

N° ordre : 4700



THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Lisa PEYRARD

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR

Spécialité : Chimie Organique

Cyclotrivératrylènes fluorescents pour la détection d'ammoniums d'intérêt biologique

Soutenue le : 17 Décembre 2012

Devant la commission d'examen formée de :

Mme BLANCHARD-DESCE Mireille, *Université Bordeaux 1, Directrice de Recherche*
M. DUTASTA Jean-Pierre, *Ecole Nationale Supérieure de Lyon, Directeur de Recherche*
Mme GOSSE Isabelle, *Université Bordeaux 1, Maître de Conférences (HDR)*
Mme LERAY Isabelle, *Ecole Nationale Supérieure de Cachan, Directrice de Recherche*
M. MEYRAND Pierre, *Institut des Maladies Neurodégénératives, Directeur de Recherche*
Mme REINAUD Olivia, *Université Paris Descartes, Professeur des Universités*
Mme PINET Sandra, *Université Bordeaux 1, Maître de Conférences*

Présidente
Examineur
Directrice de thèse
Rapporteur
Directeur de thèse
Rapporteur
Invitée

Ce n'est pas parce qu'un problème n'a pas été résolu qu'il est impossible à résoudre.
Agatha Christie, *Le mystérieux Mr Quinn*

Chercher à connaître n'est souvent qu'apprendre à douter.
Antoinette des Houlières

L'imagination est plus importante que le savoir.
Albert Einstein

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réussite de cette thèse et à mon épanouissement au sein des équipes de recherche que j'ai été amenée à côtoyer.

Je voudrais commencer par remercier sincèrement le Dr. Isabelle GOSSE et le Dr. Pierre MEYRAND de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse malgré mon profil atypique, et qui m'ont encadré pendant ces trois années. Merci à Isabelle, de m'avoir guidée dans mes choix tout en me laissant une grande autonomie à la paillasse. Je la remercie également pour m'avoir donné l'opportunité de faire de l'enseignement et de m'avoir permis d'encadrer des étudiants lors de ces trois années. J'ai également eu la chance grâce à elle de participer à plusieurs congrès internationaux, qui ont été des moments très enrichissants. Je souhaiterais remercier Pierre, pour m'avoir initié à la neurobiologie et permis de découvrir un monde dans lequel je rêvais de travailler depuis de très nombreuses années. Je souhaiterais vous dire merci à tous les deux pour l'enthousiasme dont vous avez fait part et qui m'a porté pendant ces trois années.

Je souhaiterais remercier également les Dr. Alexander KUHN et Dr. Neso SOJIC, directeurs successifs du laboratoire NSySA au cours de ma thèse, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire dans de bonnes conditions.

Mes remerciements vont également à mes rapporteurs, Dr. Isabelle LERAY et Dr. Olivia REINAUD qui ont accepté d'évaluer ce manuscrit, avec grand soin et pertinence. Je remercie les autres membres de mon jury, le Dr. Mireille BLANCHARD-DESCE et le Dr. Jean-Pierre DUTASTA, pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je voudrais remercier l'équipe d'Isabelle BARAILLE de l'IPREM de Pau, les Drs. Claire COIFFIER, Ross BROWN, Didier BEGUE et Patrice BORDAT pour la collaboration très intéressante et fructueuse à laquelle j'ai eu la chance de participer. J'ai apprécié l'apport d'une approche théorique pour la compréhension d'interactions supramoléculaires. Le travail de modélisation remarquable que vous avez réalisé a apporté une plus grande crédibilité à différentes parties de ce travail.

J'ai eu la chance de découvrir l'optique non linéaire auprès du Dr. Mireille BLANCHARD-DESCE que je remercie pour les discussions très intéressantes qu'on a eu au sujet de la fluorescence. Je remercie Vincent qui a été d'une grande patience et tolérance quand à mes changements de planning de dernière minute. Merci à Vincent mais aussi

Guillaume, Sébastien pour leur joie et encouragements au cours de ces moments passés ensemble.

D'autre part, je souhaiterais remercier le Pr. Gilles SIGAUD et le Dr. François DOLE pour m'avoir permis de réaliser des expériences de micro-calorimétrie. J'ai énormément apprécié leurs disponibilités, leur enthousiasme et leur sympathie, Vous m'avez permis de redécouvrir la thermodynamique autrement.

Je souhaiterais également remercier toute l'équipe du CESAMO de l'ISM pour leur aide dans la caractérisation de mes produits et complexes. Une mention spéciale pour Noel PINAUD qui m'a apporté une aide précieuse pour l'étude de mes complexes. Il m'a permis de me familiariser à diverses techniques que je n'aurais su utiliser sans lui et ce toujours avec beaucoup d'enthousiasme.

De même je souhaiterais remercier Dr. Anne-Laure WIROTIUS, responsable RMN au LCOP, pour son aide et sa patience.

J'ai également apprécié réaliser des expériences de diffraction des rayons-X à l'aide des Dr. J-M LASNIER et Dr. S MASSIP. J'ai acquis auprès d'eux, très rapidement de précieuses connaissances en (re) cristallisation, qui m'ont été très utiles au cours de ce travail.

Je souhaiterais également remercier chaleureusement le Dr. Nathalie MACREZ, de l'Institut des maladies Neuro-dégénératives qui m'a accordé beaucoup de temps pour optimiser le montage optique devant servir à réaliser de l'imagerie avec nos sondes fluorescentes sur un modèle animal. J'ai appris beaucoup de choses sur les microscopes et l'imagerie, et toujours dans une ambiance très agréable.

Je remercie sincèrement le Dr. Sandra PINET qui m'a co-encadrée lors de ces trois ans. Son aide en synthèse organique, et son soutien permanent m'ont été précieux. Je garderai un souvenir sympathique du congrès de photochimie de Coimbra, petite pause pendant cette longue période de rédaction.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement le Dr. Sabine CHIERICI pour ses précieux conseils, sa gentillesse, son soutien et son enthousiasme au cours de ces trois années.

Enfin, je voudrais remercier tous les membres permanents anciens et actuels du laboratoire NSySA pour le cadre de travail très agréable et sympathique qu'ils m'ont offert. Merci à vous pour les nombreux conseils que vous m'avez apporté.

Je voudrais adresser un immense merci à tous les étudiants et stagiaires avec lesquels j'ai eu un très grand plaisir à travailler. La thèse est une grande aventure professionnelle et grâce à vous tous, elle restera pour moi une très belle aventure humaine. Je vous remercie pour votre aide, et tous les bons moments que l'on a partagé. Je pense à Léa, Laurent et

Gabi avec qui j'ai commencé et fini la thèse, mais aussi aux anciens qui nous ont accueillis très gentiment (Emilie, Christophe, Matthias, Yémima, Miléna, Fiona), mais aussi à la « nouvelle vague » (Zarah, Catherine, Suresh, Salem, Hélène puis Florent, Milica), les étudiants de passages et les post-docs, notamment Emeline qui m'a supporté comme « co-labo » et m'a beaucoup appris. Je pense aussi à « mes » stagiaires, Morgane, Stéphanie, Aude, et les autres, j'espère que vous aurez appris autant de moi, que moi avec vous ... Je voudrais remercier aussi Aline, Véro, Patrick, Manu, et Bertrand pour toutes les choses qu'ils font pour nous au quotidien, et qui rendent la thèse plus facile.

Je voudrais remercier particulièrement Dr. Léa MESSAGER qui a été une collègue mais aussi une amie.

Je ne saurais terminer sans remercier mes amis extérieurs au labo, ma famille et mes proches qui m'ont permis de trop rares mais bénéfiques évasions. J'adresse toute ma reconnaissance et mon affection à mes parents, à Lucie et à Sébastien et à toute ma famille, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et m'a permis d'en arriver là. Un remerciement particulier à Mickael, qui me soutient et m'encourage au quotidien.

Abréviations utilisées

Abs	Absorbance
Ach	Acétylcholine
EP	Adrénaline
Å	Angstrom
Ar	Argon
SCn	Calix[n]arène sulfonaté
Ch	Choline
ε	Coefficient d'absorption molaire
$K_{\text{Association}}$	Constante d'association
CuAAC	Cycloaddition catalysée au cuivre
CTV	Cyclotrivératrylène
°C	Degré celsius
Δ_{Stokes}	Déplacement de Stokes
DCM	Dichlorométhane
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (mesure de taille par DLS)
DFM	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DA	Dopamine
τ	Durée de vie
Em	Emission
ΔH	Enthalpie
ΔG	Enthalpie libre
ΔS	Entropie
éq	équivalent

Et	Ethyle
g	gramme
Hz	Hertz
h	heure
ITC	Isothermal titration calorimetry
L	litre
$\lambda_{em\ max}$	Longueur d'onde correspondant au maximum d'émission
$\lambda_{Abs\ max}$	Longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption
MHz	megahertz
MeO	Méthoxyle
Me	Méthyle
μ M	micromolaire
TEM	Microscopie électronique en transmission
mL	millilitre
mM	millimolaire
mmol	millimole
M	molaire
mol	mole
nm	nanomètre
ns	nanoseconde
NEP	Noradrénaline
ppm	partie par million
Pent	Pentyl
ps	picoseconde
Pr	Propyle

Φ_F	Rendement quantique de fluorescence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
HMRS	Spectrométrie de masse haute résolution
HEPES	Tampon HEPES
PBS	Tampon phosphate (« Phosphate Buffer Solution »)
TA	Température ambiante
THF	Tétrahydrofurane
PET	Transfert d'électron photo-induit
PCT	Transfert de charge photon induit
ESPT	Transfert de proton avec le solvant à l'état excité
ESIPT	Transfert de proton intramoléculaire à l'état excité
UV-Visible	Ultraviolet-visible
u. a.	unité arbitraire

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 INTRODUCTION AUX SONDES MOLECULAIRES FLUORESCENTES	7
A. FLUORESCENCE ET DETECTION	8
a. La fluorescence en bref	8
1. Photoluminescence et fluorescence	8
2. Les grandes caractéristiques d'un fluorophore en optique linéaire	9
3. Effet de l'environnement et autres processus impliquant une molécule à l'état excité	10
b. Optique non linéaire et excitation multiphotonique	12
c. Les sondes moléculaires fluorescentes	15
d. Divers processus permettant la détection par fluorescence	18
1. Mécanisme de transfert d'électron photo-induit (PET)	19
2. Transferts de charge photo-induit (PCT)	20
3. Polarisation de l'émission de fluorescence	22
4. Formation d'excimères	22
5. Transfert d'énergie résonnant (FRET)	23
B. SONDES MOLECULAIRES FLUORESCENTES ET RECONNAISSANCE	25
a. Le processus de reconnaissance moléculaire	25
b. Sondes moléculaires fluorescentes pour l'acétylcholine	27
1. L'acétylcholine	27
2. Les sondes fluorescentes à acétylcholine dérivant de calixarènes	28
3. Les sondes fluorescentes à acétylcholine dérivant de résorcinarènes	33
c. Sondes moléculaires fluorescentes développées pour la dopamine	37
1. La dopamine, et autres neurotransmetteurs du type catécholamine	37
2. Sondes fluorescentes pour la dopamine basées sur une réaction chimique	38
3. Sonde indirecte par déplacement d'indicateur, pour la dopamine	41
4. Sonde directe, fonctionnant par liaison non-covalente, pour la reconnaissance de la dopamine	42
C. DES DERIVES DE CYCLOTRIVERATRYLENE COMME SONDES MOLECULAIRES FLUORESCENTES.	44
a. La famille des cyclotrivératrylènes et dérivés	44
b. Synthèse du trimère	46
c. Matériaux et CTVs	47
d. Les CTVs : sondes moléculaires	49
1. Les CTVs comme sondes pour les fullerènes	49
2. Les CTVs pour la reconnaissance d'ions	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	55

CHAPITRE 2	SONDES FLUORESCENTES AUX STRUCTURES PEU ETENDUES	63
A.	SYNTHESE DE CTVs INTERMEDIAIRES HALOGENES	67
a.	Obtention d'un CTV intermédiaire bromé	67
b.	Formation d'un CTV intermédiaire iodé	72
c.	Conclusion	75
B.	SYNTHESES DE CTVs MODIFIES PAR DES GROUPEMENTS ELECTRO-ATTRACTEURS	76
a.	Stratégie 1, emploi de CTVs fonctionnalisés par des groupements électro-donneurs chargés négativement	76
1.	Des cétones comme groupements électro-attracteurs.	76
2.	Des nitriles comme groupements électro-attracteurs	77
b.	Stratégie 2, emploi de CTVs fonctionnalisés par des groupements électro-attracteurs chargés négativement	78
1.	Des phosphonates comme groupements électro-attracteurs	78
2.	Des acides carboxyliques comme groupements électro-attracteurs	83
c.	Conclusion	83
C.	PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES CTVs OBTENUS	85
a.	Détermination des grandeurs caractéristiques	85
b.	Fluorescence par transfert de charge et rôle du groupement électro-attracteur	86
c.	Conclusion	90
D.	ETUDES DES PROPRIETES DE RECONNAISSANCE DES CTVs SOLUBLES EN MILIEU AQUEUX	91
a.	Stratégie 1, utilisation des groupements phénolates	91
1.	Cas des CTV 40 et 41 , fonctionnalisés par des cétones	91
2.	Cas du CTV 45 , fonctionnalisé par des nitriles	95
1)	<i>Etude spectroscopique du CTV 45, en milieu aqueux</i>	95
2)	<i>Titration pH et spectroscopie</i>	97
3)	<i>Détection d'ammoniums d'intérêt biologique</i>	101
3.	Conclusion sur cette première stratégie de solubilisation <i>via</i> les phénolates	104
b.	Stratégie 2 : Solubilisation <i>via</i> des groupements carboxylates ou phosphonates	105
1.	Cas du CTV 53 , fonctionnalisé par des acides phosphoriques	106
1)	<i>Propriétés spectroscopiques du CTV 53 dans l'HEPES</i>	106
2)	<i>Etude de reconnaissance, dans l'HEPES, pour le CTV 53</i>	107
3)	<i>Conclusion</i>	112
2.	Cas du CTV tri-acide carboxyliques 55	112
1)	<i>Propriétés spectroscopiques dans le PBS du CTV 55</i>	112
2)	<i>Etude de reconnaissance d'ammoniums d'intérêt biologique</i>	113
3)	<i>Conclusion</i>	114
3.	Conclusion sur cette seconde stratégie	114

E. CONCLUSIONS GENERALES SUR LES SONDES FLUORESCENTES AUX STRUCTURES PEU ETENDUES	116
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119
CHAPITRE 3 SONDES FLUORESCENTES OBTENUES PAR COUPLAGE DE SONOGASHIRA	125
A. SYNTHÈSE DE CTVs PLUS CONJUGUES PAR COUPLAGE DE SONOGASHIRA	128
a. Couplage de Sonogashira à partir de CTVs iodés	128
b. CTVs étendus, solubles en milieu aqueux	132
1. Déprotection des éthers dans le cas du CTV 61 .	132
2. Saponification du CTV 58	133
3. Déprotection des esters de phosphore du CTV 59	133
c. Conclusion	134
B. PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DES CTVs OBTENUS PAR COUPLAGE DE SONOGASHIRA, EN MILIEU ORGANIQUE.	135
a. Propriétés spectroscopiques en optique linéaire	135
1. Propriétés spectroscopiques, en milieu organique	135
2. En milieu aqueux salin, tamponné à pH physiologique	138
1) <i>Caractérisation du CTV 63 dans le PBS</i>	138
2) <i>Caractérisation du CTV 64 dans l'HEPES</i>	139
b. Propriétés spectroscopiques en optique non linéaire, absorption à 2 photons	140
c. Conclusion	143
C. ÉTUDE EN MILIEU AQUEUX DES CTVs 63 ET 64	144
a. Étude du CTV 63 dans le PBS	144
1. Un CTV qui forme des nano-assemblages dans le PBS	144
2. Étude de complexation	147
1) <i>Étude par spectrofluorimétrie</i>	147
2) <i>Étude RMN de la complexation de l'Ach par la sonde 63</i>	152
3) <i>Étude de biocompatibilité et neurotoxicité</i>	153
3. Conclusion	156
b. Étude des propriétés de reconnaissance du CTV 64 en milieu aqueux	157
1. CTV 64 et formation d'assemblages en milieu aqueux	157
2. Étude de reconnaissance par spectrofluorimétrie	158
3. Étude de reconnaissance du CTV 64 par microcalorimétrie	162
4. Conclusion	165
D. CONCLUSIONS GENERALES	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169

CHAPITRE 4	SONDES FLUORESCENTES OBTENUES PAR « CHIMIE CLICK »	173
A.	SYNTHESE DE CTVs CONJUGUES PAR « CHIMIE CLICK »	176
a.	Triazole et Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre	176
b.	CuAAC à partir d'un CTV tri-alcyne intermédiaire	178
1.	Synthèse d'un CTV substitué par des alcynes vrais	178
2.	« Chimie click » à partir du CTV tri-alcyne	178
c.	CuAAC à partir d'un CTV tri-azido intermédiaire	179
1.	Synthèse du CTV 67 fonctionnalisé par des groupements azotures	179
1)	<i>Méthodes décrites pour obtenir un azoture aromatique</i>	179
2)	<i>Synthèse à partir du CTV tri-iodé</i>	180
3)	<i>Synthèse du CTV tri-azido 67 à partir du CTV tri-amine 33</i>	181
2.	« Chimie click » à partir du CTV tri-azido 67	183
1)	<i>Premier essai avec l'éthynylbenzène</i>	183
2)	<i>Synthèse d'un CTV fonctionnalisé par un groupement arylphosphonate via un triazole</i>	183
3)	<i>Synthèse d'un CTV fonctionnalisé par un groupement acide carboxylique via un triazole</i>	184
d.	Conclusion	185
B.	PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DES CTVs OBTENUS PAR « CHIMIE CLICK ».	186
a.	Propriétés spectroscopiques des CTVs conjugués via un lien triazole 66 et 70	186
b.	Propriétés spectroscopiques et de reconnaissance du CTV 70	187
C.	CONCLUSION	189
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	190
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	193
	PARTIE EXPERIMENTALE	199
A.	ORGANIC SYNTHESIS	200
a.	General methods and materials	200
b.	Experimental synthetic procedures	202
B.	SPECTROSCOPY	227
a.	General methods and materials	227
b.	Titration	228
C.	MICROCALORIMETRY	229
D.	DLS MEASUREMENTS	229

E. TEM MICROSCOPY	229
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230
ANNEXES	233
ANNEXE 1 : DETERMINATION D'UNE CONSTANTE D'AFFINITE PAR SPECTROFLUORIMETRIE	234
ANNEXE 2 : DETERMINATION D'UN RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE	237
ANNEXE 3 : MESURE D'UNE TENSION DE SURFACE PAR LA METHODE DE LA GOUTTE PENDANTE	239
ANNEXE 4 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION	240
ANNEXE 5 : DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	241

E. TEM MICROSCOPY	229
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230
ANNEXES	233
ANNEXE 1 : DETERMINATION D'UNE CONSTANTE D'AFFINITE PAR SPECTROFLUORIMETRIE	234
ANNEXE 2 : DETERMINATION D'UN RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE	237
ANNEXE 3 : MESURE D'UNE TENSION DE SURFACE PAR LA METHODE DE LA GOUTTE PENDANTE	239
ANNEXE 4 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION	240
ANNEXE 5 : DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIERE	241
ANNEXE 6 : NUMEROS ET STRUCTURES DES CTVs	243
RESUMES	245

Introduction générale

Dans de nombreux pays développés comme la France, un grand nombre de personnes souffrent de maladies neuro-dégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington, notamment à cause de l'allongement de la durée de vie. Selon l'INSERM,¹ la maladie d'Alzheimer, est la maladie neuro-dégénérative la plus fréquente. Elle touchait en 2010, plus de 860 000 personnes en France et on estime que le nombre de malades pourrait atteindre 2 millions de personnes, soit plus du double, d'ici 2020. Ainsi, de nombreux travaux sont dédiés à l'étude de ces maladies depuis quelques dizaines d'années. Malgré diverses avancées scientifiques sur l'origine de celles-ci, la plupart des traitements développés, visant essentiellement à réduire les symptômes de ces maladies cognitives, reposent sur des observations montrant des déficiences ou des déséquilibres concernant des neurotransmetteurs, présents dans le système nerveux central (CNS). Une meilleure compréhension des processus neuronaux, et notamment du rôle des différents neurotransmetteurs est donc essentielle.

Il existe de nombreux neurotransmetteurs au sein du système nerveux, certains sont de type peptidique, d'autres sont de plus petites molécules, telles que l'acétylcholine (ACh) et la dopamine (DA). Celles-ci sont particulièrement impliquées dans les maladies neuro-dégénératives. Les mécanismes impliquant ces molécules causant les dysfonctionnements observés, sont encore mal connus aujourd'hui. Il est donc très important de développer des outils analytiques permettant le suivi de ces espèces, *in vivo*, au cours de la transmission neuronale.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Pierre Meyrand de l'Institut des Maladies Neuro-dégénératives afin de développer de tels outils pour suivre l'acétylcholine ou la dopamine, dans un contexte fonctionnel. Les sondes moléculaires fluorescentes peuvent constituer de tels outils, comme l'ont montré différents travaux dans la littérature et au laboratoire.² Cependant, de nombreux challenges persistent.

En effet, la fluorescence est une technique analytique rapide, très sensible, et non invasive. Elle permet une détection dans le temps et l'espace et est très utilisée aujourd'hui pour l'imagerie médicale. L'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes découle du fait que l'acétylcholine ou la dopamine ne sont pas fluorescentes, et qu'aucune méthode de marquage efficace (par un fluorophore) n'a été trouvée jusqu'à présent. Ainsi, l'élaboration de sondes moléculaires fluorescentes, permettant de reconnaître sélectivement l'acétylcholine ou la dopamine, en induisant une modification de la fluorescence, a été envisagée.

Le cahier des charges pour l'élaboration de telles sondes est complexe. Tout d'abord, ces molécules doivent fonctionner en milieu physiologique. Elles ne doivent donc pas être toxiques ou perturber la transmission neuronale. En particulier, elles ne doivent pas avoir une meilleure affinité pour les neurotransmetteurs que celles des récepteurs biologiques (qui possèdent des constantes d'association d'environ 10^3 à 10^5 M⁻¹). De plus, de telles sondes doivent posséder une grande sélectivité pour la cible et ne pas être perturbées par

d'autres espèces qui pourraient être présentes dans la synapse. Une grande sensibilité est également requise, car les concentrations fonctionnelles des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, varient beaucoup et peuvent être faibles (du nM au mM). La variation du signal de fluorescence, lors de la reconnaissance de la cible, doit donc être importante.

Les premiers travaux effectués au laboratoire pour élaborer de tels outils ont été centrés sur la modification de cavitands, connus pour complexer les ammoniums, comme l'acétylcholine et la dopamine, les cyclotrivératrylènes (CTVs). Ceci afin d'améliorer les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance de ces derniers. Différentes voies ont été abordées, mais la seule qui s'est révélée prometteuse, consistait en l'introduction de groupements électro-attracteurs et électro-donneurs conjugués, sur les aromatiques des CTVs (cf. Figure 1). Ceci permet d'avoir un transfert de charge photo-induit, améliorant les propriétés spectroscopiques (longueur d'onde d'émission notamment). Les travaux présentés dans ce manuscrit sont dans la continuité de ce premier travail.

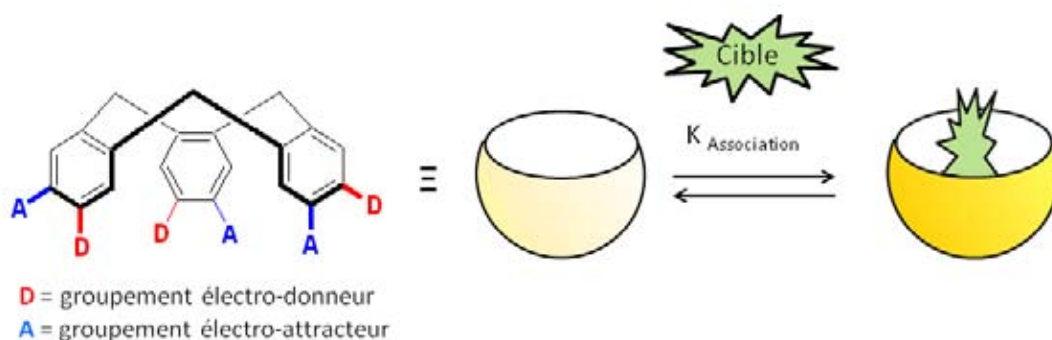


Figure 1 : Schéma du principe de fonctionnement général des sondes fluorescentes développées au laboratoire et structure des CTV utilisés.

Une étude bibliographique sur les sondes fluorescentes sera réalisée dans la première partie de ce manuscrit. En particulier, le principe et le développement de ces outils analytiques seront abordés. Nous illustrerons notre propos, en nous concentrant sur les sondes existantes, pour la détection de l'acétylcholine et de la dopamine. Nous reviendrons ensuite sur les CTVs, « template » choisis au laboratoire, pour développer des sondes fluorescentes.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous présenterons la synthèse et l'étude des propriétés de plusieurs dérivés de CTVs fonctionnalisés par différents groupements électro-attracteurs et électro-donneurs conjugués. Afin de distinguer les meilleurs couples électro-donneurs/électro-attracteurs, on évaluera le rôle des différents groupements sur les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance.

Le développement de sondes aux structures plus étendues, formant une cavité plus profonde, afin d'améliorer les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance a été ensuite envisagé. Dans un premier temps, l'extension de la conjugaison des unités aromatiques composant le CTV, a été réalisée par couplage de Sonogashira. Des couples

électro-attracteurs/électro-donneurs ont été conservés sur chaque unité aromatique, afin d'induire un déplacement bathochrome des spectres d'émission, grâce à un transfert de charge photo-induit. Pour chaque sonde synthétisée, nous avons étudié les propriétés spectroscopiques mais également leur capacité de reconnaissance par spectrofluorimétrie, ainsi que par d'autres techniques (RMN, et microcalorimétrie par exemple). Afin de varier les structures, une dernière étude tirera profit de la « chimie click » pour étendre la conjugaison. Ces deux études feront l'objet des troisième et quatrième chapitres respectivement.

Nous terminerons par une conclusion générale reprenant les résultats importants de ces diverses études pour nous permettre de définir les perspectives du projet.

- (1) Alzheimer, <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer>.
- (2) Dumartin, M.-L.; Givelet, C.; Meyrand, P.; Bibal, B.; Gosse, I. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2725–2728.

Chapitre 1 Introduction aux sondes moléculaires fluorescentes

A. Fluorescence et détection

a. La fluorescence en bref^{1,2}

1. Photoluminescence et fluorescence

La photoluminescence est un phénomène qui consiste en l'émission de photons par une molécule suite à son irradiation par un faisceau lumineux. La photoluminescence regroupe deux processus, la fluorescence et la phosphorescence, suivant la nature des états excités impliqués.

Le terme de fluorescence, introduit par Sir Georges Stokes en 1853, désigne l'émission de photon par une molécule qui a été irradiée par une onde lumineuse, sans modification de spin des états énergétiques impliqués.

Le diagramme de Perrin-Jablonski (cf. Figure 1-1) résume les divers processus impliqués dans le phénomène de photoluminescence.

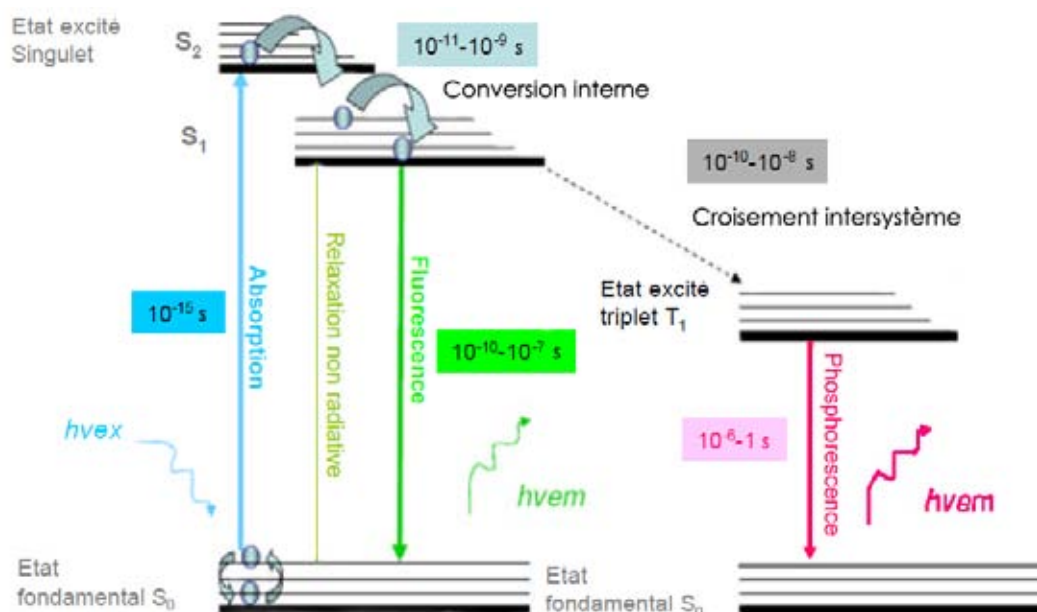


Figure 1-1 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié.

Dans un premier temps, l'onde lumineuse incidente, correspondant à un certain quantum d'énergie, permet de faire passer un électron de l'état fondamental S_0 à un état excité S_1 (cf. Figure 1-1). C'est le phénomène d'absorption. Ce phénomène est extrêmement rapide (10^{-15} s). La plupart des molécules sont excitées par absorption de photons dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant de l'ultraviolet au visible (200 à 800 nm).

L'électron à l'état excité singulet S_1 peut ensuite retourner à l'état fondamental S_0 en libérant de l'énergie sous forme d'une onde lumineuse. En 1853, Sir Georges Stokes a baptisé ce processus « fluorescence » (cf. Figure 1-1). Lors de ce processus, il n'y a pas de modification du spin de la molécule. La fluorescence est plus lente que l'absorption, et varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes (10^{-10} à 10^{-7} s).

Dans certains cas, l'électron passe par un état excité triplet intermédiaire T_1 , avant d'émettre un photon pour retourner à son niveau d'énergie fondamental S_0 (cf. Figure 1-1). Le passage d'un état excité singulet à un état excité triplet est appelé croisement intersystème. Dans ce cas, il y a modification du spin de la molécule. Ce processus est non radiatif, et dans la majorité des cas moins probable que la fluorescence. L'émission d'un photon qui accompagne le retour d'un électron de l'état triplet excité T_1 à l'état fondamental S_0 , peut alors avoir lieu. La désexcitation par émission d'un photon entre deux états de multiplicité différentes est appelé phosphorescence. Ce processus est généralement plus lent que la fluorescence (10^{-7} à 1 s).

Enfin, dans certains cas l'électron peut revenir à son état fondamental sans émission de photon par des voies de transition non radiatives (cf. Figure 1-1). Celles-ci sont plus ou moins fréquentes en fonction de l'environnement. L'inhibition de la fluorescence peut être dynamique, lorsque la désexcitation a lieu par collision avec une autre molécule (appelé quencheur). A l'inverse elle peut être statique, lorsqu'elle a lieu par interaction avec des molécules de solvant ou à cause de la formation d'un complexe à l'état fondamental.

Plusieurs niveaux vibrationnels existent pour chaque niveau énergétique. La désexcitation d'un électron vers le niveau vibrationnel de plus faible énergie est très fréquente. Ce processus est appelé conversion interne. Il est extrêmement rapide (10^{-11} à 10^{-9} s) et induit une perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis par fluorescence (cf. Figure 1-1).

2. Les grandes caractéristiques d'un fluorophore en optique linéaire

Une molécule pouvant être impliquée dans un processus de fluorescence est appelé un fluorophore. Celle-ci possède plusieurs caractéristiques dans un milieu donné :

- ✓ *Son coefficient d'extinction ou d'absorption molaire ε ($M^{-1}.cm^{-1}$).* Celui-ci reflète la probabilité d'absorption de la molécule à une longueur d'onde donnée. L'intensité de fluorescence sera d'autant plus élevée que le coefficient d'absorption molaire sera grand, pour une intensité lumineuse incidente donnée. D'autres phénomènes pouvant entrer en compétition avec le processus de fluorescence, cette condition n'est pas suffisante.

- *Le spectre d'excitation* et plus particulièrement la *longueur d'onde correspondant au maximum d'excitation* $\lambda_{ex\ max}$ (nm). Le spectre d'excitation est souvent identique au spectre d'absorption.
- *Le spectre d'émission* et la *longueur d'onde correspondant au maximum d'émission* $\lambda_{em\ max}$ (nm). Les conversions internes ainsi que d'autres processus (détaillés plus tard) sont responsable d'une perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis. Ce qui se traduit par un déplacement bathochrome du spectre d'émission par rapport au spectre d'absorption. La différence $\lambda_{ex\ max} - \lambda_{em\ max}$ est appelé déplacement de Stokes. La détection du signal de fluorescence sera d'autant meilleure que celui-ci est grand. Dans le cas d'un déplacement de Stokes faible, il sera difficile de détecter de façon efficace le signal émis par rapport au signal d'excitation sur des installations fonctionnant de façon droite comme les microscopes. Le recours à des filtres sera nécessaire, mais induira une perte du signal émis. De plus, si le recouvrement des spectres d'absorption et d'émission est important, une réabsorption des photons émis peut se produire.
- *Le rendement quantique de fluorescence* Φ_F . Celui-ci correspond à la probabilité d'émission d'un photon par le processus de fluorescence, lorsque qu'un photon est absorbé par la molécule. Aussi, il n'a pas d'unité et il est toujours inférieur ou égale à un. Le produit du rendement quantique de fluorescence par le coefficient d'extinction molaire est appelé la *brillance*.
- *Le temps de vie de fluorescence* τ (s). Par analogie avec celui des isotopes, il correspond à la durée pendant laquelle le fluorophore demeure dans un état excité, avant de redescendre à son état fondamental en émettant un photon. Il est typiquement compris entre quelques picosecondes à quelques centaines de nanosecondes. Un fluorophore sera d'autant plus sensible que ce temps sera court.

3. Effet de l'environnement et autres processus impliquant une molécule à l'état excité.

Les différentes caractéristiques citées ci-dessus sont dépendantes de l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore. Des modifications de ces dernières, plus ou moins importantes peuvent avoir lieux sous l'effet de différents facteurs résumés sur la Figure 1-2.

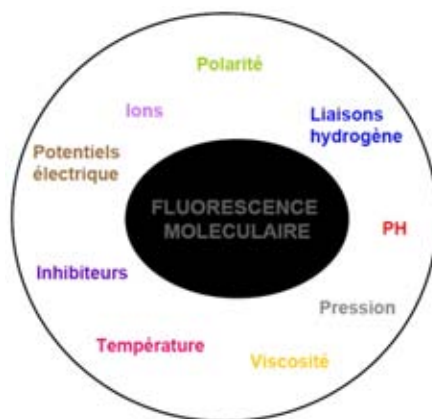


Figure 1-2 : Paramètres pouvant influencer sur l'émission de fluorescence¹

Les paramètres les plus courants pouvant influencer sur l'efficacité des voies de désexcitation non radiatives entre autres, sont la température, la viscosité du milieu, le pH, le potentiel électrique ou encore la polarité du milieu. Une température élevée favorise les collisions intermoléculaires et diminue ainsi le plus souvent le rendement quantique de fluorescence. Cette sensibilité à divers paramètres est exploitée pour le développement de sondes fluorescentes, comme nous le verrons plus tard.

Une molécule à l'état excité peut être impliquée dans de nombreux processus en plus de ceux déjà évoqués (cf. Figure 1-3). Certains sont intramoléculaires, d'autres sont intermoléculaires. Ils entrent tous en concurrence avec l'émission de fluorescence à partir de l'état excité atteint par absorption d'un photon. Ces différents processus sont plus ou moins dépendants de l'environnement.

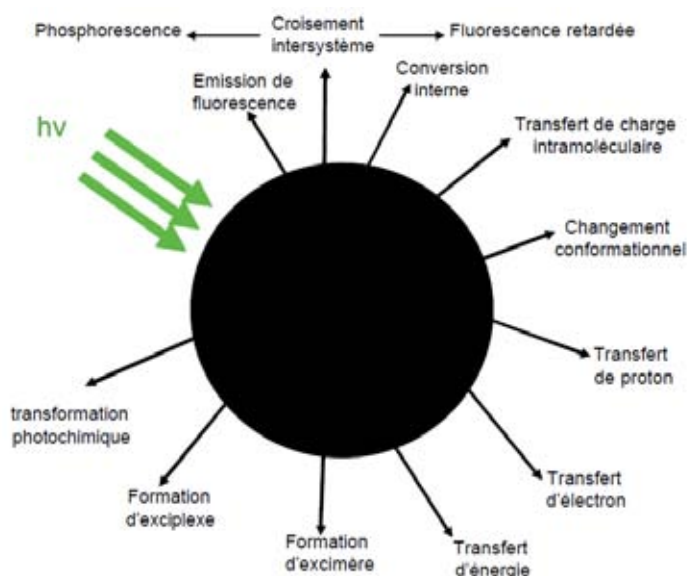


Figure 1-3 : Phénomènes possibles suivant l'excitation d'une molécule par irradiation lumineuse¹

Une molécule excitée a tendance à être plus réactive qu'à son état fondamental. En effet, le potentiel redox, le potentiel acido-basique, la densité électronique et d'autres caractéristiques de la molécule sont modifiées à l'état excité. Ainsi des processus comme des

transferts de protons, d'électrons ou de charge au sein d'une même molécule afin d'atteindre un état énergétique plus stable peuvent avoir lieu. L'émission d'un photon à partir de l'état excité plus stable, atteint suite à l'un de ces processus, permet de revenir à l'état fondamental. Ainsi, ces processus n'impliquent pas de modification chimique définitive de la molécule.

Ces mêmes processus peuvent également avoir lieu de façon intermoléculaire, comme les transferts d'énergie.

En revanche, des réactions irréversibles peuvent se produire à l'état excité, conduisant à la formation de photo-produits. Ceux-ci sont différents de la molécule de départ et posséderont donc des spectres d'absorption et d'émission différents. Ces réactions photochimiques impliquent une perte progressive de la fluorescence initiale. Cet effet est appelé photo-blanchiment. Certaines molécules à l'état excité ou photo-produits peuvent avoir une action néfaste en milieu biologique. Ils sont dits photo-toxiques. Ceci est mis à profit pour développer la photothérapie.

b. Optique non linéaire et excitation multiphotonique

Le passage d'un électron de l'état fondamental à un état singulet de plus haute énergie peut se faire par apport d'énergie *via* un photon, mais pas uniquement. En effet, en 1931 Maria Göpper-Mayer³ (prix Nobel de physique) fut la première à démontrer théoriquement, que deux photons simultanément absorbés pouvaient conduire à un état excité. Il faudra attendre 1961, et l'apparition de lasers puissants pour que Kaiser *and co.*⁴ mettent en évidence expérimentalement ce processus sur un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{3+}$.

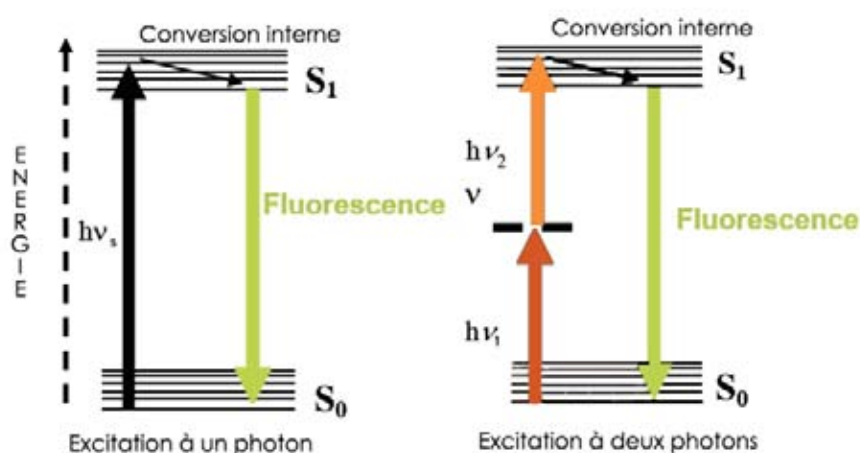


Figure 1-4 : Excitation monophotonique et biphotonique et diagramme de Jablonski

Ce processus peut paraître simple si l'on considère qu'il faut deux photons d'énergie égale à la moitié de la valeur de la transition impliquée, mais ce n'est pas le cas. Le processus d'absorption à deux photons est un processus non linéaire, lié au caractère non linéaire de la

polarisation induite par une source lumineuse incidente très intense.^{3,5,6} La théorie quantique de l'absorption multiphotonique ne sera pas abordée ici. Seule une comparaison entre le processus d'émission de fluorescence suite à une absorption monophotonique et multiphotonique sera proposée.

Dans le cas d'une absorption monophotonique, le nombre de photons absorbés par unité de temps et de volume est donné par la relation suivante :

$$N = \sigma * C * F$$

où C est la concentration en fluorophore (en molécule.cm⁻³), σ la section efficace d'absorption à un photon (en cm⁻².molécule⁻¹) et F le flux de photons incident (en photons.cm⁻².s⁻¹).

Le plus souvent un fluorophore est caractérisé, en optique linéaire, par son coefficient d'absorption molaire (ϵ en mole⁻¹.cm⁻¹, cf. rubrique précédente). Ce paramètre peut être relié à la section efficace d'absorption à un photon par la relation suivante :

$$\sigma = 2,3 * \epsilon * M/C \text{ où } M \text{ le nombre de moles de fluorophore contenues dans la solution}$$

La section efficace d'absorption à un photon est de l'ordre de 10⁻¹⁷ cm².molécule⁻¹.

En revanche, dans le cas d'une absorption à deux photons, Fisher *and co.* ont montré que le nombre de photons absorbés variait de façon quadratique avec l'intensité incidente, selon la relation :⁷

$$N = \delta * C * F^2$$

où δ est la section efficace d'absorption à deux photons (en cm⁴.s.molécule⁻¹.photon⁻¹).

La section d'absorption efficace à deux photons est beaucoup plus faible que celle à un photon et typiquement de l'ordre de 10⁻³⁰ - 10⁻⁵⁰ cm⁴.s.molécule⁻¹.photon⁻¹. L'unité la plus couramment utilisée est le Göper-Mayer GM (1 GM = 10⁻⁵⁰ cm⁴.s.molécule⁻¹.photon⁻¹). Le processus d'absorption multiphotonique n'étant pas linéaire, la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption à deux photons, n'est pas le double de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption à un photon.

