.2278.

3-Bromo-7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-4-carbaldehyde

(50)

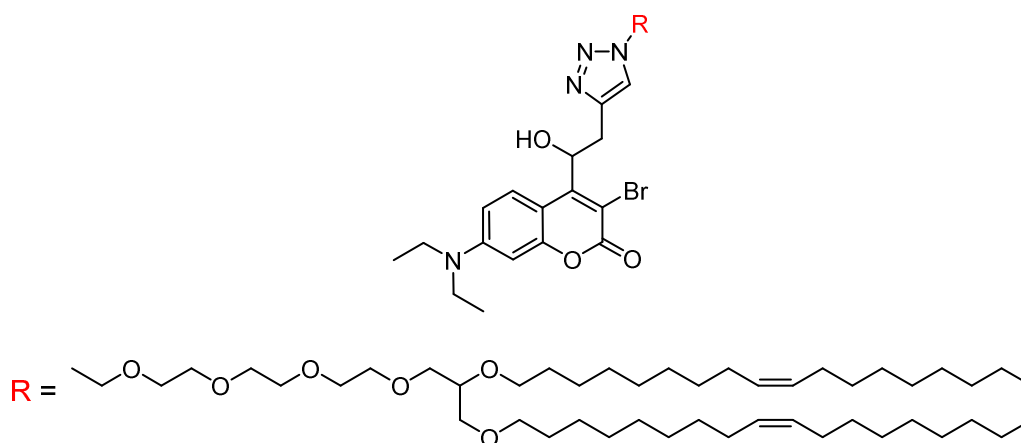


Under Ar, 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1,3-dioxolan-2-yl)-2H-chromen-2-one **47** (50 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) was dissolved in acetonitrile (3 mL) and water (1 mL). To this solution was added *para*-toluenesulfonic acid (46.8 mg, 0.27 mmol, 2 eq.) and the yellow mixture was stirred at 80 °C under Ar during 16 h 30. The TLC showed still some starting material and *para*-toluenesulfonic acid (46.8 mg, 0.27 mmol, 2 eq.) was added before heating again at 80 °C during 6 h. The solution was poured into water and extracted three times with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum.

The crude was purified on column chromatography with EtOAc/Heptane 1:9 in vol. to afford the title compound as a reddish solid (18.2 mg, 41%).

$R_f = 0.23$ (EtOAc/heptane 2:8 in vol.); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.38 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 6.62 (dd, $J = 9.3, 2.6$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 3.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 192.9, 158.3, 155.9, 151.2, 142.1, 126.7, 110.1, 109.8, 104.8, 97.6, 45.0, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrNO}_3$: 324.0230, found: 324.0231.

3-Bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxy-2-(1-((Z)-14-(((Z)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2H-chromen-2-one
(51)

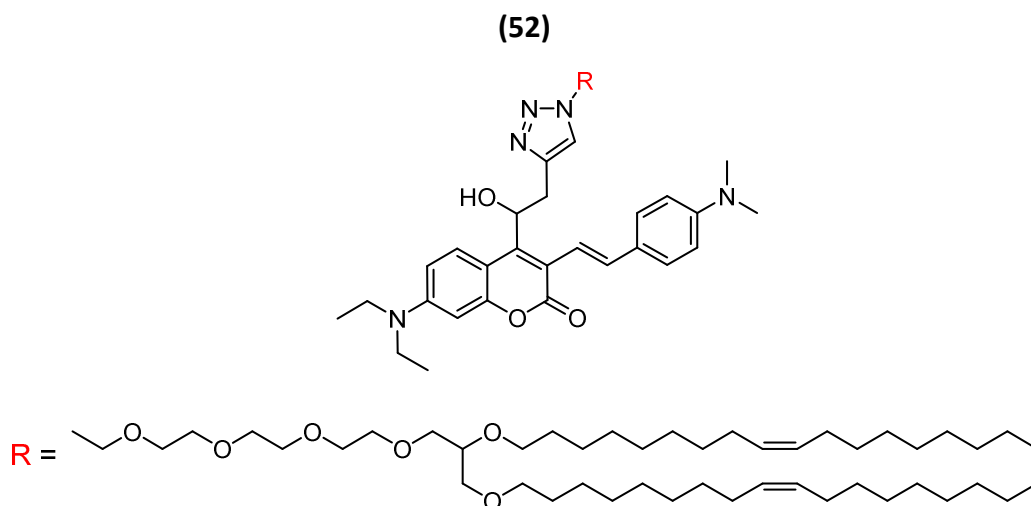


Under Ar, to (Z)-1-azido-14-(((Z)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-ene (114 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) was added distilled CH_2Cl_2 (1.7 mL), 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **12** (62.7 mg, 0.17 mmol, 1.2 eq.), ascorbic acid (75.8 mg, 0.43 mmol, 3 eq.) and tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (56.1 mg, 0.13 mmol, 0.9 eq.). Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_6$ (53.5 mg, 0.14 mmol, 1 eq.) and one of these cycles was done again. The mixture was stirred at room temperature during 19 h. Then the media was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum. The product was purified by

preparative TLC with 5% MeOH/CH₂Cl₂ in vol. as eluent to afford the title compound as a yellow solid (152.8 mg, 92%).

R_f = 0.36 (MeOH/CH₂Cl₂ 5:95 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 6.58 (dd, *J* = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.69 (dt, *J* = 10.2, 3.3 Hz, 1H), 5.47–5.25 (m, 4H), 4.55 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.46 (s, 1H), 3.87 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.66–3.56 (m, 12H), 3.53–3.35 (m, 14H), 3.14 (dd, *J* = 15.2, 3.3 Hz, 1H), 2.03–1.96 (m, 8H), 1.56–1.46 (m, 4H), 1.36–1.23 (m, 44H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 158.3, 155.5, 154.2, 150.5, 130.4, 130.1, 130.0, 128.5, 123.5, 108.8, 106.9, 103.8, 97.5, 78.0, 75.1, 71.8, 71.5, 71.0, 70.8 (3 signals), 70.7 (3 signals), 70.6, 69.6, 50.5, 44.9, 32.7, 32.0, 31.9, 30.2, 29.9 (2 signals), 29.8 (2 signals), 29.7 (3 signals), 29.6, 29.5 (2 signals), 29.3, 27.4, 26.3, 26.2, 22.8, 21.2, 14.3, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₆₄H₁₀₉BrN₄O₉Na: 1179.7270, found: 1179.7312.

7-(Diethylamino)-3-((*E*)-4-(dimethylamino)styryl)-4-(1-hydroxy-2-(1-((*Z*)-14-(((*Z*)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2H-chromen-2-one



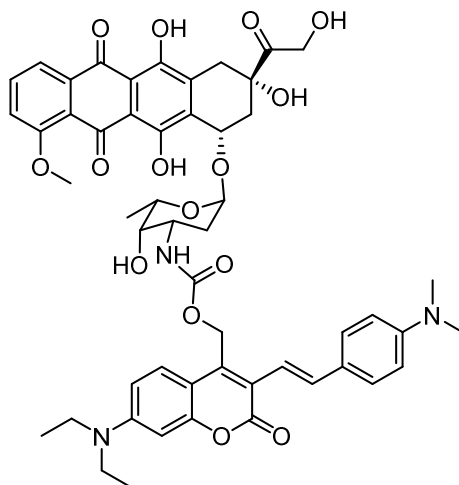
Under Ar, a microwaved tube was filled with *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (71.73 mg, 0.26 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (27.9 mg, 0.2 mmol, 1 eq.), and a solution of the substrate (234 mg, 0.2 mmol, 1 eq.) in DME (3 mL). To this was added distilled water (1 mL). Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding Pd(PPh₃)₄ (4.7 mg, 4 μmol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition.

The sealed tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 50 min. The solution turned orange. The TLC seemed to show remaining starting material. Hence the tube was frozen and Pd(PPh₃)₄ (4.7 mg, 4 μmol, 0.02 eq.) and *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (27.6 mg, 0.1 mmol, 0.5 eq.) were added under Ar. One “freeze-pump-thaw” cycle was done to remove oxygen and then the sealed tube was allowed to warm up to room temperature under Ar. The tube was microwaved at 105 °C during 30 min. The mixture was then poured into NaHCO₃ and was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified with preparative TLC with EtOAc/heptane 8:2 in vol. as eluent, to afford the title compound as a yellow solid (205 mg, 83%).

R_f = 0.79 (EtOAc/CH₂Cl₂ 2:8 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.40–7.31 (m, 3H), 6.99 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.57 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.75 (dd, *J* = 9.8, 3.7 Hz, 1H), 5.45–5.27 (m, 4H), 4.50 (dd, *J* = 5.7, 4.3 Hz, 2H), 3.99 (s, 1H), 3.84–3.79 (m, 2H), 3.61–3.53 (m, 13H), 3.52–3.35 (m, 13H), 3.19 (dd, *J* = 15.4, 3.7 Hz, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.03–1.90 (m, 8H), 1.56–1.46 (m, 4H), 1.35–1.23 (m, 44H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H), 0.87 (t, *J* = 6.8 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 161.7, 155.1, 150.4, 149.6, 148.6, 144.7, 135.3, 132.2, 130.5, 130.4, 130.1, 130.0, 128.3, 128.0, 126.4, 123.5, 116.7, 116.5, 112.5, 108.6, 107.6, 97.7, 78.0, 71.8, 71.5, 70.9, 70.8, 70.7 (2 signals), 70.6 (2 signals), 70.5, 69.7, 50.4, 44.8, 40.6, 32.9, 32.8, 32.0, 30.2, 29.9 (2 signals), 29.8 (2 signals), 29.7 (3 signals), 29.6, 29.5 (2 signals), 29.4, 29.3, 27.4, 26.3, 26.2, 22.8, 14.3, 12.7; HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₇₄H₁₂₁N₅O₉Na: 1246.9057, found: 1246.9105.