L'excitation de molécule par excitation monophotonique, se fait la plupart du temps grâce à des sources continues de lumières visibles ou UV, de type laser à argon ou lampe à vapeur de mercure. Ces sources lumineuses sont inadaptées pour de l'optique non linéaire, car trop peu puissantes. Il faut des sources 100 à 1000 fois plus puissantes, telles que les lasers impulsions femtosecondes ou picosecondes pour pouvoir exciter efficacement un fluorophore, à deux photons.⁸

Les meilleurs fluorophores purement organiques excitables à deux photons, sont des systèmes de type « push-pull ». Ce sont des molécules aux systèmes π riches, planes,

substituées à chaque extrémité par un groupement électro-donneur et un groupement électro-accepteur.^{6,9-14}

L'excitation à deux photons présente de nombreux avantages dans l'optique d'une application *in vivo*^{6,8,15,16} par rapport à l'excitation à un photon.

- ✓ La *résolution spatiale*. L'intensité requise pour avoir une absorption à deux photons n'est atteinte qu'au point focal (cf. Figure 1-5).^{6,8} Le volume concerné est très petit et dépend de la longueur d'onde.⁶ Ainsi une meilleure résolution spatiale est offerte par cette méthode d'excitation.



- ✓ La *bonne séparation entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission*. Il n'y a pas de recouvrement possible des spectres d'excitation et d'émission. Ainsi il n'y a pas de soucis de bruit lié au faisceau incident en microscopie.
- ✓ La *meilleure pénétration à travers les tissus*. La plupart des tissus biologiques absorbent la lumière dans l'ultra-violet et le proche visible aussi, il est très intéressant de pouvoir utiliser des longueurs d'onde d'excitation d'énergie plus faibles.

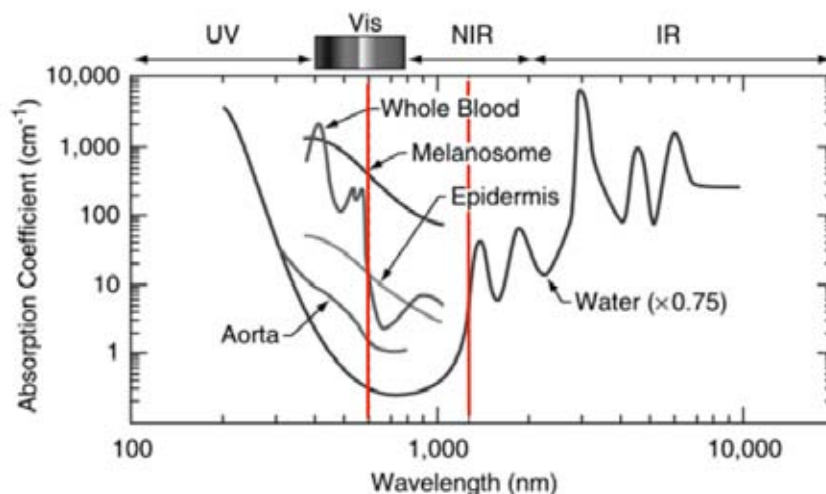


Figure 1-6 : Absorbance de différents tissus, espèces biologiques, permettant de définir une fenêtre idéale d'utilisation entre 600-1100 nm.¹⁶

- ✓ Une *dégradation de l'échantillon limitée*. En effet, les longueurs d'ondes utilisées étant peu énergétiques, elles sont moins néfastes pour les cellules. De plus, seule la région du point focal est concernée par d'éventuels dommages (photo-dégradation, photo-blanchissement).

Finalement, la fluorescence (par excitation monophotonique ou biphotonique) est un processus très intéressant pour développer des outils de détection notamment en milieu biologique. En effet, elle est très sensible et permet d'avoir une haute résolution spatiale et temporaire. Elle est non invasive (contrairement à beaucoup d'autres), non destructive et facile à mettre en œuvre.^{1,17,18,19} Ainsi, elle est utilisée dans le développement de traceurs moléculaires ou de marqueurs.^{20,21} Dans ce cas un fluorophore (type bodipy, fluorescéine ou coumarine par exemple) est greffé de façon covalente à l'espèce que l'on souhaite suivre. Aujourd'hui, de très nombreux analogues de molécules biologiques (comme les acide aminés, ou les bases azotées de l'ADN) sont également développés afin d'étudier des structures comme les protéines, ou l'ADN par exemple.^{20,21} Dans le cas particulier de la détection des ions ou petites molécules, de nombreuses sondes moléculaires fluorescentes sont développées aujourd'hui. Le principe et les caractéristiques de ces dernières seront présentés dans la partie suivante.

c. Les sondes moléculaires fluorescentes

La notion de détection d'une molécule implique la réponse à la question suivante « cette molécule est-elle présente ou non dans le milieu ? ». Pour cela il va falloir développer un outil analytique qui permet à la fois de réaliser un processus de reconnaissance de l'espèce mais également de signalisation. Cette outil appelé sonde moléculaire/supramoléculaire, est donc composé de deux éléments comme le précise la définition IUPAC de 1999. Le premier est un *récepteur moléculaire*, dédié au processus de reconnaissance et le second est un *capteur physicochimique*, pour le processus de

signalisation (cf. Figure 1-7). Dans notre cas, ce dernier sera un fluorophore. Ainsi, comme le résume E. V. Anslyn une sonde moléculaire est « a receptor that interacts with an analyte producing a detectable change of signal [*fluorescence*] ». ²² La modification du signal de fluorescence peut porter sur un ou plusieurs paramètres caractéristiques du fluorophore (rendement quantique de fluorescence, par exemple). La réversibilité du processus de reconnaissance est très importante pour celui de la détection. Tout d'abord, ceci permet d'avoir une détection « multi-usage ». Ensuite, c'est essentiel afin de ne pas perturber les processus biologiques impliquant la cible, en modifiant chimiquement celle-ci de façon non réversible.

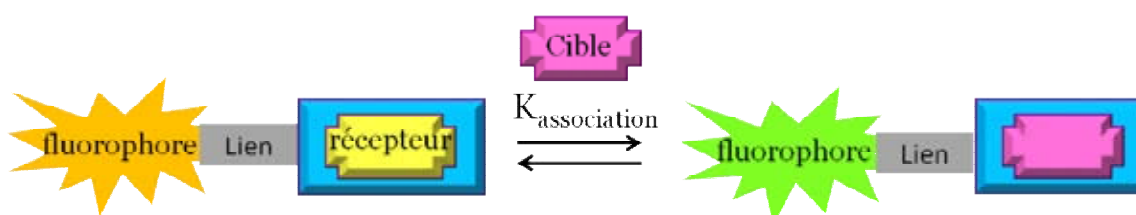


Figure 1-7 : Schéma général de fonctionnement d'une sonde moléculaire.

Afin d'avoir une réponse la plus adaptée possible, les différents paramètres caractéristiques de la sonde à prendre en compte, sont listés ci-dessous : ²³

- ✓ *Sensibilité* : variation du signal (intensité, déplacement) par unité de concentration de la cible.
- ✓ *La limite de détection* : la plus petite concentration qui peut être détectée de façon fiable (facteur à définir, on prend souvent une limite égale à 2,5 fois le bruit de fond).
- ✓ *La zone de détection dynamique* : la gamme de concentration entre la limite de détection et la valeur maximale de concentration détectable. Elle correspond le plus souvent à la zone de concentration pour laquelle la réponse est proportionnelle à la concentration, aussi appelée zone de linéarité.
- ✓ *La sélectivité* : capacité de la sonde à répondre de façon plus sensible à une cible ou famille de cible. Elle peut être quantifiée par des ratios de constante d'association par exemple.
- ✓ *La résolution* : la plus petite variation de concentration de la cible détectable autour d'une valeur initiale
- ✓ *Le temps de réponse* : temps nécessaire pour observer une modification de la réponse de la sonde entre une concentration nulle et une concentration donnée en cible.
- ✓ *La stabilité* : temps maximum au cours duquel la réponse de la sonde reste fiable dans un environnement donné.

Pour détecter le signal de fluorescence un capteur physique est utilisé (capteur LCD, par exemple). Les caractéristiques de celui-ci ainsi que celles de la source lumineuse utilisée pour exciter le fluorophore, sont à prendre en considérations afin d'estimer les performances globales du système.

Trois types de sondes fluorescentes peuvent être distingués selon B. Valeur, en fonction du lien entre la partie réceptrice et la partie fluorophore composant la sonde moléculaire fluorescente :¹

- ✓ les *sondes fluorescentes intrinsèques*, lorsque la partie récepteur et la partie fluorophore sont confondues.
- ✓ les *sondes fluorescentes extrinsèques liées de façon covalente* ; lorsque la partie récepteur et la partie fluorophore sont différentes mais liées de façon covalente.
- ✓ les *sondes fluorescentes extrinsèques liées de façon non covalente* ; lorsque la partie récepteur et la partie fluorophore sont distinctes et reliées par des interactions intermoléculaires non covalentes, formant une sonde supramoléculaire fluorescente.

Dans le cas où la partie récepteur et la partie fluorophore sont identiques ou liées de façon covalente, la détection se fait de façon directe (cf. Figure 1-8). Par opposition lorsque la partie réceptrice et la partie fluorophore sont liées de façon non covalente, la détection se fait de façon indirecte par déplacement du fluorophore (cf. Figure 1-8). Cette seconde méthode est appelée détection par déplacement d'indicateur.^{1,24,25,26}

Ce procédé de déplacement d'indicateur est plus facile à mettre en œuvre d'un point de vue conception car la partie réceptrice peut être optimisée uniquement en pensant aux propriétés de reconnaissance de la cible. Un fluorophore commercial possédant une structure proche de la cible est utilisé pour former la sonde moléculaire fluorescente. Cependant, ce procédé présente certaines limites par rapport à la méthode directe. Tout d'abord, plusieurs processus de reconnaissance (entre le récepteur et le fluorophore d'une part et le récepteur et la cible d'autre part) étant mis en jeu, les mécanismes et cinétiques sont donc plus compliqués. La sélectivité pour la cible par rapport au fluorophore est un paramètre crucial pour la détection. Ensuite, le suivi spatio-temporel du complexe formé n'est pas possible dans ce cas. Seul le fluorophore libéré pourra être tracé. De plus, la détection sera rendue inefficace, si le fluorophore non lié de façon covalente, est séparé définitivement du récepteur. Ainsi ce type de sonde ne peut être utilisé pour détecter des molécules *in vivo*.

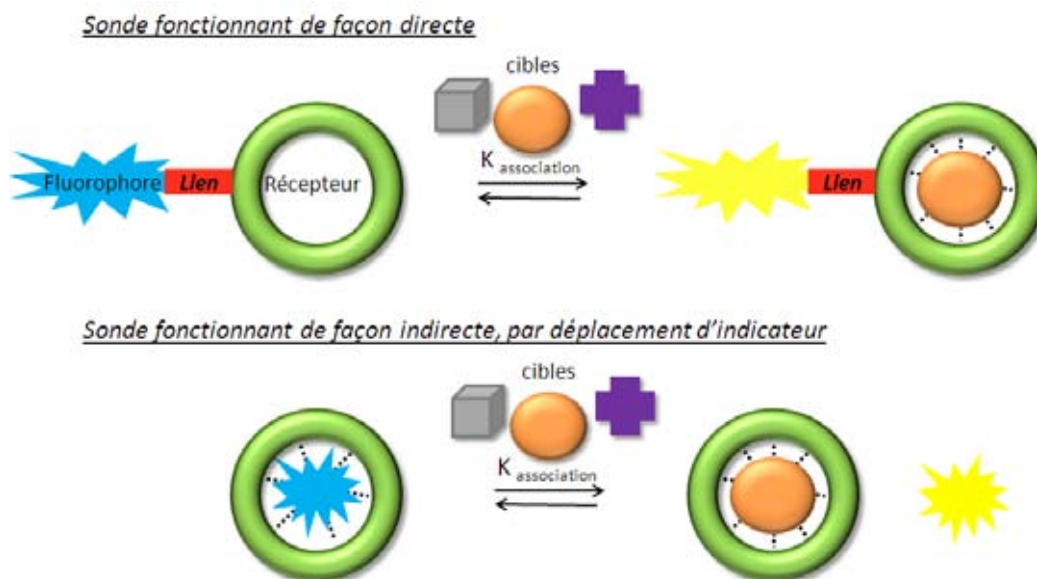


Figure 1-8 : Principe des sondes moléculaires fluorescentes directes et celles indirectes par déplacement d'indicateur.

Dans le cas des sondes fonctionnant de manière directe, divers processus permettent de détecter l'association de la sonde moléculaire fluorescente avec sa cible. Les différents mécanismes induisant une modification de la fluorescence seront détaillés dans la partie suivante.

d. Divers processus permettant la détection par fluorescence

Différents phénomènes peuvent avoir lieu suite à l'irradiation lumineuse d'une molécule (cf. figure 1-6). Or, la plupart de ces phénomènes dépendent de l'environnement et peuvent être ainsi mis à profit pour détecter une molécule. Il faut en distinguer deux types. Le premier type, concerne les transformations photochimiques irréversibles, on parle alors de « *chemodosimeter* » et non plus de « *chemosensor* ». ^{27,28,29,30} Ces phénomènes sont souvent spécifiques mais ils ne permettent qu'une détection à usage unique, à cause de leur caractère irréversible. Le second type, sur lequel nous allons nous concentrer concerne les processus réversibles, qui ont lieu pour la majorité à l'état excité, comme le transfert de charge photo-induit, le transfert résonant d'énergie, le transfert d'électrons photo-induit par exemple. Ces processus vont être perturbés lors de la complexation induisant ainsi des changements sur un ou plusieurs paramètres caractéristiques du fluorophore (longueur d'onde d'excitation et/ou d'émission, rendement quantique, temps de vie etc.). ^{1, 2, 19, 31}

Ces phénomènes réversibles peuvent impliquer un seul fluorophore comme pour le cas du transfert de charge photo-induit, ou plusieurs comme par exemple pour le mécanisme de formation d'excimères. Nous nous intéresserons dans un premier temps aux mécanismes ne faisant appel qu'à un seul fluorophore, puis à ceux faisant appel à plusieurs.

1. Mécanisme de transfert d'électron photo-induit (PET)

La fluorescence correspond à la désexcitation d'un électron depuis un état singulet excité jusqu'à son état fondamental par émission d'un photon, suite à une irradiation lumineuse (cf. diagramme de Perrin-Jablonski, Figure 1-1). Cette désexcitation peut également avoir lieu par un processus d'oxydo-réduction impliquant un transfert d'électron photo-induit.^{2,1,31,32,17} L'exaltation des propriétés d'oxydo-réduction du fluorophore à l'état excité est responsable de ce processus. La présence d'une autre espèce oxydante ou réductrice complémentaire est nécessaire pour avoir une réaction d'oxydo-réduction. Ce mécanisme est ainsi beaucoup utilisé dans la complexation de cations métalliques.

Deux cas de figure existent. Le premier, correspond au cas où le fluorophore à l'état excité joue le rôle d'oxydant (accepteur d'électron) et la partie complexante celui de réducteur (donneur d'électron). Dans ce cas, une paire d'électrons libres de la partie complexante possède une énergie intermédiaire entre la HOMO et la LUMO du fluorophore. La désexcitation se fait par transfert d'un électron de cette paire vers la HOMO du fluorophore ; celui-ci est donc réduit. Cette voie de désexcitation est non radiative et le rendement de fluorescence du fluorophore est donc quasiment nul. Dans le cas où la partie récepteur, riche en électrons, reconnaît une espèce complémentaire pauvre en électron, la densité électronique de cette partie récepteur sera abaissée. Cette meilleure répartition de la densité électronique conduira à une diminution de l'énergie de la HOMO du complexe formé. Le transfert d'électron photo-induit ne sera alors plus favorable. Aussi le rendement quantique du fluorophore sera recouvré, on parle de « système off-on ».

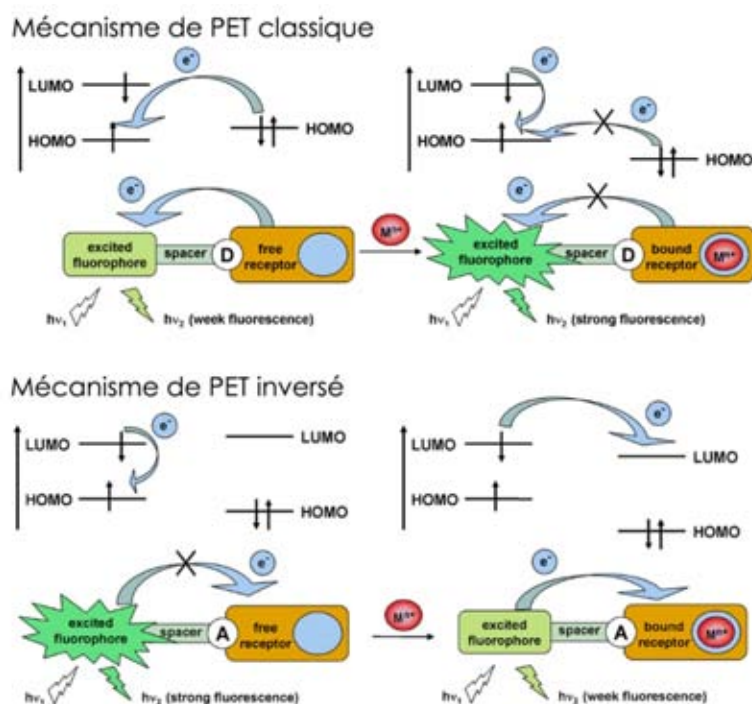


Figure 1-9 : Mécanisme de PET classique et de PET inversé.¹⁷

Dans l'autre cas le fluorophore joue le rôle de réducteur et l'unité complexante celle d'oxydant. On parle alors de système de PET inversé. Dans ce cas la partie complexante est peu riche en électrons alors que le fluorophore est plutôt riche. Aussi, aucun transfert d'électron n'a lieu. En revanche, la complexation d'une molécule pauvre en électrons par l'unité complexante a pour effet d'abaisser l'énergie de la LUMO du récepteur et permet un transfert d'électron entre la LUMO du fluorophore et la LUMO du complexe formé (entre la partie complexante et la cible cette fois). Ce transfert d'électron a pour conséquence d'éteindre la fluorescence, on parle alors de « système on-off ».

Dans les deux cas, le suivi de l'intensité de fluorescence ainsi que de la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission permettent de suivre la reconnaissance.

2. Transferts de charge photo-induit (PCT)

Il existe plusieurs types de transfert de charge photo-induit, les transferts de charge intramoléculaires (PCT), les transferts de charge accompagnés d'une rotation interne (changement de conformation) (TICT) et enfin les transferts de charge entre un métal et son/ses ligands (MLCT).^{2,1,31 et références incluses}

Les molécules qui ne sont pas de pures hydrocarbures et qui contiennent des hétéroatomes ont un moment dipolaire différent à l'état fondamental et à l'état excité à cause d'un transfert de charge photo-induit. Ce phénomène est exalté par la conjugaison de groupements électro-donneurs (amines, alcools, éthers) et de groupements électro-attracteurs (cétones, aldéhydes, nitriles, nitrites) comme dans les molécules de type « push-pull ».

Pour ces fluorophores, l'état excité atteint après absorption d'un photon, appelé état de Franck-Cordon, ou état localement excité (LE) n'est pas en équilibre avec le solvant lorsque celui-ci est polaire (cf. Figure 1-11Figure 1-10). Ceci à cause de la variation du moment dipolaire entre l'état fondamental et l'état localement excité (LE). Les molécules de solvant de la couche de solvation vont donc tourner pendant la durée de vie de l'état excité jusqu'à atteindre un état d'équilibre thermodynamique appelé état de transfert de charge intramoléculaire relaxé (ICT) pour le fluorophore. Ces systèmes sont donc très sensibles à la polarité du solvant, qui a pour effet des stabiliser plus ou moins leur état excité. Ainsi, ils constituent souvent de bonnes sondes de polarité. Ils sont également sensibles aux liaisons hydrogènes qui peuvent affecter le caractère donneur ou accepteur d'électron de la plupart des groupements.^{1,2,31}

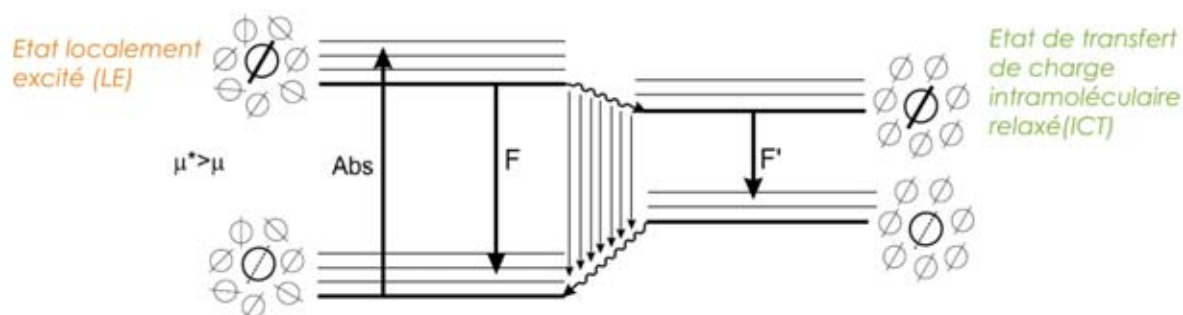


Figure 1-10 : Relaxation du solvant autour d'un fluorophore possédant une modification de son moment dipolaire à l'état excité.

Le transfert de charge photo-induit qui a lieu au niveau du fluorophore peut être modifié lors de la complexation notamment de cations. Deux cas sont à distinguer là encore. Ceux-ci seront illustrés à travers la complexation d'une cible pauvre en électrons comme un cation.

Le premier cas concerne celui où la cible interagit avec le groupement électro-donneur (cf. Figure 1-11, 1^{er} cas). Suite à la complexation ce groupement sera appauvri en électrons, son caractère donneur sera donc plus faible. Le transfert de charge ayant lieu à l'état excité sera donc moins efficace dans le complexe formé. La stabilisation énergétique de l'ICT sera donc moins grande. Le maximum d'émission sera donc déplacé vers le bleu, on parle alors de déplacement hypsochrome.

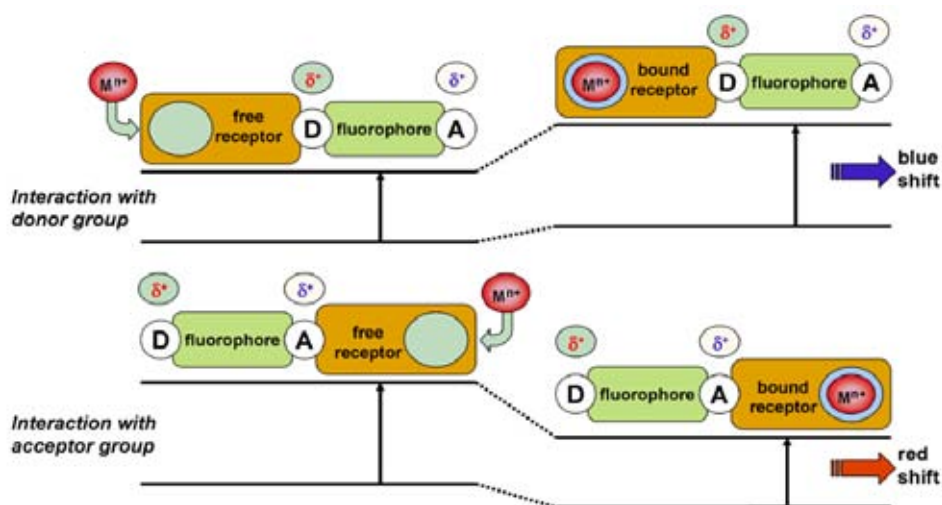


Figure 1-11 : Illustration des deux évolutions possibles de l'énergie de l'état excité lors de la complexation d'un cation par un fluorophore subissant un PCT.¹⁷

Dans le second cas, la complexation a lieu avec la partie électro-attractrice (cf. Figure 1-11, 2^{ème} cas). La complexation de la cible va renforcer le caractère attracteur de ce groupement et donc favoriser le transfert de charge photo-induit. L'état excité après relaxation du solvant ICT sera de plus basse énergie. Aussi, la longueur d'onde maximale d'émission sera déplacée vers le rouge, on parle de déplacement bathochrome.

En plus des déplacements induits, lors de la complexation des modifications du rendement quantique de fluorescence, sont également courantes. La détection par fluorescence se fait donc là encore par suivi de l'évolution de l'intensité de fluorescence et du maximum d'émission.

Le transfert de charge à l'état excité peut également être accompagné dans certains cas, d'une rotation interne, lors de la relaxation, jusqu'à atteindre un état excité plus stable.^{2,1,31} et références incluses Ce nouvel état relaxé atteint après rotation, est appelé *état de transfert de charge intramoléculaire twisté (TICT)*. L'angle de la rotation dépend des groupements impliqués, et du solvant. Cet état TICT est plus stable que l'état ICT car la séparation de charge est alors meilleure. Il correspond donc à une bande d'émission déplacée vers le rouge.

Ce mécanisme peut être impliqué dans des processus de détection moléculaire si cette rotation est perturbée en présence de la cible. De plus, ce type de fluorophore est particulièrement sensible à la viscosité du milieu.

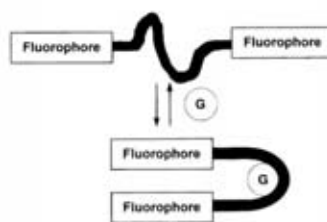
3. Polarisation de l'émission de fluorescence

L'étude de la polarisation de l'émission de fluorescence (l'excitation devant être polarisée) peut également être utilisée comme mécanisme de détection mais elle est plus spécifique au cas des très grosses molécules (type ADN) ou des fluorophores supportés. En effet, classiquement la rotation des molécules étant plus rapide que la durée de vie de l'état excité, l'étude de l'anisotropie de fluorescence est peu intéressante. En revanche, elle le devient lorsque la mobilité du fluorophore est minimisée. Nous ne détaillerons pas plus cette technique car nous nous intéressons aux petites molécules en solution.

4. Formation d'excimères

Les structures poly-aromatiques sont connues pour faire des liaisons non-covalentes de type π - π qui les rapprochent les unes des autres pouvant conduire à la formation de dimères. Lorsqu'il y a formation d'un dimère entre un fluorophore excité et un fluorophore dans son état fondamental, on obtient un dimère à l'état excité appelé *excimère*.^{2,1,31} L'excimère présente un état excité plus stable que le monomère. Ainsi, l'émission de fluorescence de celui-ci sera décalée vers le rouge. Le spectre d'émission des excimères est large car ils ne possèdent pas de bandes vibrationnelles. La formation de telles structures est influencée par la concentration et la viscosité du milieu. Elle peut également être modifiée par un processus de complexation, lorsque deux fluorophores sont greffés sur un récepteur. Soit la formation d'excimères est favorisée par la complexation, soit la complexation bloque l'approche des deux fluorophores (cf. Figure 1-12).

Cas où la formation d'excimères est favorisée



Cas où la formation d'excimères est bloquée

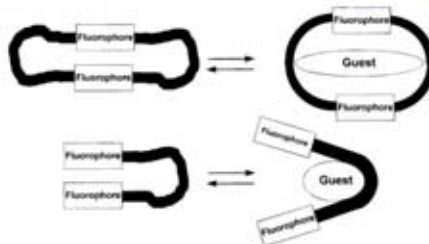


Figure 1-12 : Formation d'excimères et complexation.³¹

La détection a lieu *via* l'observation de l'évolution du rapport de la bande d'émission (rapport d'intensités ou d'aires) correspondant aux monomères comparée à celle correspondant aux excimères.

5. Transfert d'énergie résonnant (FRET)¹

Lorsqu'un fluorophore est porté à son état excité il peut se désexciter en émettant de la lumière. Le photon émis par ce donneur peut être réabsorbé dans certains cas par une molécule acceptrice, chimiquement différente, ou identique. On parle dans ce cas de transfert d'énergie radiatif, car l'énergie est véhiculée par un photon. Ce transfert ne nécessite pas d'interactions entre les deux partenaires. En revanche, il faut qu'il y ait un recouvrement spectral pour ces deux espèces. De plus ce processus est fortement dépendant de la concentration (et donc de la distance entre les deux partenaires).

Cette réabsorption a pour conséquence de diminuer le rendement de fluorescence et de modifier le spectre d'émission du fluorophore. L'intensité diminue pour les longueurs d'onde d'émission qui correspondent aux longueurs d'onde d'absorption de l'accepteur. On parle alors d'effet de filtre interne.¹ Ce phénomène est particulièrement gênant dans les cas des fluorophores aux déplacements de Stokes faibles.

Un transfert d'énergie non radiatif, à l'inverse, peut avoir lieu dans certain cas entre un fluorophore donneur et une espèce « accepteur ». Celui-ci ne passe pas par l'émission d'un photon contrairement au cas précédent, d'où le terme « non-radiatif ». Il est la conséquence d'interaction entre les deux espèces mise en jeu. Ces interactions peuvent avoir lieu à courte distance ($< 10 \text{ \AA}$), dans le cas d'un recouvrement orbitalaire par exemple. Des

interactions à longue distance (jusqu'à 100 Å) type dipôle-dipôle, sont également envisageables. C'est le mécanisme de Förster.

Comme dans le cas précédent, un recouvrement partiel du spectre d'émission du donneur et de celui d'absorption de l'accepteur est nécessaire. Il faut qu'il existe une correspondance en énergie entre une transition vibronique du donneur et une transition vibronique de l'accepteur (cf. Figure 1-13). Celles-ci sont alors en résonance, d'où le terme de transfert d'énergie résonnant (FRET).¹

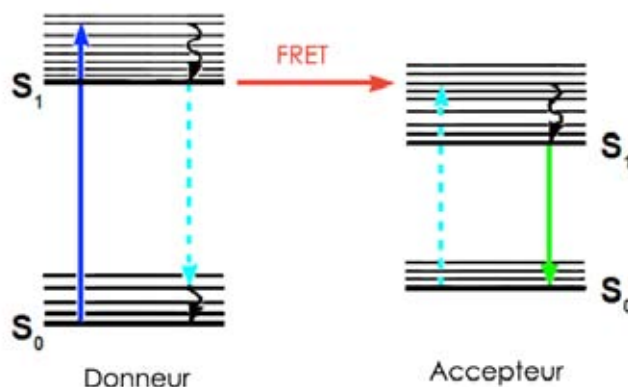


Figure 1-13 : Mécanisme de FRET et diagramme de Jablonski

Le mécanisme de Förster peut être utilisé pour déterminer des distances ou détecter une espèce. Pour cela, il faut qu'un couple donneur-accepteur de FRET soit greffé sur un récepteur. Le transfert d'énergie est régi par l'équation suivante : $\phi_T = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}$ où R_0 est le rayon critique de Förster.^{1,33} Celui-ci dépend du facteur d'orientation entre les deux molécules, du rendement quantique de fluorescence du donneur, de l'indice de réfraction du milieu, du recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et celui d'absorption de l'accepteur et enfin du coefficient d'absorption molaire de l'accepteur. Plusieurs de ces paramètres peuvent être modifiés lors de la complexation perturbant ainsi le processus de FRET. La prédiction de l'évolution quantitative du phénomène de FRET est très difficile.

Quelque soit le mécanisme utilisé pour le processus de signalisation, il est nécessaire d'avoir interaction entre la cible et la sonde à travers un processus de reconnaissance moléculaire. A présent, arrêtons-nous plus en détail sur ce processus de reconnaissance.

B. Sondes moléculaires fluorescentes et reconnaissance

a. Le processus de reconnaissance moléculaire

Le terme de reconnaissance moléculaire a été défini en 1977 par le prix Nobel J-M Lehn, comme étant la fixation sélective d'un substrat/cible par un récepteur, avec parfois une fonction spécifique associée.³⁴ La structure formée, suite à un processus de reconnaissance moléculaire, est régit la plus part du temps, par plusieurs interactions intermoléculaires, et est appelée supermolécule ou complexe. Ce complexe est caractérisé par sa stabilité et sa sélectivité (thermodynamique et cinétique). Celles-ci résultent d'un équilibre subtil entre la solvation (du récepteur et du substrat) et la complexation (qui peut être vue comme la solvation du substrat par le récepteur). Ainsi, le solvant joue un rôle dans la complexation selon les interactions intermoléculaires mises en jeu. Lorsque les interactions régissant le complexe sont de types ioniques par exemple, la polarité du solvant et la force ionique du milieu jouent un rôle décisif.

La reconnaissance moléculaire est basée sur un principe de double complémentarité, celui de la complémentarité géométrique, mais aussi celui de la complémentarité énergétique (ou électronique).^{35,36} Une bonne reconnaissance d'un récepteur pour une cible donnée implique une bonne sélectivité pour celle-ci. Pour avoir une bonne sélectivité pour une cible il faut tenir compte de nombreux facteurs.

Les deux premiers facteurs concernent les sites d'interactions :

- ✓ La *complémentarité stérique* (forme et taille) entre la cible et le récepteur. Ce principe de complémentarité géométrique a été énoncé par Emil Fisher en 1894, et résumé à travers la célèbre image de la « clé et de la serrure ».

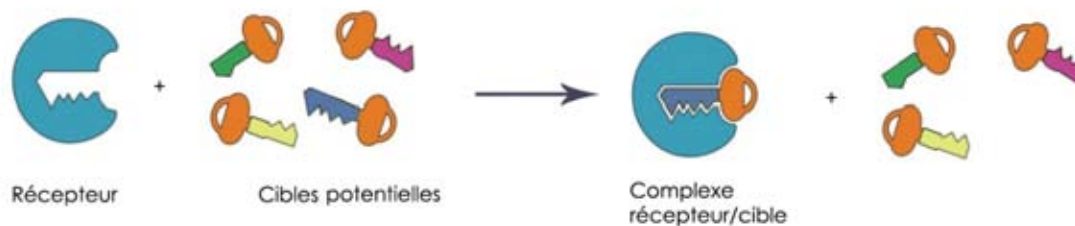


Figure 1-14 : Illustration de la complémentarité stérique par l'image de la clé et de la serrure.

- ✓ La *complémentarité énergétique*. Le récepteur et le substrat doivent avoir des distributions électroniques et nucléaires complémentaires pour assurer cette complémentarité. Les interactions attractives (π -cations ou liaison hydrogène entre un donneur et accepteur par exemple) sont alors favorisées et celles négatives de répulsion défavorisées (répulsion électrostatique par exemple). Cette complémentarité énergétique implique aussi un bon recouvrement des domaines solvophobes et solvophiles du récepteur et du substrat.

La formation d'un complexe, entre au moins deux molécules, est défavorable pour l'entropie globale du système [récepteur + cible]. Aussi, pour qu'il y ait malgré tout formation de la supermolécule, il faut que l'énergie enthalpique d'association soit grande mais également, diminuer au maximum ce coût entropique. Les deux facteurs suivants jouent un rôle important pour réduire celui-ci.^{37,36,38,39}

- ✓ La *multiplicité des sites d'interactions*. D'un point de vue entropique, s'il est coûteux de rapprocher deux molécules pour former un complexe, toute nouvelle interaction ne coûte plus rien. Les interactions supplémentaires contribuent uniquement à l'énergie enthalpique d'association. Cet effet bien connu dans la chimie de coordination est appelé « effet de chélation » et plus généralement aujourd'hui de « multivalence ». Cet effet coopératif peut être positif, lorsque l'énergie de liaison du complexe est supérieure à la somme des énergies de liaison correspondantes à chacune des interactions mises en jeu. Au contraire, cet effet peut être négatif, lorsque certaines interactions répulsives sont impliquées et sont plus importantes dans le complexe formé. C'est le cas, par exemple, lorsqu'il y a une répulsion stérique d'un site voisin à celui d'interaction première.

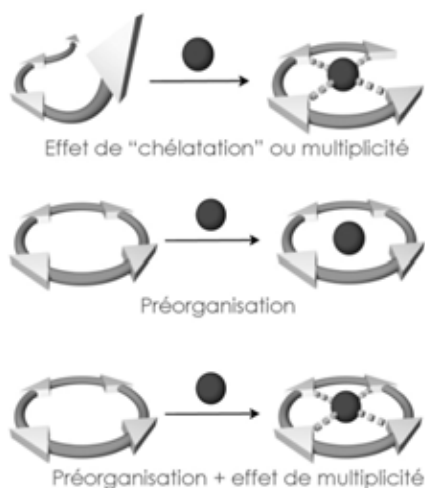


Figure 1-15 : Effets de multiplicité et de pré-organisation.

- ✓ La *pré-organisation*. Si lors de la formation du complexe, la structure du récepteur est très modifiée et qu'elle devient plus contrainte, alors le coût entropique sera grand. En revanche, si la structure du récepteur est déjà assez contrainte et propice à la complexation sans grande modification, le coût entropique sera faible. D.J. Cram parle alors du principe de pré-organisation.⁴⁰ Cet effet est important dans le cas des composées macrocycliques ou macropolycycliques, puisque la présence de cycles induit déjà, initialement, une certaine rigidité à la structure. Cependant un compromis est nécessaire entre la rigidité du récepteur (nécessaire à la stabilité thermodynamique comme on vient de le voir) et sa flexibilité (essentiel ou processus cinétiques d'échange et de réversibilité).

La prise en considération de tous ces facteurs permet de développer un récepteur moléculaire adapté à un substrat donné.

La formation de tels complexes dépend d'interactions non covalentes dans la majorité des cas. Celles-ci sont très diverses (liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals ou électrostatiques, interactions π - π , interactions π -cations, etc.)^{41,37} Ce sont des interactions dites faibles car elles correspondent à des énergies de liaisons plus faibles que celles des liaisons covalentes (cf. Tableau 1-1). Typiquement, les interactions non covalentes correspondent à des énergies qui vont de 2 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les interactions dispersives à 300 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les interactions électrostatiques. Les liaisons covalentes ont des énergies comprises entre 150 et 400 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (par liaison).³⁶ Toutes ces interactions dépendent de l'environnement.

Interactions	Forces ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Exemple
Ion-ion	200-300	Tetrabutylammonium chloride
Ion-dipôle	50-200	Sodium[15]crown-5
Dipôle-dipôle	5-50	Acétone
Liaison hydrogène	4-120	Acide-alcool
Cation- π	5-80	K^+ dans le benzène
π - π	0-50	Benzène et graphite
Van der Waals	< 5 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ mais dépendante de la surface d'interaction	Argon dans une structure cristalline
Hydrophobe (effet)	Relative à l'énergie d'interaction solvant-solvant	Inclusion de certains composés dans les cyclodextrines

Tableau 1-1 : Différentes interactions mises en jeu en chimie supramoléculaire.³⁶

A présent, regardons comment sont associés un récepteur et un fluorophore dans des sondes moléculaires fluorescentes pour deux cibles particulières. La première est l'acétylcholine, et la seconde la dopamine. Ces deux cibles sont des neurotransmetteurs, suscitant un intérêt particulier afin de mieux comprendre les mécanismes cérébraux, encore très mal connus.

b. Sondes moléculaires fluorescentes pour l'acétylcholine

1. L'acétylcholine

L'acétylcholine (Ach) est le premier neurotransmetteur à avoir été découvert. L'Ach est présente au niveau des jonctions neuromusculaires et du système nerveux central. Elle est impliquée dans le contrôle des mouvements mais également dans de nombreux processus tels que l'attention, la mémoire, l'apprentissage, la conscience ou encore le sommeil. Néanmoins son mode de fonctionnement est encore très mal connu. De plus, elle est

impliquée dans de nombreuses maladies neurologiques, telles que la maladie de Huntington, d'Alzheimer, de Parkinson ou encore la schizophrénie.⁴²

L'Ach est le seul neurotransmetteur non synthétisé à partir d'acides aminés mais directement dans les neurones par voie enzymatique, à partir de la choline (Ch)(cf. Figure 1-16). Après libération elle est à nouveau transformée en choline très rapidement (1 à 2 milliseconde). Sa structure chimique est simple puisqu'elle ne comporte que deux fonctions, un ammonium quaternaire et un ester (cf. Figure 1-16). Ainsi peu de voies de dérivation sont envisageables. Les sondes moléculaires fluorescentes constituent donc une méthode de choix pour son suivi *in vivo*.

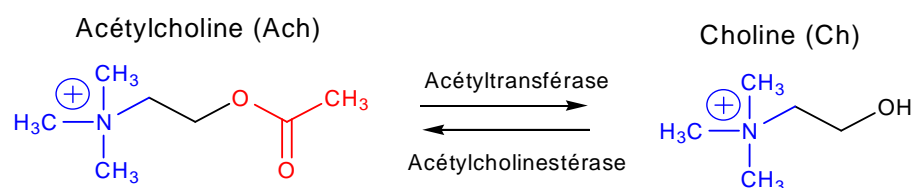


Figure 1-16 : Structure chimique de l'Ach et biosynthèse.

Des études cristallographiques ont montré que l'Ach se liait à l'enzyme acétylcholinestérase grâce à des interactions avec différents résidus aromatiques, constituant une poche étroite non chargée négativement.^{43,44} Ces observations suggèrent l'existence d'interactions π -cation entre l'enzyme et l'Ach. Plusieurs sondes fluorescentes à Ach ont alors été développées, à partir de cavitants aux systèmes π riches tels que les calixarènes ou les résorcinols.

2. Les sondes fluorescentes à acétylcholine dérivant de calixarènes

Les sondes fluorescentes à Ach fonctionnent toutes de façon indirecte par déplacement d'indicateur. Elles sont basées sur des dérivés de calix[n]arènes sulfonatés (SCn) développés par Shinkai *and co.*⁴⁵, commerciaux, facilement modifiables et solubles dans l'eau (cf. Figure 1-17). De plus, ils sont propices à la complexation de cations, tels que l'Ach par des liaisons électrostatiques ou/et π -cations car ce sont des cavités π -basiques.^{46,47} Un fluorophore ayant une bonne affinité pour ce type de calixarènes est utilisé pour former la sonde fluorescente. Les différentes études réalisées sur de telles sondes ont porté principalement sur le choix du fluorophore, afin d'optimiser les propriétés spectroscopiques de la sonde où son affinité en faveur de l'Ach par rapport à ce dernier.

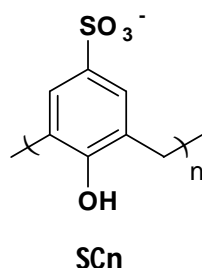


Figure 1-17 : *p*-sulfonatocalix(*n*)arènes (SCn) développé par Shinkai *and co.*⁴⁵

Le premier exemple de sonde moléculaire fluorescente basée sur un squelette calixarène a été développé par Shinkai *and co.* (cf. Figure 1-18).⁴⁸ Cette sonde est composée d'un *p*-sulfonatocalix[*n*]arène (*n*=4 ou 6) (SC4 ou SC6), comme récepteur et d'un dérivé pyridinium du pyrène (N-PP) comme fluorophore. Le fluorophore est complexé par la cavité et la reconnaissance de la cible se fait par un mécanisme de déplacement d'incateur.^{48,24} Les études de reconnaissance ont été menées dans un mélange MeOH/H₂O pH = 8, le MeOH étant nécessaire pour ne pas avoir d'agrégation du fluorophore. Le pH = 8 permet d'avoir un ou deux phénols sous forme phénolate (pour SC4 et SC6 respectivement) ce qui enrichi encore la cavité en électrons et favorise la complexation d'ammonium. La complexation du N-PP dans la cavité calixarène induit une extinction de sa fluorescence. Les auteurs proposent un mécanisme d'extinction de l'état triplet par interactions pseudo-intramoléculaires. L'ajout d'Ach au complexe [SC6/N-PP] a pour effet de régénérer la fluorescence du fluorophore, I₀/I augmentant jusqu'à plus de 2,5 fois lors des ajouts successifs d'Ach. La constante de complexation mesurée pour l'Ach avec le SC6 est de l'ordre de 10³ M⁻¹.

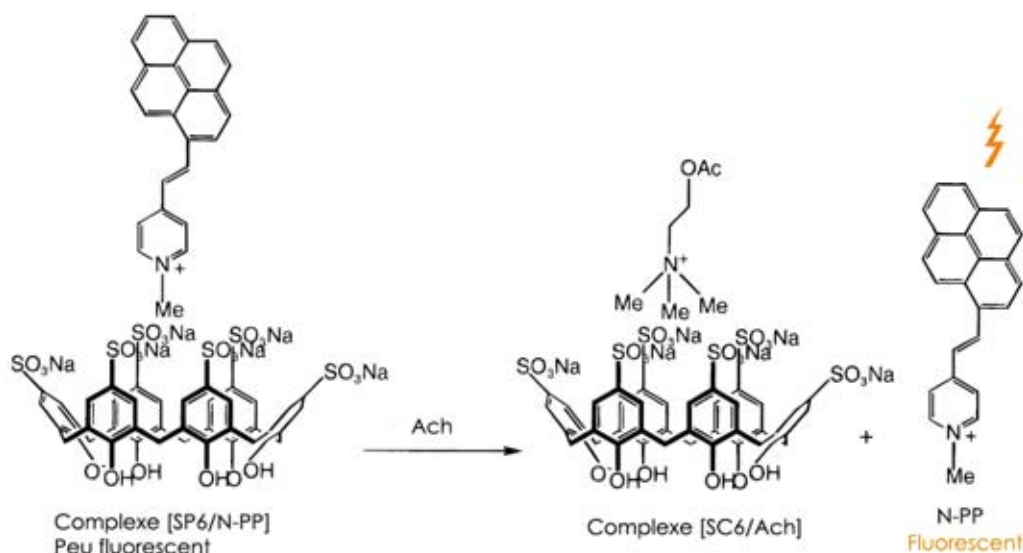


Figure 1-18 : Principe de fonctionnement de la sonde fluorescente à base de *p*-sulfonatocalix[6]arène (SC6) développé par Shinkai *and co.*⁴⁸

Une étude RMN a permis de confirmer l'inclusion de la partie ammonium (du fluorophore comme de la cible) dans la cavité. Une bonne sélectivité est mise en avant par rapport aux acides aminés, mais aucune molécule plus proche comme la choline (Ch) n'a été

testée. Le principal inconvénient de cette sonde est la nécessité d'ajouter du MeOH au milieu, ce qui rend son utilisation impossible en milieu biologique.

Afin de remédier à cela, Jin *et al.* ont développé des sondes fluorescentes à base de *p*-sulfonatocalix[n]rènes ($n=4,6,8$) (SC4, SC6, SC8) solubles dans l'eau à pH physiologique.⁴⁹ Le fluorophore utilisé (DANCh) dans ce cas est un dérivé ammonium de la Dansylsulfonamide (DANSA) (cf. Figure 1-19). La complexation de la DANCh par SC4 et SC6 a pour effet d'augmenter faiblement la fluorescence de celle-ci. En revanche, la complexation de la DANCh par SC8 augmente jusqu'à 1,8 fois son intensité de fluorescence et est accompagné d'un déplacement vers le bleu du maximum d'émission. Ces variations peuvent s'expliquer par une augmentation de l'hydrophobie de l'environnement de la DANCh.

Une étude en RMN du proton, en plus de ces observations spectroscopiques, a permis de mettre en évidence l'importance de la taille de la cavité. SC4 et SC6 ne sont pas assez grands pour accueillir la partie aromatique de la DANCh, alors que SC8 l'est. Cependant, l'étude en RMN du proton montre que les interactions principales sont de type électrostatique. L'ajout d'Ach diminue l'intensité de la fluorescence, jusqu'à 28%. Le déplacement de la DANCh par l'Ach est confirmé par des études de RMN du proton. Cette sonde permet de détecter de l'Ach dans l'eau, jusqu'à une concentration de 10^{-4} M. La sélectivité est bonne par rapport aux amino-acides, l'ATP et certains neurotransmetteurs comme le GABA, la dopamine, l'histamine, mais aucune informations n'est donnée sur la complexation de la Ch.

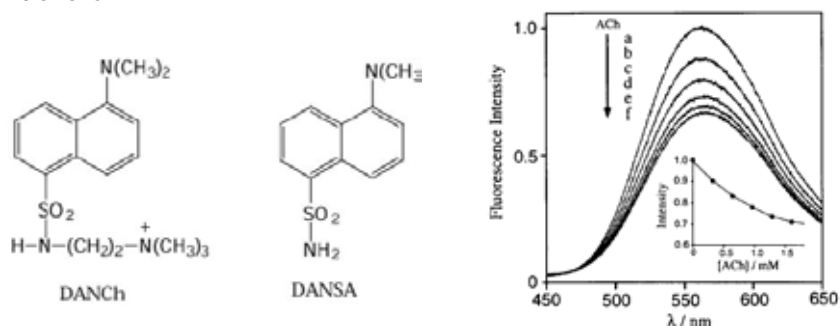


Figure 1-19 : Structures des fluorophores utilisés et courbe de titrage par fluorescence de la formation du complexe [SC8/Ach].⁴⁹

Une sonde fluorescente soluble dans l'eau à pH physiologique, basée sur l'utilisation du SC4 a également été décrite par Nau *and co.*⁵⁰ Le fluorophore utilisé, le 2,3 diazobicyclo[2.2.2]oct-2-ene (DBO), est plus petit que dans les cas précédemment cités (sondes avec N-PP et avec DANCh). C'est également un fluorophore sensible à la polarisabilité du solvant. L'inclusion du fluorophore dans la cavité a pour effet d'éteindre la fluorescence de celui-ci. Ceci est principalement dû, selon les auteurs, à un transfert de proton photo-induit des phénols de SC4 vers les azotes du DBO, ainsi qu'à la formation possible d'exciplexes avec les noyaux aromatiques de SC4.^{51,52} Remarquons que l'extinction de la fluorescence induite par la complexation peut atteindre jusqu'à 90%, ce qui est plus important que celle décrite par Shinkai *and co.* avec le N-PP qui est de 60%.⁴⁸ L'ajout d'Ach

sur le complexe induit une régénération de la fluorescence du DBO, qui est déplacé par l'Ach. La constante de complexation du SC4 pour l'Ach est plus forte que pour le DBO contrairement aux autres sondes décrites. Le rapport I/I_0 augmente jusqu'à un facteur 2 en milieu neutre. La sélectivité envers d'autres ammoniums quaternaires proches, telle que la choline, a été étudiée et s'est révélée très faible.

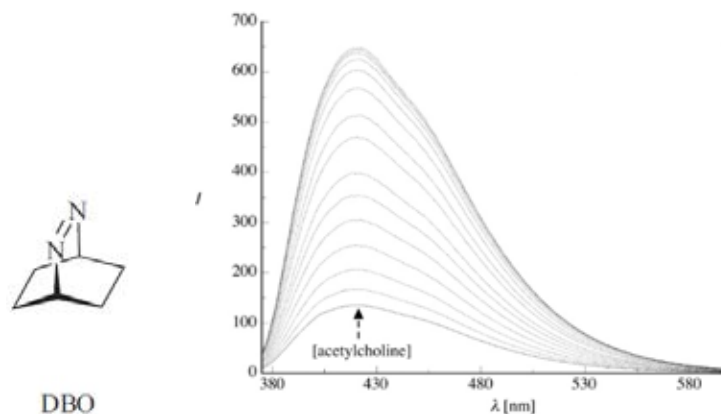


Figure 1-20 : Fluorophore utilisé par Nau *and co.* et la courbe de titrage de l'Ach.⁵⁰

Afin d'avoir une meilleure sensibilité, Yitzchaik *and co.* ont développé des sondes moléculaires fluorescentes basées sur l'utilisation de *p*-sulfonatocalix[n]arènes (SC4, SC6, SC8) complexant le *trans*-4-[4-(diméthylamino)styril]-1-méthylpyridinium (DASPI).⁵³ Le fluorophore choisi (DASPI) comporte un bon groupement donneur (l'amine) et un groupement attracteur fort (le pyridinium) conjugués, ce qui en fait un dipôle fort. Des études sur ce fluorophore ont montré qu'il pouvait subir une rotation à l'état excité dans un milieu polaire, conduisant à un état de transfert de charge twisté, qui est non fluorescent.^{54,55} Cette rotation photo-induite est très sensible à l'environnement et peut être fortement modifiée lorsque le fluorophore est complexé dans une cavité. Des études spectroscopiques et en RMN du proton de la complexation du DASPI par les SC_n, dans un mélange de tampon phosphate à pH = 7,4 et de MeOH, ont montré que ceux-ci bloquaient plus ou moins cette rotation. La complexation par les SC_n induit ainsi une augmentation de la fluorescence du DASPI (au sein du complexe) et un déplacement vers le bleu de l'émission. L'inclusion du DASPI dans SC4 grâce aux interactions électrostatiques (entre le pyridinium et les phénolates) bloque en partie la rotation photo-induite, permettant une augmentation de la fluorescence du DASPI dans le complexe (Φ_F DASPI augmente 20 fois dans le complexe). Cependant, l'inclusion est limitée par la taille de la cavité et n'est donc pas optimale, ce qui n'est pas le cas avec SC6. Celui-ci induit une augmentation plus importante (Φ_F DASPI augmente de 60 fois) car sa taille est plus adaptée, et l'effet hydrophobe augmente encore son affinité pour le DASPI. En revanche, SC8 possède une cavité trop large qui bloque peu la rotation photo-induite. L'ajout d'Ach sur le complexe [SC6/DASPI] induit une diminution de la fluorescence suite à un déplacement du DASPI hors de la cage au profit de l'acétylcholine comme le confirme l'étude en RMN du proton. La limite de détection de la sonde [SC6/DASPI] est meilleure que celles développées

auparavant et atteint 10^{-6} M.^{49,48,50} La limitation de cette sonde vient de l'utilisation de MeOH pour empêcher l'agrégation du fluorophore.

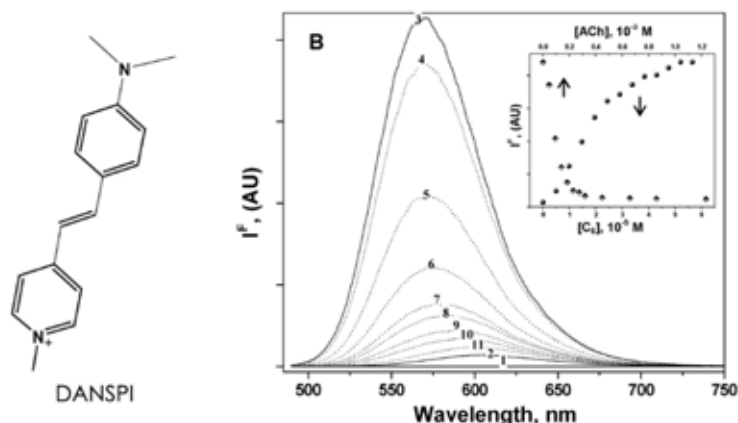


Figure 1-21 : Structure du fluorophore utilisé par Yitzchaik *and co.* et les courbes d'évolution de la fluorescence 1 → 3 suite à l'ajout de DANPSI sur le SC6, puis de 4 → 11 suite à des ajouts d'Ach.⁵³

Récemment, Jin a décrit la première sonde moléculaire fluorescente pour la détection d'Ach, fonctionnant dans le proche Infra-Rouge. Ainsi, celle-ci est plus adaptée pour une application biologique.⁵⁶ Elle comporte toujours comme récepteur un SCn (n=4,6,8) mais c'est la Rhodamine 800 (Rh 800) qui est utilisée comme fluorophore. Celle-ci permet d'utiliser une excitation à 2 photons pour la sonde [SCn/Rh 800] ainsi formée.

La première sonde à acétylcholine fonctionnant avec une rhodamine comme fluorophore avait été développée par Cao *and co.*⁵⁷ La Rhodamine B (RB) utilisée possédait des longueurs d'onde d'émission et d'excitation plus basses (environ 550-650nm), et aucune étude quantitative n'avait été faite. Cependant, dans les deux cas, le principe est le même.

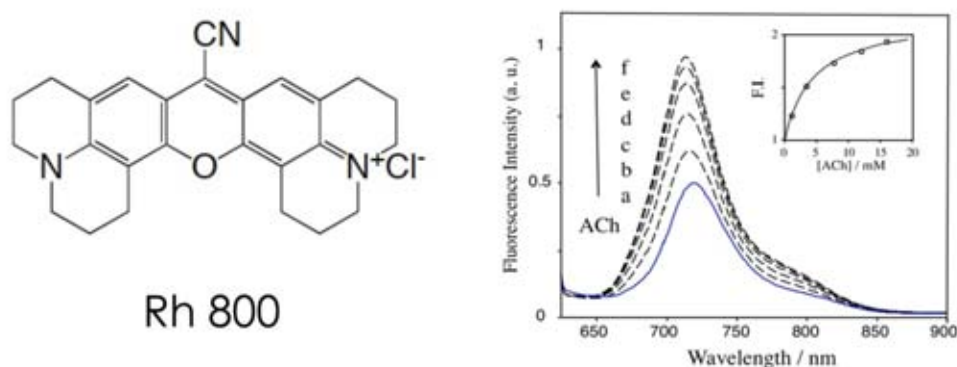


Figure 1-22 : Structure des Rhodamines utilisées par Cao et Jin, et courbes de titrage de l'acétylcholine lors de son ajout sur le complexe [SC8/Rh 800].^{56,57}

La fluorescence de la rhodamine est diminuée lorsque celle-ci est complexée dans la cavité du calixarène, et l'ajout d'Ach régénère celle-ci par déplacement de la Rhodamine hors de la cavité.^{56,57} De part la taille des dérivés de la rhodamine, le complexe le plus stable est formé avec SC8. Or, celui-ci constitue une cavité large, moyennement adapté pour la complexation d'acétylcholine (constante d'association de 588 M^{-1}) ce qui explique en partie

la limite de détection de $5 \cdot 10^{-4}$ M obtenue avec le complexe [SC8/Rh 800]. Celle-ci est moins intéressante que celle obtenue par Yitzchaik *and co.*, dans un mélange de tampon PB et de MeOH.⁵³ La sélectivité de cette sonde est bonne par rapport à la plupart des autres neurotransmetteurs de petite taille, mais reste très limitée par rapport à la choline d'après les auteurs (pas de constante décrite pour la Ch).

3. Les sondes fluorescentes à acétylcholine dérivant de résorcinarènes

L'équipe d'Inouye a décrit la première sonde supramoléculaire fluorescente permettant la détection d'Ach en milieu alcalin (cf. Figure 1-23).^{58,59} Celle-ci est composée d'un résorcinarène (**R1**), comme partie complexante, et d'un pyrène modifié par un alkylpyridinium (N-PP) comme fluorophore (cf. Figure 1-23). En milieu alcalin (MeOH/KOH) quatre hydroxyles de **R1** sont déprotonés, permettant la formation de liaisons hydrogènes qui bloquent le résorcinarène dans une conformation bol. Une cage riche en électrons et chargée négativement est ainsi formée. Celle-ci est favorable à la complexation d'ions ammoniums *via* des interactions électrostatiques et π -cations.

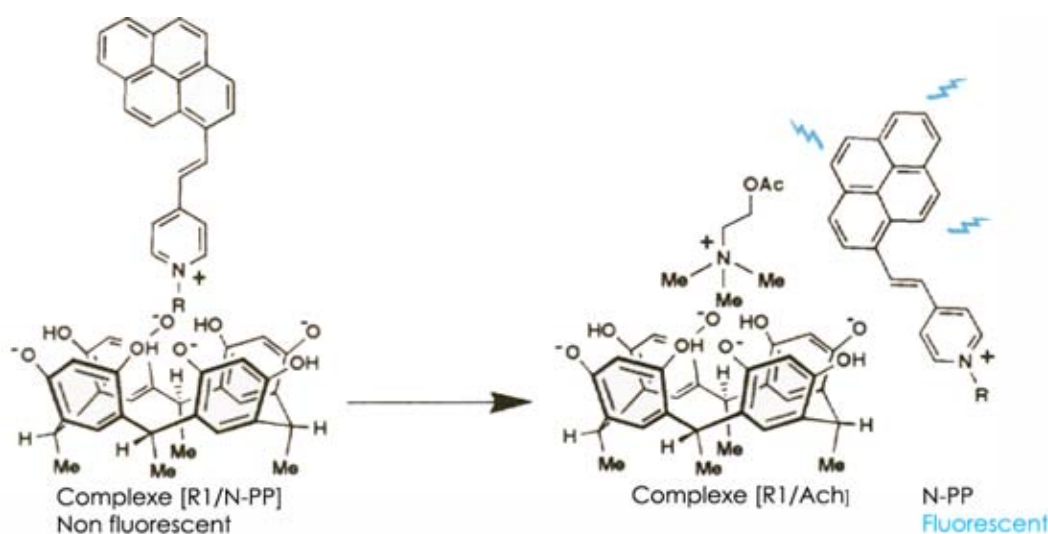


Figure 1-23 : Principe de la première sonde fluorescente à Ach développée par Inouye *and co.*^{58,59}

En effet, **R1** complexe le N-PP en milieu alcalin alcoolique (MeOH). La formation du complexe [R1/N-PP] est détectable car elle induit une extinction de la fluorescence du N-PP. Celle-ci est liée à un transfert d'électron photo-induit (PET) entre les phénolates du résorcinarène et le fluorophore d'après les auteurs. La formation de ce complexe a été confirmée par une étude RMN du proton, dans un mélange MeOD/NaOD. Lors de l'ajout d'Ach la fluorescence est régénérée, indiquant que l'Ach déplace le N-PP et forme un complexe avec le résorcinarène. La formation de ce nouveau complexe a été également confirmée par RMN.

Néanmoins, cette sonde ne fonctionne pas en milieu protique neutre (MeOH). En effet, aucune modification réelle de la fluorescence du N-PP n'est observée lors d'ajout de R4. Pour remédier à cette limitation, *Inouye and co.* ont greffé de façon covalente le fluorophore au résorcinarène, les interactions intramoléculaires étant plus favorables.^{58,59} La nouvelle sonde ainsi formée présente bien une fluorescence moins intense que le fluorophore seul. De plus, celle-ci est exaltée lors de l'ajout d'Ach. Le changement conformationnel du récepteur a été confirmé par une étude RMN du proton. Il est lié à l'expulsion de la partie pyrène hors de la cavité, suite à l'ajout d'Ach. Ceci pouvant expliquer l'exaltation observée. Cette nouvelle sonde fonctionne en milieu protique neutre (MeOH) de façon « off-on » comme la précédente, mais pas en milieu aqueux. De plus, aucune constante de complexation pour d'Ach n'a été déterminée. La sélectivité par rapport à d'autres neurotransmetteurs possédant une amine primaire est soulignée par les auteurs, mais rien n'est précisé concernant les autres ammoniums quaternaires comme la Ch.

Kobuke *et al.* ont par la suite développé une sonde supramoléculaire fluorescente indirecte, pour la détection d'Ach en milieu aqueux neutre, basée sur une unité réceptrice type résorcinol **R2** (cf. Figure 1-24).⁶⁰ Afin de diminuer les pK_A des phénols, des groupements nitriles, électro-attracteurs, ont été introduits sur le squelette du résorcinol. La reconnaissance en milieu aqueux neutre a été mise en évidence en utilisant le même principe que celui utilisé par *Inouye et al.*, avec le N-PP.⁵⁸

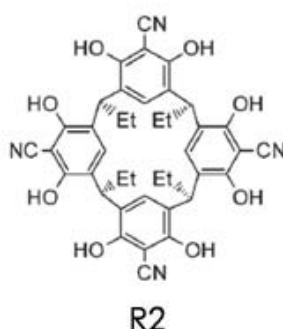


Figure 1-24 : Résorcinarène modifié par des groupements nitriles utilisé par Kobuke *et al.* pour former une sonde fluorescente soluble dans l'eau avec le N-PP.⁶⁰

Les constantes de complexation pour l'Ach et le fluorophore ont été déterminées par titrage de la fluorescence à différents pH compris entre 5 et 8,5. Elles varient de $6,94 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ à $1,13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. La constante de complexation pour l'Ach augmente d'un facteur 20 lorsque le pH passe de 5 à 8,5 (à partir des phénols non déprotonés et jusqu'à déprotonation des 4). L'apparition des phénolates favorise à la fois les interactions électrostatiques mais aussi les interactions π -cations (puisque le cycle est enrichi en électrons). Cependant, là encore il n'est pas question de la sélectivité de la sonde [R2/N-PP] notamment envers la Ch ou la carnitine.

Ballester, Rebek *and co.* ont travaillé sur la sélectivité en développant des cavitants plus profonds (cf. Figure 1-25).^{61,62,63} La forme ainsi que la taille de la cavité pouvant être à l'origine d'une certaine sélectivité envers certains ammoniums plus encombrés. Un cavitant

à base de résorcinarène **R3**, substitué par des diaminobenzènes a été synthétisé par Ballester *et al.*⁶¹ Les pentes aromatiques peuvent être soit en position équatoriale, soit en position axiale. Dans ce cas, une cavité hydrophobe riche en électrons, plus profonde, pouvant conduire à des interactions π -cations fortes est formée. Deux phénols pouvant être déprotonés en milieu alcalin sont maintenus pour permettre des interactions électrostatiques.

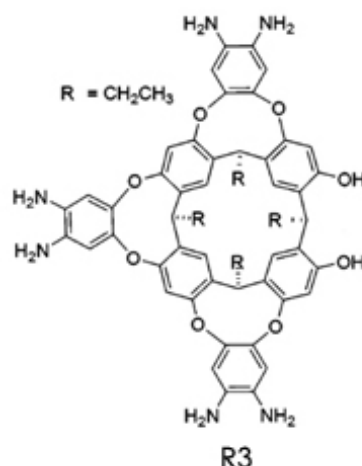


Figure 1-25 : Cavité avec un squelette résorcinarène développée par Ballester et Rebek pour formée une sonde fluorescente pour l'Ach.⁶¹

La complexation d'ammoniums a pu être évaluée en utilisant le N-PP de la même façon que pour les cas précédents. Les constantes de complexation pour différents ammoniums, aux géométries et tailles variées, ont été obtenues dans le MeOH. Cette sonde est plus sélective car elle permet de discriminer certains ammoniums en fonction de leur taille. Le tétrapropylammonium par exemple, a une constante de complexation de l'ordre de 10^2 M^{-1} contre 10^5 M^{-1} pour l'Ach. Le principe de complémentarité géométrique prend tout son sens ici. Cependant, cette approche ne permet qu'une discrimination partielle des espèces aux géométries assez proches, telles que l'Ach et la Ch ($K_{\text{association Ach}} = 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ contre $K_{\text{association Ch}} = 3,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Très récemment, l'équipe de Rebek a développé une sonde fluorescente R4 pour l'Ach fonctionnant de façon directe (cf. Figure 1-26).⁶⁴ Celle-ci est un dérivé de résorcinarène formant une cavité asymétrique, composé de trois unités 1,2 diamidobenzène et d'une unité benzoquinoxaline (cf. Figure 1-26). Les amides se trouvant dans la partie supérieure de la cavité forment des liaisons hydrogènes, bloquant la sonde en conformation vase. Une cavité hydrophobe, relativement profonde est ainsi formée.

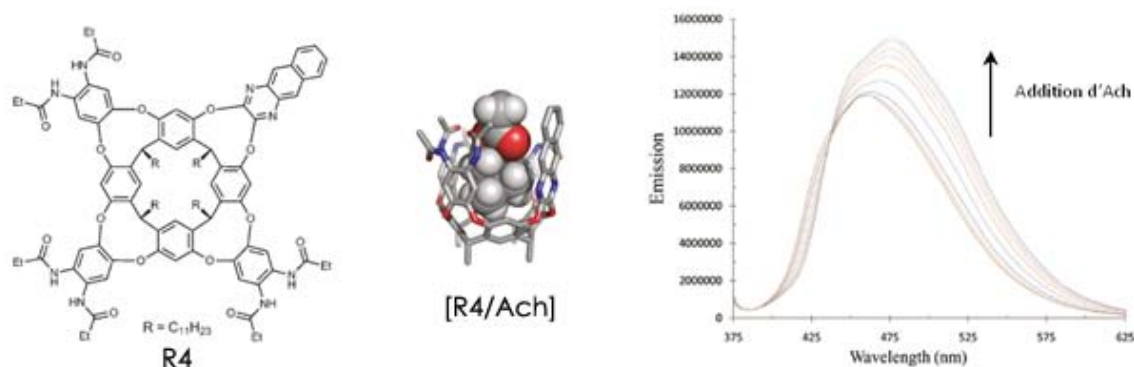


Figure 1-26 : Structure de la sonde moléculaire fluorescente R4 développée par Rebek *and co.*⁶⁴ ; minimisation du complexe [R4/Ach] formé, en MM3, et titrage en fluorescence de l'Ach.⁶⁴

Cette sonde **R4** soluble dans le chloroforme, présente un rendement quantique de fluorescence de 24 % suite à une excitation à 365 nm avec une émission maximale à 460 nm. L'addition d'Ach induit une exaltation de la fluorescence de l'ordre de 30 %. Celle-ci est accompagnée d'un déplacement bathochrome du spectre d'émission (cf. Figure 1-26). Cependant, aucune constante d'association n'a été déterminée pour l'Ach. Les constantes d'association pour différents sels de propylquinuclidinium ont été déterminées pour cette sonde par des titrages en RMN du proton. Elles sont comprises entre 8 et $2,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (suivant le contre-ion).⁶⁴ Cette sonde fluorescente constitue le premier exemple de sonde fonctionnant de façon directe à partir d'un dérivé de résorcinarène.

Ainsi la sonde fluorescente présentant la meilleure affinité pour l'Ach développée en milieu quasi-physiologique (PB, pH 7,5, 10 mM) jusqu'à aujourd'hui, est celle proposée par Kobuke (cf. Figure 1-24) au regard des constantes d'association ($K_{\text{association}} \text{ Ach} = 9,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$).⁶⁰ Les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption et d'émission (respectivement 430 nm et 570 nm) sont relativement bien adaptées pour de l'imagerie *ex vivo*. La limite de détection pour cette sonde fonctionnant en milieu quasi-physiologique n'est pas précisée. Cependant au vue des titrages présentées il semblerait qu'elle soit de l'ordre de $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ à pH 8 (facteur limite choisi $I/I_0 > 5\%$). Celle-ci est donc meilleure (d'un ordre de grandeur) que celle obtenue pour la meilleure sonde développée à partir d'un calixarène par Jin (cf. Figure 1-22).⁵⁶

La sonde fluorescente permettant la meilleure discrimination entre l'Ach et la Ch est proposée par Ballester et Rebek (cf. Figure 1-25).⁶¹ Celle-ci présente une affinité trois fois plus grande pour la Ch que l'Ach, dans le MeOH. Or, il serait plus intéressant d'obtenir une sonde sélective du neurotransmetteur, soit de l'Ach.

Enfin, toutes les sondes solubles en milieu aqueux tamponné à pH physiologique, fonctionnent de façon indirecte, par déplacement d'un fluorophore par l'Ach. Ainsi c'est la migration du fluorophore libéré qui est observée et non l'Ach. Ces sondes sont donc inutilisables pour l'imagerie de l'Ach.

A présent regardons les sondes fluorescentes développées pour détecter la seconde cible que nous avons étudiée, la dopamine.

c. Sondes moléculaires fluorescentes développées pour la dopamine

1. La dopamine, et autres neurotransmetteurs du type catécholamine.

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur qui joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions cognitives (mémoire, attention, apprentissage par exemple) et motrices. La dopamine est impliquée dans plusieurs pathologies telles que les addictions aux drogues, la maladie de Parkinson, l'hyperactivité ou encore la schizophrénie.^{65,66}

La famille des neurotransmetteurs de type catécholamine est composée de trois molécules, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline (cf. Figure 1-27). Ces neurotransmetteurs possèdent essentiellement deux groupements caractéristiques, une amine et un catéchole (cf. Figure 1-27). Ces deux groupements confèrent à ces molécules des propriétés d'oxydo-réduction, qui sont à l'origine du développement de nombreuses méthodes électrochimiques pour les détecter.⁴² Cependant, ces méthodes sont invasives et présentent un intérêt limité pour réaliser de l'imagerie *in vivo*.

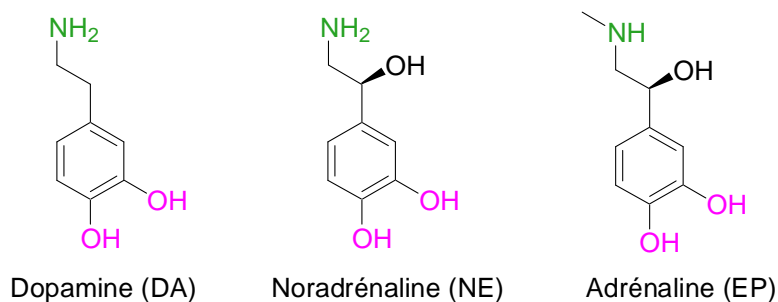


Figure 1-27 : Neurotransmetteurs dérivés de catécholamines.

La grande majorité des sondes fluorescentes développées pour la détection de la DA et autres catécholamines, tire également profit de la réactivité de ces deux fonctions (amine et catéchols). A notre connaissance, seuls deux exemples de sonde, l'une indirecte et l'autre directe reconnaissent la dopamine *via* des liaisons non-covalentes.

2. Sondes fluorescentes pour la dopamine basées sur une réaction chimique.

Les premières sondes fluorescentes pour la détection de catéchols et catécholamines (comme la DA) basées sur une réaction entre la fonction catéchol et un acide boronique, ont été décrites par Yoon and Czarnik.⁶⁷ Dans l'eau, ces dérivés d'anthracènes (l'acide 2-anthrylboronique ou l'acide 9-anthrylboronique **D1**) se lient de façon covalente aux catéchols, formant ainsi un ester boronique (cf. Figure 1-28). Un transfert d'électron photo-induit entre la partie dopamine riche en électrons et la partie anthracène a lieu d'après les auteurs. Celui-ci conduit à une diminution de la fluorescence jusqu'à un facteur 20. La constante de dissociation pour le catéchol est de 19 mM (soit $K_{\text{association}} = 53 \text{ M}^{-1}$). L'affinité de cette sonde pour les catéchols est faible.

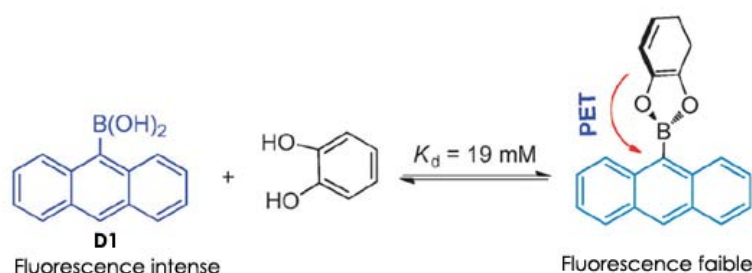


Figure 1-28 : Première sonde fluorescente **D1** développée Yoon et Czarnik, pour les catéchols fonctionnant dans l'eau.^{67,68}

Ensuite, Glass et Secor ont développé une sonde fluorescente **D2**, basée sur la formation d'un ester boronique impliquant la partie catéchol de la cible, mais également d'un iminium à partir de l'amine primaire (cf. Figure 1-29).⁶⁹ Ainsi celle-ci est composée d'une coumarine modifiée par un aldéhyde, et d'un bras espaceur terminé par un acide phenylboronique (cf. Figure 1-29). Cette sonde soluble à pH neutre dans un tampon HEPES en présence d'une grande quantité de sel (170 mM) présente une très bonne affinité pour la dopamine ($K_{\text{association DA}} = 6500 \text{ M}^{-1}$). La réaction avec la dopamine produit une espèce au spectre d'absorption déplacé, vers le rouge (cf. Figure 1-29). La fluorescence est décalée également dans une moindre mesure vers le rouge mais surtout éteinte jusqu'à 60 % (cf. Figure 1-29). Le faible déplacement de Stokes empêche d'observer tout le spectre d'émission. L'extinction partielle de la fluorescence s'explique selon les auteurs d'après un transfert d'électron photo-induit entre l'ester boronique et la coumarine.

Cette sonde **D2** ne semble pas réagir avec les sucres tels que le glucose, mais ne présente aucune sélectivité pour la dopamine par rapport à l'adrénaline ou la noradrénaline. L'absence de sélectivité par rapport à l'adrénaline, qui ne peut pas former d'iminium, montre le rôle secondaire de l'aldéhyde. En revanche, une sélectivité d'un facteur dix est observé par rapport à la tyramine (qui ne présente pas un groupement catéchol mais phénol simple, par rapport à la dopamine). Ceci illustre l'importance de la formation de l'ester boronique pour la détection.

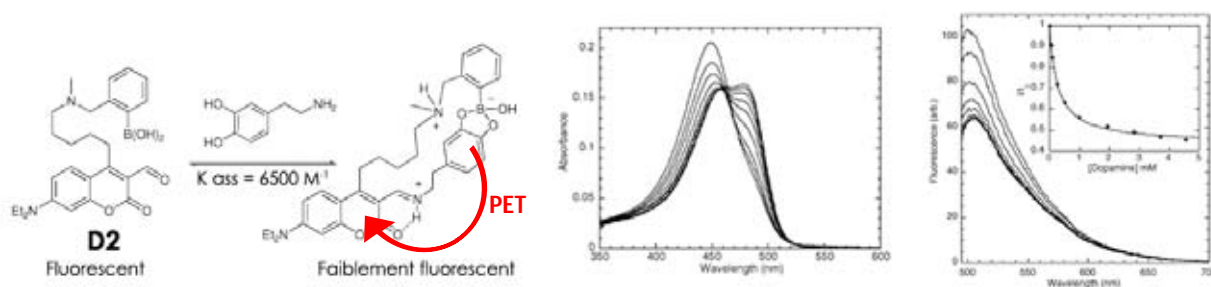


Figure 1-29 : Mécanisme de la sonde fluorescente développée par Glass et Secor pour la détection de la DA en milieu physiologique, et courbes de titrage en absorbance et en fluorescence.⁶⁹

En suivant cette méthode, consistant à conjuguer deux réactions afin de former un complexe plus stable, l'équipe de Yoon a développé une sonde dérivant de l'antracène **D3** selon le même principe (cf. Figure 1-30).⁷⁰ L'antracène a été modifié par un aldéhyde et substitué *via* un bras espaceur par un acide phénylboronique, suivant la méthode de Glass et Secor.^{69, 70}

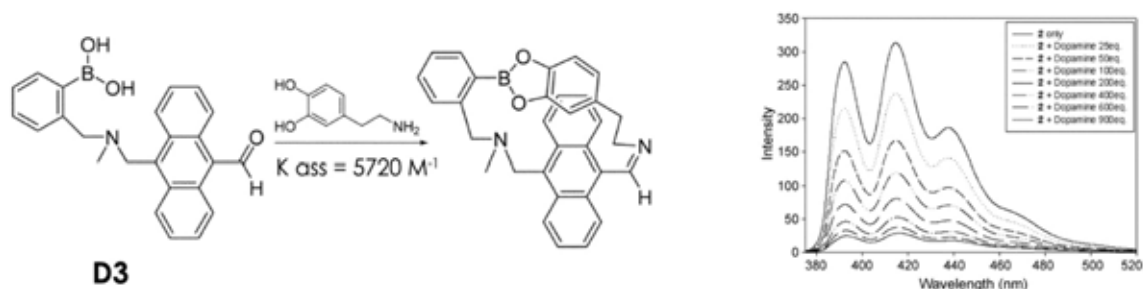


Figure 1-30 : Mécanisme de la sonde **D3** développée par Yoon *and co.*, et titrage en fluorescence pour la DA.^{69, 70}

Contrairement à **D2**, cette sonde ne fonctionne pas en milieu purement aqueux et nécessite un mélange 5/5 MeOH/tampon HEPES. Les constantes d'affinité dans ce milieu sont proches de celles obtenues par Glass et Secor ($K_{\text{association DA}} = 5720 \text{ M}^{-1}$). En revanche, cette sonde présente un meilleur facteur d'extinction ($\approx 90 \%$). Celle-ci est toujours liée à l'existence d'un PET entre l'unité ester boronique et l'antracène selon les auteurs.⁷⁰

Plus récemment, Jiang *and co.* ont développé une sonde fluorescente **D4** permettant de détecter la dopamine, mettant en jeu un autre type de réaction entre la cible et un fluorophore.⁷¹ Le fluorophore utilisé est un complexe d'euprium possédant un chlorure de sulfone (cf. Figure 1-31). L'amine primaire de la dopamine peut substituer le chlore de **D4** afin de former une nouvelle entité. Cette réaction a lieu en milieu aqueux dans le tampon Tris à pH 10. Ceci pour des questions de réactivité et de stabilité du chlorure de sulfone. De plus, il faut attendre 40 min à 40°C pour former le produit souhaité de façon quantitative. La molécule formée, présente une fluorescence beaucoup plus intense que la molécule de départ (jusqu'à un facteur 20). D'après les auteurs ceci est lié à la formation d'un complexe entre l'euprium et le catéchol, et non plus des molécules d'eau, connues pour éteindre la fluorescence de celui-ci.

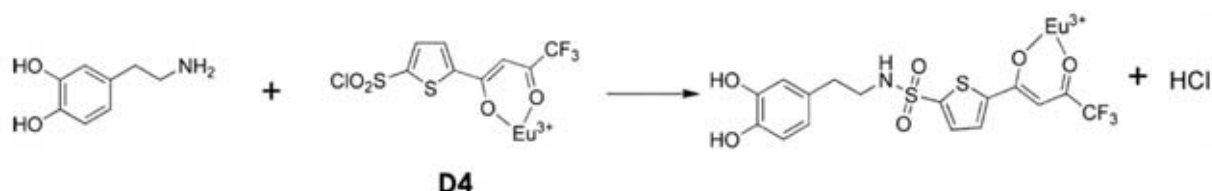


Figure 1-31 : Mécanisme de la sonde fluorescente **D4**, développée par Jiang *and co.* afin de détecter les catécholes.⁷¹

Si cette méthode permet, d'après les auteurs, de déterminer de façon fiable (peu de perturbation en présence d'autres espèces type acides aminés par exemple) la dopamine jusqu'à une concentration de $5 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}$ dans le sérum humain, elle n'est pas applicable pour de l'imagerie *in vivo*.

La dernière sonde développée, **D5**, pour la détection de dopamine par association covalente a été décrite par l'équipe de Chang.⁷² Celle-ci est un dérivé de BODIPY fonctionnalisé par un acide phénylboronique (de façon conjuguée) (cf. Figure 1-32). Cette sonde **D5** fonctionnant en tampon aqueux HEPES (10 mM, pH 7,4) présente une constante d'association pour la dopamine de $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. C'est la meilleure réactivité envers la dopamine décrite jusque là. La formation d'un ester boronique en présence de dopamine, induit une extinction de la fluorescence de l'ordre de 90%. La limite de détection pour cette sonde se situe à $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ selon les auteurs. Aucun commentaire sur la sélectivité de cette sonde par rapport à d'autres catéchols ou dérivés, n'est proposé.

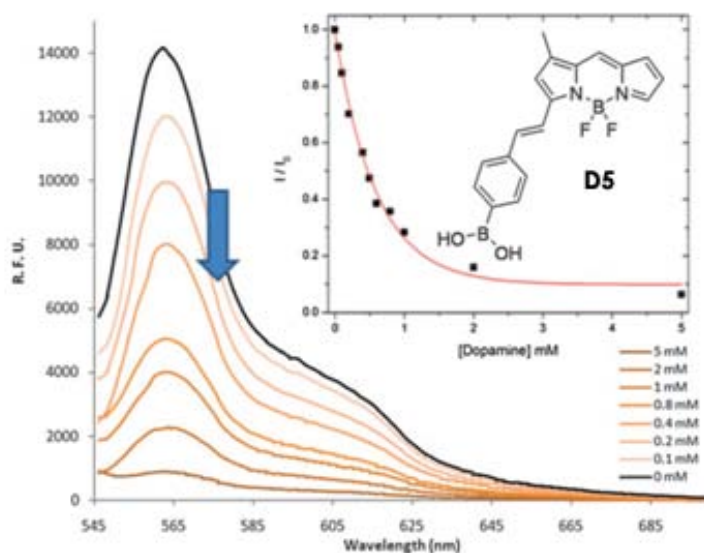


Figure 1-32 : Structure de la sonde développée par Chang *and co.* et courbe de titrage en fluorescence en présence de DA.⁷²

Finalement, la meilleure sonde fonctionnant par formation d'une liaison covalente (voire deux) avec la cible (dopamine) en vue d'une application *in vivo* serait celle développée par Glass et Secor (**D2**).⁶⁹ En effet, la plus récente développée par Chang *and co.*, **D4**, présente une réactivité trop grande envers la dopamine qui risquerait de bloquer toute transmission nerveuse.