**(7-(Diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl
 ((2S,3S,4S,6R)-3-hydroxy-2-methyl-6-(((1S,3S)-3,5,12-trihydroxy-3-(2-hydroxyacetyl)-10-
 methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-1-yl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-4-
 yl)carbamate**

(54)



To (*E*)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(hydroxymethyl)-2H-chromen-2-one **6** (90 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) under Ar and in the dark, 2.5 mL of anhydrous DMF, DIPEA (76 μ L, 0.46 mmol, 2 eq.) and *para*-nitrophenyl carbonate (105 mg, 0.34 mmol, 1.5 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature. After 18 h, the volatiles were removed under vacuum.

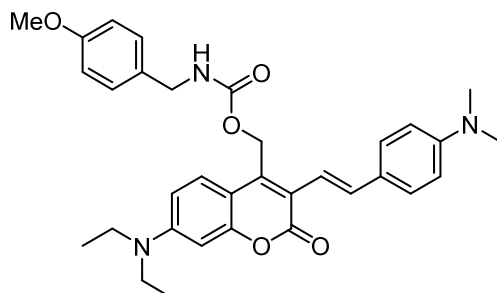
R_f = 0.58 (EtOAc/Heptane 1:1 in vol.).

In the dark and under Ar, to the solution of the DEACAS-*para*-nitrophenyl carbonate intermediate (40 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (1 mL) was added doxorubicin hydrochloride (54 mg, 0.09 mmol, 1.3 eq.), DIPEA (31 μ L, 0.19 mmol, 2.6 eq.) and DMAP (9 mg, 0.07 mmol, 1 eq.). After 4 h, the resulting mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative TLC with 100% EtOAc as eluent to afford the title compound as a reddish solid (10.2 mg, 15% over two steps).

HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[M+H]^+$ calculated for $C_{52}H_{56}N_3O_{15}$: 962.3706, found: 962.3735; m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{52}H_{55}N_3O_{15}Na$: 984.3525, found: 984.3546.

(E)-7-(Diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methyl (4-methoxyphenyl)carbamate

(55)



To (*E*)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-4-(hydroxymethyl)-2*H*-chromen-2-one **6** (90 mg, 0.23 mmol, 1 eq.) under Ar and in the dark, 2.5 mL of anhydrous DMF, DIPEA (76 μ L, 0.46 mmol, 2 eq.) and *para*-nitrophenyl carbonate (105 mg, 0.34 mmol, 1.5 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature. After 18 h, the volatiles were removed under vacuum.

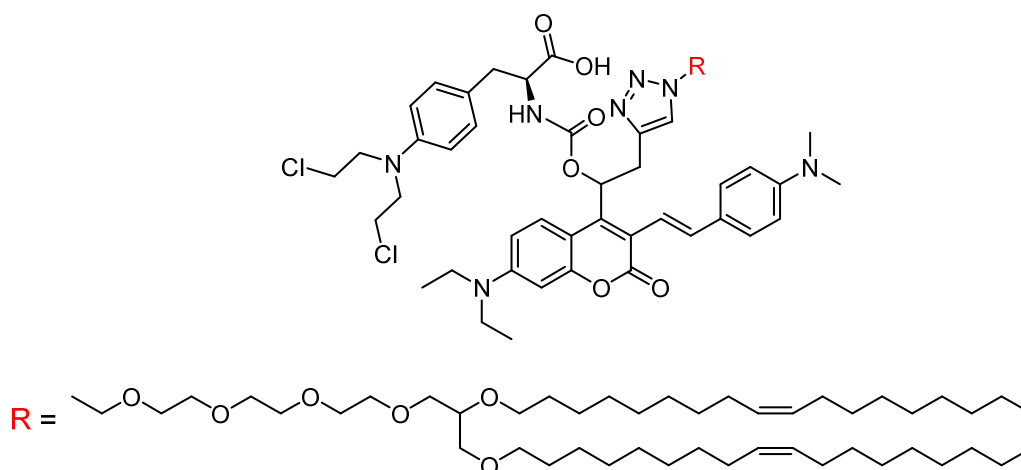
R_f = 0.58 (EtOAc/Heptane 1:1 in vol.).

In the dark and under Ar, to a solution of the DEACAS-*para*-nitrophenyl carbonate intermediate (40 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) in anhydrous DMF (1 mL) was added 4-methoxybenzylamine (12 μ L, 0.09 mmol, 1.3 eq.), DIPEA (15 μ L, 0.09 mmol, 1.3 eq.) and DMAP (9 mg, 0.07 mmol, 1 eq.). After 4 h, some starting materials were still seen on TLC. Hence 4-methoxybenzylamine (5 μ L, 0.04 mmol, 0.5 eq.), DIPEA (6 μ L, 0.04 mmol, 0.5 eq.) and DMAP (4 mg, 0.04 mmol, 0.5 eq.) were added. After 1 h the reaction was complete. The volatiles were removed under reduced pressure and the residue was purified on preparative TLC with MeOH/CH₂Cl₂ 2:98 in vol. as eluent. The product was purified again by preparative HPLC to afford the title compound as an amorphous reddish solid (18.1 mg, 45% over two steps).

R_f = 0.42 (EtOAc/Heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.55 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.63 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.6

Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.30 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.42 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 3.00 (s, 6H), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ 161.5, 159.6, 156.4, 155.2, 150.5, 150.2, 141.8, 135.2, 131.2, 129.3, 128.4, 126.6, 125.0, 119.5, 117.5, 114.4, 113.7, 109.6, 109.2, 97.7, 59.5, 55.7, 45.3, 45.1, 41.3, 12.9; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_5$: 556.2806, found: 556.2793; m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5\text{Na}$: 578.2625, found: 578.2600.

(2S)-3-(4-(Bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)-2-(((1-(7-(diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)-2-(1-((Z)-14-(((Z)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethoxy)carbonyl)amino)propanoic acid
(57)



To 7-(diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-4-(1-hydroxy-2-(1-((Z)-14-(((Z)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2H-chromen-2-one **52** (33 mg, 0.027 mmol, 1 eq.), under Ar and in the dark, 1 mL of anhydrous DMF, DIPEA (9 μL , 0.05 mmol, 2 eq.) and *para*-nitrophenyl carbonate (12.3 mg, 0.04 mmol, 1.5 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature during 8 h. The volatiles were removed by rotary evaporation. The product was kept at -20 °C before launching the next step. The next reaction was then launched without purification.

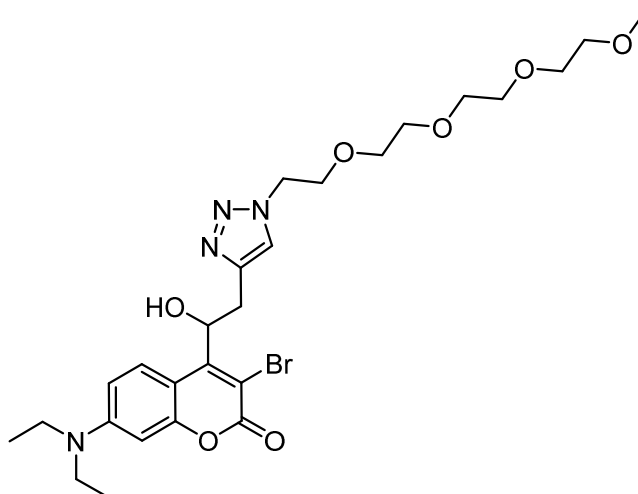
R_f = 0.75 (EtOAc/CH₂Cl₂ 2:8 in vol.).

Under Ar and in the dark, to the 7-(diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-4-(1-hydroxy-2-(1-((Z)-14-(((Z)-octadec-9-en-1-yl)oxy)-3,6,9,12,16-pentaoxatetracont-25-en-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)ethyl)-2H-chromen-2-one-*para*-nitrophenyl carbonate intermediate were added melphalan (10.6 mg, 0.035 mmol, 1.3 eq.), 1 mL of anhydrous DMF, DIPEA (12 μ L, 0.07 mmol, 2.6 eq.) and DMAP (3.3 mg, 0.027 mmol, 1 eq.). After 4 h 30, the media was concentrated under reduced pressure and the product was purified by preparative TLC with 5% in vol. of MeOH/CH₂Cl₂. The title product was obtained as a reddish solid (34 mg, 82% over two steps).