3. Sonde indirecte par déplacement d'indicateur, pour la dopamine

Récemment, la première sonde fonctionnant selon une méthode indirecte, de déplacement d'indicateur, a été décrite par Biczok and co.⁷³ Cette sonde fluorescente est composée pour la partie réceptrice d'un curcubit[7]uril (CB7), et pour la partie fluorophore du DAPI (cf. Figure 1-33). L'addition de dopamine sur le complexe [CB7/DAPI], déplace le DAPI hors de la cavité du CB7, induisant ainsi une extinction de la fluorescence dans l'eau. Cependant aucune courbe dans le cas de la dopamine n'est donnée dans la publication. La constante d'association dans l'eau, pour la dopamine, déterminée par spectrofluorométrie est de $1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$.

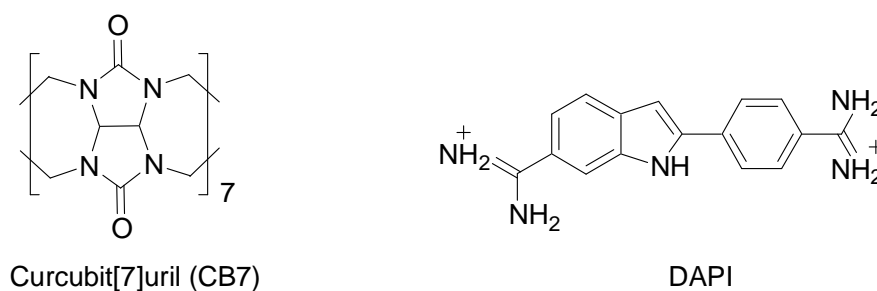


Figure 1-33 : Molécules composant la sonde fluorescente fonctionnant de façon indirecte développée par Biczok and co.⁷³

Des interactions ion-dipôle et un effet hydrophobe expliqueraient la reconnaissance selon les auteurs. Aucune étude en milieu physiologique, n'est malheureusement décrite.

4. Sonde directe, fonctionnant par liaison non-covalente, pour la reconnaissance de la dopamine

Enfin, à notre connaissance une seule sonde fluorescente fonctionnant de manière directe par interactions non-covalentes entre la sonde et la cible a été décrite dans la littérature.⁷⁴ Cette sonde comporte des fonctions diazapyreniums fonctionnalisées à la surface de particules de silice (cf. Figure 1-34). Les particules ainsi formées sont solubles dans un tampon phosphate à pH 7 et reconnaissent la dopamine avec une constante d'affinité de 180 M^{-1} . L'addition de DA à une solution de telles particules induit une diminution de la fluorescence jusqu'à 60 %. Ces particules présentent une affinité comparable pour le catéchol mais pas pour les amines primaires. La taille des particules utilisées n'est pas précisée.

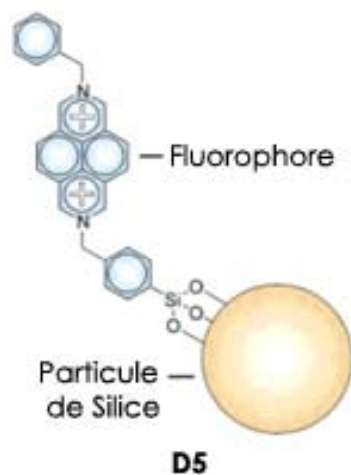


Figure 1-34 : Sonde fluorescente D5 pour la dopamine, développée par Raymo et Cejas à partir de particules de silice.⁷⁴

Ainsi la sonde fluorescente **D2**, décrite par Glass and Secor semble la plus adaptée en vue d'une application en neurobiologie. En effet, elle fonctionne en milieu aqueux salin à pH physiologique et présente une très bonne affinité pour la dopamine ($K_{\text{association DA}} = 3\,400\text{ M}^{-1}$). Celle-ci n'est pas trop importante, pour ne pas bloquer la transmission du message nerveux (*i.e.* inférieure à l'affinité des récepteurs biologiques pour la dopamine). Elle fonctionne par formation de deux liaisons covalentes avec la cible afin de former une fonction ester boronique et un iminium. Il est fort probable que cette sonde réagisse également avec les différents sucres présents *in vivo*, il serait donc plus intéressant d'avoir une sonde basée sur des liaisons non-covalentes.

Ces études bibliographiques sur la détection de l'acétylcholine, et de la dopamine par fluorescence ont montré qu'il existait déjà des sondes fluorescentes pour ces cibles dans la littérature. La plupart des sondes pour l'acétylcholine fonctionnent de façon indirecte, par déplacement d'un fluorophore. Des cavitants de type calix[n]arènes ou résorcinarènes essentiellement, ont été utilisés pour développer ce type de sonde. Dans le cas de la dopamine, la grande majorité des sondes fluorescentes développées sont basées sur une réaction chimique entre la sonde et la fonction catéchol de la cible. Toutefois, les exigences du milieu physiologique (pH 7,4, concentration en sels > 100 mM) et de sélectivité pour le neurotransmetteur choisi ne sont pas encore tout à fait respectées. De plus dans le cas de l'acétylcholine, les sondes fonctionnant toute de façon indirecte en milieu aqueux, elles permettent de suivre le fluorophore libéré et non la cible. Elles ne sont donc pas adaptées pour réaliser de l'imagerie.

Ainsi, le développement de nouvelles sondes fluorescentes pour la détection de ces espèces *ex vivo*, par une méthode directe et grâce à des interactions non-covalentes a été considéré. Dans la continuité des travaux précédents basés sur des récepteurs types calix[n]arènes, résorcinarènes ou curcubituriles, les structures envisagées sont des dérivés de cyclotrivératrylènes (CTVs). Cette famille de cavitant encore peu exploitée pour le développement de sondes fluorescentes, présente un potentiel certain pour obtenir des

telles structures, comme l'on démontré les travaux effectués par M-L Dumartin lors d'une thèse antérieure, au laboratoire.

A présent, une étude bibliographique sur les cyclotrivratriylènes et dérivés va être proposée.

C. Des dérivés de cyclotrivéatrylènes comme sondes moléculaires fluorescentes.

a. La famille des cyclotrivéatrylènes et dérivés

Le nom « cyclotrivéatrylène » a été attribué par Lindsley,⁷⁵ en 1963, à un trimère en forme de bol, composé de trois benzènes substitués chacun par deux groupements méthoxy, et liés par des ponts méthylènes (cf. **1**, Figure 1-35). Cette molécule fut synthétisée pour la première fois par Robinson⁷⁶, au début du 20^{ème} siècle, mais ne fut identifiée que 50 ans plus tard grâce aux travaux de Lindsey,^{75,77} Erdtman *et al.*⁷⁸ et Goldup *et al.*⁷⁹. Par extension, le nom de cyclotrivéatrylène désigne également tous les dérivés portant divers groupements éthers. De façon plus générale, le terme cyclotribenzène (CTB) désigne tous les trimères formés de trois benzènes substitués ou non, et reliés par des ponts méthyles. Cependant, dans un souci de simplicité nous appellerons CTV tous les dérivés de cyclotribenzènes, portant au moins une fonction éther ou phénol, par la suite.

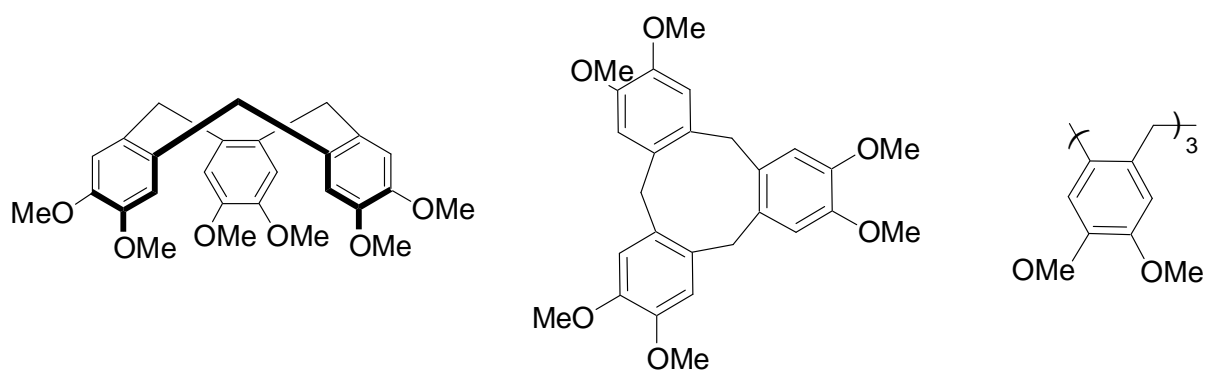


Figure 1-35 : Structure chimique du premier cyclotrivéatrylène **1 développé, et représentations couramment utilisées.**

De nombreux dérivés de cyclotrivéatrylène ont été développés par introduction de divers groupements R_1 , R_2 *via* des liens éthers à partir de l'analogue phénolique, le cyclotricatechylène (CTC, **2**, cf. Figure 1-36), ou le cyclotriguaiacylène (CTG, **3**, cf. Figure 1-36).^{80,81,82,83,84} D'autres familles de dérivés avec d'autres hétéroatomes ont été décrits, notamment avec des souffres^{85,86} ou des azotes, dérivés amide⁸⁷, amine⁸⁷, le cyclotrianisidine (CTA, **4**, cf. Figure 1-36), ou encore d'imine⁸⁸.^{84,81,82}

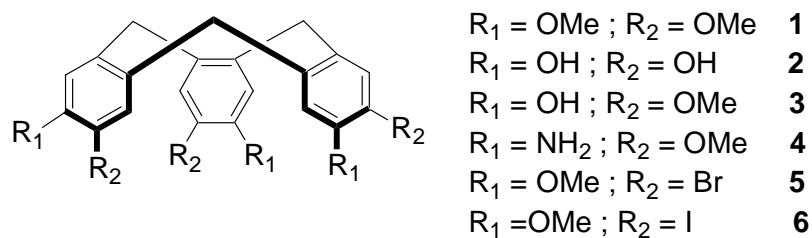


Figure 1-36 : Structure du cyclotrivératrylène, **1**, et dérivés.

Des dérivés de CTV comportant des halogènes (brome, **5**, ou iode, **6**, cf. Figure 1-35)^{89,88,90,91,92} ont également été développés. Ceux-ci constituent des intermédiaires de synthèse intéressants pour introduire d'autres groupements. Jusqu'à présent, un seul exemple de CTV, **7**, comportant des groupements électro-attracteurs (cf. Figure 1-37) a été décrit par Warmuth et Xu.⁹³ Plus récemment, Zheng *and co.*⁹⁴ ont exploité le CTV **5** pour introduire des aromatiques directement sur le squelette *via* un couplage organométallique de Suzuki-Miyaura (cf. **8** sur la Figure 1-37).

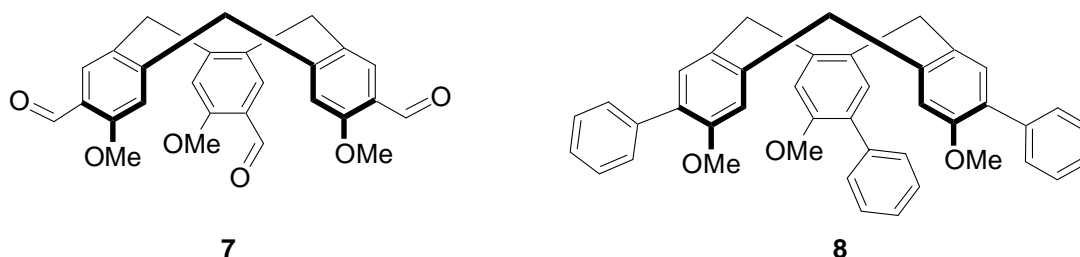


Figure 1-37 : Structure des dérivés de CTV développés par Warmuth et Xu, **7**, et Zheng *and co.*, **8**.^{93,94}

Contrairement aux résorcinarènes ou aux calixarènes, les cyclotrivératrylènes et dérivés adoptent quasi exclusivement une conformation rigide, stable, en forme de bol, mise en évidence par RMN et structures cristallographiques.^{80,81} En particulier, les hydrogènes des ponts méthylènes sont différents et leurs signature en RMN du proton est caractéristique. Les déplacements chimiques des hydrogènes pseudo-axiaux des ponts (H_a) sont séparés de ceux des hydrogènes équatoriaux (H_e) d'environ 1 ppm. Ceci provient de la compression stérique engendrée par la conformation couronne. Cette compression stérique a également pour conséquence de fermer la cavité en son extrémité supérieure.

De part leur rigidité et leur chiralité dans certains cas (lorsqu'ils possèdent des groupements R_1 et R_2 différents) certains CTVs et dérivés sont optiquement actifs, comme l'ont démontré pour la première fois Luttringaus et Peters, en 1966.⁹⁵ Les propriétés optiques de nombreux CTVs ont été largement étudiées par l'équipe de Collet.^{80,81}

L'étude des propriétés optiques des CTVs a permis de mettre en évidence, la possible conversion d'une forme couronne à une autre, suite à la racémisation d'un CTV optiquement pur.^{80,81,95} La barrière d'inter-conversion couronne-couronne est assez élevée et de l'ordre de 26-28 kcal.mol⁻¹, pour de nombreux CTVs, ce qui ne peut pas être mesuré par RMN.⁸⁰ Le mécanisme d'inversion de conformation a été établi suite à divers travaux de Sato et Unq,

Dale, et Ermer⁸⁰ et références incluses. Ce n'est que récemment que l'état intermédiaire en conformation pseudo-selle a été isolé par Luz *and co.*⁹⁶

b. Synthèse du trimère

Deux voies de synthèse existent pour former les CTVs et dérivés.

La première voie de synthèse développée par Robinson,⁷⁶ consiste en la condensation de composés aromatiques avec le formaldéhyde en conditions acides. Cette méthode fonctionne lorsque l'aromatique est substitué par deux groupements électro-donneurs (comme deux éthers par exemple) positionnés en *ortho* l'un de l'autre. Lorsque les deux groupements sont identiques, le CTV formé est achiral et de symétrie C_3 . En revanche, si les deux groupements sont différents, cette méthode n'étant pas régiosélective, elle conduit à un mélange racémique de deux trimères isomères C_1 et C_3 .⁸⁰ Aussi, cette méthode s'applique presque uniquement pour la formation d'hétéro-cyclotrivératrylènes, à partir d'indole, pyrrole ou thiophène par exemple.⁸⁰

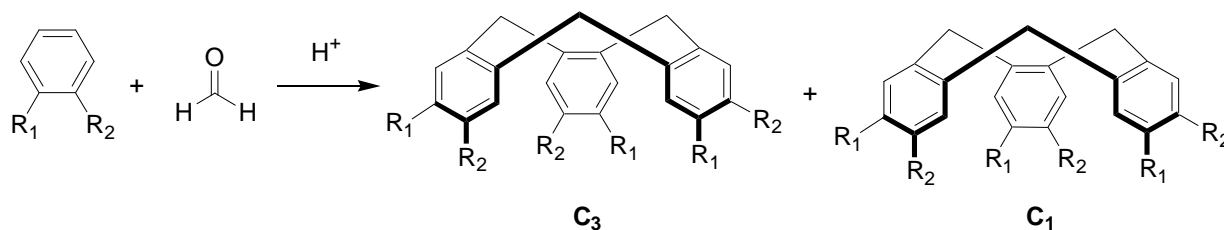


Figure 1-38 : Voie de synthèse des CTVs développée par Robinson.⁷⁶

L'autre voie principalement utilisée, dite de « trimérisation », consiste en la condensation d'un alcool benzylique approprié grâce à une catalyse acide. Le plus souvent, la réaction est faite dans des conditions dures (acide perchlorique, acide formique, acide acétique).^{80,82,91} Cependant, des conditions plus douces, ont récemment été mises au point, en utilisant un acide de Lewis, le triflate de scandium dans l'acétonitrile,⁹⁷ ou en liquide ionique.⁹⁸ Cette méthode ne conduit qu'à un seul trimer de symétrie C_3 contrairement à la première méthode. Néanmoins, tout comme la première méthode, elle nécessite d'avoir un alcool benzylique substitué par des groupements R₁ et R₂ donneurs, sans quoi la trimérisation *via* la formation d'un carbocation, lors de la substitution électrophile aromatique, est défavorisée.

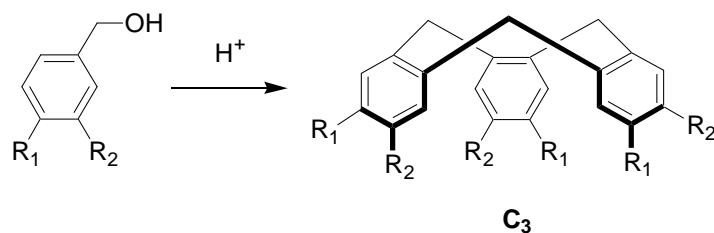


Figure 1-39 : Formation d'un CTV par trimérisation.

Les CTVs et dérivés forment une cavité concave, peu profonde, riche en électrons dans laquelle des molécules invitées peuvent venir se complexer facilement *via* de nombreuses interactions (π -cations, π - π , effet hydrophobe, etc.). De plus, une post-fonctionnalisations, *via* des bras éthers principalement, permet l'introduction de multiples fonctions. Ceci permet de les utiliser de façons diverses et variées.

c. Matériaux et CTVs

Dans le domaine des matériaux, les CTVs ont été utilisés dans de nombreuses applications. L'une des plus anciennes est le développement de cristaux liquides.^{80,81,99,100} Cette application met à profit le squelette rigide et la fonctionnalisation facile des CTVs par de longs bras éthers.

Echegoyen *and co.*¹⁰¹ ont développé des CTVs substitués par des groupes éthers terminés par des disulfures, afin de former une monocouche sur la surface d'une électrode en or (cf. **9**, Figure 1-40). La monocouche de CTVs peut complexer des fullerènes (C₆₀), grâce à sa forme de bol et des longues chaînes carbonées.

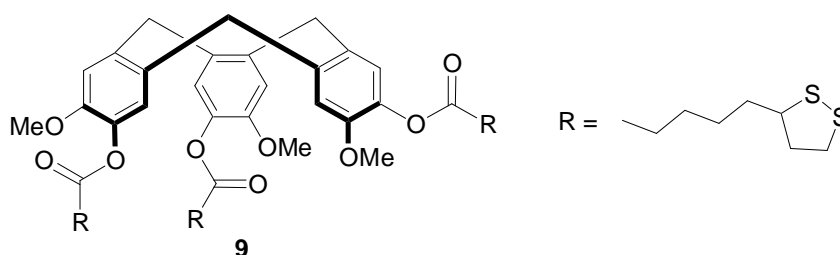


Figure 1-40 : CTV **9** développé par Echegoyen *and co.*¹⁰¹

Récemment, des dérivés dendrimériques de CTVs substitués par des bras comportant de multiples aromatiques ont été décrits par Heiney, Peterca, Percec *and co.*^{102,103} Ces couronnes dendritiques ont pour propriété de s'auto-assembler sous forme de sphère ou d'hélice pyramidale pouvant elles-mêmes s'auto-assembler, sous forme de tube ou de cube. Le premier exemple d'assemblage moléculaire purement organique, en forme de cube, a été décrit par Warmuth et Xu.⁹³ Il est constitué de CTVs **7** aux angles du cube et de diamines symétriques pour les arrêtes (cf. Figure 1-41).

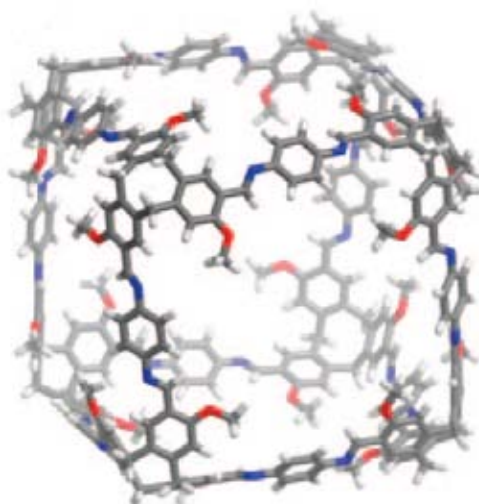


Figure 1-41 : Structure cubique à base de CTV 7, développée par Warmuth et Xu.⁹³

McKeown, Budd *and co.*¹⁰⁴ ont développé, en 2006, le premier polymère purement organique à base de CTV. Celui-ci présente une structure microporeuse intrinsèque et peut adsorber de l'hydrogène. Le polymère formé avec des CTVs présente une meilleure capacité de stockage que ceux avec des tripodes aromatiques plans. Ceci met une fois de plus en avant l'avantage d'avoir une structure en forme de bol rigide.

Dans le domaine des assemblages moléculaires, l'application la plus développée aujourd'hui, notamment par Hardie *and co.*, Raston *and co.*, Mough et Holman, est la formation d'assemblages organométalliques supramoléculaires, 2-D et 3-D, comme en témoigne les dernières revues à propos des CTVs auxquelles nous renvoyons le lecteur.^{83,84}

Une nouvelle application des CTVs consiste en la formation de gels. Certains sont purement organiques, et formés en milieu organique, comme ceux développés par Hannon *and co.*¹⁰⁵ ou Kubo *and co.*¹⁰⁶ La formation de ces gels est basée sur des interactions π - π , des liaisons hydrogènes, voir des interactions entre des acides boroniques et des diols. D'autres sont organométalliques, comme ceux développés par Hardie *and co.*¹⁰⁷, formés en milieux organiques (DMSO, acétonitrile, etc.) en présence d'ions Cu(II) ou Ag(I) par exemple. Ils reposent sur l'introduction de ligands comme des bipyridines, ou de bonnes fonctions complexantes de cations, telles que les esters et thiourées. Enfin plus récemment, les premiers exemples d'hydrogels à base de CTV ont été décrits par Jiang *and co.* (cf. **10** et **11**,).¹⁰⁸ Leur formation repose sur des interactions π - π et des liaisons hydrogènes, et est contrôlable par le pH.

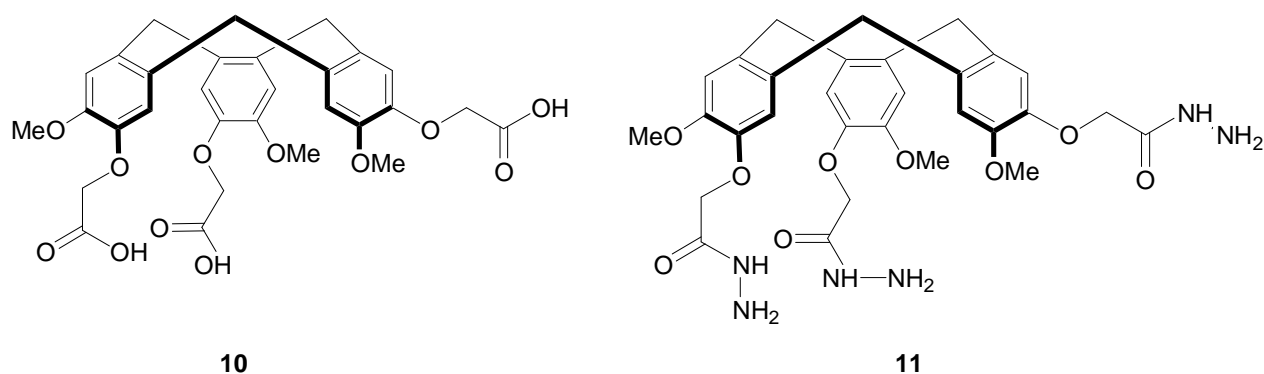


Figure 1-42 : Structure des CTVs 10 et 11 développés par l'équipe de Jiang, permettant de former des hydrogels.¹⁰⁸

Toutes ces applications concernaient la chimie des matériaux, regardons plus en détails maintenant, celles concernant la reconnaissance moléculaire et tout particulièrement leur utilisation comme sondes moléculaires fluorescentes.

d. Les CTVs : sondes moléculaires

1. Les CTVs comme sondes pour les fullerènes

Depuis les travaux d'Atwood, Raston *and co.*^{109,110} démontrant la capacité des CTVs à complexer les fullerènes C₆₀ et C₇₀ notamment, de nombreux dérivés de CTVs ont été développés tout en améliorant leurs propriétés de complexation.^{94,109-117} Ils ont été modifiés afin d'être immobilisés sur des électrodes d'or¹⁰¹ ou d'être solubles dans l'eau¹¹⁸. Récemment, Zheng *and co.*⁹⁴ ont décrit un CTV modifié directement sur le squelette par un couplage organométallique de Suzuki-Miyaura, formant une cavité profonde. Ce nouveau CTV est fluorescent et complexe les C₆₀ et C₇₀ dans le toluène, grâce à des interactions π-π, et une bonne complémentarité de forme entre les deux structures. La formation du complexe induit un shift bathochrome de la longueur d'onde d'émission du CTV (d'environ 10 nm) et diminue le rendement quantique de fluorescence. Ceci s'explique, selon les auteurs, par un transfert de charge photo-induit entre le CTV, riche en électrons, et le fullerène relativement pauvre en électrons.

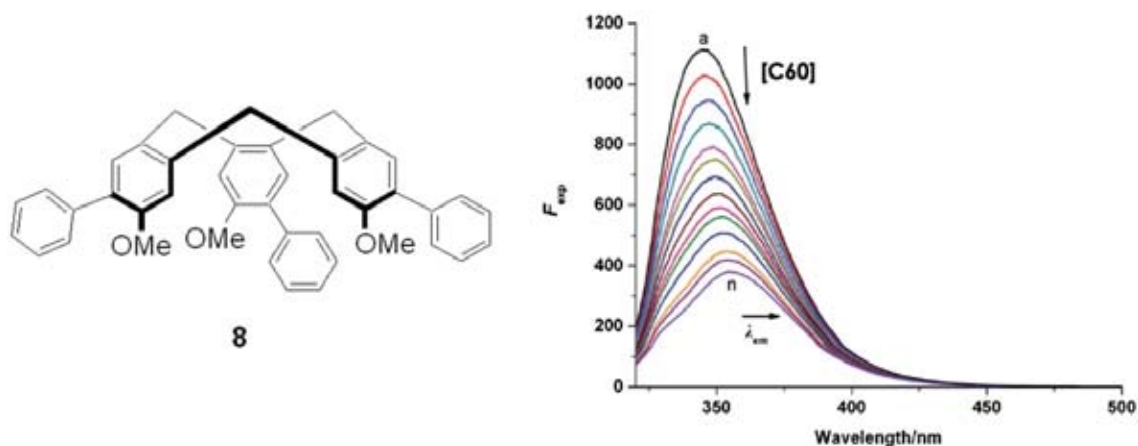


Figure 1-43 : Structure du CTV 8 développé par Zheng *and co.*, et courbe de titrage par fluorescence de la complexation du C₆₀.⁹⁴

L'équipe de Han¹¹⁸ a développé des dérivés de CTV fonctionnalisés par des sucres, capables de complexer et ainsi solubiliser, les fullerènes dans l'eau (cf. **12**, Figure 1-44). Ces CTVs fonctionnalisés par des sucres sont fluorescents. L'ajout de fullerènes dans un mélange toluène-DMSO (1:1) induit une extinction de fluorescence jusqu'à 80 % ainsi qu'un déplacement bathochrome de 16 nm de l'émission. Ces deux phénomènes s'expliquent selon les auteurs par un transfert d'électron photo-induit entre les entités sucres et le fullerène.

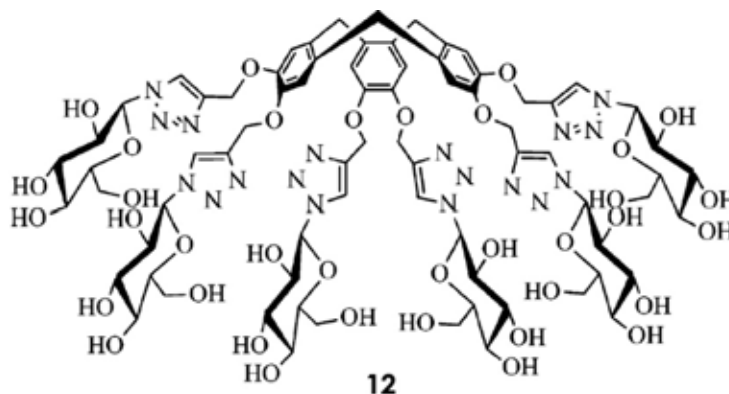


Figure 1-44 : Structure du CTV 12 développés par Han *and co.*¹¹⁸

L'équipe de Mendoza¹¹⁷ a également décrit un CTV substitué par un dérivé d'antracène reconnaissant les fullerènes ce qui conduisait également à un PET entre la cavité et la cible. Cependant l'étude ne porte que sur l'absorption.

2. Les CTVs pour la reconnaissance d'ions

Des dérivés de CTVs sont également utilisés pour la reconnaissance d'anions, et deux stratégies ont été développées pour y parvenir.^{84,119,120,121,122}

La première méthode développée consiste à utiliser des cations métalliques comme anionophores. Ils sont introduits sur la structure CTV à travers des complexes

organométalliques. Atwood et Steed *and co.* ont décrits des CTVs modifiés par des ferrocènes permettant la complexation d'ions halogénures,¹²² ou des complexes de Ru(II) ou Ir(II) permettant la complexation d'anions comme BF_4^- mais surtout des anions radioactifs, pouvant servir de traceur, comme $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ou $^{188}\text{ReO}_4^-$.¹¹⁹

L'autre voie consiste en l'utilisation de groupements donneurs de liaisons hydrogènes, comme les amides. Des CTVs portant des amides terminés par des ferrocènes ont été décrits par Dutasta *and co.*¹²⁰ permettant la détection des anions H_2PO_4^- et ATP^{2-} (cf. **13** et **14**, Figure 1-45). La reconnaissance des anions peut être suivie comme pour les cas précédents, par électrochimie. Echegoyen *and co.*¹²¹ ont développé des CTVs comportant des fonctions amides supportées sur des électrodes d'or *via* des thiols. Ces systèmes reconnaissent sélectivement les ions acétates par rapport aux autres anions couramment testés.

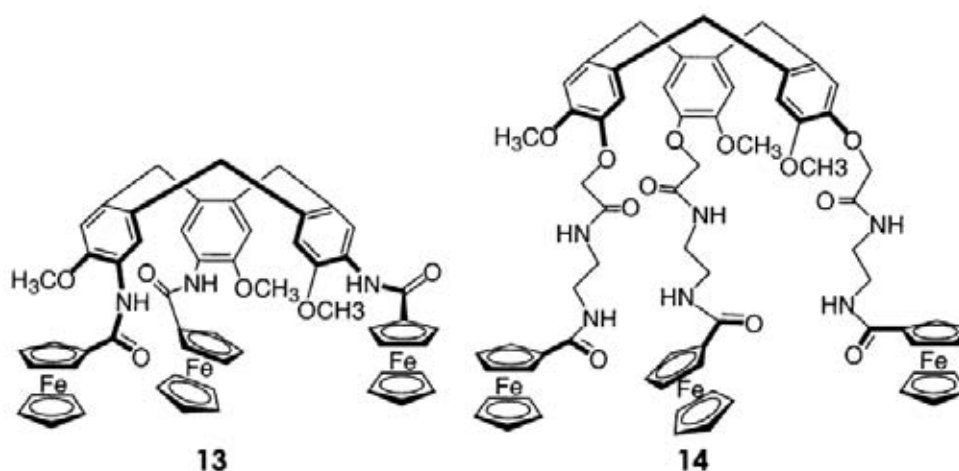


Figure 1-45 : CTVs **13** et **14**, substitués par des ferrocènes, par Dutasta *and co.*¹²⁰

La reconnaissance de cations, par la cavité riche en électrons formée par les CTVs est connue depuis longtemps. Le premier exemple fut décrit par Hyatt *and co.*¹²³ en 1978. Le « CTV-octopus » développé permet la reconnaissance des cations alcalins et de l'ion ammonium, NH_4^+ de façon sélective.

Peu après, Frensch et Vögtle eurent l'idée de former des éther-couronnes en partant de deux oxygènes de différents aromatiques¹²⁴(cf. **15**, Figure 1-46). Dans ces premiers travaux les propriétés de complexation de ces CTVs éther-couronne n'ont pas été étudiées. Ce fut Akabori *et al.*¹²⁵ qui montrèrent que ces CTV éther-couronnes étaient de bons complexants de cations (alcalins, alcalino-terreux) ce qui permettait leur extraction partielle d'une phase aqueuse.

Plus récemment, Verboom *and co.*¹²⁶ ont développé le CTV **16** (cf. Figure 1-46), substitué par des chaînes portant des carbonyles, comme plateforme permettant l'extraction d'ions actinides et lanthanides d'une phase aqueuse.

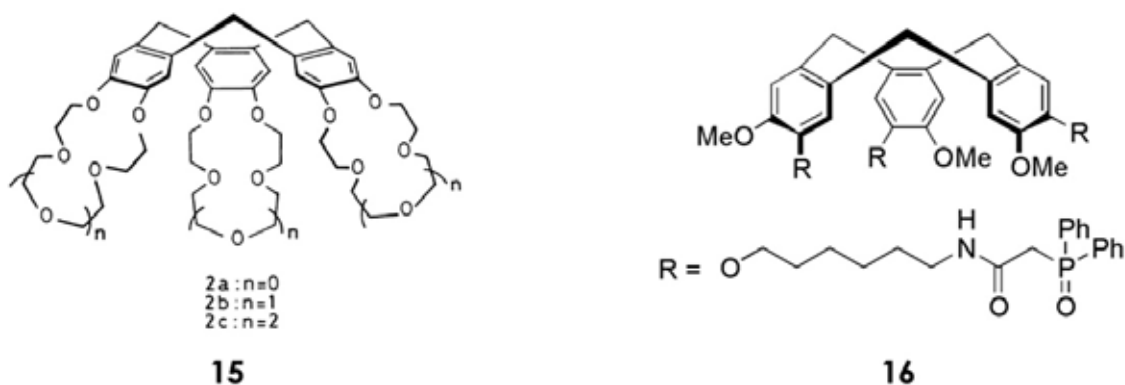


Figure 1-46 : CTVs pour la complexation de cations développés par Frensch et Vögtle,¹²⁴ 15 et par Verboom *and co.*,¹²⁶ 16.

L'affinité de la cage des CTVs, riche en électrons, pour des ions ammoniums a été suggérée par Hyatt¹²³ et confirmée par la suite, par plusieurs travaux.

Secchi *and co.*¹²⁷ ont développé des cavités plus profondes à base de CTVs (cf. 17, Figure 1-47), permettant des interactions π -cations plus fortes. Ils ont montré que ces cavités pouvaient complexer le tétraméthylammonium dans le chloroforme, lorsque le CTV porte des phénols (permettant d'avoir de bons groupements donneurs de liaisons hydrogènes en plus d'une cavité riche en électrons).

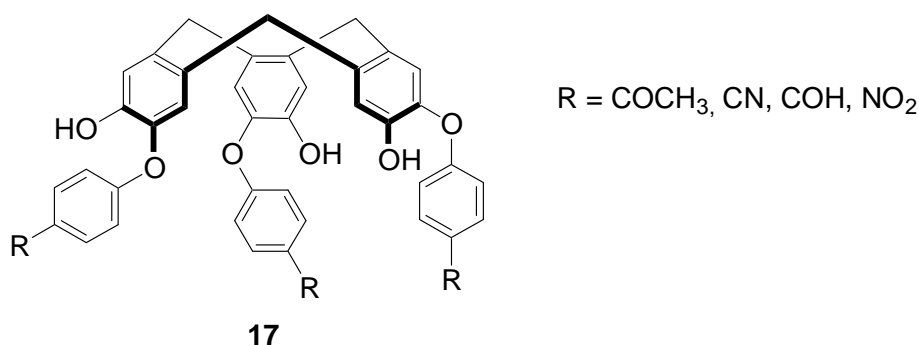


Figure 1-47 : Structure des CTVs développés par Secchi *and co.* pour la complexation de cations.¹²⁷

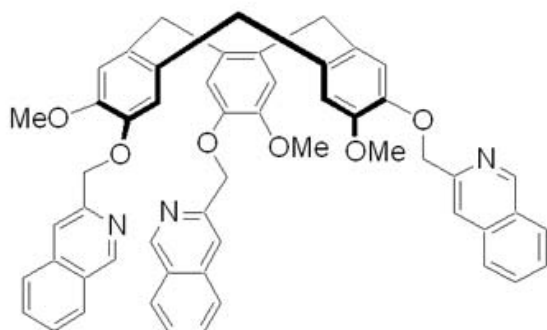
Récemment, des capsules à bases de dérivés de CTVs faisant intervenir des ammoniums comme template, ont été décrites, comme par exemple celle développée par Kubo *and co.* (cf. Figure 1-48).^{128,129,130}



18

Figure 1-48 : Exemple de structure des capsules à base de CTV développée par Kubo *and* *co.*^{129,130}

Kawakami *et al.*¹³¹ ont développé le premier CTV fluorescent permettant la détection du cuivre (II) Cu^{2+} (cf. **19**, Figure 1-49). Pour cela, trois groupements quinoléines, connus pour leur affinité pour le cuivre (II), ont été introduits *via* des groupements éthers. Ceux-ci permettent également d'avoir un signal de fluorescence intéressant. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la sonde ainsi formée sont décalées vers le rouge par rapport à celle du « monomère » quinoléine, indiquant un effet du CTV. L'ajout de cuivre (Cu^{2+}) dans l'acétonitrile sur la sonde, a pour effet d'exalter la fluorescence jusqu'à un facteur 4, alors qu'il induit une diminution de plus de moitié de celle du monomère. Aucune explication n'est proposée par les auteurs.



19

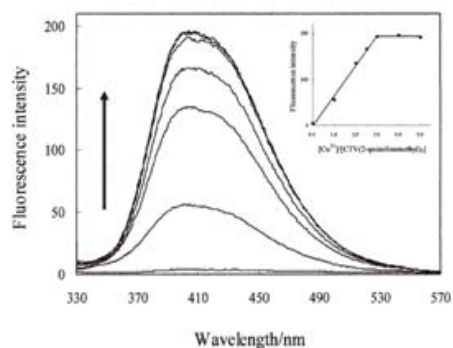


Figure 1-49 : Structure du CTV **19** développé par Kawakami *et al.* comme sonde fluorescente pour l'ion cuivre Cu^{2+} , suivi de la courbe de titrage du cuivre dans l'acétonitrile.¹³¹

Le premier dérivé de CTV fluorescent, capable de complexer des ammoniums dans un tampon salins aqueux, et en particulier des ammoniums d'intérêt biologique comme l'acétylcholine et la choline, a été développé au laboratoire (cf. **20**, Figure 1-50).¹³² Celui-ci est substitué par des groupements phosphorilés chargés négativement et comportant des chaînes alkyles hydrophobes. Ainsi, des interactions électrostatiques et un effet hydrophobe peuvent avoir lieu en plus des interactions π -cations. Le CTV **20** est fluorescent dans l'ultraviolet, en milieu physiologique. La complexation d'acétylcholine ou de choline a pour conséquence d'augmenter l'intensité de fluorescence du CTV d'environ 20 %. Ce CTV ne présente pas de sélectivité particulière pour l'une de ces deux cibles.

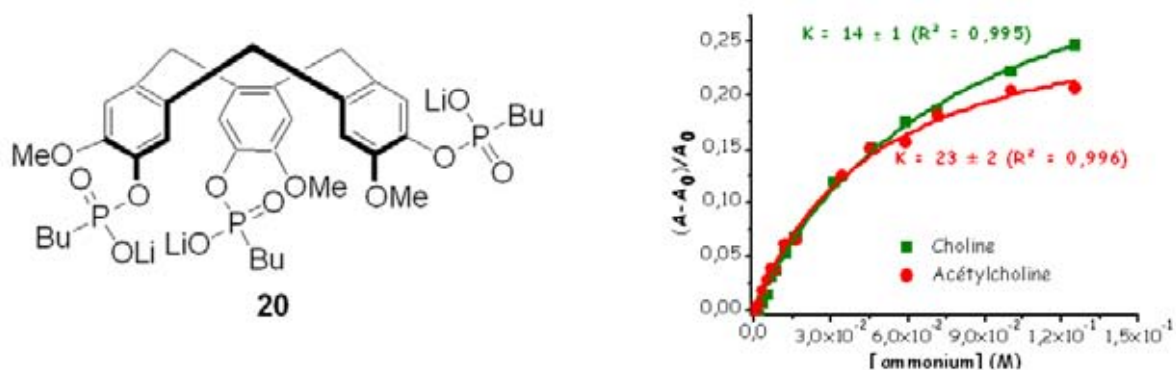


Figure 1-50 : Structure du CTV fluorescent 20, développé au laboratoire permettant la détection de l'Acétylcholine et de la Choline, en milieu physiologique.¹³²

Les travaux qui vont être présentés maintenant s'inscrivent dans la continuité de la thèse de M-L Dumartin. C'est au cours de celle-ci qu'avait été développée cette première sonde fluorescente à acétylcholine fonctionnant en milieu physiologique, de façon directe. Cependant, des améliorations étaient encore requises afin d'avoir une sonde permettant de réaliser de l'imagerie. Tout d'abord, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de cette sonde étaient trop basses pour une telle application. La constante d'association, ensuite, était trop faible pour envisager de la détection d'acétylcholine en milieu biologique, où sa concentration fluctue entre 10^{-6} et $10^{-3}M^{-1}$. Enfin, le manque de sélectivité en faveur de l'acétylcholine par rapport à la choline restait également une limitation.

Ainsi, il a été envisagé d'explorer plus en détail différentes possibilités permettant d'améliorer les propriétés spectroscopiques de ce type de cavitants, en même temps que les propriétés de complexation.

Dans une première étude, différents couples de groupements électro-attracteur et électro-donneurs conjugués ont été introduits directement sur le squelette du CTV. Ceci permet d'envisager l'existence d'un transfert de charge photo-induit pouvant déplacer les spectres d'émission de façon bathochrome. De plus, l'influence des groupements introduits, sur les propriétés de reconnaissance, pourra ainsi être évaluée.

Références bibliographiques

- (1) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- (2) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 1999.
- (3) Goppert-Mayer, M. *Ann. Phys.-Berlin* **1931**, *9*, 273–294.
- (4) Kaiser, W.; Garrett, C. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229–231.
- (5) Mertz, J. *Eur. Phys. J. D* **1998**, *3*, 53–66.
- (6) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- (7) Fisher, A.; Cremer, C.; Stelzer, E. H. K. *Appl. Opt.* **1995**, *34*, 1989–2003.
- (8) Oheim, M.; Michael, D. J.; Geisbauer, M.; Madsen, D.; Chow, R. H. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2006**, *58*, 788–808.
- (9) He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.
- (10) Terenziani, F.; Katan, C.; Badaeva, E.; Tretiak, S.; Blanchard-Desce, M. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4641–4678.
- (11) Yao, S.; Belfield, K. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3199–3217.
- (12) Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J.-L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J.-Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Röckel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X.-L.; Xu, C. *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- (13) Mongin, O.; Porrès, L.; Charlot, M.; Katan, C.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481–1498.
- (14) Porrès, L.; Mongin, O.; Katan, C.; Charlot, M.; Pons, T.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Org. Lett.* **2003**, *6*, 47–50.
- (15) Strachan, C. J.; Windbergs, M.; Offerhaus, H. L. *Int. J. Pharm.* **2011**, *417*, 163–172.
- (16) Vo-Dinh, T. *Biomedical Photonics Handbook*; 1st ed.; CRC Press, 2003.
- (17) Bojinov, V.; Georgiev, N. *J. Univ. Chem. Tech. Metal.* **2011**, *46*, 3–26.
- (18) Schäferling, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 3532–3554.
- (19) Altschuh, D.; Oncul, S.; Demchenko, A. P. *J. Mol. Recognit.* **2006**, *19*, 459–477.
- (20) Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- (21) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *110*, 2620–2640.

- (22) Anslyn, E. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 687–699.
- (23) Gründler, P. *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*; Springer, 2007.
- (24) Wiskur, S. L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J. J.; Anslyn, E. V. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 963–972.
- (25) Czarnik, A. W. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 423–428.
- (26) Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980.
- (27) Eun Jun, M.; Roy, B.; Han Ahn, K. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7583–7601.
- (28) Cho, D.-G.; Sessler, J. L. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1647–1662.
- (29) Mohr, G. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1201–1214.
- (30) Bell, T. W.; Hext, N. M. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *36*, 589–598.
- (31) de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- (32) Ward, M. D. *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 365–375.
- (33) Leray, I.; Valeur, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2009*, 3525–3535.
- (34) Lehn, J. M. *Struct. Bonding* **1973**, *16*, 1–69.
- (35) Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives: a Personal Account*; VCH, 1995.
- (36) Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K. J. *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*; John Wiley & Sons, 2007.
- (37) Schneider, H.-J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3924–3977.
- (38) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (39) Schalley, C. A. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH.; 2007.
- (40) Cram, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1986**, *25*, 1039–1057.
- (41) Lehn, J. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **1988**, *27*, 89–112.
- (42) Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R. T. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *653*, 1–22.
- (43) Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- (44) Bourne, Y.; Radić, Z.; Sulzenbacher, G.; Kim, E.; Taylor, P.; Marchot, P. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29256–29267.
- (45) Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Sone, T.; Manabe, O. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5315–5318.

- (46) Oshovsky, G. V.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2366–2393.
- (47) Joseph, R.; Rao, C. P. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4658–4702.
- (48) Koh, K. N.; Araki, K.; Ikeda, A.; Otsuka, H.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 755–758.
- (49) Jin, T. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *45*, 195–201.
- (50) Bakirci, H.; Nau, W. M. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 237–242.
- (51) Pischel, U.; Patra, D.; Koner, A. L.; Nau, W. M. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 310–317.
- (52) Nau, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12614–12618.
- (53) Korbakov, N.; Timmerman, P.; Lidich, N.; Urbach, B.; Sa'ar, A.; Yitzchaik, S. *Langmuir* **2008**, *24*, 2580–2587.
- (54) Cao, X.; Tolbert, R. W.; McHale, J. L.; Edwards, W. D. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 2739–2748.
- (55) Kim, J.; Lee, M. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 3378–3382.
- (56) Jin, T. *Sensors* **2010**, *10*, 2438–2449.
- (57) Zhang, Y.-J.; Cao, W.-X.; Xu, J. *Chin. J. Chem.* **2002**, *20*, 322–326.
- (58) Inouye, M.; Hashimoto, K.; Isagawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5517–5518.
- (59) Inouye, M. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *148*, 265–283.
- (60) Tan, S.-D.; Chen, W.-H.; Satake, A.; Wang, B.; Xu, Z.-L.; Kobuke, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2719–2721.
- (61) Ballester, P.; Sarmentero, M. A. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3477–3480.
- (62) Hof, F.; Trembleau, L.; Ullrich, E. C.; Rebek, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3150–3153.
- (63) Ballester, P.; Shivanyuk, A.; Far, A. R.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14014–14016.
- (64) Berryman, O. B.; Sather, A. C.; Rebek, J. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5232–5235.
- (65) Cookson, M. R. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 29–52.
- (66) Everitt, B. J.; Robbins, T. W. *Nat Neurosci* **2005**, *8*, 1481–1489.
- (67) Yoon, J.; Czarnik, A. W. *Bioorgan. Med. Chem.* **1993**, *1*, 267–271.
- (68) Guo, Z.; Shin, I.; Yoon, J. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5956–5967.
- (69) Secor, K. E.; Glass, T. E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3727–3730.

- (70) Jang, Y.-J.; Jun, J.-H.; Swamy, K. M. K.; Nakamura, K.; Koh, H.-S.; Yoon, Y.-J.; Yoon, J.-Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 2041–2043.
- (71) Xiaojing Zhu; Ge, X.; Jian, C. *J. Fluoresc.* **2007**, *17*, 655–661.
- (72) Lee, J.-S.; Kim, H. K.; Feng, S.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2339–2341.
- (73) Miskolczy, Z.; Biczók, L.; Megyesi, M.; Jablonkai, I. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1645–1651.
- (74) Raymo, F. M.; Cejas, M. A. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3183–3185.
- (75) Lindsey, A. *Chem. Ind.* **1963**, 823–824.
- (76) Robinson, G. M. *J. Chem. Soc.* **1915**, *107*, 267–276.
- (77) Lindsey, A. *J. Chem. Soc.* **1965**, 1685–&.
- (78) Erdtman, H.; Ryhage, R.; Haglid, F. *Acta Chem. Scand.* **1964**, *18*, 1249–+.
- (79) Goldup, A.; Morrison, A.; Smith, G. *J. Chem. Soc.* **1965**, 3864–&.
- (80) André, C. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5725–5759.
- (81) Atwood, J. L.; Lehn, J.-M.; Davies, J. E.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; F. Vögtle, Pergamon: Oxford, UK, 1996; Vol. 2.
- (82) Brotin, T.; Dutasta, J.-P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 88–130.
- (83) Hardie, M. J.; Ahmad, R.; Sumby, C. J. *New J. Chem.* **2005**, *29*, 1231–1240.
- (84) Hardie, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 516–527.
- (85) Garcia, C.; Andraud, C.; Collet, A. *Supramolecular Chemistry* **1992**, *1*, 31–45.
- (86) Sanseverino, J.; Chambron, J.-C.; Aubert, E.; Espinosa, E. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1914–1917.
- (87) Garcia, C.; Malthete, J.; Collet, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, *130*, 93–95.
- (88) GARCIA, C.; COLLET, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 52–58.
- (89) Cram, D. J. *Science* **1983**, *219*, 1177–1183.
- (90) Canceill, J.; Collet, A. *Nouv. J. Chem.* **1986**, *10*, 17–23.
- (91) Cram, D. J.; Tanner, M. E.; Keipert, S. J.; Knobler, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8909–8916.
- (92) Traoré, T.; Delacour, L.; Garcia-Argote, S.; Berthault, P.; Cintrat, J.-C.; Rousseau, B. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 960–962.
- (93) Xu, D.; Warmuth, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7520–7521.
- (94) Yu, J.-T.; Huang, Z.-T.; Zheng, Q.-Y. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*.
- (95) Luttring, A.; KC Peters *Angew. Chem., Int. Ed.* **1966**, *5*, 593–594.

- (96) Zimmermann, H.; Tolstoy, P.; Limbach, H. H.; Poupko, R.; Luz, Z. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18772–18778.
- (97) Brotin, T.; Roy, V.; Dutasta, J.-P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6187–6195.
- (98) Scott, J. L.; MacFarlane, D. R.; Raston, C. L.; Teoh, C. M. *Green Chem.* **2000**, *2*, 123–126.
- (99) Collet, A.; Dutasta, J.-P.; Lozach, B.; Canceill, J. *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 103–129.
- (100) Felder, D.; Heinrich, B.; Guillon, D.; Nicoud, J. F.; Nierengarten, J. F. *Chem.-Eur. J.* **2000**, *6*, 3501–3507.
- (101) Zhang, S.; Palkar, A.; Fragoso, A.; Prados, P.; de Mendoza, J.; Echegoyen, L. *Chem. Mat.* **2005**, *17*, 2063–2068.
- (102) Percec, V.; Imam, M. R.; Peterca, M.; Wilson, D. A.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *131*, 1294–1304.
- (103) Peterca, M.; Percec, V.; Imam, M. R.; Leowanawat, P.; Morimitsu, K.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14840–14852.
- (104) McKeown, N. B.; Gahnem, B.; Msayib, K. J.; Budd, P. M.; Tattershall, C. E.; Mahmood, K.; Tan, S.; Book, D.; Langmi, H. W.; Walton, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1804–1807.
- (105) Bardelang, D.; Camerel, F.; Ziessel, R.; Schmutz, M.; Hannon, M. J. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 489–494.
- (106) Kubo, Y.; Yoshizumi, W.; Minami, T. *Chem. Lett.* **2008**, *37*, 1238–1239.
- (107) Westcott, A.; Sumby, C. J.; Walshaw, R. D.; Hardie, M. J. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 902–912.
- (108) Cai, F.; Shen, J.-S.; Wang, J.-H.; Zhang, H.; Zhao, J.-S.; Zeng, E.-M.; Jiang, Y.-B. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1418–1423.
- (109) Steed, J. W.; Junk, P. C.; Atwood, J. L.; Barnes, M. J.; Raston, C. L.; Burkhalter, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10346–10347.
- (110) Atwood, J. L.; Barnes, M. J.; Gardiner, M. G.; Raston, C. L. *Chem. Commun.* **1996**, 1449–1450.
- (111) Matsubara, H.; Oguri, S.; Asano, K.; Yamamoto, K. *Chem. Lett.* **1999**, 431–432.
- (112) Grey, I. E. *Chem. Commun.* **1999**, 1139–1140.
- (113) Nierengarten, J.-F.; Oswald, L.; Eckert, J.-F.; Nicoud, J.-F.; Armaroli, N. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5681–5684.
- (114) Eckert, J. F.; Byrne, D.; Nicoud, J. F.; Oswald, L.; Nierengarten, J. F.; Numata, M.; Ikeda, A.; Shinkai, S.; Armaroli, N. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 749–758.

- (115) Bond, A. M.; Miao, W. J.; Raston, C. L.; Ness, T. J.; Barnes, M. J.; Atwood, J. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1687–1695.
- (116) Wang, L.; Wang, G.-T.; Zhao, X.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3531–3535.
- (117) Huerta, E.; Isla, H.; Pérez, E. M.; Bo, C.; Martín, N.; Mendoza, J. de *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5351–5353.
- (118) Yang, F.; Chen, Q.; Cheng, Q.-Y.; Yan, C.-G.; Han, B.-H. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 971–976.
- (119) Holman, K. T.; Halihan, M. M.; Jurisson, S. S.; Atwood, J. L.; Burkhalter, R. S.; Mitchell, A. R.; Steed, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9567–9576.
- (120) Reynes, O.; Maillard, F.; Moutet, J. C.; Royal, G.; Saint-Aman, E.; Stanciu, G.; Dutasta, J. P.; Gosse, I.; Mulatier, J. C. *J. Organomet. Chem.* **2001**, *637*, 356–363.
- (121) Fairchild, R. M.; Holman, K. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16364–16365.
- (122) Travis Holman, K.; William Orr, G.; L. Atwood, J.; W. Steed, J. *Chem. Commun.* **1998**, 2109–2110.
- (123) Hyatt, J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1808–1811.
- (124) Frensch, K.; Vögtle, F. *Liebigs Annalen Der Chemie* **1979**, 2121–2123.
- (125) Akabori, S.; Takeda, M.; Kawakami, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1413–1415.
- (126) Dam, H. H.; Reinhoudt, D. N.; Verboom, W. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1620–1632.
- (127) Arduini, A.; Calzavacca, F.; Demuru, D.; Pochini, A.; Secchi, A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1386–1388.
- (128) Abrahams, B. F.; FitzGerald, N. J.; Hudson, T. A.; Robson, R.; Waters, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3129–3132.
- (129) Kataoka, K.; James, T. D.; Kubo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15126–15127.
- (130) Kataoka, K.; Okuyama, S.; Minami, T.; James, T. D.; Kubo, Y. *Chem. Commun.* **2009**, 1682–1684.
- (131) Moriuchi-Kawakami, T.; Sato, J.; Shibutani, Y. *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 449–452.
- (132) Dumartin, M.-L.; Givélet, C.; Meyrand, P.; Bibal, B.; Gosse, I. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2725–2728.

Chapitre 2 Sondes fluorescentes aux structures peu étendues

Le développement de CTVs fluorescents siège d'un transfert de charge photo-induit (PCT), par introduction de groupements électro-attracteurs et électro-donneurs conjugués sur le squelette aromatique, avait déjà été envisagé au préalable au laboratoire. En effet, deux CTVs substitués respectivement par des groupements phosphonates, **20** et par des groupements cétones **21**, **22**, avaient été synthétisés (cf. Figure 2-1).^{1,2} Le CTV **20** présente une certaine affinité pour l'acétylcholine et la choline en milieu physiologique, évaluée par spectrofluorimétrie ($K_{\text{ass Ach milieu physiologique}} = 23 \text{ M}^{-1}$).¹ Les CTVs **21** et **22** présentent une fluorescence complexe (sur laquelle nous reviendrons plus tard) et nécessitaient des études complémentaires. Dès lors, l'élaboration d'une petite librairie de CTVs fonctionnalisés par divers groupements électro-donneurs et électro-attracteurs directement introduits sur l'aromatique, a été envisagée. Ceci afin de discriminer le meilleur couple électro-donneurs/électro-attracteurs, au regard des propriétés spectroscopiques mais également de la reconnaissance.

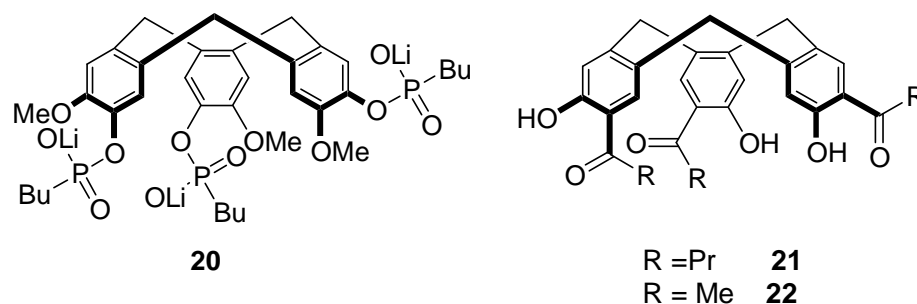


Figure 2-1 : CTVs fluorescents développés auparavant au laboratoire par M-L Dumartin.^{1,2}

L'objectif d'une application biologique implique la solubilité en milieu aqueux à pH physiologique, or la structure aromatique des CTVs est hydrophobe. Afin de rendre celle-ci hydrophile, il a été décidé d'introduire des charges sur la structure. Les cibles envisagées comportent une fonction ammonium. Aussi, des charges négatives seront préférées pour permettre d'éventuelles interactions électrostatiques favorables avec les cibles. Trois stratégies pour introduire des charges négatives sur le squelette CTV, tout en gardant une structure permettant d'avoir un PCT, sont envisageables.

La première stratégie repose sur l'utilisation des groupements phénolates comme électro-donneurs, chargés négativement (cf. stratégie 1, Figure 2-2). Le pK_A d'un phénol aromatique se situe entre 9 et 10.³ Pour l'abaisser, afin de se rapprocher du pH physiologique, il faut introduire un groupement électro-attracteur fort (de type nitro, nitrile, sulfone ou cétone), qui va appauvrir l'aromatique et ainsi augmenter le caractère acide du phénol. L'introduction de tels groupements permettra également d'avoir un bon transfert de charge à l'état excité.

La seconde stratégie consiste à introduire des groupements chargés négativement à pH physiologique au niveau des éthers (type acide carboxylique ou phosphonate) (cf. stratégie 2, Figure 2-2). Ces groupements seraient non directement conjugués aux aromatiques. Les éthers étant électro-donneurs, des groupements électro-attracteurs

devront être introduits directement sur les aromatiques afin d'avoir un bon transfert de charge à l'état excité. L'utilisation de groupements carboxylates au niveau des éthers pour améliorer la solubilité des CTVs dans l'eau a déjà été décrite dans la littérature.^{4,5,6} Néanmoins aucun exemple de sonde fluorescente de ce type a été décrit. Ceci vient probablement du fait que si la cible est complexée *via* des interactions impliquant uniquement des groupements introduits sur les éthers (électrostatiques par exemple) ceux-ci se trouvant loin de la cavité et non conjugués à la partie fluorescente, la fluorescence risque de ne pas être perturbée. La complexation ne sera alors pas détectée. Nous n'avons donc pas considéré cette approche au cours de ce travail.

Enfin, la dernière stratégie est basée sur l'introduction de groupements chargés négativement à pH physiologique, directement sur le squelette aromatique afin qu'ils soient conjugués avec les groupements électro-donneurs (cf. stratégie 3, Figure 2-2). Ceux-ci pourront être là encore de type carboxylate, phosphonate ou sulfonate. Ces différents groupements sont faiblement électro-attracteurs. Des groupements électro-donneurs forts devront donc être conjugués afin d'avoir un transfert de charge à l'état excité efficace. Les groupements éther ou amines peuvent convenir. Cependant, les groupements éthers seront préférés pour des raisons de synthèse développées plus tard.

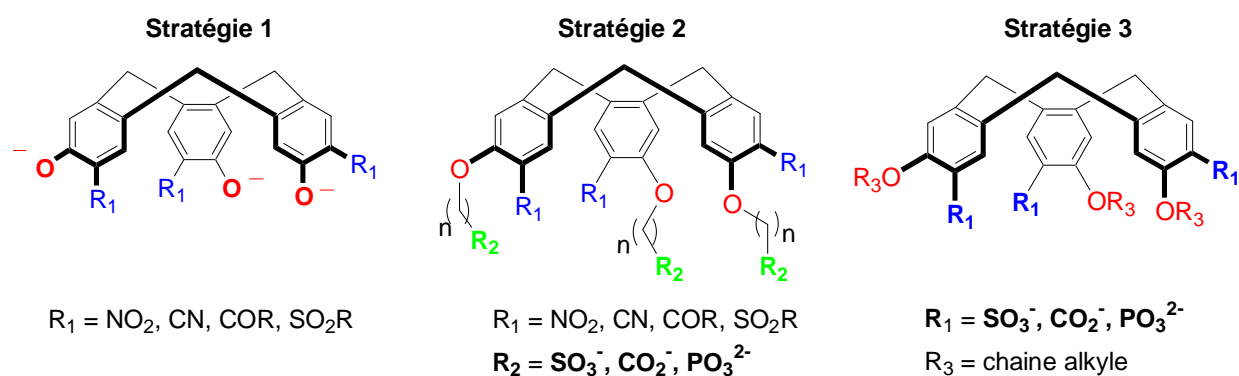


Figure 2-2 : Stratégies envisagées pour obtenir des dérivés de CTVs solubles à pH physiologique et siège d'un PCT. Les groupements en rouge sont impliqués comme électro-donneurs dans le PCT. Les groupements en bleu jouent eux le rôle d'électro-attracteurs. Les groupements en vert, ne sont pas impliqués dans le PCT. Les groupements portant les charges négatives sont en gras.

D'un point de vue synthèse, le mécanisme de synthèse le plus courant pour obtenir un CTV est une substitution électrophile aromatique (cf. chapitre 1).^{7,5,8,9,10} Celle-ci est favorisée par la présence de groupements mésomères électro-donneurs sur l'aromatique. Cependant, le groupement donneur utilisé ne doit pas être sensible aux additions nucléophiles, afin de ne pas conduire à la formation de produits non désirés. Les amines, excellents groupements donneurs, ne peuvent donc pas convenir. Aussi, des groupements éthers, également très bons donneurs, seront utilisés. De plus, dans le cadre de la stratégie 1, ceux-ci peuvent être facilement déprotégés pour conduire en une étape aux phénols correspondants. Diverses méthodes ont déjà été décrites sur des CTVs dans la littérature (avec du tribromure de bore par exemple).^{7,5,8}

En ce qui concerne l'introduction des groupements électro-attracteurs, celle-ci ne peut pas se faire avant la réaction de trimérisation. En effet, ceux-ci étant méta-orienteurs désactivant, ils bloquent la substitution électrophile, empêchant la formation du CTV. Le passage par un CTV intermédiaire, permettant d'introduire divers groupements électro-attracteurs, a donc été envisagé. Nous avons donc synthétisé un dérivé de CTV halogéné. Les groupements halogénés (brome et iode notamment) permettent d'envisager un grand nombre de réactions comme les substitutions nucléophiles, de nombreux couplages organo-métalliques, ou la formation d'un organo-lithien.^{3,11,12,13} Les synthèses des CTVs tri-bromé **5** et CTV tri-iodé **6** ont déjà été décrites dans la littérature par l'équipe de Collet.^{14,15} Cependant, ces synthèses sont relativement longues (au moins 5 étapes) et doivent être optimisées afin de pouvoir produire ces intermédiaires clés à l'échelle du gramme.

Au niveau des bons groupements électro-attracteurs, les groupements cétone et nitrile ont été envisagés dans le cadre de la stratégie 1. Le groupement nitro n'a pas été considéré car la fluorescence des dérivés aromatiques nitrés est souvent extrêmement faible.¹⁶ La transition électronique conduisant au premier état excité est souvent de type $n-\pi^*$ pour de telles molécules. Une voie de désexcitation non-radiative efficace par passage intersystème, est alors couramment observée.¹⁶ Dans d'autres cas l'absence de fluorescence s'explique par l'existence d'une conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$, liée au transfert de charge très favorable de par la présence du groupement nitro, très électro-attracteur.¹⁶

Pour la stratégie 3 nous considérerons les groupements acides carboxyliques et acides phosphoriques qui sont chargés négativement à pH physiologique.

Au cours de ce chapitre, les synthèses des différents CTVs développés seront tout d'abord décrites. Ensuite, leurs propriétés spectroscopiques en milieu organique seront détaillées afin de comparer les divers CTVs entre eux. Enfin, les propriétés spectroscopiques mais également de complexation des CTVs solubles dans l'eau, seront présentées.

A. Synthèse de CTVs intermédiaires halogénés

Toutes les voies de synthèse envisagées pour obtenir des CTVs fluorescents passent par un CTV intermédiaire halogéné. Aussi, dans un premier temps, nous avons développé une méthode efficace pour obtenir un CTV halogéné (cf. Figure 2-3) à l'échelle du gramme.

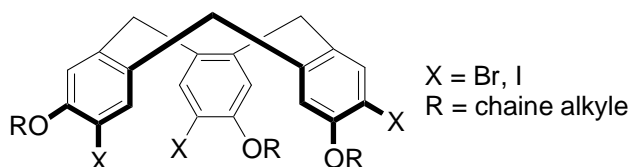


Figure 2-3 : Structure chimique des CTVs intermédiaires, halogénés, envisagés.

a. Obtention d'un CTV intermédiaire bromé

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à **5** car d'après la littérature, celui-ci est plus soluble que son analogue tri-iodé **6**.¹⁵

La synthèse de **5** a été décrite pour la première fois, par Canceill et Collet¹⁴ en 1986. Celle-ci comporte 5 étapes à partir de l'acide 3-hydroxybenzoïque, comme décrit ci-dessous (Figure 2-4).

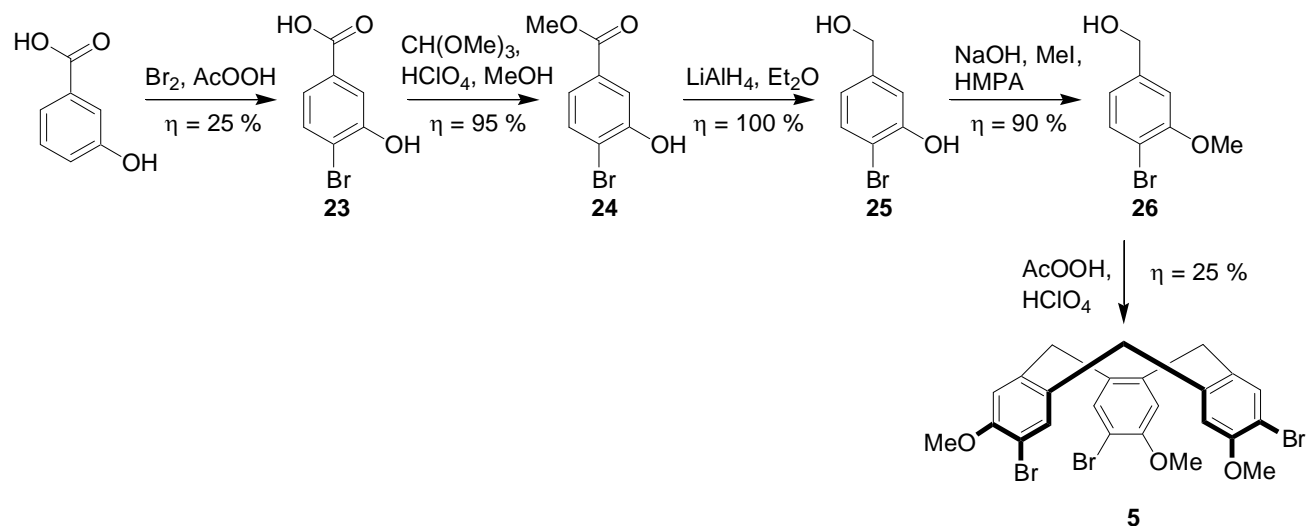


Figure 2-4 : Synthèse de **5** proposée par Canceill et Collet.¹⁴

La dernière étape, la trimérisation, a été améliorée par la suite, par l'équipe de Cram.¹⁷ L'utilisation du pentoxyde de phosphore dans l'éther, comme agent déshydratant, pour former le cation benzylique, conduit à **5** avec un rendement de 40% (cf. Figure 2-5). Ceci correspond presque au double de celui obtenu dans le mélange acide acétique/acide perchlorique, décrit par Canceill et Collet. De plus cette, méthode est moins dangereuse car elle ne risque pas de produire des perchlorates qui sont toxiques et explosifs.

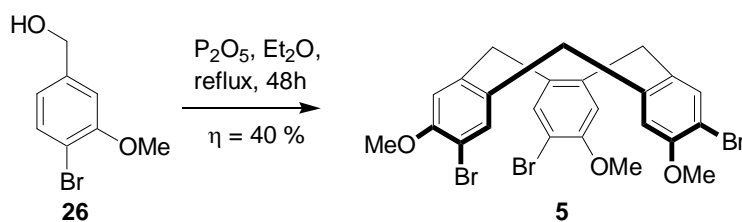


Figure 2-5 : Méthode de trimérisation employée par Cram *and co.*¹⁷

Dès lors, l'étape limitante de cette voie de synthèse est la première étape de bromation permettant d'obtenir **26**. Afin de gagner des étapes, nous avons cherché dans la littérature s'il existait des méthodes permettant de bromer l'alcool 3-methoxybenzylique directement.

Une première méthode décrite par Baker *et al.*¹⁸, utilise une ortholithiation suivie d'une substitution électrophile en présence de 1,2-dibromotetrafluoroethane (cf. Figure 2-6). Deux produits sont isolés par cette voie. L'alcool **26** souhaité est obtenu en minorité avec 14% de rendement. En effet, l'affinité du lithium pour les atomes d'oxygènes oriente la régiosélectivité de cette réaction. Le rendement d'obtention de **26** par cette méthode, est moins bon que celui décrit par Canceill et Collet (en 4 étapes).¹⁴ Celle-ci n'a donc pas été utilisée.

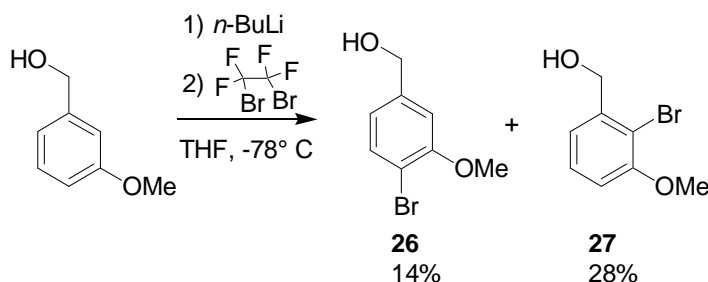


Figure 2-6 : Réaction décrite par Baker *et al.* pour bromer l'alcool 3-methoxybenzylique.

Diverses méthodes classiques de bromation (utilisant le dibrome par exemple) sont envisageables à partir de l'alcool 3-methoxybenzylique ou de l'aldéhyde correspondant. Cependant, celles-ci conduisent majoritairement, voire exclusivement, au régioisomère **28** pour lequel le brome est substitué en *para* du groupe méthoxyle (cf. Figure 2-7).^{19,20,21} Seules deux méthodes ont été décrites dans la littérature et permettent d'obtenir exclusivement le régioisomère **26**.^{22, 23, 24}

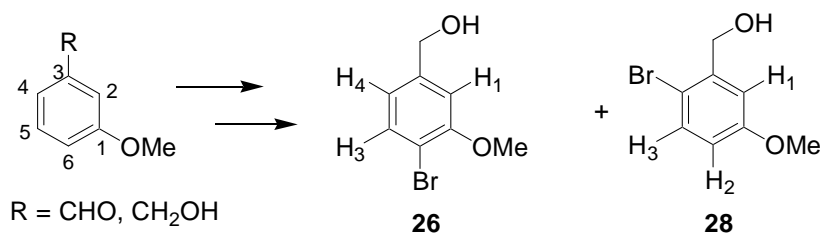


Figure 2-7 : Régioisomères obtenus par les différentes méthodes de bromation classiques.

La première voie de synthèse, utilisant comme agent bromant le bromate de sodium en présence d'hydrogénosulfate de sodium, a été décrite par Lee *and co.* (cf Figure 2-8).²² L'alcool **26** est obtenu avec un rendement de 76%. Cette synthèse sera améliorée par Speicher *and co.*²³, afin d'obtenir **26** avec un rendement de 88%.

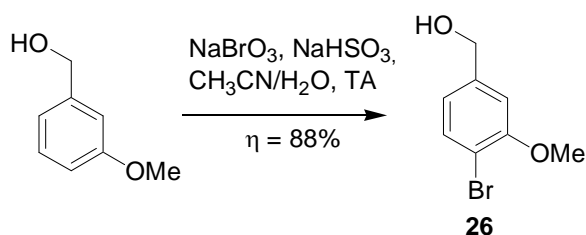


Figure 2-8 : Bromation de l'alcool 3-methoxybenzylique selon la méthode développée par Lee *and co.* et reprise par Speicher *and co.*^{22, 23}

Peu après, une autre méthode, utilisant l'agent bromant, le N-bromosuccinimide (NBS), couramment utilisé comme oxydant, a été proposé par Adimurthy and Patoliya.²⁴ Contrairement aux autres cas étudiés, la réaction du NBS sur l'alcool 3-methoxybenzylique ne conduit pas au benzaldéhyde correspondant. Une bromation régiosélective est observée et conduit à **26** avec 84% de rendement (cf figure suivante).

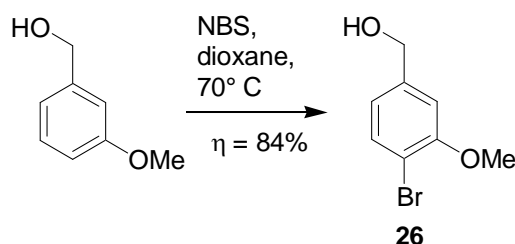


Figure 2-9 : Méthode de bromation de l'alcool 3-methoxybenzylique avec du NBS.

Les auteurs de ces différents travaux ne donnent aucune explication ou hypothèse pour justifier la régiosélectivité de ces méthodes par rapport aux autres qui conduisent exclusivement à **28**.

Les deux méthodes de bromation proposées ci-dessus, ont été testées (avec le NaBrO₃/NaHSO₃ ou le NBS) et un produit unique correspondant à la description faite par les auteurs, a été obtenu dans les deux cas avec des rendements similaires. Cependant, placés dans l'éther en présence de pentoxyde de phosphore, les alcools ainsi obtenus n'ont pas réagi. **5** ne s'est donc pas formé, le produit de départ a été conservé. Ceci nous a amené à

remettre en question la structure du régioisomère bromé réellement obtenu. En effet, alors que **26** peut conduire à **5**, comme l'ont démontré Collet *and co.*¹⁴ ou Cram *and co.*¹⁷ (cf. Figure 2-4), **28** (cf. Figure 2-7) ne le peut pas. Le brome en *para* du groupement méthoxyle occupe la position activée lors de la substitution électrophile, permettant d'obtenir **5**. D'après ces premières observations, il semblerait que l'isomère formé soit **28** et non **26**.

Le spectre en RMN proton des produits obtenus selon les méthodes décrites par Lee *and co.*²² (puis Speicher *and co.*²³) et Adimurthy and Patoliya²⁴ sont identiques. En revanche, la description des protons aromatiques n'est pas la même que celle du produit décrit comme étant **26** par Baker *et al.*¹⁸ Afin d'identifier clairement l'isomère synthétisé une analyse par RMN NOESY a été faite sur ce composé.

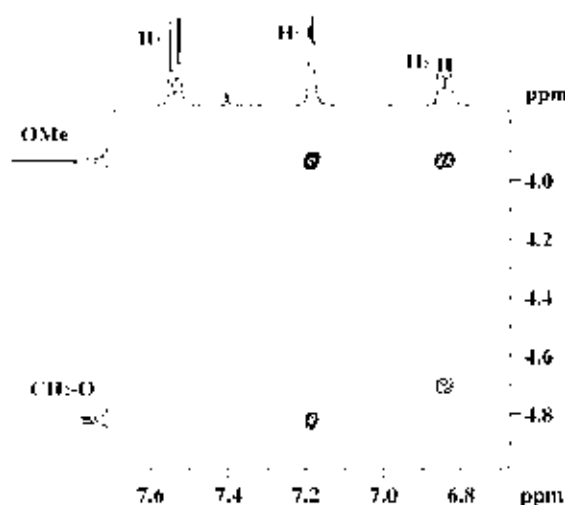


Figure 2-10 : Zoom du spectre NOESY obtenu pour le composé synthétisé par les méthodes décrites par Lee *and co.*, Speicher *and co.* ou Adimurthy et Patoliya, dans l'acetone- d_6 .

Deux taches de corrélations sont visibles entre les protons du groupement méthoxyle (OCH_3) et deux aromatiques (H_1 et H_2). Les protons du méthylène de l'alcool benzylique (CH_2OH) ne donnent qu'une seule tache de corrélation avec le proton aromatique H_3 . Ceci ne peut être le cas que pour l'isomère **28**. On peut également noter un artefact à 4,7 et 6,8 ppm, qui ne correspond pas à une vraie interaction. Afin de lever toute suspicion, il a été envisagé de résoudre la structure par diffraction des rayons X. Le produit à analyser étant liquide à température ambiante, il a été oxydé en aldéhyde **29**, grâce à l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX). **29** est un solide blanc qui peut cristalliser sous forme de monocristaux dans l'éthanol. Sa structure a ainsi pu être résolue par diffraction des rayons X (cf. Figure 2-11).

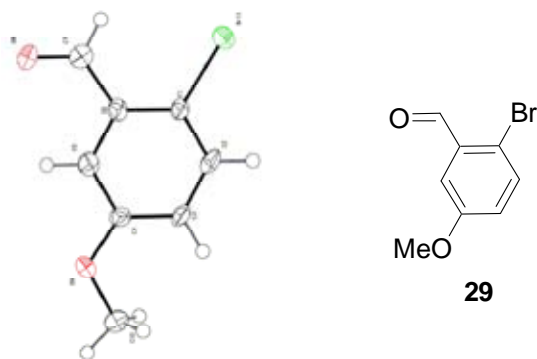


Figure 2-11 : Structure obtenues par diffraction des rayons X de l'aldéhyde **29**, obtenu après oxydation de l'alcool.

La structure RX permet d'affirmer que la bromation pas n'a pas lieu en *ortho* du groupement méthoxyle mais bien en *para* comme par les autres méthodes. La seule façon d'obtenir l'isomère **26** majoritairement, est d'encombrer la position 6 (cf. Figure 2-7) puis de faire appel à des mécanismes régiospécifiques (comme l'ortholithiation citée précédemment, cf. Figure 2-6).

Dans cette optique, Uemura *et al.* ont développé une méthode passant par un complexe métallique, pour substituer régiosélectivement l'alcool 3-méthoxybenzylique en position 6 (cf. Figure 2-12).²⁵ Une première étape consiste à former un complexe de chrome. Celui-ci subit ensuite l'abstraction d'un proton aromatique en présence de *n*-butyl lithium. Le lithien peut alors s'additionner sur divers électrophiles (comme un chlorosilane ou du dioxyde de carbone dans le cas décrit). Le produit final est enfin obtenu après élimination oxydante du chrome, sous irradiation lumineuse en présence d'oxygène. La régiosélectivité s'explique d'après les auteurs par deux facteurs. Le premier est l'affinité du lithium pour l'oxygène, favorisant la déprotonation de l'aromatique en *ortho* du groupement méthoxyle. Le second, est la présence du chrome (Cr(CO)₃), qui induit un encombrement stérique et une la répulsion électrostatique, orientant la réaction en position 4 et non 2. La formation du complexe de chrome permet également d'augmenter l'acidité des protons aromatiques les rendant plus labiles.^{26,27}

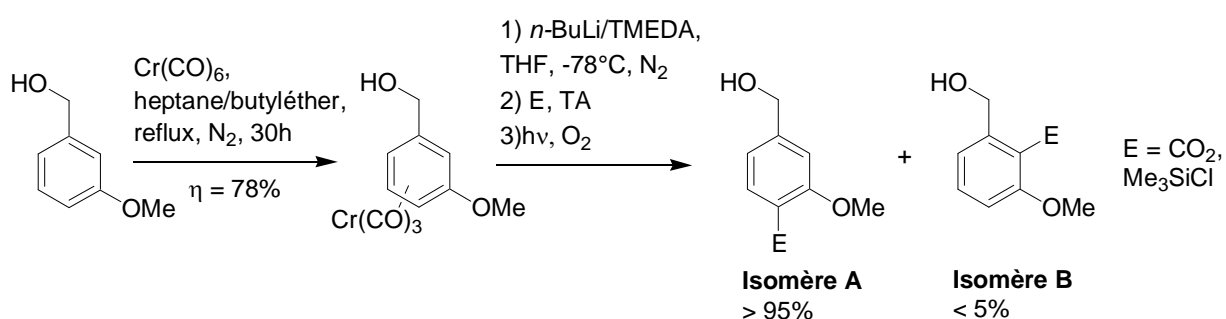


Figure 2-12 : Substitution régiosélective de l'alcool 3-méthoxybenzylique proposé par Uemura *et al.*²⁵

Divers exemples ont été développés dans la littérature, afin d'introduire régiosélectivement un atome du brome sur un aromatique, selon cette méthode.^{26 et références incluses} Les sources de brome électrophile sont variées, telles que le dibrome, le *N*-bromosuccinimide, ou le dibromoéthane et dérivés (le dibromotetrachloroéthane et le dibromotetrafluoroéthane).^{26 et références incluses} Cependant, il est préférable d'utiliser un dérivé de dibromoéthane car, un excès de *N*-bromosuccinimide ou de dibrome oxyde le chrome, et libère ainsi l'aromatique. Ceci a pour conséquence de diminuer le rendement et la régiosélectivité.²⁶

Aussi la formation de **26** a été envisagée selon cette méthode. Les essais ont été conduits par Emeline Girard, post-doctorante au laboratoire. Le complexe de chrome a d'abord été formé selon la méthode décrite par Uemura, à partir de l'alcool 3-méthoxybenzylique. Ensuite, divers essais de bromation en utilisant le dibromoéthane ont été menés, faisant varier plusieurs paramètres (température, nombre d'équivalent, durée). Aucun d'entre eux n'a abouti, le produit de départ a été retrouvé dans la plupart des cas en fin de réaction. Dans un seul cas, la réaction a évolué, mais le produit formé n'a pas été identifié. Il est possible que dans notre cas, le dibromoéthane ne soit pas assez électrophile. L'utilisation du dibromotetrafluoroéthane, plus électrophile, pourrait être intéressante mais n'a pas été tentée faute de temps.

La limitation liée à l'étape de bromation, nous a conduit à nous tourner vers l'analogie iodé, **6**.

b. Formation d'un CTV intermédiaire iodé

La première voie de synthèse de **6** a été décrite par l'équipe de Collet, en 1995.¹⁵ Celle-ci consiste en 5 étapes, décrites ci-dessous (cf. Figure 2-1), avec un rendement global de 43%.

Cette méthode fait appel à des réactions très efficaces jusqu'à la formation de **32** et permet d'obtenir celui-ci presque quantitativement en trois étapes. Cependant, l'objectif de cette synthèse est **33**, et **6** n'en est qu'une application.