R_f = 0.38 (0.5% MeOH/CH₂Cl₂ in vol.); ¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.72–7.42 (m, 2H, CH_{triazol} + CH_{5coumarin}), 7.42–7.29 (m, 2H, CH_{aniline part}), 7.40–7.20 (m, 1H, CH_{alkene}), 7.08–7.00 (m, 1H, CH_{aromatic melphalan}), 7.00–6.80 (m, 1H, CH_{alkene}), 6.92–6.83 (m, 1H, CH_{aromatic melphalan}), 6.75–6.65 (m, 2H, CH_{aniline part}), 6.64–6.56 (m, 1H, CH_{aromatic melphalan}), 6.64–6.41 (m, 1H, CH_{6coumarin}, 2 conformers), 6.56–6.32 (m, 1H, CH_{8coumarin}, 2 conformers), 6.50–6.45 (m, 1H, CH_{benzylic coumarin}), 6.49–6.31 (m, 1H, CH_{aromatic melphalan}), 5.40–5.33 (m, 4H, CH_{alkene fatty chain}), 4.53–4.44 (m, 1H, CH_{melphalan}), 4.43–4.29 (m, 2H, CH_{2melphalan}), 3.69–3.56 and 3.38–3.21 (m, 2H, CH_{2coumarin}), 3.56–3.46 (m, 1H, CH_{glycol}), 3.73–3.38 (m, 32H, CH_{2O}, CH_{2Nmelphalan}, CH_{2melphalan} and CH_{2Clmelphalan}), 3.46–3.39 (m, 4H, CH_{2Ncoumarin}), 2.97 and 2.96 (2s, 6H, CH_{3Ncoumarin}, 2 conformers), 2.07–1.93 (m, 8H, CH_{2CHalkene fatty chain}), 1.55–1.48 (m, 4H, CH_{2fatty chain}), 1.35–1.25 (m, 44H, CH_{2fatty chain}), 1.22 and 1.14 (2t, 6H, *J* = 7.1 Hz, CH_{2CH₃coumarin}, 2 conformers), 0.88 (t, 6H, *J* = 6.90 Hz, CH_{3fatty chain}); ¹³C{¹H} NMR (126 MHz, CD₂Cl₂): δ 174.6, 163.1, 161.4, 158.7 and 158.5 (for 2 conformers), 155.3, 155.2, 151.0, 150.2 and 150.1 (for 2 conformers), 145.6 and 145.5 (for 2 conformers), 143.3 and 143.1 (for 2 conformers), 135.6, 135.2, 132.6 and 132.5 (for 2 conformers), 131.3, 131.1 and 130.9 (for 2 conformers), 130.9 (2 signals for 2 conformers), 130.4 (2 signals), 129.2 and 129.1 (for 2 conformers), 128.4 and 128.3 (for 2 conformers), 124.0, 112.9, 112.4 (2 signals), 109.3, 97.9 and 97.8 (for 2 conformers), 78.5 and 78.3 (for 2 conformers), 73.1 and 72.3 (for 2 conformers), 72.1 (2 signals), 71.8, 71.7, 71.3, 71.2, 71.0 (2 signals), 70.9 (2 signals), 70.0 and 69.9 (for 2 conformers), 56.5, 53.8 (under the signal of CD₂Cl₂), 51.0, 50.8, 45.2, 41.3, 41.2 and 41.1 (for 2 conformers), 40.76, 33.2, 32.5 (2 signals), 30.7, massif with [30.4 (2 signals), 30.3 (2 signals), 30.1 (2 signals), 29.9 (2 signals) 29.8, 29.7],

27.7, massif with [26.7 (3 signals)], 23.3, 14.5, 13.0; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[M+Na]^+$ calculated for $C_{88}H_{137}Cl_2N_7O_{12}Na$: 1576.9594, found: 1576.9605.

4-(2-(1-(2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-hydroxyethyl)-3-bromo-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one
(58)



Under Ar, distilled CH_2Cl_2 (2.5 mL), 3-bromo-7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **12** (91 mg, 0.25 mmol, 1 eq.), ascorbic acid (132 mg, 0.75 mmol, 3 eq.) and tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amine (97.8 mg, 0.23 mmol, 0.9 eq.) were added. Three “freeze-pump-thaw” cycles were performed before adding $Cu(CH_3CN)_4PF_6$ (93.2 mg, 0.25 mmol, 1 eq.) and one of these cycles was done again.

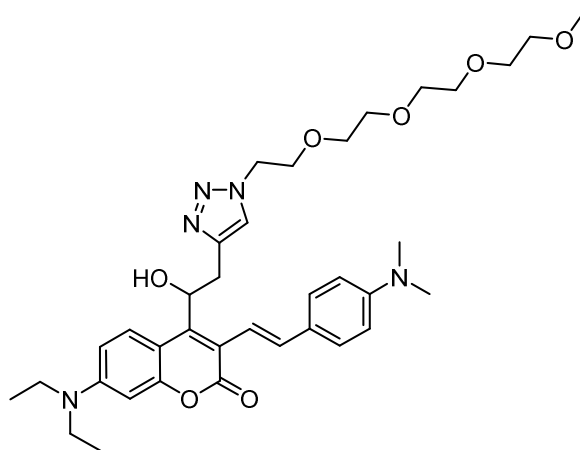
After 22 h, the media was poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified by preparative TLC using 5% MeOH/ CH_2Cl_2 in vol. as eluent to afford the title compound as a yellow oil (56.9 mg, 38%).

R_f = 0.35 (5% MeOH/ CH_2Cl_2 in vol.); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.41 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 6.56 (dd, J = 9.4, 2.6 Hz, 1H), 6.44 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 5.66 (dd, J = 10.1, 3.7 Hz, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.53–4.48 (m, 2H), 3.86–3.80 (m, 2H), 3.59–3.54 (m, 10H), 3.46–3.43 (m, 2H), 3.38 (m, 5H), 3.26 (s, 3H), 3.12 (dd, J = 15.1, 3.7 Hz, 1H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 6H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 158.3, 155.4, 154.4, 150.4, 144.1, 128.4, 123.6, 108.8, 106.8, 103.6, 97.3, 74.9, 71.9, 70.7, 70.6, 70.5, 70.5, 69.5, 59.0, 50.4, 44.8, 32.0, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): m/z

[M+H]⁺ calculated for C₂₆H₃₈BrN₄O₇: 597.1918, found: 597.1933; m/z [M+Na]⁺ calculated for C₂₆H₃₇N₄O₇Na: 619.1738, found: 619.1733.

(E)-4-(2-(1-(2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one

(59)



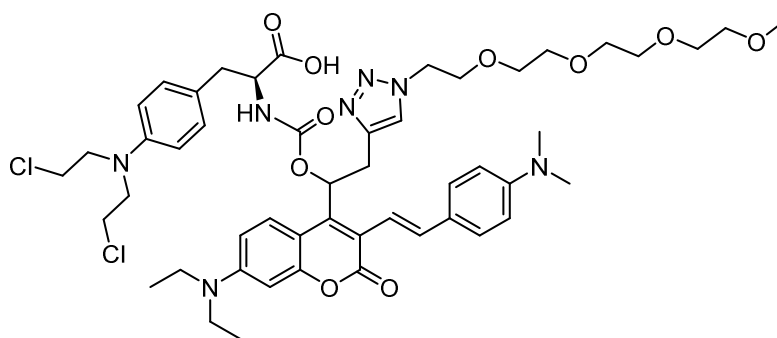
Under Ar, a microwaved tube was filled with *N,N*-dimethyl-4-[(*E*)-2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)ethenyl]aniline **9** (33.9 mg, 0.12 mmol, 1.3 eq.), K₂CO₃ (13.2 mg, 0.095 mmol, 1 eq.), and a solution of 4-(2-(1-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-hydroxyethyl)-3-bromo-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one **58** (57 mg, 0.095 mmol, 1 eq.) in DME(3 mL). To this was added distilled water (1 mL). The tube was degased by three "freeze-pump-thaw" cycles before adding Pd(PPh₃)₄ (2.2 mg, 1.9 μmol, 0.02 eq.) and one of these cycles was done again after the addition. The tube was allowed to warm up to room temperature and was microwaved at 105 °C during 50 min. The mixture was poured into NaHCO₃ and was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified with preparative TLC with 5% MeOH/CH₂Cl₂ in vol. to afford the title compound as an orange oil (29 mg, 46%).

R_f = 0.38 (5% MeOH/ CH₂Cl₂ in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.37–7.29 (m, 3H), 6.96 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.56 (dd, *J* = 9.3, 2.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 9.7, 3.9 Hz, 1H), 4.49–4.45 (m, 2H), 4.21 (s, 1H), 3.80–3.76 (m, 2H), 3.57–3.50 (m, 11H), 3.45–3.42 (m, 2H), 3.39 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.26 (s, 3H), 3.19 (dd, *J* = 15.3, 3.9 Hz, 1H), 2.94 (s, 6H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H); ¹³C{¹H} NMR (101 MHz,

CDCl₃): δ 161.7, 155.0, 150.3, 149.5, 148.8, 144.6, 135.1, 128.3, 128.0, 126.4, 123.5, 116.5, 112.4, 108.6, 107.6, 97.5, 71.9, 70.7, 70.6 (2 signals), 70.5, 70.4, 69.6, 59.0, 50.4, 44.7, 40.5, 32.9, 12.7, 12.6; HR-MS (ESI, positive mode): m/z [M+H]⁺ calculated for C₃₆H₅₀N₅O₇: 664.3705, found: 664.3724; m/z [M+Na]⁺ calculated for C₃₆H₄₉N₅O₇Na: 686.3524, found: 686.3544.

(2S)-2-(((2-(1-(2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-(7-(diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)ethoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)propanoic acid

(61)



To *(E)*-4-(2-(1-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one **59** (29 mg, 0.044 mmol, 1 eq.), under Ar and in the dark, 1.5 mL of anhydrous DMF, DIPEA (14.4 μ L, 0.087 mmol, 2 eq.) and *para*-nitrophenyl carbonate (19.9 mg, 0.066 mmol, 1.5 eq.) were added and the mixture was stirred at room temperature during 6 h. DIPEA (7.2 μ L, 0.044 mmol, 1 eq.) and *para*-nitrophenyl carbonate (6.7 mg, 0.022 mmol, 0.5 eq.) were added and the mixture was stirred during 16 additional hours. The reaction was then stopped and the volatiles were removed by rotary evaporation. The next reaction was then launched without purification.

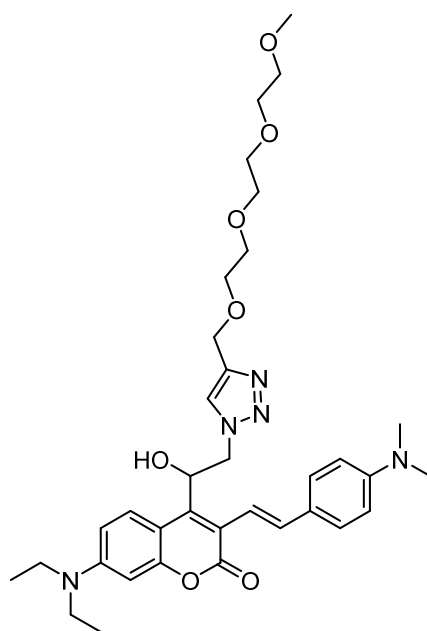
R_f = 0.71 (5% MeOH/CH₂Cl₂ in vol.).