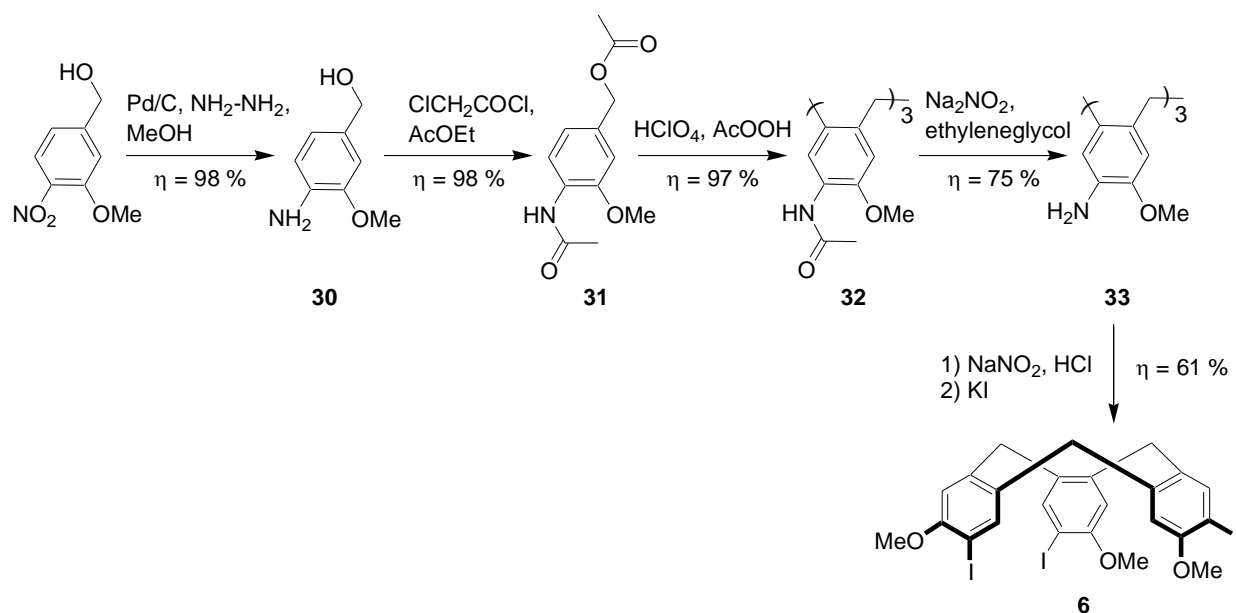


Figure 2-13 : Voie de synthèse pour obtenir 6, proposée par l'équipe de Collet.¹⁵

Aussi, une synthèse plus rapide en 3 étapes à partir de l'acide 3-hydroxy 4-iodobenzoïque commercial, a été élaborée (cf. Figure 2-14).²⁸ Cette voie de synthèse se fait avec un rendement global de 47 %, comparable à celui de la méthode précédente.

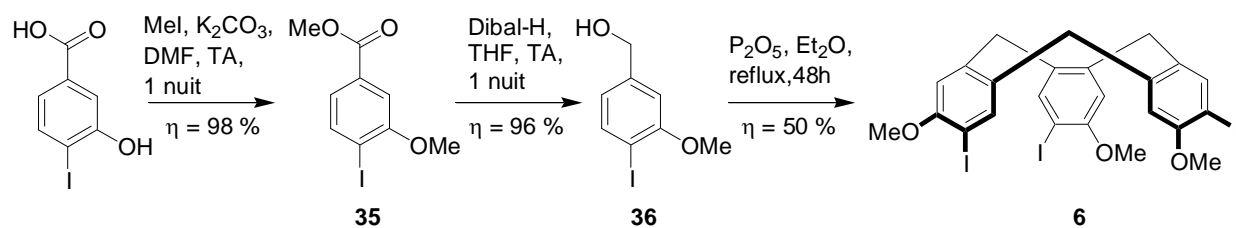


Figure 2-14 : Synthèse de 6 mise au point au laboratoire.²⁸

L'utilisation de l'hydru de diisobutylaluminium (Dibal-H) pour réduire l'ester et non du tétrahydru de lithium et d'aluminium (LiAl-H₄), comme classiquement, est due au fait que ce dernier induit une substitution de l'iode. Ceci a été démontré par Collet *and co.*, qui ont synthétisé 34 à partir de 6 avec un rendement de 98% (cf. Figure 2-15).¹⁵

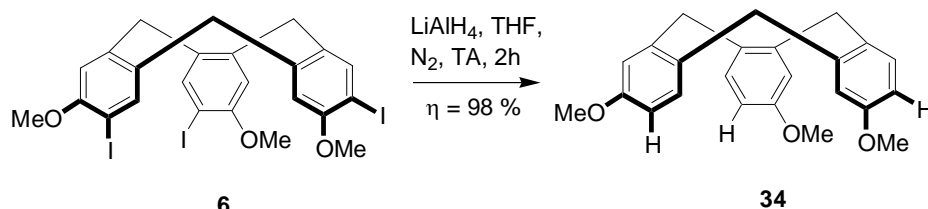


Figure 2-15 : Synthèse de 34 mise au point par l'équipe de Collet.¹⁵

La méthode que nous avons mise au point pour obtenir 6, requiert comme seule purification après la réaction de trimérisation, une filtration sur gel de silice suivie d'une digestion avec un mélange diéthyléther/DCM. De plus cette voie de synthèse simple permet d'obtenir rapidement 6 à l'échelle du gramme.

L'acide iodé de départ est commercial mais relativement onéreux, nous le synthétisons donc directement au laboratoire à partir de l'acide 3-hydroxybenzoïque, beaucoup moins cher, selon la méthode décrite par Speicher *and co.*²⁹ avec un rendement de 63% (cf. Figure 2-16).

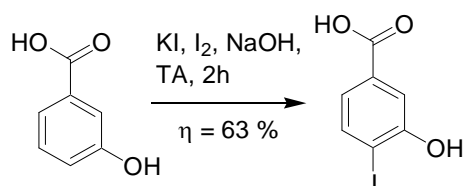


Figure 2-16 : Formation de l'acide 3-hydroxy 4-iodobenzoïque.

Un autre avantage de cette méthode, comparée à celle développée par Collet *and co.*, est la possibilité d'utiliser le phénol (de l'acide 3-hydroxy 4-iodobenzoïque) comme nucléophile pour introduire différentes chaînes alkyles. La formation d'éthers, avec une chaîne alkyle plus longue (pentyle) a été testée, afin d'améliorer la solubilité du CTV formé en milieu organique, celle de **6** étant limitée (cf. Figure 2-17, Tableau 2-1). La formation d'éthers du type O-(CH₂)_n-Br, à partir de composés dibromés (Br-(CH₂)_n-Br) a également été envisagée. Ceci dans l'optique d'introduire d'autres groupements par la suite sur ces chaînes, ou afin de former des hémicryptophanes et cryptophanes. Ces réactions ont été testées par des étudiantes (Morgane François, Julie Baillet et Aude Guillemet) que j'ai encadrées dans le cadre de leurs stages de licence 3.

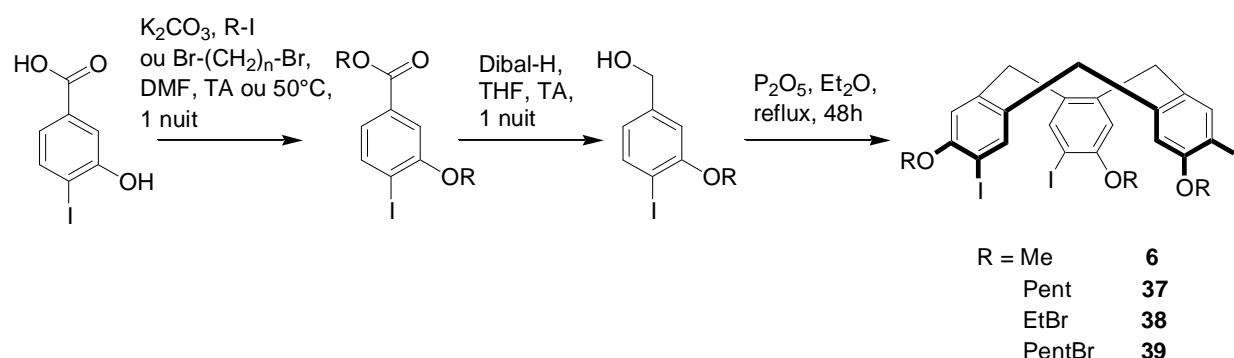


Figure 2-17 : Synthèses de divers CTVs tri-iodés.

R	Alkylation	Réduction	Trimérisation
Methyle	98 %	96 %	50 %
Pentyle	95 %	90 %	60 %
EthylBr	59 %*	74 %*	30 %*
PentylBr	88 %*	69 %*	26 %*

*Ces synthèses ont été réalisées qu'une seule fois par une stagiaire de License 3 et n'ont pas été optimisées.

Tableau 2-1 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus lors de la synthèse des différents CTVs tri-iodés.

Dans le cas des chaînes plus longues ou fonctionnalisées, une étape de purification doit être ajoutée, afin d'éliminer les restes de réactifs halogénés de départ (qui ne sont pas éliminables sous pression réduite contrairement à l'iodométhane). La purification du brut

reste simple, une filtration sur gel de silice suffit, étant donné la grande différence de polarité entre les produits formés et les réactifs halogénés.

Le rendement de l'étape de trimérisation conduisant à **37** est légèrement supérieur, probablement grâce à la plus grande solubilité de celui-ci dans le DCM.

Aujourd'hui, l'alcool 3-hydroxy-4-iodobenzyle est commercialisé à un prix raisonnable et permet d'obtenir grâce à une substitution nucléophile sur un halogénure, directement un précurseur de CTV, comme décrit par Rousseau *and co* (cf.).³⁰

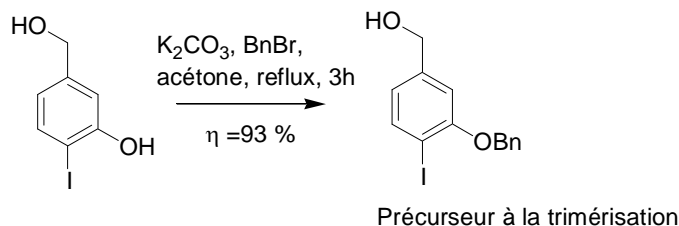


Figure 2-18 : Obtention d'un précurseur à la trimérisation à partir de l'alcool 3-hydroxy 4-iodo benzylique.

Cependant, il faut noter que l'alcool 3-hydroxy-4-iodobenzyle est très instable à la lumière.

c. Conclusion

Le CTV tri-bromé **5** ne peut être obtenu en grande quantité de façon efficace. Ceci est dû à la difficulté de réaliser la bromation régiosélective de l'alcool 3-méthoxybenzylique. En effet, aucune méthode efficace et régiosélective n'a été trouvée afin d'obtenir **26** avec un rendement supérieur à 25%. Les méthodes proposées dans la littérature (utilisant le N-bromosuccinimide ou le bromate de sodium en présence d'hydrogénosulfate de sodium) conduisent finalement au mauvais régioisomère, **28**.^{22,23,24} D'après la littérature, des voies de synthèse plus élaborées faisant appel à la formation d'un complexe de chrome, suivie d'une ortho-lithiation devraient permettre d'obtenir le régioisomère **26** voulu. Les premiers essais n'ont pas été concluants mais d'autres tentatives utilisant différents électrophiles bromés doivent être menées.

En parallèle, nous avons mis au point une synthèse efficace et permettant d'obtenir en deux étapes divers CTV tri-iodés. L'obtention à l'échelle du gramme de tels intermédiaires iodés, permet d'envisager d'utiliser les atomes d'iode pour introduire différents groupements électro-attracteurs, comme nous allons le voir dans la partie suivante.

B. Synthèses de CTVs modifiés par des groupements électro-attracteurs

a. Stratégie 1, emploi de CTVs fonctionnalisés par des groupements électro-donneurs chargés négativement

1. Des cétones comme groupements électro-attracteurs.

La synthèse de dérivés de CTV fonctionnalisés par des cétones avait déjà été mise au point par Marie-Laurence Dumartin lors de sa thèse au laboratoire.² Celle-ci consiste en une réaction de Friedel et Craft à partir de **34** (cf. Figure 2-19). Les éthers sont ensuite déprotégés à l'aide de tribromure de bore, afin d'obtenir les phénols correspondant. Deux CTVs portant des fonctions cétones avec une chaîne méthyle ou propyle, ont été ainsi synthétisés, avec des rendements pour les deux étapes de 70 % pour **40** et 64 % pour **41**.

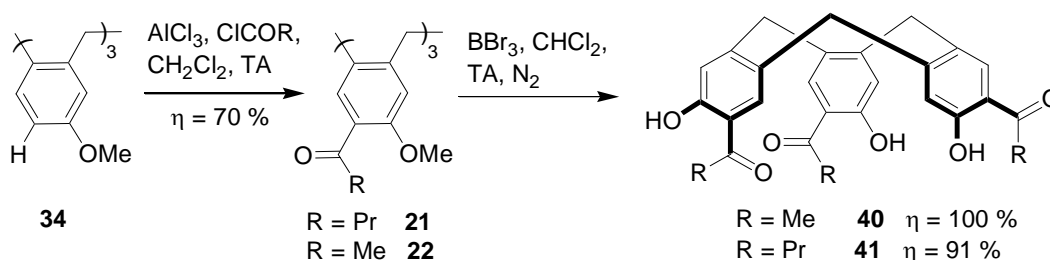


Figure 2-19 : Synthèses de CTVs tri-cétones, développées au laboratoire.²

Le CTV **34** avait été synthétisé par Marie-Laurence Dumartin, selon la procédure décrite dans la littérature, en 6 étapes à partir de la vanilline (cf. Figure 2-20).³¹ Tout d'abord, une substitution nucléophile par le phénolate du bromure d'allyle, puis une réduction de l'aldéhyde en alcool par le borohydrure de sodium suivi d'une trimérisation en milieu acide avec l'acide perchlorique dans le méthanol conduisent à **42** (cf. Figure 2-20). Le rendement global étant de 30%.^{32,33} Les éthers allyliques de **42** sont ensuite déprotégés en présence de palladium (0) et d'eau pour former **3**, avec un rendement de 96%.³⁴ Le CTV **3** est ensuite obtenu en deux étapes avec un rendement de 60%. La première étape est la formation des triflates, bons groupes partants, qui permettent ensuite l'obtention **34** par hydrogénation catalytique au palladium (cf. Figure 2-20).³¹

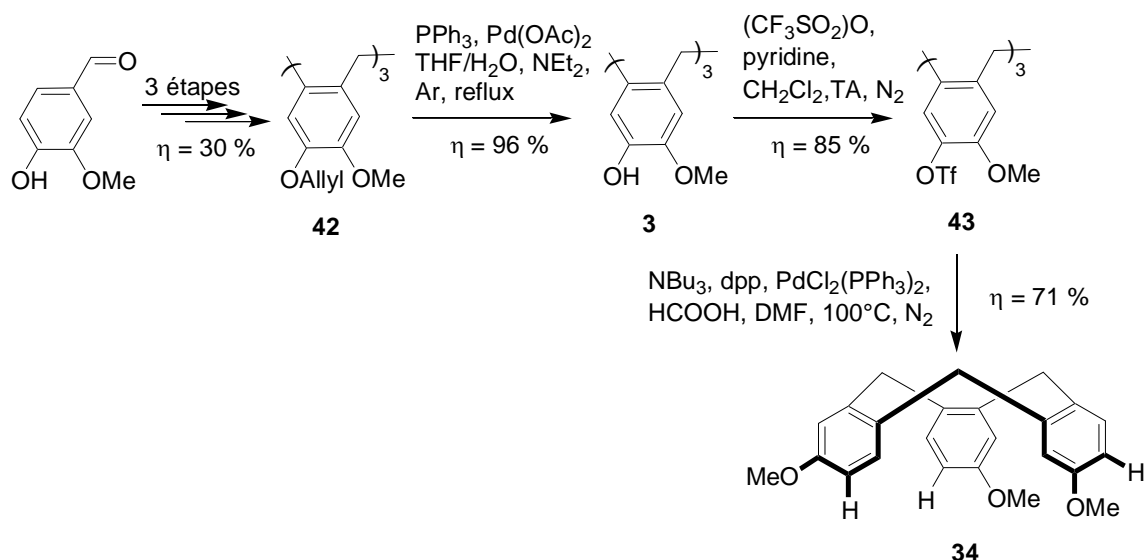


Figure 2-20 : Synthèse du CTV 34 à partir de la vanilline.

Afin de reprendre les études des propriétés spectroscopiques de **40** et **41**, leurs synthèses ont été reprises selon les protocoles déjà établis. Cependant, cette fois **34** a été obtenu en une étape à partir de **6**, en présence du tétrahydruure de lithium et d'aluminium, comme décrit par Collet¹⁵ (cf. Figure 2-15).

2. Des nitriles comme groupements électro-attracteurs

L'introduction d'un groupement nitrile en *ortho* d'un phénol, afin d'abaisser son pKa, et ainsi le rendre soluble à pH physiologique, a été utilisé par Kobuke *and co.*, sur un résorcin[4]arène.³⁵

Différentes méthodes existent pour introduire un groupement nitrile sur un aromatique, notamment par hydrolyse à chaud d'un amide, ou par substitution nucléophile d'un dérivé halogéné par l'anion cyanure.¹¹ Une méthode classique de substitution nucléophile, catalysée par du cuivre,³⁶ appelée réaction de Rosenmund-von Bran, déjà appliquée sur un résorcinarène,³⁵ a été envisagée. Tout d'abord, **44** est obtenu par réaction de Rosenmund-von Bran à partir de **6** (cf. Figure 2-21).³⁷ Les éthers méthyliques sont ensuite déprotégés par une méthode classique, faisant appel au tribromure de bore.³⁸ Finalement, **45** est synthétisé en 2 étapes à partir de **6** avec un rendement global de 57 % (cf. Figure 2-21).

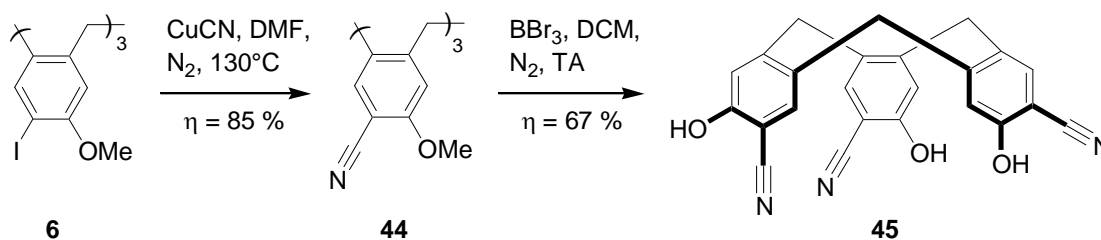


Figure 2-21 : Synthèse de **44** par réaction de Rosenmund-von Bran à partir de **6**.

L'intermédiaire **44** est insoluble dans la plus part des solvants organique. Le rendement moyen de cette réaction comparé à d'autres cas est probablement lié à la faible solubilité de celui-ci. Le CTV **45** formé est, quant à lui, bien soluble dans le DMSO et dans l'eau basique. La voie de synthèse mise au point permet, malgré quelques difficultés, d'obtenir le CTV souhaité avec un bon rendement.

b. Stratégie 2, emploi de CTVs fonctionnalisés par des groupements électro-attracteurs chargés négativement

3. Des phosphonates comme groupements électro-attracteurs

Un premier CTV fluorescent substitué par des groupements phosphorylés avait déjà été synthétisé par Marie-Laurence Dumartin lors de sa thèse au laboratoire.¹ La synthèse de ce CTV **20** se fait en 2 étapes (cf. Figure 2-22) à partir de **3** dont la synthèse a été décrite auparavant (cf. Figure 2-20). Premièrement, une substitution par les phénolates sur un réactif phosphorylé chloré permet d'obtenir **46** avec 31 % de rendement. Ensuite, les groupes éthoxyles portés par les phosphores sont déprotégés, en présence de bromure de lithium, pour former **20** avec 80 % de rendement.

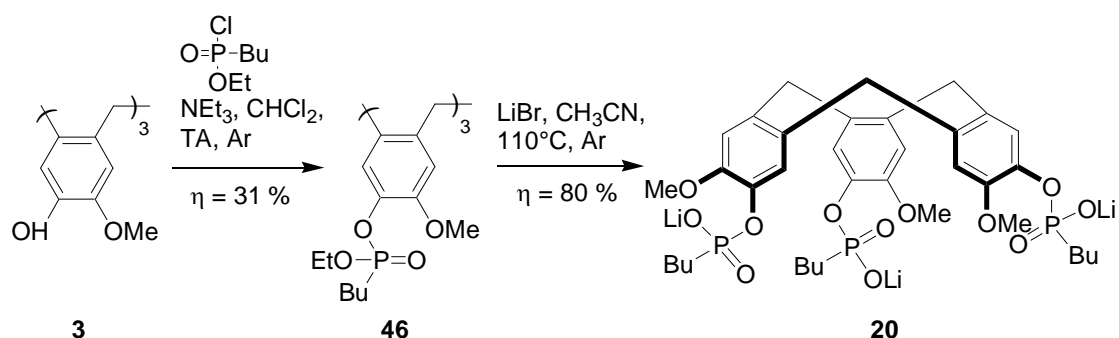


Figure 2-22 : Synthèse du premier CTV phosphorylé développé au laboratoire.

Les groupements phosphonates ont été introduits par une liaison oxygène-phosphore dans le cas de **20**. Afin que ces groupements soient conjugués avec les méthoxyles, il a été envisagé de les introduire directement sur le squelette aromatique, en formant une liaison carbone-phosphore. Par ailleurs, afin d'avoir une meilleure conjugaison, il serait intéressant

d'avoir un deuxième noyau aromatique relié au phosphore et non plus une chaîne alkyle. La synthèse de **47** a ainsi été envisagée (cf. Figure 2-23).

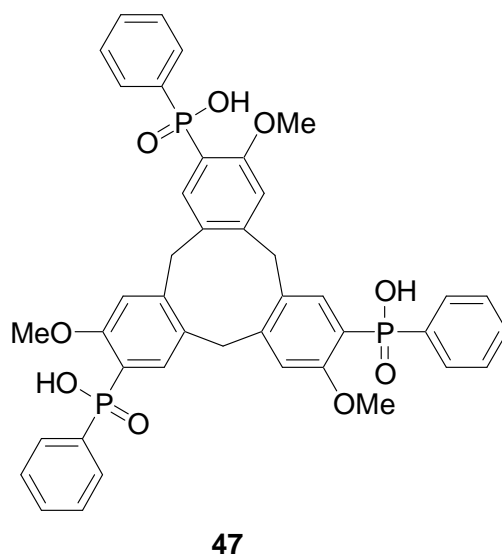


Figure 2-23 : Nouveau CTV phosphorylé envisagé.

De nombreux essais ont été réalisés pour introduire le groupement phosphinate souhaité ($-P(O)(OH)(Ph)$). Tout d'abord sur l'anisole ou le 2-bromoanisole, en faisant appel à différents types de réactifs phosphorylés et des catalyseurs variés. Notons que ces travaux ont été initiés par Camille Bousquet lors de son stage de Master 1, j'ai repris ces premiers essais.

Des méthodes de couplage organométallique à partir d'un réactif bromé modèle, ont été tentées. Les deux premiers protocoles testés consistaient en des réactions de Michaelis-Becker entre un réactif halogéné et un phosphinate possédant tous deux, une liaison phosphore-hydrogène.^{39,40} Une base est utilisée pour arracher l'hydrogène porté par le phosphore qui devient alors nucléophile, et peut être alors impliqué dans une substitution nucléophile sur le dérivé halogéné électrophile. Cette réaction ne doit être faite à haute température, mais une base forte pour déprotoner le phosphore, est nécessaire. Lorsque le dérivé halogéné est aromatique, une catalyse, le plus souvent grâce à du cuivre (I), sous la forme de iodure de cuivre, en présence d'un ligand (la proline par exemple) est utilisée.^{41,42,43}

Seule l'une des méthodes testées (cf. Figure 2-24) a fonctionné avec un rendement très faible de 17 %. Aussi nous sommes passés à une réaction de Michaelis-Arbuzov.

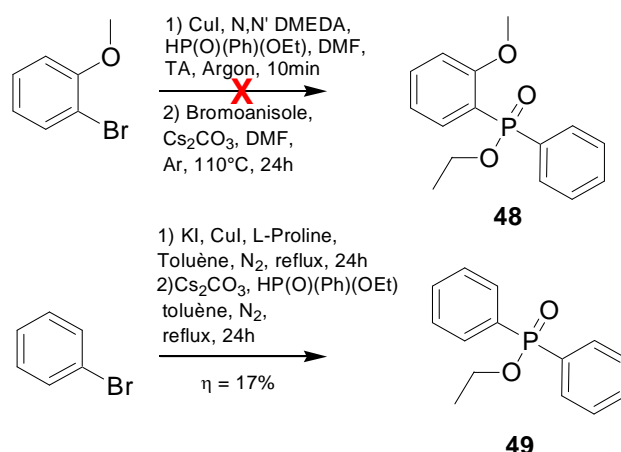


Figure 2-24 : Réaction de Mickaelis-Becker testées sur des dérivés du bromobenzène.

La réaction de Mickaelis-Arbuzov est également une substitution nucléophile. Cependant, cette fois c'est un phosphite qui joue le rôle de nucléophile (avec toujours un réactif halogéné comme électrophile).^{39,44} Cette réaction a lieu à haute température (>150°). De plus, elle requiert soit une irradiation lumineuse soit l'ajout d'un métal (chlorure de nickel, de cuivre ou de palladium).^{39,45,46} La première étape consiste en une substitution nucléophile du phosphore sur le réactif halogéné, libérant un halogénure. Cet halogénure réagit sur l'un des alkyles d'une des fonctions alkyloxy, portées par le phosphore. Ceci conduit à la formation d'un halogénure d'alkyle d'une part, mais surtout à la formation d'une double liaison phosphore oxygène (P = O). C'est la formation de cette liaison qui est la force motrice de cette réaction. Cette méthode a fonctionnée sur le 2-bromoanisole, permettant d'obtenir **50** avec un rendement bien supérieur au cas précédent et sera donc testé sur le CTV en priorité.

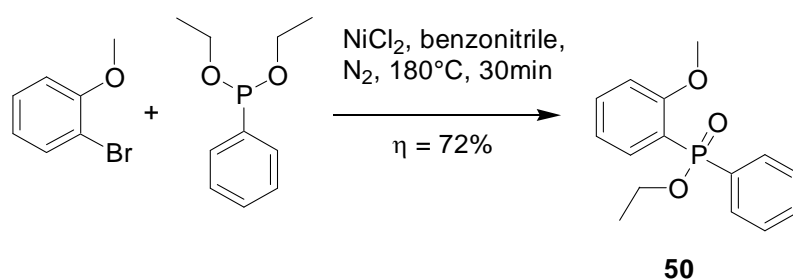


Figure 2-25 : Formation de la liaison carbone-phosphore par la réaction de type Michaelis-Arbuzov, sur un aromatique modèle.

Les deux méthodes ayant fonctionné sur des réactifs bromés modèles, ont été testées sur le CTV tri-bromé **5**, afin d'obtenir **51**, sans succès (cf. Figure 2-26). Le CTV **5** ne réagit pas malgré un grand nombre d'équivalents de réactifs phosphorylés ajoutés dans certains essais. Le CTV **5** est retrouvé à la fin.

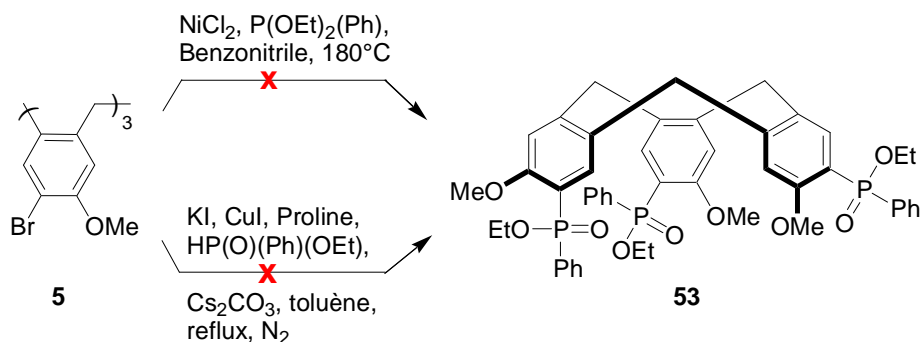


Figure 2-26 : Application des réactions de Michaelis-Arbuzov et Michaelis-Becker, à la synthèse de **53**.

D'autres voies de synthèse ont été tentées directement sur **5**. La première consiste à passer par un organomagnésien nucléophile qui attaque ensuite un électrophile, dans notre cas l'oxazophosphole (cf. Figure 2-27), synthétisé directement au laboratoire selon la méthode décrite dans la littérature.⁴⁷ Cette réaction n'a pas conduit au résultat escompté, mais c'est la formation de l'organomagnésien (malgré plusieurs essais) qui est en cause car **5** est récupéré.

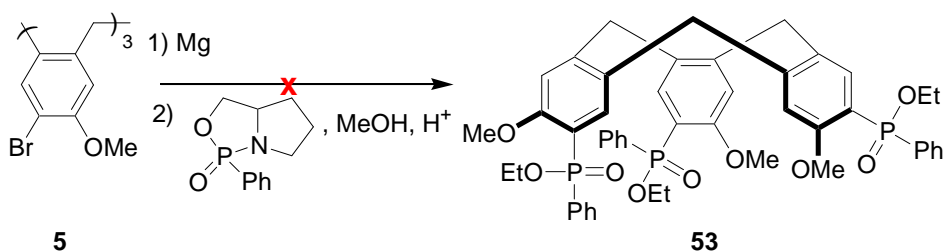


Figure 2-27 : Essais *via* par un réactif de Grignard à partir de **5**.

La formation de l'organomagnésien étant en cause nous avons décidé de passer par un lithien. Des essais sur l'anisole ont été conduits avec deux types de réactifs phosphorylés électrophiles, l'oxazaphosphole et l'oxyde dichlorophényl-phosphonique ont été utilisés (cf. Figure 2-28).

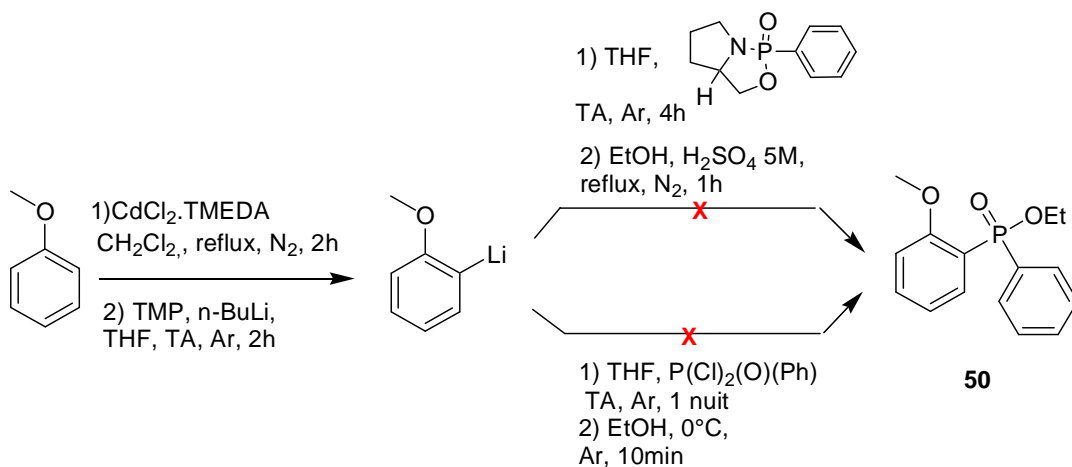


Figure 2-28 : Essais pour former **50** à partir de l'anisole en passant par un lithien.

Les essais en passant par le lithien n'ont pas abouti. La formation du lithien a été validée par introduction d'un iode sur celui-ci en utilisant du diode avec un rendement de

65% (d'après la RMN du brut). Ce n'est donc pas l'intermédiaire qui est en cause cette fois, mais la substitution sur le phosphore. Cependant, il est précisé dans la littérature que ce type de phosphorylation, passant par un réactif de Grignard ou un lithien est moyennement efficace.³⁹

La dernière méthode testée pour introduire le phosphore directement sur l'aromatique, est un couplage organométallique au palladium, en présence d'un réactif de type H-phosphinate ou H-phosphonate.^{39,40,48} Cette méthode est souvent plus efficace pour les réactifs halogénés aromatiques ou encombrés. Le mécanisme est un mécanisme classique de couplage au palladium, commençant par une addition oxydante du palladium (0) au niveau du réactif halogéné, suivi d'un échange de ligand, pour finir par une élimination réductrice du palladium (II) en palladium (0) qui est ainsi régénéré.³⁹ Cette méthode n'a pas abouti sur le CTV tri-bromé **5**.

Il est possible qu'une trop grande contrainte stérique, empêche la formation de **53** quelque soit la réaction envisagée. Une autre hypothèse serait qu'une molécule de réactif est complexée par **5** (*via* des interactions π - π par exemple), empêchant ensuite l'approche des autres réactifs.

Finalement, la méthode de Michaelis-Arbuzov qui avait fonctionné sur la bromo-anisole a été tentée sur **5** avec le triéthylphosphite, ce dernier étant moins encombré. De même il est peu probable que cette molécule soit complexée par le CTV. Cette réaction a fonctionné avec succès, avec des rendements identiques sur **5** et **6** (respectivement 70% et 68%) (cf. Figure 2-29).²⁸ Ceci valide la possibilité de former une liaison carbone-phosphore impliquant le squelette du CTV.

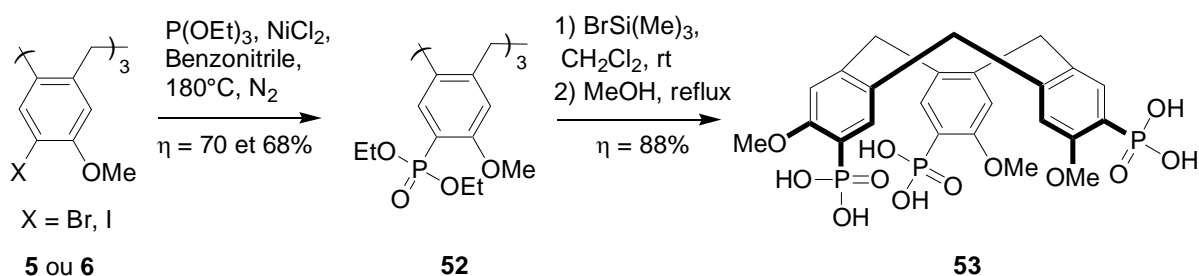


Figure 2-29 : Synthèse de **53** mise au point.²⁸

Le CTV **52** est formé avec un bon rendement de l'ordre de 70 %. Celui-ci peut être déprotégé afin d'obtenir **53**, grâce à une méthanolyse. Cette méthode plus douce qu'une hydrolyse acide à chaud a été préférée afin de ne pas risquer une dégradation du CTV. La saponification des esters de phosphore par une catalyse basique ne permet pas de saponifier tous les groupements éthoxyles, mais seulement 3 (un sur chaque phosphore). La densité de charge de l'espèce en cours de formation empêche probablement la saponification complète des phosphonates. Finalement, **53** est obtenu en deux étapes à partir de **6**, avec un rendement global de 60%.

4. Des acides carboxyliques comme groupements électro-attracteurs

Afin d'introduire des acides carboxyliques directement sur le squelette aromatique du CTV nous nous sommes inspirés des travaux de Xu et Warmuth permettant d'introduire des aldéhydes à partir du CTV tri-iodé **6** (cf. Figure 2-30).⁴⁹ La synthèse décrite consiste à transformer les iodures en organolithiens par échange halogène métal, puis ceux-ci conduisent à **7** par addition nucléophile sur le DMF (cf. Figure 2-30).

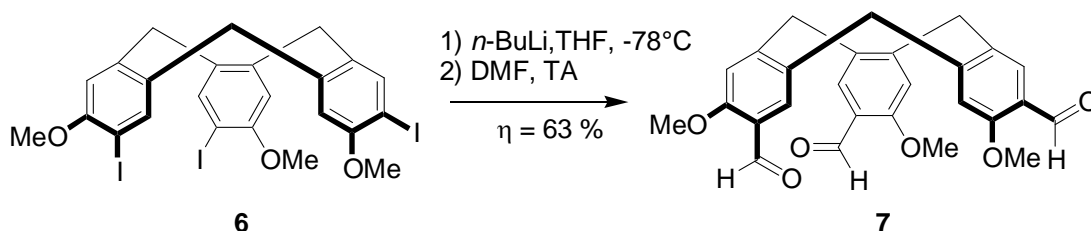


Figure 2-30 : Synthèse de **7**, proposée par Xu et Warmuth.⁴⁹

Pour obtenir **54** nous avons remplacé le DMF par du chloroéthylacétate (cf. Figure 2-31). Cette réaction s'effectue avec un rendement de 55% comparable à celui obtenu par Xu et Warmuth.⁴⁹ La saponification des esters permet obtenir **55** avec un rendement quasi-quantitatif de 98%.

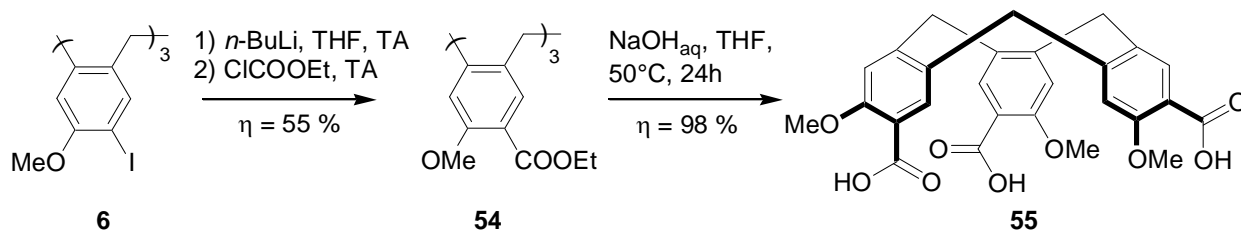


Figure 2-31 : Synthèse de **57** à partir de **6**.

Le CTV **55** est donc obtenu à partir de **6** en deux étapes avec un rendement global de 54 %.

c. Conclusion

Les synthèses de plusieurs CTVs portant des groupements électro-attracteurs directement sur le squelette aromatique ont été réalisées avec succès. L'intérêt et la bonne réactivité du dérivé de CTV tri-iodé **6** a été mise en avant à travers ces synthèses. Certains dérivés obtenus sont substitués par des groupements acido-basiques leur permettant d'être solubles en milieu aqueux à un pH adapté (CTVs **40**, **45**, **53** et **55**). Ainsi, l'introduction de divers groupements, directement sur le squelette aromatique, ouvre des perspectives

nouvelles pour l'utilisation des dérivés de CTVs dans de nombreuses applications, y compris en milieu aqueux.

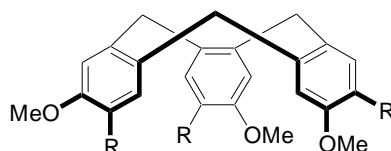
Au laboratoire nous souhaitons développer des sondes fluorescentes pour des espèces d'intérêt biologique, les propriétés spectroscopiques puis de reconnaissance de ces nouveaux dérivés de CTVs vont être à présent présentées.

C. Propriétés spectroscopiques des CTVs obtenus

L'étude des propriétés spectroscopiques des différents dérivés de CTVs synthétisés a été faite tout d'abord en milieu organique. Les différentes grandeurs caractéristiques des fluorophores synthétisés (cf. chapitre 1), possédant comme groupements électro-donneurs des méthoxyles ont été déterminées dans un même solvant, le DMSO. Ainsi, l'influence des différents groupements électro-attracteurs sur ces grandeurs caractéristiques a été évaluée. Afin de mettre en évidence l'existence d'un transfert de charge photo-induit (PCT), et de déterminer la nature des transitions impliquées, de la modélisation moléculaire a été réalisée, en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Baraille à l'IPREM de Pau.

a. Détermination des grandeurs caractéristiques

Les grandeurs caractéristiques ont été déterminées dans le DMSO, pour tous les nouveaux CTVs possédant des groupements méthoxyles comme électro-donneurs, ainsi que pour le CTV **34** qui sert de « référence » (ne portant pas de groupement électro-attracteur), et le CTV tri-iodé **6** (cf. Tableau 2-1). Le DMSO a été choisi pour des raisons de solubilité (solubilité assurée jusqu'à 10^{-3} M pour tous les CTVs). Par ailleurs, certaines molécules testées pouvant être le siège d'un PCT, l'utilisation d'un solvant très polaire est favorable à un déplacement bathochrome du spectre d'émission (cf. chapitre 1).



	R	$\lambda_{\text{abs max}}^{**}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ (nm)	Φ_{F}^* (%)	τ (ns)
CTV 6	I	300	12	/	/	/	/
CTV 34	H	290	4,1	305	15	21	4,5
CTV 40	COMe	316	1,3	470	154	<1	0,09
CTV 44	CN	310	6,4	334	24	16	2
CTV 55	COOH	302	5,1	348	46	8	1
CTV 53	PO(OH) ₂	297	7,1	317	20	14	2,7

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un $\Phi_{\text{F}} = 0,18$ dans le MeOH.⁵⁰

** Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maxima d'absorption est donnée ici.

Tableau 2-2 : Grandeurs spectroscopiques caractéristiques de différents CTVs dans le DMSO, à 25°C.

De façon générale, les CTVs décrits ci-dessus possèdent des coefficients d'absorption molaire relativement proches, les groupements introduits n'ont pas beaucoup d'influence cependant. Ceux-ci sont plus élevés (d'environ un facteur 10) que le benzène ou des dérivés substitués par des groupements similaires à ceux introduits sur les CTVs décrits.⁵¹ Ceux-ci sont également jusqu'à 2 à 5 fois plus grands que ceux d'autres fluorophores aromatiques non substitués par des couples électro-donneurs/électro-accepteurs (phénanthrène, naphthalène, acridine).¹⁶ La présence de trois unités benzéniques et la géométrie, augmentent probablement la capacité de ces molécules à absorber la lumière.

A l'exception des CTV **40** et CTV **6**, tous possèdent des rendements quantiques modérés et des temps de vie classiques (*i.e.* $\sim 10^{-10}$ - 10^{-8} s).^{16,52}

Tout d'abord, le CTV tri-iodé **6** ne présente aucune fluorescence. L'absence de fluorescence dans le cas des aromatiques substitués par un atome d'iode est décrite dans la littérature et liée à l'*effet d'atome lourd interne*.^{16,52} La présence d'un atome lourd tel que l'iode augmente le couplage spin-orbite (dont l'efficacité varie un z^4 où z est le numéro atomique), ce qui favorise énormément le passage intersystème expliquant l'absence de fluorescence (cf. diagramme Jablonski-Perrin, chapitre 1).

Ensuite, la fluorescence des composés aromatiques comportant une fonction carbonyle a elle aussi été étudiée dans la littérature, et est difficile à anticiper.¹⁶ En effet, la présence d'un groupement cétone sur un composé aromatique, implique qu'on peut avoir deux types de transitions, soit une transition π - π^* soit une transition n - π^* (impliquant les doublets non liants de l'oxygène du carbonyle). Il est très difficile de prévoir à l'avance quelle sera la nature de la transition impliquée, car celles-ci sont souvent proches en énergie et dépendent ainsi beaucoup des autres substituants et de l'environnement (notamment des liaisons hydrogènes pouvant avoir lieu avec les doublets non liants de la cétone).¹⁶ Les rendements quantiques de ce type de composés sont très variables en fonction des niveaux d'énergie impliquant ces transitions.

Des groupements électro-attracteurs ont été introduits de façon à être conjugués avec des groupements méthoxyles, électro-attracteurs, afin d'avoir un transfert de charge photo-induit (PCT). A présent, regardons plus en détails ce qu'il en est.

b. Fluorescence par transfert de charge et rôle du groupement électro-attracteur

Les longueurs d'ondes correspondant au maximum d'absorption ($\lambda_{\text{abs max}}$) sont légèrement affectées par les différents groupements attracteurs introduits sur l'aromatique. Celles-ci sont légèrement décalées vers le rouge par rapport à celle du CTV de référence, **34**. Les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption augmente dans l'ordre suivant $\lambda_{\text{CTV } 40} < \lambda_{\text{CTV } 46} < \lambda_{\text{CTV } 53} < \lambda_{\text{CTV } 55}$. La longueur d'onde correspondant au maximum

d'absorption est d'autant plus haute que l'énergie de la transition entre la HOMO et le LUMO est faible. Cette transition semble donc d'autant plus favorable, qu'un groupement électro-attracteur fort, est placé sur l'aromatique. Ceci peut s'expliquer par l'existence d'un transfert de charge photo-induit entre le groupement électro-donneur et le groupement électro-attracteur lors du passage à l'état localement excité (LE).

Les longueurs d'ondes correspondant au maximum d'émission, sont également déplacées de façon bathochrome par rapport à celle du CTV **34**. La longueur d'onde correspondant au maximum d'émission est, là encore, d'autant plus haute que le groupement électro-attracteur est fort. Néanmoins, une inversion entre les groupements nitriles et acides carboxyliques par rapport aux observations sur l'absorbance est observée. D'après les spectres d'émission, les groupements sont du plus attracteur au moins attracteur, la cétone, l'acide carboxylique, le nitrile et l'acide phosphorique. Une étude avait déjà comparé différents groupements attracteurs sur des benzènes substitués par des couples électro-donneurs/électro-accepteurs conjugués et proposait le même ordre.⁵³

Finalement, les déplacements de Stokes pour ces différents fluorophores sont relativement faibles à l'exception du CTV **40** ($\Delta_{\text{Stokes}} = 154 \text{ nm}$). La stabilisation de l'état localement excité, pour atteindre l'état de transfert de charge semble donc efficace que pour le CTV **40**. La faible distance entre les groupements électro-donneurs et électro-attracteurs, explique probablement la faible modification de moment dipolaire.

Afin d'observer l'existence d'un transfert de charge photo-induit, au sein des différents fluorophores, les spectres d'absorption et d'émission de ceux-ci, ont été enregistrés dans un solvant beaucoup moins polaire. Le chloroforme a été testé pour des questions de solubilité. De plus, les déplacements de Stokes étant déjà relativement faibles dans le DMSO, on ne s'attendait pas à observer de grandes variations en fonction de la polarité du solvant.

	CTV 40		CTV 46		CTV 55		CTV 53	
	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)
Chloroforme	316	346	310	330	303	339	299	319
DMSO	316	470	310	334	302	348	297	317

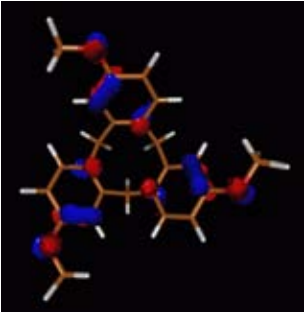
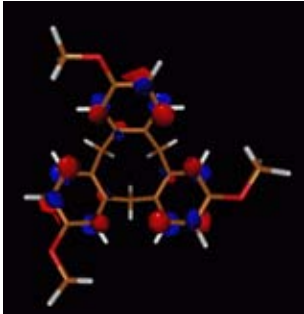
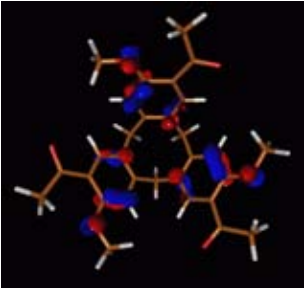
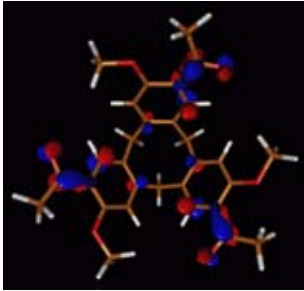
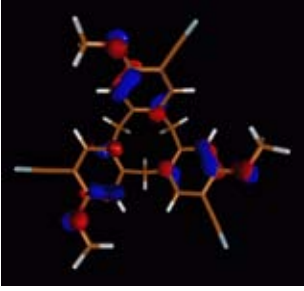
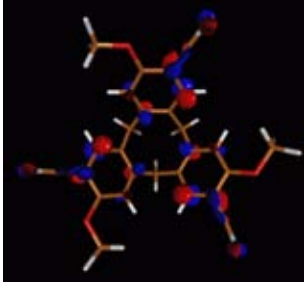
Tableau 2-3 : Longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption et d'émission dans le DMSO et le chloroforme pour différents CTVs, à 25°C.

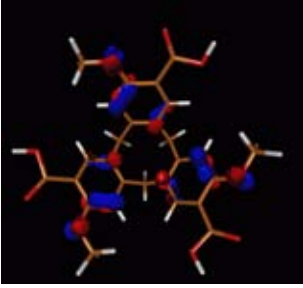

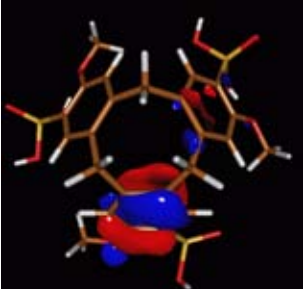

Le solvant n'a pas d'influence sur la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption comme attendu. En revanche, la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission est plus haute dans le DMSO, plus polaire que dans le DCM, pour tous les CTVs, sauf le CTV **53**. La différence de longueur d'onde d'émission est très faible dans le cas du CTV **46** (avec seulement 4 nm), légèrement plus importante dans le cas du CTV **55** (avec 9 nm), et

vraiment important pour le CTV **40** (avec 124 nm). Il semblerait donc bien qu'un PCT ait lieu au sein de ces trois fluorophores, et que l'importance du PCT soit corrélée à la force des groupements électro-attracteurs.

Pour mieux mettre en évidence le transfert de charge photo-induit, et en savoir un peu plus sur la nature de la transition mise en jeu, de la modélisation moléculaire a été réalisée en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Baraille de l'IPREM, à l'université de Pau.

Les structures des différentes HOMO et LUMO dans le DMSO calculées par Claire Coiffier, en DFT, sont résumées dans le tableau ci-dessous.

	R	HOMO	LUMO	Energie de la transition* et longueur d'onde correspondante
CTV 34	H			4,7566 eV 261 nm $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{exp}} = 290 \text{ nm}$
CTV 40	COMe			3,9050 eV 318 nm $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{exp}} = 316 \text{ nm}$
CTV 44	CN			4,2570 eV 291 nm $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{exp}} = 310 \text{ nm}$

CTV 55	COOH			4,0736 eV 304 nm $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{exp}} = 302 \text{ nm}$
CTV 53	PO(OH) ₂			4,3602 eV 284 nm $\lambda_{\text{abs max}}^{\text{exp}} = 297 \text{ nm}$

* Energie calculée dans le DMSO

Tableau 2-4 : Tableau récapitulatif des structures des HOMOs et LUMOs, ainsi que de l'énergie de la transition associée calculées en DFT, avec la fonctionnelle WB97XD, dans la base /6-31G.

Toutes les HOMOs présentent une densité électronique principalement concentrée sur les groupements méthoxyles. En revanche, celle-ci est majoritairement localisée au niveau des groupements attracteurs conjugués au niveau des LUMOs. Ceci semble être en accord avec l'existence d'un transfert de charge photo-induit à l'état excité, depuis les groupements méthoxyles vers les groupements électro-attracteurs. Dans le cas du CTV **34**, la densité de charge dans la LUMO, est délocalisée au niveau des l'aromatiques, traduisant malgré tout un transfert de charge des méthoxyles vers les aromatiques.

En ce qui concerne les énergies des transitions associées, elles sont relativement proches de celles observées expérimentalement. La correspondance est excellente pour les dérivés de CTVs portant des fonctions cétones ou acides carboxyliques. En revanche, dans le cas des dérivés portant des fonctions nitrile ou des hydrogènes, les énergies obtenues par calcul sont inférieures à celles observées, jusqu'à 30 nm.

Le classement des groupements du plus attracteur au moins attracteur en fonction des énergies de transition obtenues par calcul, est le même que celui obtenu d'après les longueurs d'ondes correspondant au maximum d'émission (*i.e.* la cétone, l'acide carboxylique, le nitrile, l'acide phosphorique). Le rôle du solvant au niveau du transfert de charge photo-induit (phénomène de relaxation notamment) semble donc bien prise en compte dans le calcul.

D'après les orbitales moléculaires calculées, il semblerait que toutes les transitions soient de nature $\pi\text{-}\pi^*$. Ceci est en accord avec une étude décrite dans la littérature, sur des benzènes substitués par des couples de groupements électro-donneurs électro-attracteurs.⁵⁴

c. Conclusion

A travers cette étude des propriétés spectroscopiques dans le DMSO, nous avons pu évaluer notre stratégie. Celle-ci consistait en l'introduction de groupements électro-attracteurs en *ortho* des méthoxyles, électro-donneurs, afin d'avoir un transfert de charge photo-induit, permettant d'avoir un déplacement bathochrome des spectres d'absorption et d'émission. Le déplacement concerne plus particulièrement le spectre d'émission, en milieu polaire. Le CTV **40** fonctionnalisé par des cétones, meilleurs groupements électro-attracteur utilisés, possède les longueurs d'ondes les plus hautes comme attendu. Cependant, la fonction cétone induit également un faible rendement quantique de fluorescence. On voit dès lors, qu'un compromis est à faire pour déterminer le CTV le plus intéressant, d'un point de vue spectroscopique. Le meilleur compromis est en faveur du CTV **55**, car il possède la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission la plus haute après le CTV **40**, et un rendement quantique de fluorescence qui reste correct (8 %).

La modélisation permet d'avoir une idée relativement bonne de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. En revanche, la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission et le rendement quantique de fluorescence, ne sont pas prévisibles par cette méthode.

Si le CTV **55**, fonctionnalisé par des acides carboxyliques semble le meilleur candidat au vue des propriétés spectroscopiques en milieu organique, regardons à présent ce qu'il en est d'un point de vue spectroscopique et de la reconnaissance en milieu aqueux.

D. Etudes des propriétés de reconnaissance des CTVs solubles en milieu aqueux

L'objectif étant de développer des sondes fluorescentes afin de suivre des espèces *ex/in vivo*, l'étude des propriétés de reconnaissance a été uniquement faite en milieu aqueux. Pour cela deux stratégies ont été envisagées, et seront ainsi développées dans deux parties différentes.

Quelque soit la stratégie utilisée, les caractéristiques spectroscopiques en milieu aqueux seront déterminées avant d'étudier leur propriétés de reconnaissance par spectroscopie, ainsi que d'autres méthodes complémentaires parfois.

a. Stratégie 1, utilisation des groupements phénolates

La première stratégie consiste à tirer profit des charges négatives des groupements phénolates, électro-donneurs. Ainsi, un titrage pH, afin de déterminer la zone dans laquelle les formes ioniques seront majoritaires doit être réalisé dans un premier temps. Les propriétés de reconnaissance, ne seront évaluées que dans le cas où les phénolates seront majoritairement formés, pour un pH proche du pH physiologique. Ceci pour des questions de solubilité avant tout, mais également afin d'optimiser les interactions électrostatiques qui pourraient exister avec les cibles portant des ammoniums.

L'utilisation du groupement phénolate, comme électro-donneur, peut être intéressante car elle pourrait permettre d'avoir une meilleure délocalisation de charge au sein de la molécule et donc un PCT plus efficace. Ainsi, les spectres d'émission pourraient être déplacés de façon plus importante vers le visible.

1. Cas des CTV **40** et **41**, fonctionnalisés par des cétones

Les CTV **40** et **41**, fonctionnalisés par des cétones avait été développés par M-L Dumartin lors de sa thèse.² Les propriétés spectroscopiques du dérivé de CTV **41** avaient été étudiées dans un mélange DMSO-Eau (92-8). Ce mélange contenant la quantité de DMSO minimale garantissant la solubilité. Les premiers résultats obtenus par M-L Dumartin devaient être confirmés. Cependant, l'utilisation du CTV **40** a été envisagée pour avoir une meilleure solubilité en milieu aqueux. En effet, celui-ci est soluble dans un mélange DMSO-Eau contenant seulement 10% de DMSO, soit bien moins que pour **41**.

Toutefois, pour comparer les deux CTVs nous avons commencé en travaillant dans un mélange DMSO-EAU (92-8) comme utilisé précédemment.

	R	$\lambda_{\text{abs max}}^{**}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	ΔStokes^* (nm)	Φ_F (%)
CTV 41	COPr	332	530	198	$\ll 1$
CTV 40	COMe	335	520	185	$\ll 1$

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un $\Phi_F = 0,18$ dans le MeOH.⁵⁰

** Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maxima d'absorption est donnée ici.

Tableau 2-5 : Caractéristiques spectroscopiques des CTVs 40 et 41 dans un mélange DMSO-Eau (92-8), à 25°C.

Comme pour le CTV 41, le CTV 40 présente un très grand déplacement de Stokes (185 nm). Cet important déplacement de Stokes est connu dans la littérature pour les dérivés d'hydroxyacétophénone et peut être expliqué par un transfert de proton intramoléculaire à l'état excité (ESIPT) (cf. Figure 2-32).^{55,56,57,58,59,60,61}

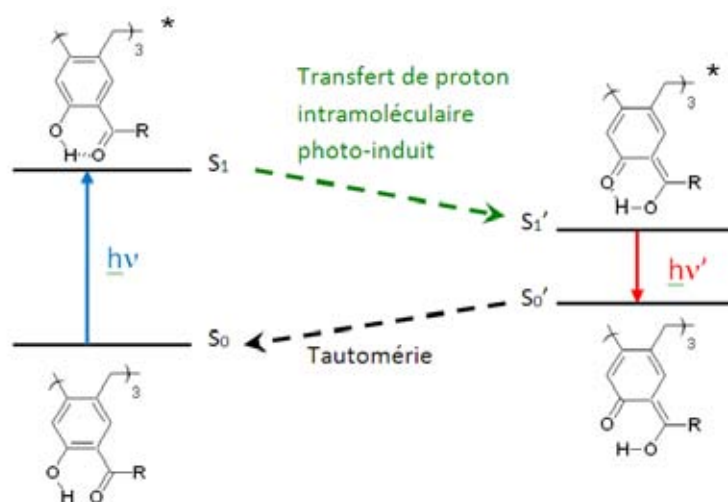


Figure 2-32 : Transfert de proton intramoléculaire photo-induit dans le cas des CTV 40 et 41.

À l'état fondamental S_0 , le CTV est sous la forme cétonique. Lors de l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ il atteint un niveau d'énergie supérieure correspondant à l'état excité S_1 , sans modification de structure, *i.e.* sous forme cétonique. Cependant, le CTV à l'état excité S_1 va évoluer ultra rapidement (de l'ordre de la picoseconde voir femtoseconde) vers un état excité S_1' , plus stable, résultant d'un transfert de proton. Le tautomère, sous forme énol est formé ainsi à l'état excité, d'où le terme de transfert de proton intramoléculaire photo-induit. Celui-ci va revenir à l'état fondamental correspondant S_0' en émettant un photon d'énergie $h\nu'$. Enfin, le CTV va revenir à sa forme la plus stable à l'état fondamental par tautomérisation, *i.e.* sous forme cétonique.

Ainsi l'énergie émise, après transfert de proton intramoléculaire photo-induit, est beaucoup plus faible que l'énergie absorbée pour atteindre l'état excité correspondant à la

forme cétone. Ceci se traduit par un déplacement bathochrome (vers les grandes longueurs d'ondes) du maximum d'émission, induisant un grand déplacement de Stokes comme observé.

Les rendements quantiques de fluorescence des deux dérivés de CTVs portant des cétones, sous la forme phénol, sont très faibles, et n'ont ainsi pas pu être mesurés de façon précise.

Les spectres d'absorption et d'émission de la forme phénolate du CTV **40** ont été enregistré également en présence d'une grande quantité de base 10^{-3} M, dans le mélange DMSO-eau (92-8).

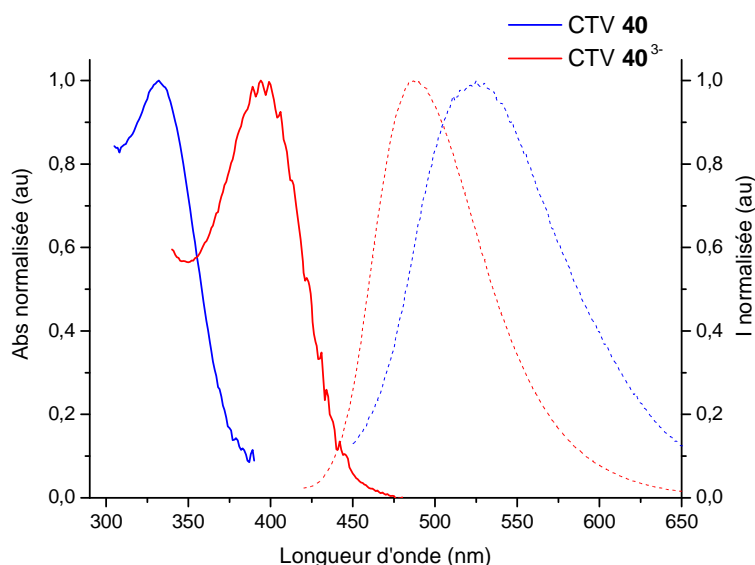


Figure 2-33 : Spectre d'absorption et d'émission normalisés pour le CTV **40**, dans un mélange DMSO-eau 92-8 (en bleu) et en présence de 10^{-3} M de soude (en rouge).

Tout d'abord, on remarque que la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption de la forme phénolate est déplacée vers des longueurs d'onde correspondant à de plus faibles énergies. La présence de la charge négative sur le phénolate permet une meilleure délocalisation électronique (comparée aux groupements hydroxyles et méthoxyles) vers les groupements attracteurs (cétones), ce qui est probablement à l'origine de la stabilisation de l'état excité. A l'inverse, la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission est déplacée de façon hypsochrome par rapport à la forme phénol. Ceci s'explique par l'absence de stabilisation par transfert de proton intramoléculaire photo-induit dans ce cas. La stabilisation par effet de relaxation du solvant, reste malgré tout importante au vue du déplacement de Stokes, illustrant un transfert de charge efficace.

Enfin, la forme phénolate présente un rendement quantique de fluorescence raisonnable, contrairement à la forme phénol. Ceci était déjà vrai dans le cas du CTV **41**,² suggérant qu'il y a moins de voies de désexcitation non radiatives efficaces, dans le cas du phénolate.

Les études de déprotonation par spectroscopie pour ces deux CTVs ont été réalisées de nombreuses fois y compris en condition inerte (dégazage à l'argon longuement des solvants, solutions, et de la cuve). Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de titrage reproductible. Une extrême sensibilité à l'air de nos solutions au cours du titrage pH a été observée. Il semblerait d'après l'évolution des spectres d'émission, mais surtout d'absorption, qu'il y ait perturbation de l'équilibre pH en présence d'air. Un ajout suffisamment conséquent de base (bien supérieur à celui nécessaire pour commencer la déprotonation) permet d'obtenir une solution de phénolate stable à l'air. D'autres solvants comme le DMF, le THF, l'acétonitrile ou l'éthanol ont été utilisés mais on observe toujours la même instabilité à l'air. Seule la quantité de base nécessaire pour atteindre la forme phénolate de façon stable change avec le solvant.

La quantité de soude nécessaire pour avoir une solution stable en spectroscopie était très importante ($\sim 10^{-3}M$), pour les deux CTVs **40** et **41**. La valeur du pK_A pour la 2-hydroxyacétophénone est de 10,3 d'après la littérature.⁶² La présence de la cétone en *para* n'abaisse pas le pK_A du phénol. Ceci s'explique probablement par l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le carbonyle et le phénol qui stabilise la structure. La déprotonation du phénol n'est donc pas vraiment favorable malgré le groupement attracteur.⁶³

Les valeurs des pK_A du CTV **40** ont été estimées à l'aide de MarvinSketch, et sont similaires à celle de la 2-hydroxyacétophénone (cf. Figure 2-34).

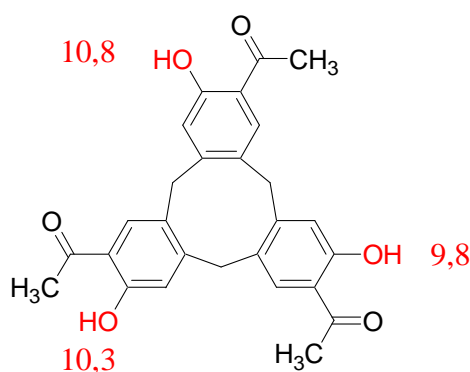


Figure 2-34 : Valeurs des pK_A estimées pour le CTV **40** à l'aide de MarvinSketch®.

Les formes phénolates des CTV **40** et **41** ne peuvent pas être obtenues à un pH proche du pH physiologique. Aussi, l'étude de propriétés de complexation pour ces espèces n'a pas été menée.

2. Cas du CTV 45, fonctionnalisé par des nitriles

1) Etude spectroscopique du CTV 45, en milieu aqueux

Tout d'abord, le CTV 45 a été caractérisé en milieu aqueux acide (HCl 5mM, pH 2,3) avec 1% de DMSO pour garantir la solubilité (cf. Tableau 2-6).

	$\lambda_{\text{abs max}}^{**}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Φ_F^* (%)
Eau-DMSO (99-1), pH 2,3	307	***	460	2,5

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un $\Phi_F = 0,18$ dans le MeOH.⁵⁰

** Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maxima d'absorption est donnée ici.

*** Non déterminé

Tableau 2-6 : Grandeurs spectroscopiques caractéristiques du CTV 45 en milieu acide.

Le déplacement de Stokes pour ce composé en milieu majoritairement aqueux est très important (153 nm). Celui-ci est beaucoup plus grand que celui observé dans le DMSO pur. Un déplacement bathochrome de la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission en est la principale cause. De telles observations sont décrites dans la littérature dans le cas du 2-hydrobenzonnitrile. Un transfert de proton à l'état excité avec le solvant (ESPT) en est la raison (cf. Figure 2-35).^{64, 16, 65}

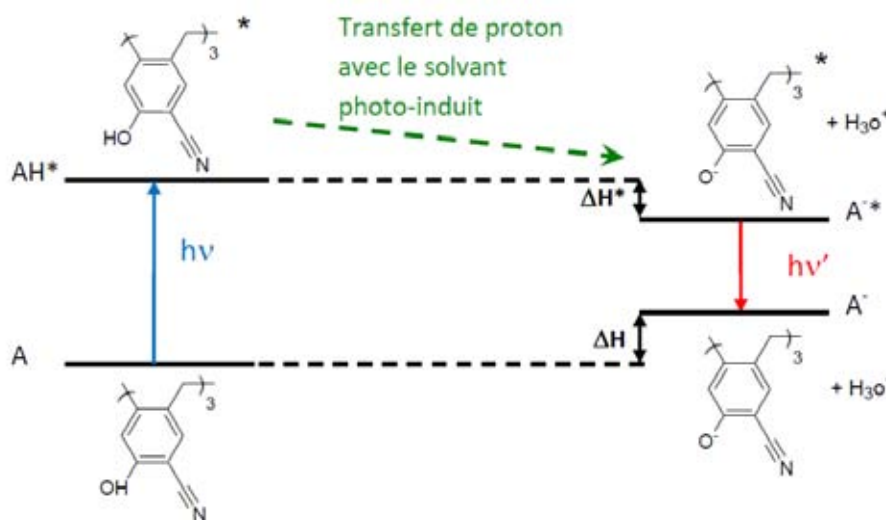


Figure 2-35 : Transfert de proton avec le solvant photo-induit et cycle de Förster dans le cas du dérivé de CTV 45.

Premièrement le CTV 45 est excité par un photon d'énergie $h\nu$ lui permettant de passer de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 . Le transfert de charge photo-induit lié à la présence du groupement nitrile (attracteur fort) abaisse l'enthalpie d'ionisation du phénol, diminuant ainsi son pK_A^* par rapport à l'état fondamental. La déprotonation du

phénol par dissociation de charge autour de la liaison hydrogène $H_{CTV} \cdots O_{H_2O}$ a lieu alors à l'état excité. Ceci a déjà été observé auparavant dans la littérature pour le 2-hydroxybenzonnitrile ($pK_A^* = 0,66$ ou $-0,5$).^{64,66} Cette déprotonation est extrêmement rapide. Typiquement, dans le cas du 2-hydroxybenzonnitrile la déprotonation à l'état excité a lieu en 15 ps.⁶⁴ Le proton libéré (sous forme d' H_3O^+) va ensuite s'éloigner de la molécule de CTV par diffusion. La molécule de CTV à l'état excité sous forme phénolate va retourner à son état fondamental en libérant un proton d'énergie $h\nu'$, bien inférieure à celle absorbée. Enfin le CTV à l'état fondamental sous forme phénolate va se protoner et conduire à la forme phénol. L'émission d'un photon, depuis la forme phénol (AH^*), n'est donc observée qu'à des pH très bas. La différence de pK_A entre l'état fondamental et l'état excité a été décrite pour la première fois par Förster en 1950.⁶⁷

Le déplacement de Stokes lié au ESPT dans le cas du CTV **47** est presque deux fois plus important que celui décrit dans la littérature pour le 2-hydroxybenzonnitrile (150 contre 80 nm).⁶⁴ Ceci est majoritairement lié à une longueur d'onde correspondant au maximum d'émission, plus élevée dans le cas du dérivé de **45** que pour le 2-hydroxybenzonnitrile (460 nm contre 360 nm).

Avant d'étudier l'évolution des spectres d'absorption et d'émission en fonction du pH, il est intéressant de caractériser la forme phénolate pour savoir quelles conditions utiliser. Pour cela, une solution de CTV à $10^{-5}M$ dans NaOH 5 mM (pH = 11,7) avec 1% de DMSO a été utilisée.

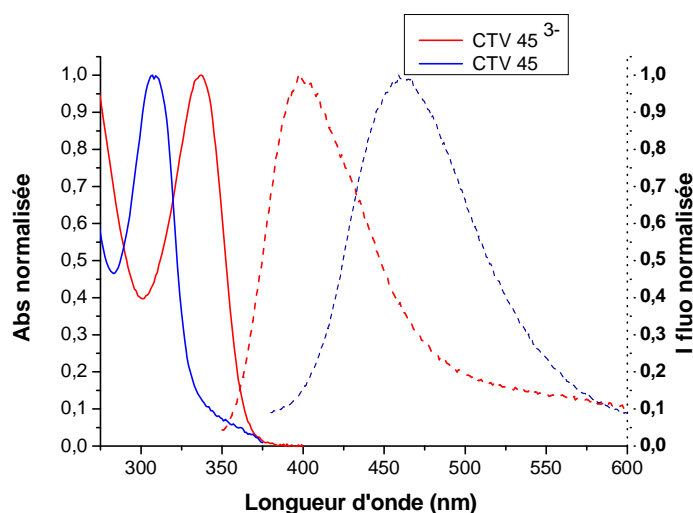


Figure 2-36 : Spectres d'absorption et d'émission pour le CTV 45 sous forme tri-phénol (CTV 45) et sous la forme tri-phénolate (CTV 45³⁻).

Tout d'abord, on observe un déplacement bathochrome de la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption entre la forme phénol et la forme phénolate. Ceci s'explique probablement, comme dans le cas du CTV **40**, par une meilleure délocalisation de charge dans le cas de la forme tri-phénolate.

Ensuite, la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission subit un déplacement hypsochrome relativement important (de 60 nm), malgré que dans les deux cas les photons soient émis à partir d'état excité sous forme tri-phénolate. Un tel déplacement n'a pas été observé dans le cas du 2-hydroxybenzonnitrile.⁶⁴

Enfin, le CTV **45** possède un rendement quantique de fluorescence très faible en milieu basique (soit tri-phénolate, CTV **45**³⁻) d'environ 0,02 %, comme la forme phénolate du 2-hydroxybenzonnitrile (0,1%). D'après la littérature, un processus de désexcitation non radiatif, liée à l'existence de liaisons hydrogènes entre $O_{CTV}^- \cdots H_{H_2O}$, et $N_{CTV} \cdots H_{H_2O}$ en serait la raison.^{68,69}

A présent regardons plus en détail l'équilibre acido-basique des fonctions phénols du CTV **45** par spectroscopie.

2) Titrage pH et spectroscopie

Nous avons commencé par estimer les pK_A des phénols à l'aide de MarvinSketch®, afin d'avoir une idée de la zone de pH à considérer (cf. Figure 2-37). Conformément à ce qui est attendu, les trois pK_A sont différents (7,3 ; 7,8 et 8,3), une unité pH séparant même les deux plus extrêmes. Dans la littérature trois études différentes décrivent trois valeurs différentes pour le pK_A du 2-hydroxybenzonnitrile de 7,86 ; 7,22 et 6,97.^{66,70,71} Ces deux valeurs sont relativement disparates, ce qui est surprenant. Les pK_A estimés sont en accord avec la littérature pour le 2-hydroxybenzonnitrile.

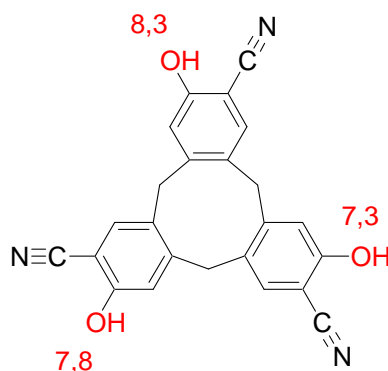


Figure 2-37 : Estimation des pK_A des trois phénols du CTV (CN) (OH).

Le titrage pH a été effectué en présence d'un tampon pH. Pour cela nous avons fait varier le ratio des deux formes acido-basiques du couple de l'espèce tampon. Le tampon devait couvrir la zone pH 6 à 9 au moins, pour que nous puissions voir les sauts pH. Le tampon barbital semblait convenir, avec un pK_A de 7,9 (à 25°).⁷² De plus, cette molécule ne comporte pas de fonction amine pouvant être potentiellement complexées par le CTV **45**. Cependant, le barbital est une molécule psychotrope puissante, soumise à une réglementation très lourde et nous n'avons pas réussi à nous en procurer. Un tampon plus courant, le Trizma® ou Tris qui possède un pK_a de 8 (à 25°C) et permet donc de tamponner

sur une zone de pH 7 à 9 a finalement été utilisé. Ce tampon comporte une fonction amine primaire dont l'influence devra être étudiée. Pour chaque solution contenant un ratio acide/base des formes du tampon différent (avec une concentration globale de 5 mM maintenue constante), le spectre d'absorption est enregistré, puis les spectres de fluorescence à deux longueurs d'onde d'excitation différentes, correspondant au maximum de chaque forme acido-basique du CTV 45 à l'état fondamental ($\lambda_{ex} = 307$ et 335 nm). Ainsi, l'évolution de chaque bande pourra être observée. Le pH est ensuite mesuré directement dans la cuve.

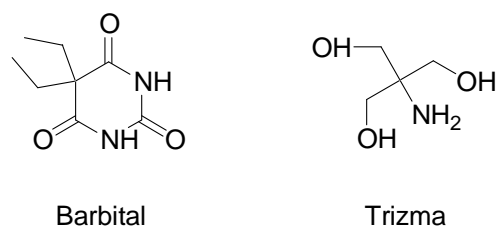


Figure 2-38 : Tampons envisagés pour le titrage pH du CTV 45.

Tout d'abord, le spectre d'absorption montre bien l'existence d'un équilibre entre deux formes en fonction du pH. En effet, lorsque le pH augmente entre 6,5 et 9 la bande d'absorption centrée à 307 nm correspondant à l'acide (comme déjà observé dans la solution HCl 5mM) diminue au profit de la bande d'absorption centrée à 338 nm qui elle correspond à la forme basique (cf. Figure 2-39). Si l'apparition de la forme basique est évidente, la disparition de la forme acide est masquée par une autre bande d'absorption correspondant à une transition de plus haute énergie pour la forme phénolate.

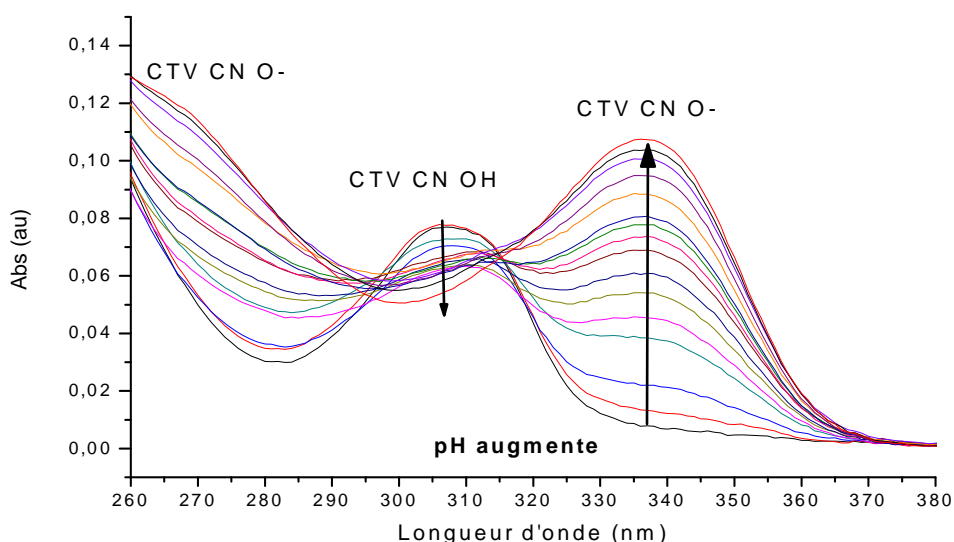


Figure 2-39 : Evolution du spectre d'absorption au cours du titrage pH, pour le CTV 45 en milieu tamponné par du trizma 5 mM, et une concentration constante de 10^{-5} M, à 25 °C.

Malgré tout, l'évolution de la bande de plus basse énergie correspondante à la forme phénolate, nous permet de d'avoir une idée du pK_A à l'état fondamental. Pour cela, la courbe correspondante à l'absorbance pour le maximum de cette bande (à 338 nm) en

fonction du pH a été tracée (cf. Figure 2-40). La concentration globale en CTV 45 étant maintenue constante, et travaillant dans la zone de linéarité, lorsque l'absorbance à 338 nm sera égale à la moitié de sa valeur maximale, la concentration de la forme phénolate sera égale à celle de la forme phénol, si l'on fait l'hypothèse que les trois pK_A sont équivalents. Le pH sera alors égal au pK_A . Ainsi, nous obtenons un pK_A à l'état fondamental moyen de 7,65. D'après la simulation, l'hypothèse trois pK_A identiques semble grossière. De plus si l'on observe en détail la courbe d'évolution de l'absorbance à 338 nm en fonction du pH, on observe des décrochements comme si l'on avait trois pK_A différents. Cependant, ceux-ci ne sont pas assez différents pour que l'on puisse déterminer les différents pK_A avec précision. La valeur moyenne obtenue semble cohérente, car elle est proche des valeurs estimées des pK_A et de celle du 2-hydroxybenzonnitrile donnés dans la littérature.^{66,70,71}

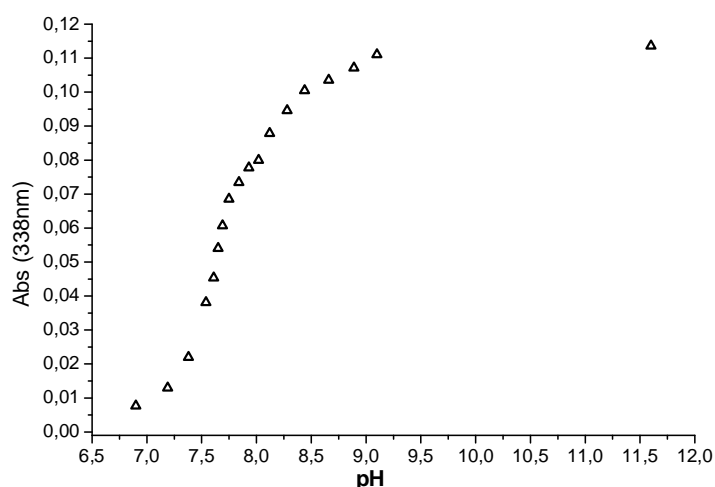


Figure 2-40 : Absorbance à 338 nm en fonction du pH pour le CTV 47, dans un tampon trizma à 5 mM avec 1% de DMSO et une concentration de 10^{-5} M en CTV, à 25 °C.

Maintenant, regardons l'évolution des spectres d'émission en fonction du pH. Ce n'est pas la même forme acido-basique qui est excitée en fonction du pH. En revanche, la forme phénol subissant un transfert de proton avec le solvant à l'état excitée (ESPT), c'est dans les deux cas depuis un état excité sous forme phénolate qu'un photon est émis.

L'intensité du spectre d'émission, suite à l'excitation de la forme phénol ($\lambda_{ex} = 307$ nm) diminue de plus d'un facteur 10 000, jusqu'à la quasi-extinction lorsque le pH augmente entre 6,5 et 8,5 (cf. Figure 2-41). A l'inverse, l'intensité du spectre d'émission suite à l'excitation de la forme phénolate (à l'état fondamental, $\lambda_{ex} = 338$ nm) augmente d'environ un facteur 700 avec l'augmentation du pH entre 6,5 et 10 (cf. Figure 2-41).

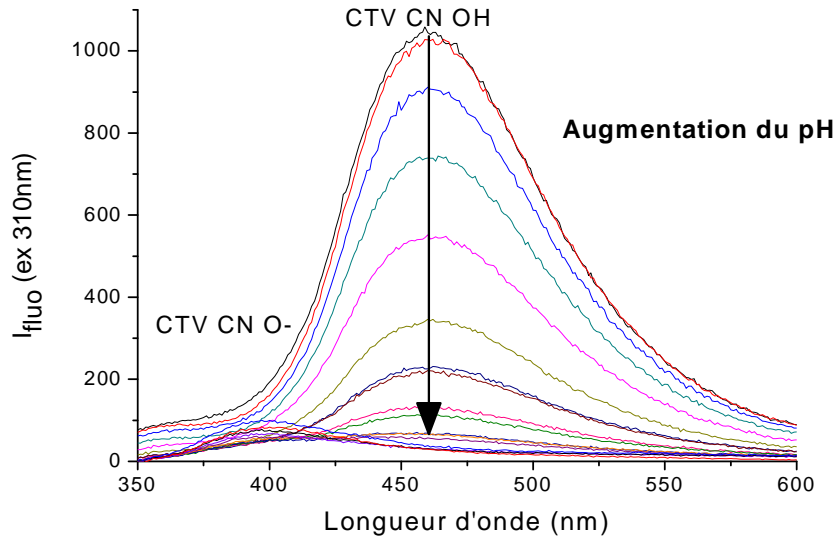


Figure 2-41 : Spectre d'émission suite à une excitation à 310 nm et 335 nm respectivement en fonction du pH, pour le CTV 45 dans un tampon trizma 5 mM avec 1% de DMSO, et une concentration en CTV de 10^{-5} M, à 25°C.

Comme précédemment, l'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée peut être tracée en fonction du pH. La fluorescence, suite à l'excitation de la forme phénolate étant très faible (rendement quantique en milieu basique du CTV 45^{3-} : 0,02 %), seule la décroissance de la fluorescence suite à l'excitation de la forme phénol sera présentée (cf. Figure 2-42). L'évolution de l'absorbance à 338 nm correspondant à l'apparition de la forme phénolate a été tracée en parallèle.

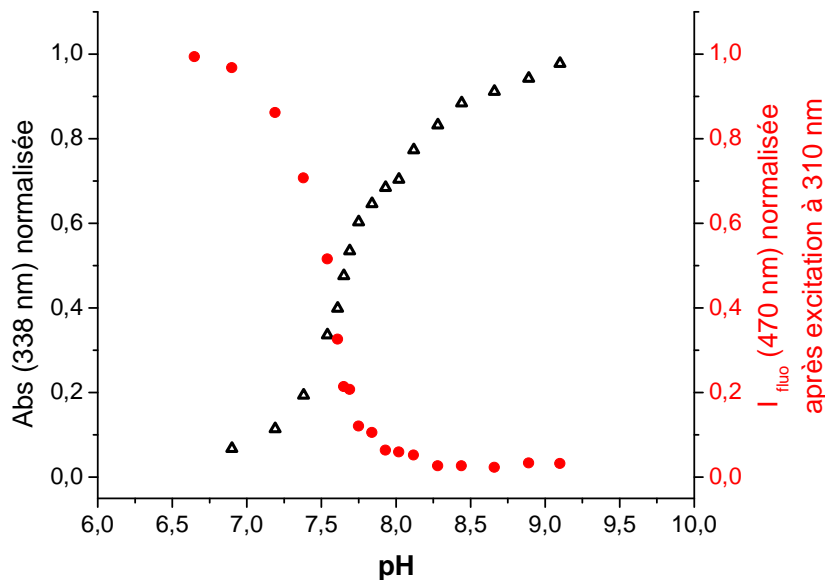


Figure 2-42 : Evolution en fonction du pH de l'absorbance à 338 nm et de l'intensité de fluorescence à 470 nm après excitation à 310 nm, pour une solution de CTV 45 à 10^{-5} M dans une solution de trizma 5 mM, à 25°C.

Tout d'abord, l'évolution de l'intensité de fluorescence suite à l'excitation de la bande phénol évolue de façon continue. Il ne semble pas possible de distinguer le pK_A de chacun

des trois phénols. Ensuite, les deux courbes se croisent pour un pH 7,6, pour une valeur proche de 0,5. L'équivalence entre la forme phénol et la forme phénolate semble donc bien être pour un pH 7,6-7,7.