Under Ar and in the dark, to this intermediate were added melphalan (21 mg, 0.069 mmol, 1.3 eq.), 1 mL of anhydrous DMF, DIPEA (22.8 μ L, 0.14 mmol, 2.6 eq.) and DMAP (6.5 mg, 0.053 mmol, 1 eq.). After 4 h, the resulting mixture was concentrated under reduced pressure and the product was purified on preparative HPLC to yield the title product as a reddish oil (20.4 mg, 47% over two steps).

R_f = 0.30 et 0.43 for the 2 diastereoisomers (10% MeOH/CH₂Cl₂ in vol.); HR-MS (ESI, positive mode): m/z [M+Na]⁺ calculated for C₅₀H₆₅Cl₂N₇O₁₀Na: 1016.4062, found: 1016.4062.

(E)-4-(2-(4-(2,5,8,11-Tetraoxadodecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one

(62)



In a dry flask (*E*)-4-(2-azido-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one **30** (81 mg, 0.18 mmol, 1 eq.), 2,5,8,11-tetraoxatetradec-13-yne (44 mg, 0.22 mmol, 1.2 eq.), ascorbic acid (16 mg, 0.09 mmol, 0.5 eq.) and proline (4.2 mg, 0.04 mmol, 0.2 eq.) were dissolved in a mixture of t-butanol (3.2 mL), DMF (0.22 mL) and water (0.22 mL). The flask was degassed by three "freez-pump-thaw" cycles before adding CuSO₄·5H₂O (9 mg, 0.04 mmol, 0.2 eq.), and one of these cycles was done again. The reaction was then stirred at 60 °C during 3 days. The media was diluted with water and extracted with CH₂Cl₂. Brine was used to break the emulsion. The product was purified by preparative TLC (5% MeOH/CH₂Cl₂ in vol. as eluent).

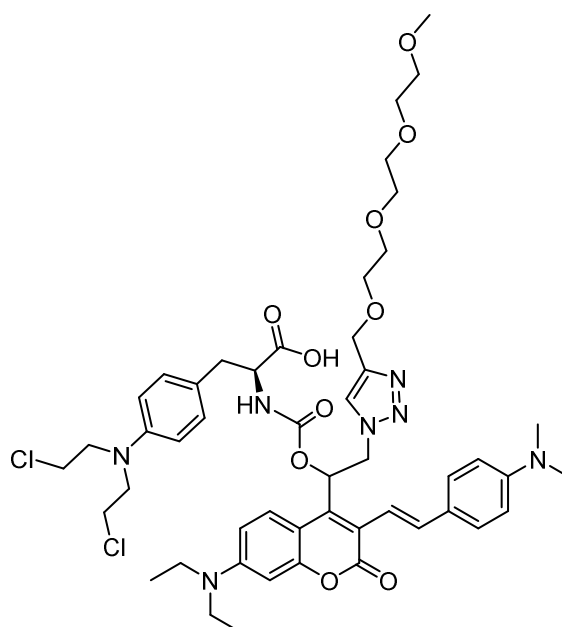
R_f = 0.35 (MeOH/CH₂Cl₂ 5:95 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.43–7.34 (m, 3H), 7.05 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.60 (dd, *J* = 9.2, 2.7 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 5.85–5.79 (m, 1H), 4.89 (dd, *J* = 14.2, 9.5 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 14.2, 3.2 Hz, 1H), 4.70 (s, 2H), 3.89 (s, 1H), 3.68–3.46 (m, 12H), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.27

(s, 3H), 2.97 (s, 6H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 161.5, 154.7, 150.3, 149.6, 145.4, 144.9, 135.7, 128.0, 127.5, 126.0, 124.3, 117.1, 115.4, 112.3, 108.9, 107.4, 97.5, 71.9, 70.5 (3 signals), 70.4, 70.2, 69.5, 64.5, 59.0, 54.7, 44.7, 40.4, 12.6;

HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_5\text{O}_7$: 650.3548, found: 650.3556; m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_7\text{Na}$: 672.3368, found: 672.3373.

(2S)-2-(((2-(4-(2,5,8,11-Tetraoxadodecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1-(7-(diethylamino)-3-((E)-4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2H-chromen-4-yl)ethoxy)carbonyl)amino)-3-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)propanoic acid

(64)



(E)-4-(2-(4-(2,5,8,11-Tetraoxadodecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one **62** (99 mg, 0.15 mmol, 1 eq.), bis-(4-nitrophenyl) carbonate (70 mg, 0.23 mmol, 1.5 eq.), dry DIPEA (51 μL , 0.30 mmol, 2 eq.) and dry DMF (3.5 mL) were added in a flask under Ar and in a dark room. The reaction was stirred 18 h and the volatiles were removed under reduced pressure. The next step was launched without purification.

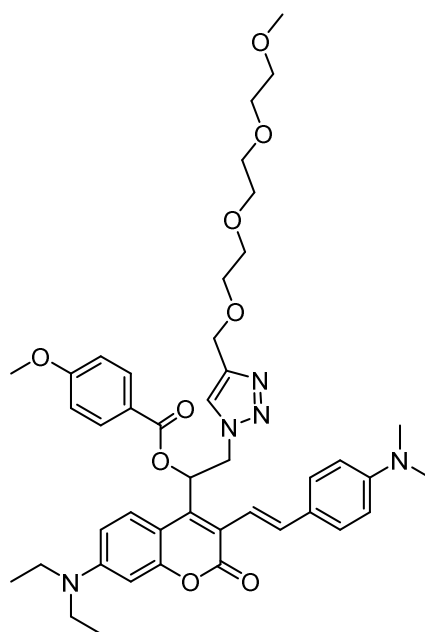
To the (E)-4-(2-(4-(2,5,8,11-tetraoxadodecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2H-chromen-2-one-*para*-nitrophenyl carbonate

intermediate (120 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) were added under Ar: melphalan (60 mg, 0.19 mmol, 1.3 eq.), dry DIPEA (64 μ L, 0.39 mmol, 2.6 eq.), 3 mL of dry DMF and DMAP (18 mg, 0.15 mmol, 1 eq.). The reaction was stirred at room temperature for 4 h and the volatiles were removed under reduced pressure. The resulting oil was then purified on preparative TLC (MeOH/CH₂Cl₂ 10:90 in vol.) to afford the expected product as a reddish solid (13.8 mg, 47%).

¹H NMR (500 MHz, acetonitrile-*d*₃): δ 7.86–7.80 (2s, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.00–6.94 (m, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.80–6.74 (m, 2H), 6.74–6.60 (m, 2H), 6.57–6.51 (m, 2H), 6.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.14 (dd, *J* = 17.7, 8.4 Hz, 1H), 5.03 (dd, *J* = 14.8, 8.9 Hz, 1H), 4.84 (dd, *J* = 14.6, 4.5 Hz, 1H), 4.53 (2s, 2H), 4.20 (m, 1H), 3.67 (q, *J* = 6.2 Hz, 4H), 3.63–3.42 (m, 24H), 3.28 (d, *J* = 5.7 Hz, 3H), 2.98 (s, 6H), 2.93 (dd, *J* = 13.9, 4.6 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 14.1, 8.8 Hz, 1H), 1.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H); HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₅₀H₆₅Cl₂N₆O₁₀: 979.4134, found: 979.40; *m/z* [M+D]⁺ calculated for C₅₀H₆₄DCl₂N₆O₁₀: 980.4197, found: 980.4084.

(*E*)-2-(4-(2,5,8,11-Tetraoxadodecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-(7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl)ethyl 4-methoxybenzoate

(65)



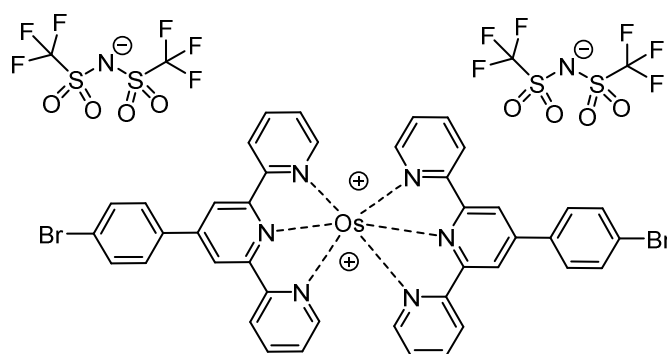
In the dark and under Ar, to (*E*)-4-(2-(4-(2,5,8,11-tetraoxadodecyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-hydroxyethyl)-7-(diethylamino)-3-(4-(dimethylamino)styryl)-2*H*-chromen-2-one **62** (44.8 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) was added 4-methoxybenzoic acid (12.6 mg, 0.083 mmol, 1.2 eq.), DMAP (0.84 mg, 7 μ mol, 0.1 eq.) and distilled CH₂Cl₂ (2 mL). The mixture was cooled down to 0 °C

and DIC (21.5 μL , 0.14 mmol, 2 eq.) was added. The mixture was stirred during 30 min at 0 $^{\circ}\text{C}$, then the cold bath was removed. After 22 h, some starting materials were still seen on TLC hence 4-methoxybenzoic acid (5.2 mg, 0.034 mmol, 0.5 eq.) was added and the mixture was cooled to 0 $^{\circ}\text{C}$. Then DIC (5.4 μL , 0.034 mmol, 2 eq.) was added and after 30 min at 0 $^{\circ}\text{C}$ the mixture was allowed to warm up to room temperature. The mixture was stirred for 3 days. The volatiles were removed by rotary evaporation. The product was then purified by preparative HPLC with a gradient over 30 min (acetonitrile/ H_2O with 0.01%TFA, from 20/80 to 80/20 in vol.).

$R_f = 0.5$ (MeOH/ CH_2Cl_2 7:93 in vol.); ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.98–7.84 (m, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.54–7.42 (m, 3H), 7.12 (br s, 1H), 6.92–6.83 (m, 5H), 6.67 (dd, $J = 9.3, 2.7$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 5.23 (dd, $J = 14.6, 8.7$ Hz, 1H), 4.97 (dd, $J = 14.6, 4.7$ Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.58–3.47 (m, 12H), 3.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.31 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (126 MHz, CD_2Cl_2): δ 165.1, 164.6, 161.0, 155.4, 150.6, 146.1, 132.4, 128.6, 124.1, 121.6, 114.5, 114.2, 109.8, 98.2, 72.5, 71.0 (2 signals), 70.9, 70.0, 64.8, 59.2, 56.1, 52.7, 45.3, 41.7, 12.9; HR-MS (ESI, positive mode): m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{43}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_9\text{Na}$: 806.3735, found: 806.3746.

$\text{Os}(\text{bptpy})_2(\text{TFSI})_2$

(70)



In a microwave glass vial, was added under Ar 4-(4-bromophenyl)-6-(pyridin-2-yl)-2,2'-bipyridine (100 mg, 0.26 mmol, 1 eq.) and ethylene glycol (2.5 mL). The solution was degassed with "freeze-pump-thaw" cycles, before adding $\text{OsCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (40.5 mg, 0.13 mmol, 0.5 eq.). One of these cycles was done again after the addition. The mixture was heated 1 h at 200 $^{\circ}\text{C}$. A

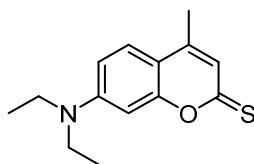
dark reddish/brownish solution was obtained. This solution was transferred with ethylene glycol (7.5 mL) in a round bottom flask to perform targeted anion metathesis.

LiTFSI (740 g, 2.58 mmol, 20 eq.) was dissolved in 5 mL of water. The aqueous solution was added dropwise to the osmium complex. Then the mixture was heated up to 60 °C overnight. After 20 h the mixture was extracted with dichloroethane and the combined organic phase was washed one time with water. The volatiles were then removed by rotary evaporation and the crude was triturated with toluene to afford a dark purple solid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.53 (s, 4H), 9.10 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 8.39 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 8.00 (d, J = 8.7 Hz, 4H), 7.94 (t, J = 8.0 Hz, 4H), 7.44 (d, J = 5.9 Hz, 4H), 7.21 (t, J = 5.9, 4H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ 159.6, 154.7, 152.3, 144.7, 137.8, 134.6, 132.1, 129.9, 128.0, 125.0, 124.1, 119.6, 119.5 (q, J = 322.2 Hz); HR-MS (ESI, positive mode): m/z [M] $^{2+}$ calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{N}_6\text{Os}$: 483.0173, found: 483.0161.

7-(Diethylamino)-4-methyl-2H-chromene-2-thione

(71)

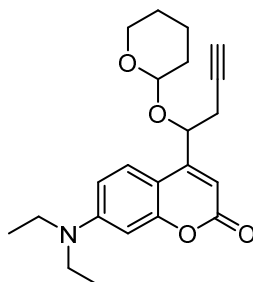


Toluene was distilled before use. 7-(Diethylamino)-4-methyl-2H-chromen-2-one **1** (500 mg, 2.16 mmol, 1eq.) and Lawesson's reagent (524.6 mg, 1.13 mmol, 0.6 eq.) were dissolved in freshly distilled toluene (13.5 mL). The mixture was heated at 100 °C during 18 h. The volatiles were then removed by rotary evaporation. The product was purified by column chromatography (0 to 100% CH_2Cl_2 /heptane in vol.) to afford the title compound **71** as an amorphous orange solid (443 mg, 83%).

R_f = 0.5 (CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.37 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 6.61 (dd, J = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 3.36 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 2.22 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 1.15 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

The analyses were consistent with the ones described in literature.¹⁶⁴

7-(Diethylamino)-4-(1-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)but-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one
(73)



In the dark and under Ar, 7-(diethylamino)-4-(1-hydroxybut-3-yn-1-yl)-2H-chromen-2-one **11** (100 mg, 0.35 mol, 1 eq.) and TsOH (3 mg, 0.018 mmol, 0.05 eq.) were dissolved in freshly distilled CH₂Cl₂ (3.5 mL). The mixture was cooled down to 0 °C before adding DHP (40 μL, 0.44 mmol, 1.25 eq.). The mixture was stirred 10 min at 0 °C and then warmed up to room temperature. After 19h, a slight trace of starting material was seen. DHP (8 μL, 0.087 mol, 0.25 eq.) was added. After 5h, NaHCO₃ was added to the media and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum. The product was purified by preparative TLC (EtOAc/heptane 1:1 in vol.) to afford the title compound **73** as an amorphous yellowish solid (120 mg, 93% estimated).

R_f = 0.58 (EtOAc/heptane 1:1 in vol.); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.49 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.57–6.50 (m, 2H), 6.49–6.45 (m, 2H), 6.27 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.05 (t, *J* = 3.1 Hz, 1H), 5.01 (dd, *J* = 7.2, 4.8 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.11–4.02 (m, 1H), 3.63–3.55 (m, 1H), 3.53–3.46 (m, 1H), 3.37 (m, 9H), 2.74–2.69 (m, 2H), 2.03–1.99 (m, 2H), 2.00 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H), 1.91–1.40 (m, 12H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 12H); HR-MS (ESI, positive mode): *m/z* [M+H]⁺ calculated for C₂₂H₂₈NO₄: 370.2013, found: 370.2012; *m/z* [M+Na]⁺ calculated for C₂₂H₂₇NO₄Na: 392.1832, found: 392.1824.

VII-3) Photochemical and photophysical studies

VII-3-a) Absorption measurements and fluorescence quantum yields determination

UV-visible absorption spectra were recorded on a Cary 400 spectrophotometer in a dual beam mode using a matched pair of 1x0.5 cm quartz cells. Pure solvent was used as reference. Fluorescence emission spectra were performed on a Fluorolog (Jobin-Yvon) spectrofluorimeter with optically dilute solutions (Abs. < 0.15) in 1x0.5 cm cells. Fluorescence quantum yields were measured by the relative method, using a water solution of fluorescein in 0.1 M aqueous NaOH as reference.¹⁶⁵ For these measurements, the slit widths were adjusted so that the spectral bandwidth of the absorption and emission were identical at 3.0 nm, and the absorbance of the samples and the reference were chosen so that they were in the 0.05–0.15 at the same excitation wavelength. Emission quantum yields were then calculated according to the method described by Crosby and Demas, considering the differences between the refractive indices of the sample and reference solutions.¹⁶⁶

VII-3-b) One-photon photolysis

A solution of compounds **16a-c** (at 20 μ M) in MeOH/H₂O 9:1 in vol. at 25 °C was exposed to a LUMOS 43 LED source (Atlas Photonics Inc.) at 430 nm (typical optical output: 200 mW/cm²). The reaction was monitored by UV and aliquots of samples (100 μ L) were analyzed by HPLC to determine the percentage of released *p*-MBA using a calibration curve and to follow the uncaging reaction.

VII-3-c) Determination of the photochemical quantum yields

For compounds **16a-c**: Quantum yields for the photoconversion were determined in MeOH/H₂O 9:1 in vol. at 25 °C by competition with **10** ($\Phi = 0.2$) at the same concentration (20 μ M) as reference. Light (430 \pm 0.2 nm) from a 1000 W Hg lamp from Hanovia was focused on the entrance slit of a monochromator for photolysis. The reaction was monitored by UV spectroscopy on 1 mL for 20 μ M solutions of **10**, **16a**, **16b** and **16c**. To determine the extent of the photolytic conversions, difference spectra ($t_{\text{irr}}-t_0$) were used. Full photolysis was confirmed by HPLC analysis. The absorbance decreases at 450 nm (for **10**, **16a** and **16c**) and 430 nm (for **16b**) were plotted to follow the uncaging kinetics (k_{sample} for **16a-c** and k_{ech} for **10**)

and values were normalized to full photolysis. The percentage of photolysis was plotted vs the irradiation time. A linear regression was then performed.

According to the following equation, the ratio of the rate constants was indeed directly proportional to the one-photon uncaging sensitivities of the new compound ($\epsilon_{\text{sample at 430nm}} \times \Phi_{\text{sample}}$) and the reference compound ($\epsilon_{\text{ref at 430nm}} \times \Phi_{\text{ref}}$):

$$k_{\text{sample}}/k_{\text{ref}} = \epsilon_{\text{sample}} \times \Phi_{\text{sample}} / \epsilon_{\text{ref}} \times \Phi_{\text{ref}}$$

The determination of the ϵ values at the excitation wavelength, measured in the solvent of the photolysis, then allowed the determination of the Φ_{sample} .

For the compound **44**:

The compound **44** was dissolved in a mixture of MeOH/H₂O 9:1 in vol. to reach a concentration of 23 μM . The quantum yield for the photoconversion was determined by competition with the photolysis of the reference **10** ($\Phi=0.2$) at the same concentration (23 μM). To this end, a mixture of both solutions was prepared (1:1 in vol.). Light (430 ± 0.2 nm) from a 1000 W Hg lamp from Hanovia was focused on the entrance slit of a monochromator for photolysis. Aliquots of 100 μL were subjected to reversed phase HPLC to determine the extent of the photolytic conversion.

VII-3-d) Two-photon experiments

Two-photon photolysis experiments were performed on our home-made set-up at the "Plateforme d'Imagerie Quantitative" (PIQ) at the faculty of pharmacy (University of Strasbourg). The excitation source was a Ti:sapphire femtosecond laser Insight DS (680–1300 nm) with a pulse width < 120 fs and a repetition rate of 80 MHz (Spectra-Physics). The excitation beam was collimated using a 5 cm lens in the center of a Hellma 105.202 – Ultra-Micro cells. The position of the two-photon focal point was verified using a solution of fluorescein and its two-photon induced fluorescence at 800 nm in the ultra-micro cell. The average laser power was measured using a Spectra Physics 407A power meter.

The reference compound **10**⁵⁹ and the studied compound were dissolved in MeOH/H₂O 9:1 in vol. with the absorbance of both solution close to 0.4000 (at λ_{max}) matched using a Uvikon XL UV-vis spectrophotometer and two Ultra-Micro cells. First, the quadratic dependency of the photolysis percentage was verified at 740 and 800 nm. To do this, 100 μL of the solution of

interest was irradiated for 45 min for compound **10** and 20 min for compounds **16a-c** with various average laser powers. The percentage of uncaging was calculated for each power by absorbance measurement. To avoid artifacts and to remain in the initial linear regime, the percentage of uncaging should remain below 15%. The plot of Log (Photolysis) vs Log (Laser power) was linear in this range with a slope of 2 for a two-photon process.

Secondly, the kinetics of the two-photon process of the compound of interest compared to compound **10** allowed the determination of the two-photon uncaging action cross-sections. Thus 100 μ L of the solution (both reference and sample alternatively) was irradiated and analyzed by UV-vis spectroscopy after different times of irradiation, without modifying the laser excitation settings. The percentage of photolysis was plotted vs the irradiation time. A linear regression was then performed with uncaging percentages again lower than 15% giving access to the slope of the line. The two-photon uncaging action cross-section was then calculated using the following formula:

$$\delta_a \phi_u(\text{compound}) = \delta_a \phi_u(\text{reference}) \times \frac{\text{slope}_{\text{compound}}}{\text{slope}_{\text{reference}}} \times \frac{C_{\text{reference}}}{C_{\text{compound}}}$$

with δ_a = the two-photon absorption cross-section

ϕ_u = the uncaging quantum yield

slope = determined on the graph %uncaging vs time

C = concentration of the reference and the compound

The precision of the uncaging action cross-section was estimated to 20% and all experiments were at least duplicated.

VII-4) General protocols for the formulation of liposomes and nanocapsules

Formulation of liposomes: Multilamellar vesicles (MLV) were prepared by using a lipid film hydration technique. Briefly, a $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ solution (9:1 in vol.) containing a mixture of lipids and light-sensitive molecules was prepared in a round-bottom Pyrex tube, and was completely dried under vacuum for 45 min. The resulting lipid film was then hydrated in 10 mM HEPES and 150 mM NaCl buffer (pH 7.1) containing 10 mM ascorbic acid at a final phospholipid concentration of 10 mM, leading to the formation of MLV. This suspension was then sonicated (1 s cycle every 3 s) during 1 h at room temperature under a continuous flow of Ar, using a

Vibra Cell 75041 ultrasonicator (750 W, 20 kHz, Fisher Bioblock Scientific) equipped with a 3 mm-diameter tip probe (40% amplitude). The resulting small unilamellar vesicle (SUV) preparation was centrifuged at 13.000 g for 15 min to remove the titanium dust coming from sonication probes.

Formulation of nanocapsules: The formulations were performed according to the phase inversion method described in patent No. WO02688000 by Heurtault B. *et al.*. The upconversion couple (PdTPBP and TBPe) was dissolved in CHCl₃/MeOH (9:1 in vol.) and the solvents were evaporated. To this residue were added all main components of the LNCs (oil, initial aqueous buffer, surfactants) and the media was mixed in a glass vial while heating at 60 °C using a hotplate stirrer. Then, three cycles of progressive heating and cooling between 60 and 90 °C were performed. At the phase inversion temperature during the last cycle, an irreversible shock was induced by adding cold aqueous buffer (0 °C, pH 7.1) composed of HEPES (20 mM) and NaCl (150 mM) solubilized in MilliQ water. The suspension was then slowly stirred for 5 min before being filtered (0.2 µm filters).

Références

- ¹ Raza A., Rasheed T., Nabeel F., Hayat U., Bilal M., Iqbal H. M. N., *Molecules* **2019**, *24*, 1117-1137
- ² Gun'ko V. M., Savina J. N., Mikhalovsky S. V., *Gels* **2017**, *3*, 37 (DOI: 10.3390/gels3040037)
- ³ Peppas N. A., *Hydrogels in Medicine and Pharmacy: Fundamentals*, CRC Press, **1986**,1
- ⁴ Stefanadis C., Chrysohoou C., Panagiotakos D. B., Passalidou E., Katsi V., Polychronopoulos V., Toutouzas P. K., *BMC Cancer* **2003**, *3*, 1-6
- ⁵ Calceti P., Salmaso S., Lante A., Yosida M., Katakai r., Martellini F., Mei L. H. I., Carezza M., *J. Control. Release*, **2001**, *75*, 173-181
- ⁶ Liu M., Du H., Zhang W., Zhai G., *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 1267-1280
- ⁷ Mahkam M., Allahverdipoor M., *J. Drug Target.* **2004**, *12*, 151-156
- ⁸ Liu M., Du H., Zhang W., Zhai G., *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *71*, 1267-1280
- ⁹ Couture O., Foley J., Kassel N. F., Larrat B., Aubry J.-F., *Transl. Cancer Res.* **2014**, *3*, 494-511
- ¹⁰ Paris J. L., Manzano M., Cabañas M. V., Valet-Regi M., *Nanoscale* **2018**, *10*, 6402-6408
- ¹¹ Xin Y., Qi Q., Mao Z., Zhan X., *Int. J. Pharm.* **2017**, *528*, 47-54
- ¹² Bezagu M., Clarhaut J., Renoux B., Monti F., Tanter M., Tabeling P., Cossy J., Couture O., Papot S., Arseniyadis S., *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 2-7
- ¹³ Su Y.-C., Cheng T.-C., Leu Y.-L., Roffler S. R., Wang J.-Y., Chuang C.-H., Kao C.-H., Chen K.-C., Wang H.-E., Cheng T.-L., *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 2852-2863
- ¹⁴ Al Rifai N., Desgrange S., Le Guillou-Buffello D., Giron A., Urbach W., Nassereddine M., Charara J., Contino-Pépin C., Taulier N., *J. Mater. Chem. B.* **2020**, *8*, 1640-1648
- ¹⁵ Wang S., Liu H., Wu D., Wang X., *J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *583*, 470-486
- ¹⁶ Kin Y. K., Kim E.-J., Lim J. H., Cho H. K., Hong W. J., Jeon H. H., Chung B. G., *Nanoscale Res. Lett.* **2019**, *14* (DOI: 10.1186/s11671-019-2909-y)
- ¹⁷ Liu T.-Y., Hu S.-H., Liu K.-H., Shaiu R.-S., Liu D.-M., Chen S.-Y., *Langmuir* **2008**, *24*, 13306-13311
- ¹⁸ Lakowicz J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **2006**
- ¹⁹ Mitscherlich E., *Ann. Pharm.* **1834**, *12*, 311–314
- ²⁰ Hüll K., Morstein J., Trauner D., *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 10710-10747
- ²¹ Merino E., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3835-3853

-
- ²² Hartley G. S., *Nature* **1937**, *140*, 281
- ²³ Merino E., Ribagorda M., *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1071–1090
- ²⁴ Barillé R., Molécule azobenzène – Propriétés et applications photomécaniques de la commutation moléculaire, *Techniques de l'ingénieur*, **2017**, 1-18
- ²⁵ Heller H. G., Photochromic Materials (Organic), *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, **2001**, 6904-6909
- ²⁶ Dhammika Bandara H. M., Burdette S. C., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1809-1825
- ²⁷ Banghart M., Borges K., Isacoff E., Trauner D., Kramer R.H., *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 1381-1386
- ²⁸ Brieke C., Rohrbach F., Gottschalk A., Mayer G., Heckel A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446-8476
- ²⁹ Irie M., *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685-1716
- ³⁰ Tsuboi Y., Shimizu R., Shoji T., Kitamura N., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12623-12627
- ³¹ Pu S., Zheng C., Le Z., Liu G., Fan C., *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2576-2585
- ³² Morimitsu K., Kobatake S., Irie M., *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1155-1158
- ³³ Tsvigoulis G. M., Lehn J.-M., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1119-1122
- ³⁴ Göppert-Mayer M., Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen, *Ann. Phys.* **1931**, *401*, 273–294
- ³⁵ Bègue A., Anselmi F., Papagiakoumou E., Emiliani V., *Med. Sci. (Paris)*, **2011**, *27*, 811-813
- ³⁶ Piant S., Speht A., Zemelman B., Losonczy A., Bolze F., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2016**, *627*, 56-65
- ³⁷ Klán P., Solomek T., Bochet C. G., Blanc A., Givens R., Rubina M., Popik V., Kostikov A., Wirz J., *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119-191
- ³⁸ Barltrop J. A., Plant P. J., Schofield P., *Chem. Commun.* **1966**, *22*, 822-823
- ³⁹ Patchornik A., Amit B., Woodward R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *21*, 6333-6335
- ⁴⁰ Engels J., Schlaeger E. J., *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907-911
- ⁴¹ Kaplan J. H., Forbush B., Hoffman J. F., *Biochemistry* **1978**, *17*, 1929-1935
- ⁴² Specht A., Goeldner M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2008-2012
- ⁴³ Mitchison T. J., Sawin K. E., Theriot J. A., Gee K., Mallavarapu A., *Methods Enzymol.* **1998**, *291*, 63-78
- ⁴⁴ Pelliccioli A. P., Wirz J., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441-458

-
- ⁴⁵ Hasan A., Stengele K.-P., Giegrich H., Cornwell P., Isham K. R., Sachleben R. A., Pflaidere W., Foote R. S., *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247-4264
- ⁴⁶ Specht A., Thomann J.-S., Alarcon K., Wittayanan W., Ogden D., Furuta T., Kurakawa Y., Goeldner M., *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1690-1695
- ⁴⁷ Gug S., Charon S., Specht A., Alarcon K., Ogden D., Zietz B., Léonard J., Haacke S., Bolze F., Nicoud J.-F., Goeldner M., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1303-1307
- ⁴⁸ Specht A., Bolze F., Donato L., Herbivo C., Charon S., Warther D., Gug S., Nicoud J.-F., Goeldner M., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 578-586
- ⁴⁹ Perkin W. H., *J. Chem. Soc.* **1868**, *21*, 53-63
- ⁵⁰ Perkin W. H., *J. Chem. Soc.* **1868**, *21*, 181-186
- ⁵¹ Von Pechmann H., Duisberg C., *Berichte d. D. chem. Gesellschaft* **1883**, *16*, 2119-2128
- ⁵² Sethna S., Phadke R., *The Pechmann Reaction*, **2011**, *7*, 1-58
- ⁵³ Sugino T., Tanaka K., *Chem. Lett.*, **2001**, *30*, 110-111
- ⁵⁴ Givens R. S.; Matuszewski B., Atheu P. S., Stoner M. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6016-6021
- ⁵⁵ Goeldner M., Givens R., *Dynamic Studies in Biology*, Wiley-VCH, **2006**
- ⁵⁶ Schoenleber R. O., Giese B., *Synlett*, **2003**, *4*, 501-504
- ⁵⁷ Givens R. S., Matuszewski B., *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6861-6863
- ⁵⁸ Olson J. P., Kwon H.-B., Yakasaki K. T., Chiu C. Q., Higley M. J., Sabatini B. L., Ellis-Davies G. C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5954-5957
- ⁵⁹ Lin Q., Yang L., Wang Z., Hua Y., Zhang D., Bao B., Bao C., Gong X., Zhu L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 3722-3726
- ⁶⁰ Fournier L., Aujard I., Le Saux T., Maurin S., Beaupierre S., Baudin J.-B., Jullien L., *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17494-17507.
- ⁶¹ Weissleder R., *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316-317
- ⁶² Juzenas P., Juzeniene A., Kaalhus O., Iani V., Moan J., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 745-748
- ⁶³ Delori F. C., Webb R. H., Sliney D. H., *J. Opt. Soc. Am.* **2007**, *24*, 1250-1265
- ⁶⁴ Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B., *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2001**, *64*, 144-161
- ⁶⁵ Rozanowska M., Wessels J., Boulton M. E., Burke J. M., Rogers M. A. J., Truscott T. G., Sarna T., *Free. Radic. Biol. Med.* **1998**, *24*, 1107-112

-
- ⁶⁶ Beharry A. A., Sadovsky O., Woolley G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19684-19687
- ⁶⁷ Samanta S., Beharry A. A., sadovski O., McCormick T. M., Babalhavaeji A., Troppe V., Woolley G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9777-9784
- ⁶⁸ Durand-de Cuttoli R., Chauhan P. S., Pétriz Reyes A., Faure P., Mourot A., Ellis-Davies G. C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 6831-6835
- ⁶⁹ Richers M. T., Amatrudo J. M., Olson J. P., Ellis-Davies G. C. R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *56*, 193-197
- ⁷⁰ Bort G., Gallavardin T., Odgen D., Dalko P. I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4526-4573
- ⁷¹ Ellis-Davies G. R. C., *Front. Synaptic Neurosci.* **2019**, *10*, 1-13.
- ⁷² Furuta T., Wang S. S.-H., Dantzker J. L., Dore T. M., Bybee W.-J., Callaway E. M., Denk W., Tsien R. Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1193-1200
- ⁷³ Matsuzaki M., Ellis-Davies G. C. R., Nemoto T., Miyashita Y., Lino M., Kasai H., *Nat. Neurosci.* **2001**, *11*, 1086-1092
- ⁷⁴ Judkewitz B., Roth A., Häusser M., *Neuron*. **2006**, *50*, 180-183
- ⁷⁵ Warther D., Gug S., Specht A., Bolze F., Nicoud J.-F., Mourot A., Goeldner M., *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7753-7758
- ⁷⁶ Chitose Y., Abe M., Furukawa K., Lin J.-Y., Lin T.-C., Katan C., *Org. Lett.* **2017**, *19*, 2622-2625
- ⁷⁷ Bojtár M., Kormos A., Kis-Petik K., Kellermayer M., Kele P., *Org. Lett.* **2019**, *21*, 9410-9414
- ⁷⁸ Klausen M., Dubois V., Clermont G., Tonnelé C., Castet F., Blanchard-Desce M., *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 4209-4219
- ⁷⁹ Elamri I., Heumüller M., Herzig L.-M., Stirnal E., Wachtveitl J., Schuman E. M., Schwalbe H., *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2458-2464
- ⁸⁰ Zhang W., Ji T., Li Y., Zheng Y., Mehta M., Zhao C., Liu A., Kohan D. S., *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2323
- ⁸¹ Kulhánek J. Bureš F., Ludwig M., *Beilstein J. Org. Chem.* **2009**, *5*, doi:10.3762/bjoc.5.11
- ⁸² Gegiou D., Muszkat K. A., Fischer E., *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3907-3918
- ⁸³ Brubaker A. N., DeRuiter J., Whitmer W. L., *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1094-1099
- ⁸⁴ Forbes D. C., Amin S. R., Bean C. J., Standen M. C., *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8287-8290
- ⁸⁵ Corey E. J., Chaykovsky M., *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 867-868
- ⁸⁶ Corey E. J., Chaykovsky M., *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3782-3783
- ⁸⁷ Li J. J., Name Reactions in Heterocyclic Chemistry, *John Wiley & Sons, Inc.* **2005**, 2-7
- ⁸⁸ Forbes D. C., Standen M. C., Lewis D. L., *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 2283-2286

-
- ⁸⁹ Bolinger M. T., Antonetti D. A., *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1498
- ⁹⁰ The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, *Ophthalmology* **1995**, *102*, 647-661
- ⁹¹ Aiello L. P., Avery R. L., Arrigg P. G., Keyt B. A., Jampel H. D., Shah S. T., Pasquale L. R., Thieme H., Iwamoto M. A., Park J. E., Nguyen H. V., Aiello L. M., Ferrara N., King G. L., *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1480-1487
- ⁹² Stefansson E., Bek T., Porta M., Larsen N., Kristinsson J. K., Agardh E., *Acta Ophthalmol. Scand.* **2000**, *78*, 374-385
- ⁹³ Al-Hussainy S., Dodson P. M., Gibson J. M., *Eye* **2008**, *22*, 96-99
- ⁹⁴ Stefansson E., Machemer R., de Juan E., Mc Cuen B. W., Peterson J., *Am. J. Ophthalmol.* **1992**, *113*, 36-38
- ⁹⁵ Stefansson E., *Acta Ophthalmol. Scand.* **2001**, *79*, 435-440
- ⁹⁶ Zhao Y., Singh R. P., *Drugs Context* **2018**, *88*, 212532
- ⁹⁷ McLellan M. A., Rosenthal N. A., Pinto A. R., *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2017**, *7*, 1-12
- ⁹⁸ Sternberg N., Hamilton D., *J. Mol. Biol.* **1981**, *150*, 467-486
- ⁹⁹ Babinet C., *Med Sci* **1995**, *11*, 1154-1157
- ¹⁰⁰ Mao X., Fujiwara Y., Chapdelaine A., Yang H., Orkin S. H., *Blood* **2001**, *97*, 324-326
- ¹⁰¹ Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6991-6995
- ¹⁰² Feil R., Clifford J., Chiba H., Chambon P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10887-10890
- ¹⁰³ Šalamoun J., Macka M., Nechvátal M., Matoušek M., Knesel L., *J. Chromatogr. A* **1990**, *514*, 179-187
- ¹⁰⁴ Sinha D. K., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Benbrahim-Bouzidi C., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Goetz B., Dubruille S., Baaden M., Volovitch M., Bensimon D., Vríz S., Jullien L., *ChemBioChem* **2010**, *11*, 653-663
- ¹⁰⁵ Sinha D. K., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Kawakami K., Laucht C., Bally-Cuif L., Volovitch M., Bensimon D., Jullien L., Vríz S., *Zebrafish*. **2010**, *7*, 199-204
- ¹⁰⁶ Warther D., Bolze F., Léonard J., Gug S., Specht A., Puliti D., Sun X.-H., Kessler P., Lutz Y., Vonesch J.-L., Winsor B., Nicoud J.-F., Goeldner M., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2585-2590
- ¹⁰⁷ Alouane A., Labruère R., Le Saux T., Schmidt F., Jullien L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492-7509
- ¹⁰⁸ Beauté L., McClenaghan N., Lecommandoux S., *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2019**, *138*, 146-166
- ¹⁰⁹ Auzel F. E., *Proc. IEEE* **1973**, *61*, 758-786
- ¹¹⁰ Bloembergen N., *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 84-85
- ¹¹¹ Zhou J., Liu Q., Feng W., Sun Y., Li F., *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 395-465

-
- ¹¹² Joubert M.-F., *Opt. Mater.* **1999**, *11*, 181-203
- ¹¹³ Zhou J., Liu Z., Li F., *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1323-1349
- ¹¹⁴ Jalil R. A., Zhang Y., *Biomaterials* **2008**, *29*, 4122-4128
- ¹¹⁵ Fedoryshin L. L., Tavares A. J., Petryayeva E., Doughan S., Krull U. J., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 13600-13606
- ¹¹⁶ Fan Y., Liu L., Zhang F., *Nano Today* **2019**, *25*, 68-84
- ¹¹⁷ Wang Y., Song S., Zhang S., Zhang H., *Nano Today* **2019**, *25*, 38-67
- ¹¹⁸ Xie X., Li Z., Zhang Y., Guo S., Pendharkar A. I., Min L., Huang L., Huang W., Han G., *Small* **2017**, *13*, 1602843
- ¹¹⁹ Arboleda C., He S., Stubelius A., Johnson N. J. J., Almutairi A., *Chem. Matter.* **2019**, *31*, 3103-3110
- ¹²⁰ Zhao E., Liu X., Tang D., Liu L., Liu G., Zhou B., Xing C., *Mater. Res. Bull.* **2021**, *133*, 111027-111034
- ¹²¹ Parker C. A., Hatchard C.G., *Proc. Chem. Soc.* **1962**, *373*, 386-387
- ¹²² Askes S. H. C., Bonnet S., *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2*, 437-452
- ¹²³ Yan B., Boyer J.-C., Branda N. R., Zhao Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19714-19717
- ¹²⁴ Jalani G., Naccache R., Rosenzweig D. H., Haglund L., Vetrone F., Cerruti M., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1078-1083
- ¹²⁵ Askes S. H. C., Bahreman A., Bonnet S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1029-1033
- ¹²⁶ Sgambellone M. A., David A., Garner R.N., Dunbar K. R., Turro C., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11274-11282
- ¹²⁷ Huang L., Zhao Y., Zhang H., Huang K., Yang J., Hang G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 14400-14404
- ¹²⁸ Askes S. H. C., Kloz M., Bruylants G., Kennis J. T. M., Bonnet S., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 27380-27390
- ¹²⁹ Periasamy A., *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 287-291
- ¹³⁰ Cheung H. C., *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles*, Springer US, **2002**, 127-176
- ¹³¹ Latt S. A., Cheung H. T., Blout E. R., *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 995-1003
- ¹³² Selvin P. R., *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 300-334
- ¹³³ Bangham A. D., Horne R. W., *J. Mol. Biol.* **1964**, *8*, 660-668
- ¹³⁴ Maherani B., Arab-Tehrany E., Mozafari M. R., Gaiani C., Linder M., *Curr. Nanosci.* **2011**, *7*, 436-452
- ¹³⁵ Vemuri S., Rhodes C. T., *Pharm. acta Helv.* **1995**, *70*, 95-111

-
- ¹³⁶ Demirci M., Caglar M. Y., Cakir B., Gülseren I., Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries, *Academic Press*, **2017**, 74-113
- ¹³⁷ Kakhi Z., Frisch B., Heurtault B., Pons F., *Biochimie* **2016**, *130*, 14-22
- ¹³⁸ Bozzuto G., Molinari A., *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 975-999
- ¹³⁹ Vemuri S., Yu C.-D., Degroot J. S., Roosdorp N., *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1990**, *16*, 1579-1584
- ¹⁴⁰ Zamboni W. C., *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 8230-8234.
- ¹⁴¹ Liu Q., Yin B., Yang T., Yang Y., Shen Z., Yao P., Li F., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5029-5037
- ¹⁴² Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.-E., Benoit J.-P., *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 875-880
- ¹⁴³ Li C., Koenigsmann C., Deng F., Hagstrom A., Schmuttenmaer C. A., Kim J.-H., *ACS Photonics* **2016**, *3*, 784-790
- ¹⁴⁴ Ye C., Gray V., Kushwaha K., Singh S. K., Erhart P., Börjesson K., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 1715-1720
- ¹⁴⁵ Askes S. H. C., Leeuwenburgh V. C., Pomp W., Arjmandi-Tash H., Tanase S., Schmidt T., Bonnet S., *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 322-334
- ¹⁴⁶ Askes S. H. C., Mora N. L., Harkes R., Koning R. I., Koster B., Schmidt T., Kros A., Bonnet S., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9137-9140
- ¹⁴⁷ Thorn C. F., Oshiro C., Marsh S., Hernandez-Boussard T., McLeod H., Klein T. E., Altman R. B., *Pharmacogenet. Genomics* **2011**, *21*, 440-446
- ¹⁴⁸ Tavoloni N., Guarino A. M., Berk P. D., *J. Pharm. Pharmacol.* **1980**, *32*, 860, 862
- ¹⁴⁹ Williams B. A., Tritton T. R., *Photochem. Photobiol.* **1981**, *34*, 131-134
- ¹⁵⁰ Wood M. J., *J. Clin. Pharm. Ther.* **1990**, *15*, 291-300
- ¹⁵¹ Kuczma M., Ding Z.-C., Zhou G., *Crit. Rev. Immunol.* **2016**, *36*, 179-191
- ¹⁵² Gajek A., Poczta A., Łukawaska M., Cecuda-Adamczewska V., Tobias J., Marczak A., *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 4479-4493
- ¹⁵³ Lawley P. D., Phillips D. H., *Mutat. Res.* **1996**, *355*, 13-40
- ¹⁵⁴ Lin M., Qi X.-R., Liposome-Based Drug Delivery Systems, Biomaterial Engineering, *Springer*, **2018**, 1-11
- ¹⁵⁵ Goegan B., Terzi F., Bolze F., Cambridge S., Specht A., *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1341-1348
- ¹⁵⁶ Askes S. H. C., Meijer S. M., Bouwens T., Landman I., Bonnet S., *Molecules* **2016**, *21*, 1460-1476
- ¹⁵⁷ Sasaki Y., Oshikawa M., Bharmoria P., Kouno H., Hayashi-Takagi A., Sato M., Ajioka I., Yanai N., Kimizuka N., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 17827-17833

-
- ¹⁵⁸ Sasaki Y., Amemori S., Kouno H., Yanai N., Kimizuka N., *J. Mater. Chem. C*, **2017**, *5*, 5063-5067
- ¹⁵⁹ Yakutkin V., Aleshchenkov S., Chernov S., Miteva T., Nelles G., Cheprakov A., Balushev S., *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9846-9850
- ¹⁶⁰ Umezawa H., Okada S., Oikawa H., Matsuda H., Nakanishi H., *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 468-472.
- ¹⁶¹ Kulhánek J., Bureš F., Ludwig M., *Beilstein J. Org. Chem.* **2009**, *5*, doi:10.3762/bjoc.5.11
- ¹⁶² Seyfried P., Eiden L., Grebenovsky N., Mayer G., Heckel A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 359-363.
- ¹⁶³ Goegan B., Terzi F., Bolze F., Cambridge S., Specht A., *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1341-1348
- ¹⁶⁴ Gandioso A., Contreras S., Melnyk I., Oliva J., Nonell S., Velasco D., García- Amorós J., Marchán V., *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5398-5408
- ¹⁶⁵ Magde D., Wong R., Seybold P. G., *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327-334
- ¹⁶⁶ Crosby G. A., Dema J. N.s, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991-1024

Synthèses et applications de groupements protecteurs photolabiles pour la libération de principes actifs *in vivo*.

Résumé

La lumière est un stimulus particulièrement intéressant et son utilisation dans divers domaines de la chimie et de la biologie est croissante. Ces dernières années, des réactions de photolyse de plus en plus performantes ont été développées afin de contrôler de façon spatio-temporelle la libération d'un effecteur biologique.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons notamment développé de nouveaux groupements protecteurs photolabiles (GPPs) conjugués qui ont permis d'obtenir des sensibilités à 1 et 2 photons particulièrement élevées. Nous nous sommes également consacrés au développement de systèmes de photolibération *in vivo*. Pour cela, un GPP a été conçu et synthétisé afin de libérer *in vivo*, à la suite d'une irradiation, un œstrogène capable d'activer un système d'expression de gène dans l'œil, nous permettant ainsi d'envisager de nouveaux traitements pour des pathologies oculaires (liées au diabète ou à la DMLA). Enfin, nous avons développé un GPP couplé à une ancre lipidique qui, une fois incorporé dans la formulation de nanocapsules capables d'effectuer une conversion ascendante de photons, a permis la libération *in vivo* d'un anticancéreux modèle, le melphalan.

Mots-clés : groupements protecteurs photolabiles, photolyse, nanoparticules, conversion ascendante de photons, excitation à deux photons.

Abstract

Light is a stimulus which is extremely interesting and its use in various fields of chemistry and biology is increasing. In the last few years, more efficient photolysis reactions were developed in order to control the release and the concentration of a biological effector in space and time.

As part of this thesis, we developed new conjugated photolabile protecting groups (PPGs) that reached extremely high 1 and 2 photon sensitivities. We also developed photorelease systems that can be implemented *in vivo*. Therefore, we designed and synthesized a PPG which is capable, after an irradiation, to release *in vivo* an estrogen. This estrogen is then able to activate, in the eye, a gene expression system and that enables us to consider new treatments for ocular pathologies (regarding diabetes and age-related macular degeneration). Finally, we developed a PPG, linked to a lipidic anchor, that can release *in vivo* an anti-tumor drug (melphalan) once it is incorporated in the formulation of upconverting nanocapsules.

Keywords: photolabile protecting groups, photolysis, nanoparticles, upconversion, two-photon excitation.