En ce qui concerne la détermination du pK_a^* , l'utilisation de la méthode basée sur le cycle de Förster n'est pas possible, car on n'a pas observé la bande d'émission correspondant à la forme phénol (à cause du ESPT). Néanmoins, les premières observations semblent indiquer que les pK_a^* des phénols du CTV **45** sont proches de zéro, voire inférieurs, tout comme pour le 2-hydroxybenzonnitrile ($pK_a^* = 0,66$ ou $-0,5$).^{64,66}

Cette étude n'a pas encore été reproduite et doit encore être approfondie afin de mieux comprendre tous les phénomènes mis en jeu.

Le CTV **45** constitue une sonde pH doublement intéressante à cause de son pK_a , proche du pH physiologique et des variations d'amplitudes des spectres d'émission en fonction du pH permettant de réaliser un titrage fin.

3) Détection d'ammoniums d'intérêt biologique

Le CTV **45** étant soluble dans l'eau à des pH proches du pH physiologique, nous avons décidé de réaliser des études de titrages d'ammoniums d'intérêt biologique tels que l'acétylcholine (Ach) et la choline (Ch). Ces cibles ont été choisies car elles avaient déjà montré une certaine affinité pour le premier dérivé de CTV fluorescent développé au laboratoire.¹

Dans un premier temps, nous avons décidé de travailler avec la forme phénolate de ce CTV afin d'optimiser les interactions électrostatiques potentielles avec l'ammonium de la cible. Aussi, une solution de tampon trizma à pH 8,7, permettant d'avoir majoritairement la forme tri-phénolate a été utilisée. La concentration totale en tampon a été maintenue à 5 mM car les espèces introduites ne sont pas acido-basiques (ammoniums quaternaires). La concentration en CTV est fixée à $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Une exaltation de la fluorescence d'un facteur deux, est observée suite à l'ajout d'ACH ou de Ch (cf. Figure 2-43) sur le CTV **45**. Aucune modification n'est observée au niveau de la l'absorbance. Comme dans le cas du premier CTV **20** développé par M-L. Dumartin, c'est une sonde fluorescence « off-on ». Cependant, celle-ci possède un facteur d'amplification beaucoup plus important (120% contre 20%).¹ Aucun déplacement du spectre d'émission n'est observable.

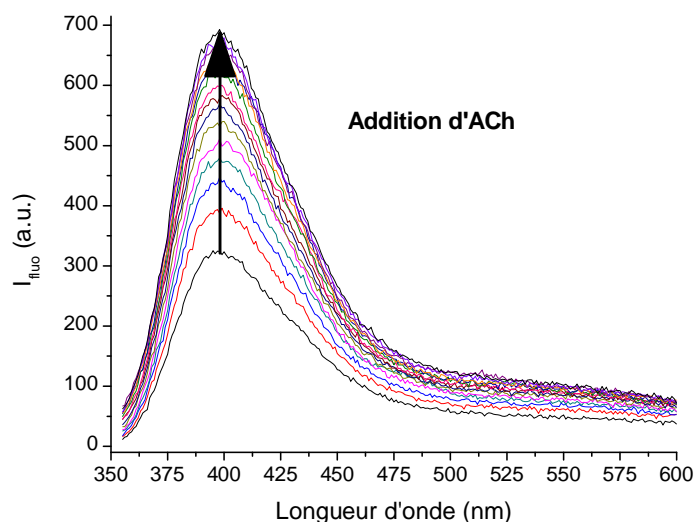


Figure 2-43 : Titration par fluorescence de l'ACH avec 45, dans le trizma 5mM, pH 8,7, à 25 °C.

Les courbes d'évolution de l'aire de la courbe d'émission, en fonction de la concentration en cible ajoutée ont été tracées, afin de déterminer les constantes d'association pour l'Ach et la Ch. Les courbes ont été fittées selon le modèle correspondant à un complexe de stœchiométrie 1:1. La constante d'association est de $338 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ pour l'Ach contre $262 \pm 19 \text{ M}^{-1}$ pour la Ch. Ces constantes d'association sont dix fois plus élevées que celles obtenues en milieu physiologique (concentration globale en sel de 150 mM soit 30 fois plus), et cinq fois plus importantes que celles obtenues dans l'eau pure, pour le CTV 20 développé précédemment.¹ Cependant, tout comme pour le CTV 20 aucune sélectivité entre les deux ammoniums n'a été observée (cf. Figure 2-44).

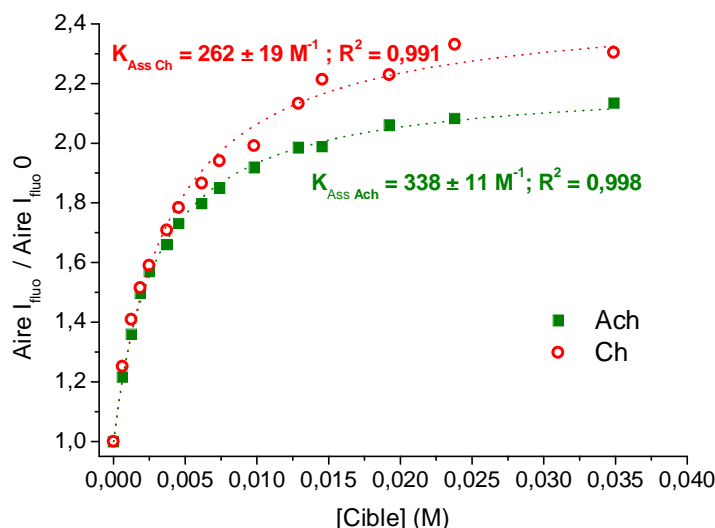


Figure 2-44 : Evolution des aires correspondantes aux intensités de fluorescence en fonction des concentrations en ACh et Ch ajoutées, dans le tampon Trizma 5mM, pH = 8,7, à 25 °C.

Des études en RMN du proton, ont été réalisées afin de mieux comprendre les interactions mises en jeu. Les protons des chaînes alkyles du trizma possédant des déplacements proches de ceux de nos cibles, l'étude RMN a été faite en milieu basique par ajout de NaOD (0,1 M) uniquement. Tout d'abord, afin d'observer l'influence sur les

constantes d'association du changement de milieu, celles-ci ont été déterminées par spectrofluorimétrie. Une constante de $140 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ pour la choline a été obtenue dans une solution de soude à 0,1 M. L'ACh n'a pas été titrée car celle-ci s'hydrolyse à un tel pH. Cette constante est inférieure à celle obtenue précédemment ($K_{\text{association Ch}} = 262 \pm 19 \text{ M}^{-1}$), probablement à cause de la grande quantité de sels utilisée par rapport aux études dans le trizma (20 fois plus). Une diminution de la constante d'association avec de grande quantité de sel avait déjà été observée dans le cas du CTV **20** ($K_{\text{association ACh}} = 76 \text{ M}^{-1}$ dans l'eau contre $K_{\text{association ACh}} = 23 \text{ M}^{-1}$ avec une concentration en sel de 150mM)¹.

Aucune modification notable des déplacements chimiques des protons de la sonde, lors de l'ajout de Ch, n'a été observée. Un titrage par RMN du proton n'est donc pas possible. De même avec le CTV **20** aucun déplacement significatif ($\delta > 0,05 \text{ ppm}$) n'avait été observé pour les protons aromatiques du squelette du CTV.¹

Malgré tout, une expérience de RMN-NOE pour mettre en évidence la formation d'un complexe a été menée. Deux taches de corrélation sont apparues entre les méthyles de l'ammonium quaternaire de la Ch et les deux protons aromatiques de la sonde (cf. Figure 2-45). La partie ammonium semble donc être à proximité de la cavité et des aromatiques.

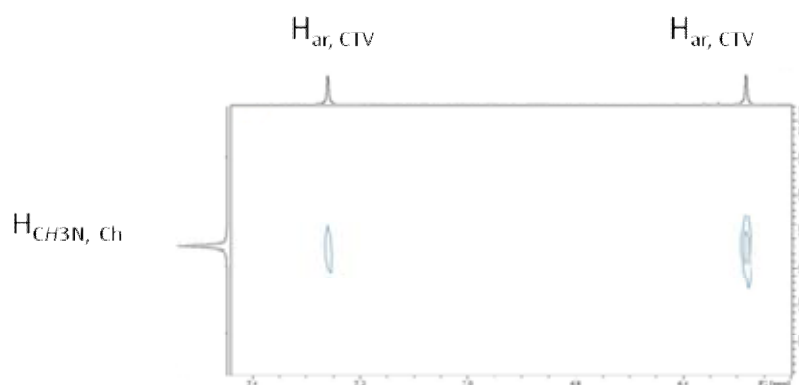


Figure 2-45 : Zoom sur une partie du spectre RMN-NOE enregistré dans NaOD, pD = 11, avec le CTV 45 en présence de Ch.

Au vue des résultats de fluorescence et de RMN la complexation semble être drainée par l'interaction entre la sonde et la partie ammonium de la cible. Cependant, il est très difficile de préciser les interactions observées lors de ces études. Des interactions de type π -cations entre les aromatiques du squelette et l'ammonium, comme des interactions ioniques avec les phénolates, peuvent exister.

L'exaltation de la fluorescence peut avoir des raisons diverses. L'absence de déplacement du spectre d'émission, laisse envisager que celle-ci n'est pas liée au niveau d'énergie mais plutôt à l'environnement. Certaines voies de désexcitation non radiatives sont probablement moins favorisées. Par exemple, on peut supposer que la cible se plaçant à l'entrée de la cavité (quelques soit les interactions mise en jeux) remplace les molécules d'eau qui s'y trouvaient. Les phénomènes de désexcitation par collision avec des molécules de solvants sont alors moins probables. Des liaisons hydrogène, entre le nitrile et l'eau, ainsi

qu'entre le phénolate et l'eau, semblent être en partie à l'origine du faible rendement quantique comme décrit, dans le cas du 2-hydroxybenzonnitrile.^{68,69} La modification de telles liaisons dans le cas du CTV **45**, lors de la formation du complexe [CTV **45**/cible] pourraient expliquer l'exaltation de la fluorescence.

Il faudrait synthétiser à nouveau du CTV **45**, afin de continuer cette étude et notamment en réalisant des titrages pour ces deux cibles à des différents pH, de façon à évaluer l'importance des charges négatives des phénolates pour la reconnaissance. Si les cibles sont toujours reconnues à des pH acides, il serait intéressant d'observer l'impact de la reconnaissance sur le transfert de proton avec le solvant à l'état excité.

3. Conclusion sur cette première stratégie de solubilisation via les phénolates

La première stratégie envisagée pour rendre soluble en milieu aqueux les CTVs, consistait en l'introduction de charges négatives *via* des groupements phénolates. Afin d'avoir majoritairement la forme phénolate à pH physiologique, il est nécessaire de conjuguer les phénols à des groupements électro-attracteurs forts. Dans cette optique, des groupements cétones et nitriles ont été utilisés.

L'introduction de groupements cétones en *ortho* des phénols, dans le cas des CTVs **40** et **41**, s'est révélée peu intéressante. En effet, les pK_A des phénols n'ont pas été abaissés suffisamment pour obtenir des sondes fluorescentes à des pH proches du pH physiologique. Aussi, les propriétés de reconnaissance éventuelles des CTV **40** et **41** n'ont pas été explorées.

En revanche, l'introduction de groupements nitriles, électro-attracteurs, en *ortho* des phénols a fonctionné dans le cas du CTV **45**. Les pK_A des phénols sont ainsi abaissés autour de 7,6, d'après une étude pH en spectroscopie (absorbance et fluorescence). Le CTV **45** constitue ainsi une sonde pH fonctionnant dans la zone du pH physiologique 6,5 – 8,5. Cette sonde présente un facteur d'extinction de sa fluorescence (suite à l'excitation de sa forme phénol à 310 nm) d'un facteur supérieur à 1000 pour un pH allant de 6,5 à 8,5, ce qui permet de réaliser un titrage pH fin.

Des premières études de reconnaissance ont été réalisées pour le CTV **45**, en présence de deux ammoniums quaternaires d'intérêts biologiques l'Ach et la Ch. Celles-ci ont été menées à un pH basique permettant d'avoir une majorité de sonde sous la forme triplement chargée négativement, afin d'optimiser les interactions électrostatiques (entre l'ammonium des cibles et les phénolates de la sonde). L'acétylcholine et la choline sont reconnues par cette sonde d'après des titrages en fluorescence et des expériences en RMN. Les constantes d'association obtenues par spectrofluorimétrie sont respectivement de $338 \pm 11 \text{ M}^{-1}$ pour l'acétylcholine, $262 \pm 19 \text{ M}^{-1}$ pour la choline, dans le tampon Trizma, pH 8,7 à 5 mM (à 25°C). Ces constantes sont intéressantes, mais démontrent l'absence de sélectivité pour le

neurotransmetteur (l'acétylcholine). D'autres titrages complémentaires vont être réalisés afin d'approfondir cette étude.

Des études complémentaires en RMN ont été menées. L'absence de modification notable des déplacements chimiques n'a pas permis de réaliser de titrage. Néanmoins, des expériences NOE ont démontré l'existence d'interactions entre les aromatiques de la sonde et l'ammonium quaternaire des cibles. Il semblerait que des interactions π -cations ou électrostatiques aient lieu entre la sonde et les cibles.

Quelque soit les groupements électro-attracteurs introduits (cétones ou nitriles), des processus de transfert de protons à l'état excité, liés à la présence des phénols, ont été observés avec les formes protonées dans l'eau. Ces transferts de proton photo-induit sont à l'origine des grands déplacements de Stokes observés (> 150 nm). Le transfert de charge est intramoléculaire dans le cas des CTV **40** et **41**, et lié à l'équilibre céto-énolique. Pour le CTV **45**, celui-ci a lieu avec le solvant, suite à l'exaltation du pK_A des phénols à l'état excité.

Finalement, cette stratégie s'est révélée prometteuse avec l'utilisation de groupement nitriles comme électro-attracteurs. Le CTV **45** possède des pK_A proches du pH physiologique (pK_A moyen pour les trois phénols déterminé à 7,6). De plus, l'utilisation de phénolates, électro-donneurs conjugués à des nitriles, électro-attracteurs, permet d'avoir une bonne délocalisation de charge, et donc d'avoir un bon transfert de charge à l'état excité, comme le montre le déplacement de Stokes élevé (de l'ordre de 100 nm). Toutefois, si le spectre d'émission du CTV **45** se situe dans le visible, ce n'est pas le cas du spectre d'absorption, encore trop bas pour envisager une application en imagerie. Cette stratégie intéressante doit donc encore être améliorée.

b. Stratégie 2 : Solubilisation via des groupements carboxylates ou phosphonates

La seconde stratégie envisagée afin d'obtenir des sondes solubles en milieu aqueux, est basée sur l'utilisation des charges négatives présentes sur les groupements acides carboxyliques et acides phosphoriques, à pH neutre. Les propriétés spectroscopiques, puis de reconnaissance de ces sondes, ont donc été étudiées directement en milieu tamponné salin, proche du milieu physiologique.

Il est possible que la présence de charges négatives sur les groupements électro-attracteurs défavorise le transfert de charge photo-induit. Aussi, les propriétés spectroscopiques de ces sondes en milieu aqueux tamponné, ont été comparées à celles obtenues dans le DMSO dans un premier temps.

1. Cas du CTV **53**, fonctionnalisé par des acides phosphoriques

Les études en milieu aqueux pour cette sonde, ont été faites dans un tampon sulfonate afin de ne pas avoir de souci de compétition entre le tampon et la sonde. Une solution d'HEPES 100 mM, à pH = 7,5, proches des conditions physiologiques a été utilisée.

1) Propriétés spectroscopiques du CTV **53** dans l'HEPES

Les différentes grandeurs spectroscopiques caractéristiques du CTV **53** ont été déterminées dans l'HEPES et comparées à celles obtenues dans le DMSO (cf. Tableau 2-7).

	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Φ_F^* (%)	τ (ns)
DMSO	297	7,1	317	14	2,7
HEPES 100mM, pH 7,5	295	0,8	316	11	2,4

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un Φ_F ⁵⁰ = 0,18 dans le MeOH.

Tableau 2-7 : Grandeurs spectroscopiques caractéristiques du CTV **53 dans le DMSO et un tampon HEPES 100 mM, pH 7,5, à 25 °C.**

Les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption et d'émission ne sont pas modifiées par le changement de solvant et l'apparition de charges négatives. En revanche, le coefficient d'absorption molaire et le rendement quantique de fluorescence, sont atténués dans le tampon aqueux.

Le CTV **53** a été synthétisé suite au développement du CTV **20** pour voir dans quelles mesures l'introduction du phosphore, directement sur l'aromatique et non *via* un atome d'oxygène, affecterait les propriétés. Dans le CTV **20**, les phosphores ne sont pas conjugués avec les cycles aromatiques, alors que c'est le cas dans le CTV **53**. Les grandeurs spectroscopiques caractéristiques de ces deux CTVs, en milieu aqueux semblables, ont donc été comparés (cf. Tableau 2-7 et Tableau 2-8). Elles sont quasi-identiques. La conjugaison des groupements phosphorylés aux aromatiques, n'a pas d'influence notable sur les propriétés spectroscopiques.

	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Φ_F^* (%)
Milieu physiologique, C _{sels globale} = 140mM, pH 7,6	280	0,8	314	14

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un Φ_F ⁵⁰ = 0,18 dans le MeOH.

Tableau 2-8 : Propriétés spectroscopiques du CTV **20 en milieu physiologique tamponné à pH 7,6 avec une concentration en sels globales de 140 mM.¹**

A présent, regardons l'influence éventuelle de la modification des groupements phosphorylés sur les propriétés de reconnaissance.

2) Etude de reconnaissance, dans l'HEPES, pour le CTV 53

Tout d'abord, les propriétés de reconnaissance du CTV 53 ont été évaluées dans l'HEPES 100 mM, à pH 7,5 pour l'Ach et la Ch par spectrofluorimétrie, comme dans le cas du CTV 20.

Une exaltation de la fluorescence est visible lors de l'ajout d'Ach ou de Ch à une solution de CTV (cf. Figure 2-46), alors que l'absorbance n'est pas modifiée. L'augmentation du signal de fluorescence est de l'ordre de 20% dans le cas de la Ch contre 15% dans le cas de l'ACh (cf. Figure 2-47). Comme dans le cas du CTV 20, le CTV 53 est une sonde « off-on » avec des variations d'amplitudes similaires, de l'ordre de 15-20 %.^{1,28}

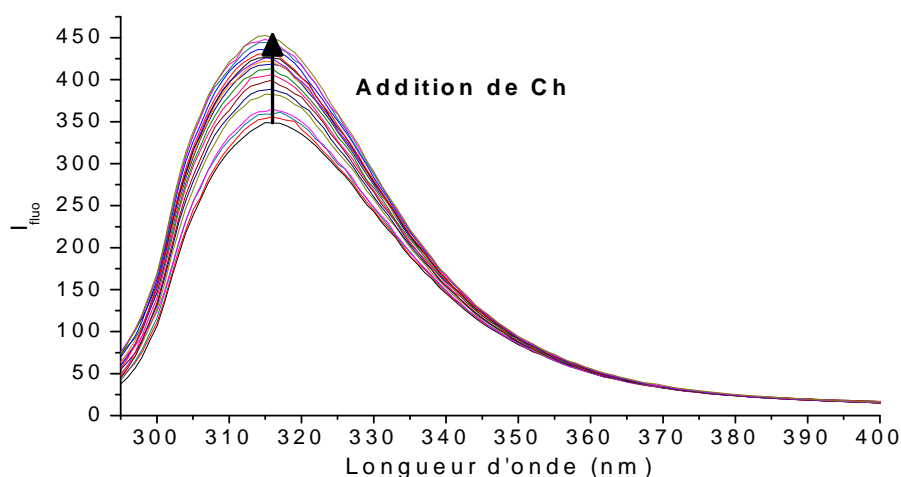


Figure 2-46 : Titrage par fluorescence de la Ch avec le CTV 53 dans l'HEPES 100 mM, pH 7,5, à 25°C, avec une excitation à 290 nm.

Un très léger déplacement hypochrome de 3 nm est observable au niveau du maximum de la longueur d'onde d'émission. Cependant, celui-ci n'est pas significatif pour que l'on puisse en tirer des informations sur les interactions impliquées dans la formation d'un complexe entre la sonde et le cibles.

D'après les titrages par fluorescence, les constantes d'association en suivant un modèle correspondant à une stoechiométrie 1:1 pour les complexes formés, sont de $66 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0,993$) pour la Ch et de $23,5 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0,998$) pour l'Ach. Ces constantes sont du même ordre de grandeur que celles obtenues lors de l'étude précédente avec le CTV 20 en milieu physiologique ($K_{\text{association Ch}} = 14 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{association Ach}} = 23 \pm 2 \text{ M}^{-1}$).¹ Néanmoins, il semble que la modification du groupement phosphorylé ait une influence sur la complexation, surtout de la Ch. En effet, une sélectivité d'un facteur 2,8 en faveur de la Ch est observée avec le CTV 53, ce qui n'était pas le cas avec le CTV 20. La ressemblance des structures de l'Ach et de la Ch, fait qu'il est difficile d'avoir une sélectivité, même limitée,

comme en témoigne la littérature. L'Ach, caractérisée par un groupement acétate est légèrement plus hydrophobe que la Ch, caractérisée par une fonction alcool.

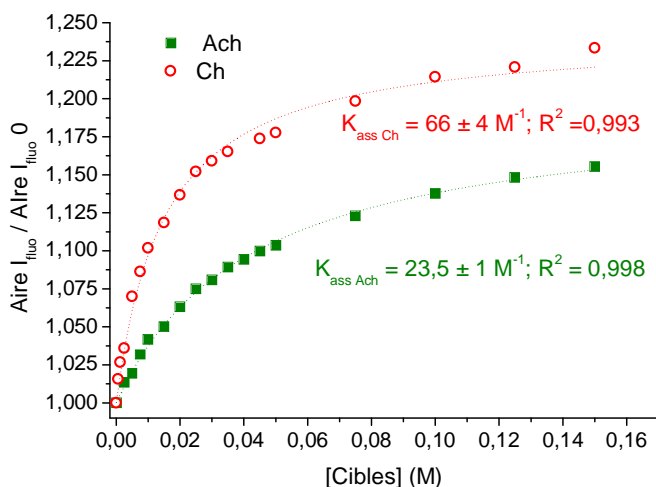


Figure 2-47 : Courbes de titrage par fluorescence de l'affinité du CTV 53 pour l'ACh et la Ch, à 25 °C.

Afin de mieux comprendre la sélectivité observée, des titrages complémentaires ont été réalisés en spectrofluorimétrie. Les structures des espèces choisies sont présentées sur la Figure 2-48. Deux ammoniums quaternaires substitués par des chaînes alkyles de longueurs différentes ont été choisis, pour mettre en évidence l'importance de la taille ainsi que celle de l'hydrophobie. Un analogue de la choline, protégé sous forme d'éther a également été testé, afin de voir l'importance de l'hydrophobie mais surtout de la présence d'un donneur de liaison hydrogène sur la cible.

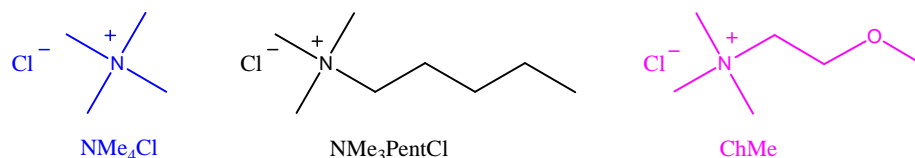


Figure 2-48 : Structure des ammoniums quaternaires testés de façon complémentaire pour mieux comprendre les interactions mises en jeu et la sélectivité pour la Ch, observée avec le CTV 53.

Les titrages par fluorescence pour ces différents ammoniums ont permis de déterminer les valeurs des constantes d'associations résumées dans le tableau ci-dessous (cf. Tableau 2-1).

	Ch	ACh	NMe ₄ Cl	NMe ₃ Pent	ChMe
$K_{Ass} (M^{-1})$	66 ± 4	$23,5 \pm 1$	48 ± 2	$16,5 \pm 2$	$18,5 \pm 1$
R^2	0,993	0,998	0,994	0,996	0,997

Tableau 2-9 : Constantes d'association pour différents ammoniums avec le CTV 53, dans l'HEPES 100 mM, pH 7,5 à 25°C.

Au vu de la plus grande affinité pour la Ch par rapport à l'ACh et le NMe₃Pent, il semblerait que l'effet hydrophobe ne soit pas prépondérant. La constante d'association pour le NMe₄ est plus grande que pour l'ACh et se rapproche de celle de la Ch. La taille de la cible semble donc être importante. Le NMe₄ qui est petit, a probablement une taille qui correspond mieux à celle de la cavité du CTV **53**. Ainsi, il est mieux reconnu que toutes les autres cibles, à l'exception de la Ch.

Dès lors, on voit qu'un autre type d'interaction que des interactions de type π -cations ou ioniques sont à prendre en compte pour expliquer la sélectivité pour la Ch. La constante d'association obtenue pour le NMe₃Ether est intéressante à ce niveau. En effet, celle-ci est bien inférieure à celle de la Ch et proche de celle obtenue pour l'ACh. Ainsi, alors que la polarité de la chaîne ne semble pas être déterminante au vue des constantes d'associations obtenues pour les autres cibles, la présence d'un donneur de liaison hydrogène semble essentielle. Une liaison hydrogène entre l'alcool de la Ch et l'un des phosphonates pourrait être une interaction complémentaire, permettant d'expliquer la sélectivité pour cette dernière.

Afin, d'approfondir l'étude des interactions mises en jeu, des expériences RMN ont été menées. L'objectif était notamment d'essayer de voir quelles interactions existaient entre la sonde et les cibles. Les spectres RMN ont été enregistrés dans D₂O afin de limiter les pics pouvant appartenir au tampon.

Tout d'abord, des analyses en RMN du proton et du phosphore ont été effectuées pour le CTV **53** seul et en présence d'un très large excès de Ch. Cependant, aucun shift significatif permettant de réaliser un titrage n'a été observé, ni en proton, ni en phosphore. Remarquons que dans le cas précédent du CTV **20**, les seuls déplacements significatifs permettant de réaliser un titrage avaient été observés sur les chaînes butyles portées par les phosphores et non au niveau de la structure du CTV (protons aromatiques ou du méthoxyle) ou du phosphore.¹

Pour confirmer malgré tout l'existence d'un complexe, des expériences de RMN-DOSY ont été entreprises. En effet, l'analyse DOSY permet de détecter la formation d'un complexe entre deux espèces, en s'appuyant sur la mesure des coefficients de diffusion. Des spectres ont été enregistrés pour la sonde en présence de Ch et d'ACh (rapports 1:40 et 1:200) (cf. Figure 2-49). Nous nous sommes concentrés sur la zone des aromatiques, afin de bien voir le CTV seul et la formation d'un éventuel complexe.

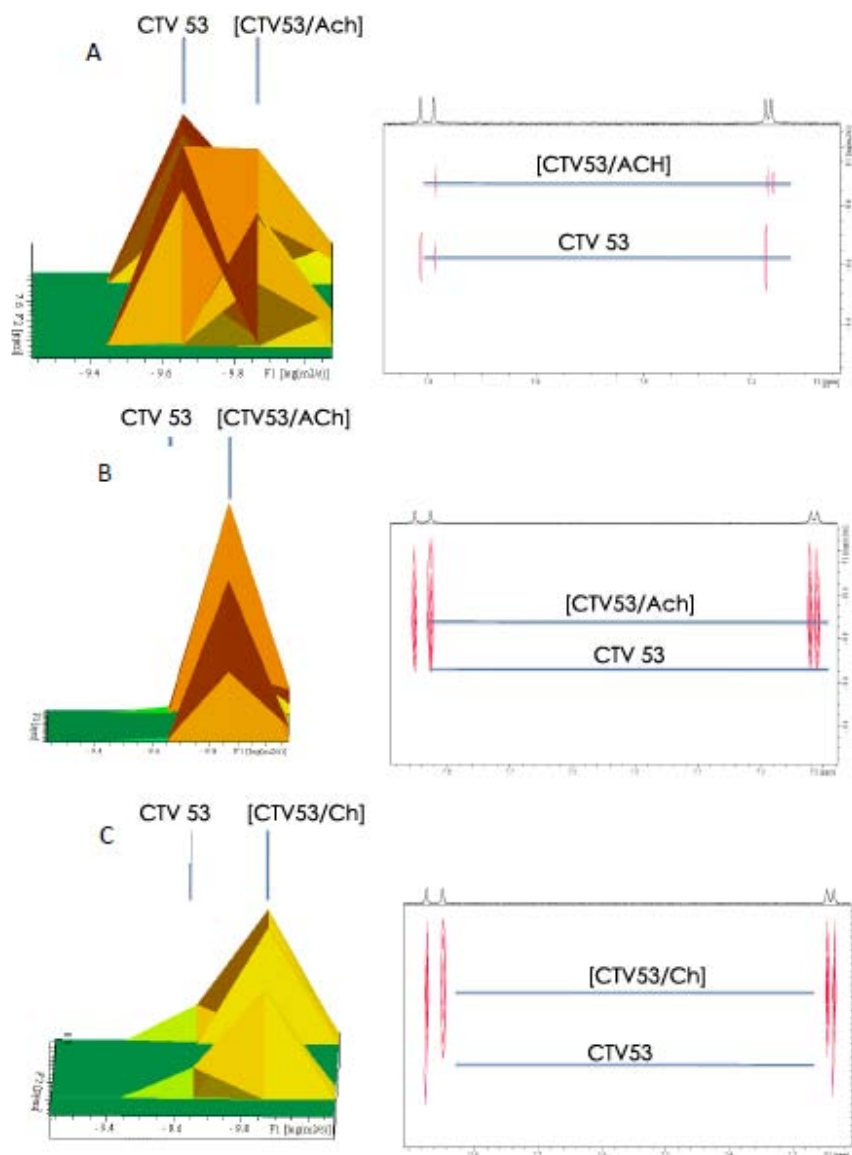


Figure 2-49 : Zoom sur la partie aromatique des spectres DOSY enregistrés dans D_2O , avec le CTV 53, en présence de A) 40 éq. Ach, B) 200 éq. ACh et C) 40 éq. De Ch.

Dans le cas de l'Ach, l'évolution des intensités correspondantes aux deux populations (CTV seul et complexe) entre un ratio 1:40 et 1:200 (sonde:cible) illustre bien la formation du complexe. Celui-ci est formé plus efficacement dans le cas de la Ch, car une seule population, largement majoritaire, correspondant au complexe est visible dès un ratio 1:40. Ceci est en accord avec les résultats obtenus en fluorescence.

De façon complémentaire, des analyses de RMN-NOE du complexe formé avec la Ch ont été faites. Le spectre NOESY obtenu pour le complexe ([cible/Ch]) dans D_2O , présente deux taches de corrélation entre les protons aromatiques du CTV et les protons des méthyles de l'ammonium (cf. Figure 2-50). Un spectre présentant des taches de corrélation similaires a été obtenu pour l'Ach. La partie ammonium de nos cibles semble donc se rapprocher de la cavité aromatique. Les interactions à l'origine de ce rapprochement,

peuvent être des interactions π -cations et/ou électrostatiques, comme pour le CTV 45 étudié précédemment.

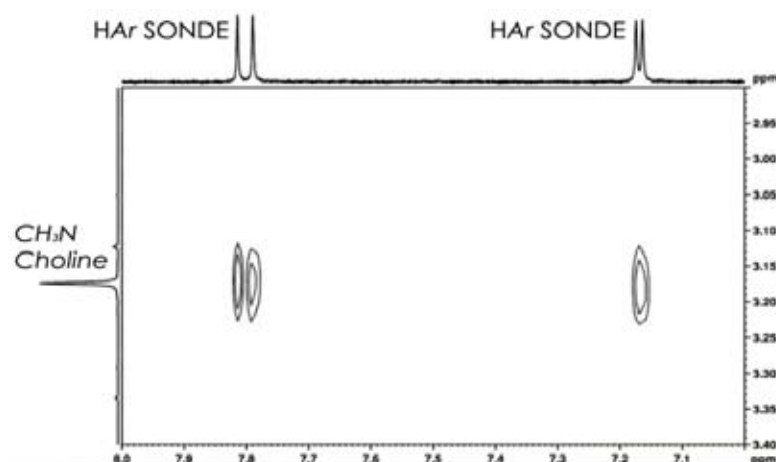


Figure 2-50 : Zoom sur la partie aromatique du spectre NOESY, dans D₂O, enregistré pour 53 en présence de 40 équivalents de Ch.

Diverses tentatives de cristallisation afin de déterminer la structure du complexe [CTV53/Ch] ont été menées, malheureusement aucune n'a abouti. De la modélisation moléculaire afin de mieux comprendre les interactions a été faite, dans une boîte d'eau avec la méthode MM⁺ à l'aide du logiciel HyperChemTM. Une optimisation de structure du complexe [CTV53/Ch] a été faite pour voir notamment, si une liaison hydrogène était bien envisageable avec l'hydroxyle de la Ch. Une conformation stable obtenue est présentée ci-dessous (cf. Figure 2-51).

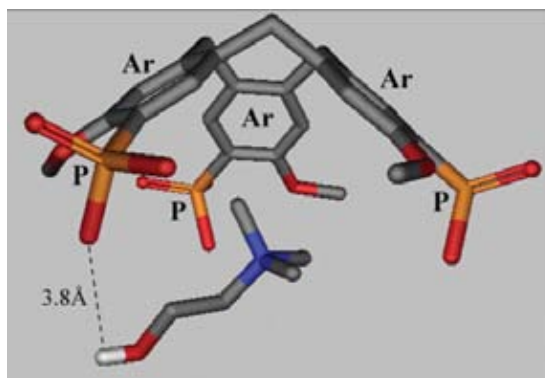


Figure 2-51 : Structure du complexe [sonde53/Ch] obtenue après minimisation dans une boîte d'eau par la méthode MM⁺ avec HyperChem[®].

Tout d'abord, on observe, comme le suggérait l'expérience RMN-NOE, que la partie ammonium de la Ch semble se rapprocher de la cavité aromatique. Cependant, il faut noter que l'ammonium n'est pas tout à fait centré au sein de la cavité. Des interactions électrostatiques entre l'ammonium et les phosphonates sont envisageables d'après les distances mesurées de 4,39, 4,46 et 4,94 Å. Au vu des distances, des interactions π -cations sont également possibles. Notons qu'une distance H...O de 3,8 Å et un angle de 110° ont été mesurés entre l'hydrogène de l'alcool de la Ch et l'oxygène du phosphonate de la sonde le

plus proche. L'angle très faible (par rapport à 180°) et la distance élevée, ne sont pas optimaux pour avoir une liaison hydrogène, néanmoins une liaison hydrogène resterait envisageable d'après la littérature.⁷³

3) Conclusion

Le nouveau dérivé de CTV **53** a des propriétés de spectroscopie très proches du précédent (CTV **20**) en milieu aqueux. Conjuguer les groupements phosphorylés avec le squelette aromatique *via* une liaison carbone-phosphore, n'a rien changé. Ceci semble réaffirmer le caractère très faiblement électro-attracteur du groupement phosphonate.

Néanmoins, ce changement de structure a modifié les propriétés de reconnaissance de la sonde ainsi obtenue, surtout pour la Ch. En effet, avec les groupements phosphonates plus proches de la cavité, une sélectivité en faveur de la choline est apparue. Une liaison hydrogène entre l'alcool de la Ch et l'un des phosphonate pourrait expliquer celle-ci.

2. Cas du CTV **55**, fonctionnalisé par des acides

L'étude pour le CTV **55** a été menée dans un tampon phosphate (PBS 140 mM, pH 7,4). Les fonctions phosphates n'entrent pas en compétition avec la sonde, et l'étude est conduite dans des conditions physiologiques.

1) Propriétés spectroscopiques dans le PBS du CTV **55**

Les grandeurs caractéristiques principales du CTV **55** ont été déterminées dans le tampon PBS (cf. Figure 2-9) et comparées à celles obtenues dans le DMSO.

	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Φ_{F}^* (%)
DMSO	302	5,1	348	8
PBS pH 7,4	293	0,8	346	6

* Rendements quantiques déterminés par rapport à l'acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique possédant un $\Phi_{\text{F}} = 0,18$ dans le MeOH.⁵⁰

Tableau 2-10 : Principales grandeurs spectroscopiques caractéristiques du CTV 55 dans le DMSO et une solution de PBS pH 7,4, à 25 °C.

Le changement de solvant et l'apparition de charges négatives n'ont pas beaucoup d'influence sur les longueurs d'onde correspondantes aux maxima d'excitation et d'émission. En revanche, le passage en milieu aqueux très salin diminue le coefficient d'absorption molaire (facteur 5) et le rendement quantique de fluorescence (facteur 1,5) comme pour le CTV **53**.

2) Etude de reconnaissance d'ammoniums d'intérêt biologique

Dans un premier temps les propriétés de reconnaissance par fluorescence du CTV 53, dans le tampon PBS, pH 7,4 ont été évaluées pour l'Ach et la Ch comme pour les sondes précédentes.

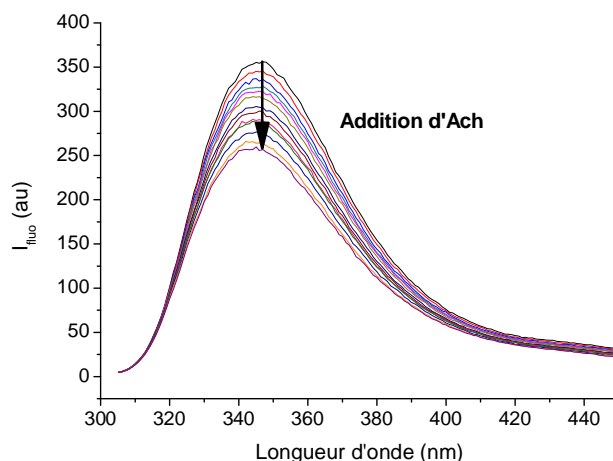


Figure 2-52 : Titrage spectrofluorométrique de l'ACh par le CTV 55 dans le PBS 140 mM, pH 7,4, à 25 °C.

Les ajouts d'Ach (cf. Figure 2-52) et de Ch induisent une extinction progressive de la fluorescence de l'ordre de 30% (cf. Figure 2-53). Cette sonde fonctionne de façon « on-off » contrairement aux précédentes. L'extinction est accompagnée d'un très léger shift hypochrome du maximum d'émission de 4 nm. Le léger shift hypochrome du maximum d'émission (*i.e.* augmentation de l'énergie de l'état excité cf. chap1) nous indique que la complexation de l'Ach (ou de la Ch) défavorise très légèrement le transfert de charge photo-induit. Des interactions π -cations (entre les aromatiques de la sonde et l'ammonium des cibles) pourraient en être à l'origine. Cependant, ce déplacement reste très faible.

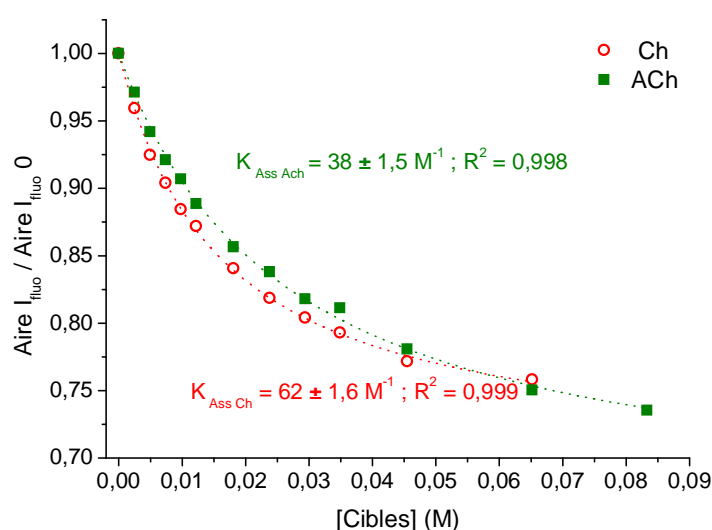


Figure 2-53 : Courbes de titrage en fluorescence, de l'affinité du CTV 57 pour l'ACh et la Ch dans le PBS 100 mM, pH 7,4 à 25°C.

Les constantes d'association obtenues dans l'hypothèse d'un complexe de stœchiométrie 1:1, sont de $38 \pm 1,5 \text{ M}^{-1}$ pour l'ACh et de $62 \pm 1,6 \text{ M}^{-1}$ pour la Ch, d'après le titrage en fluorescence. Ces constantes sont très proches de celles obtenues pour les CTVs phosphorylés **20** et **53**. De plus, dans ce cas aucune sélectivité réelle en faveur de l'une de ces deux cibles n'est observée, contrairement au cas du CTV **53**. Ainsi, nous avons décidé de ne pas aller plus loin pour ce composé qui ne présentait pas de réelle amélioration d'un point de vue des propriétés de reconnaissance ou de la spectroscopie.

3) Conclusion

Le CTV **55** présente des propriétés spectroscopiques proches de celles de ses homologues phosphorylés, les CTV **20** et **53**. Son rendement quantique de fluorescence en milieu aqueux tamponné ($\Phi = 6 \%$) est plus faible mais en revanche ses spectres d'absorption et d'émission surtout sont plus hauts.

En ce qui concerne les propriétés de reconnaissances, celui-ci reconnaît l'ACh et la Ch dans une moindre mesure en condition quasi-physiologiques ($K_{\text{association ACh}} = 38 \pm 1,5 \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{association Ch}} = 62 \pm 1,6 \text{ M}^{-1}$). Là encore ces constantes sont proches de celles obtenues auparavant pour les CTV phosphorylés **20** et **53**. Par contre, le CTV **55** ne présente pas d'affinité plus marquée pour l'un des deux ammoniums d'intérêt biologique testés. Aussi, au vue des propriétés spectroscopiques limitées pour une application *ex vivo* nous avons décidé de ne pas aller plus loin avec cette sonde.

3. Conclusion sur cette seconde stratégie

La seconde stratégie envisagée afin de rendre les CTVs solubles par introduction de charges négatives, consistait en l'utilisation de groupements tels que les acides carboxyliques ou phosphoriques. Les groupements méthoxyles, électro-donneurs, ont été conservés ainsi pour ces CTVs.

Cette stratégie a fonctionné, car deux nouveaux CTVs (**53** et **55**) solubles en milieu aqueux proche du milieu physiologique (pH ~7,5 et une concentration en sels $\geq 100 \text{ mM}$) ont été obtenus. Ceux-ci possèdent des spectres d'absorption et d'émission dans l'ultra-violet, avec de faibles déplacements de Stokes. Comme attendu, le transfert de charge est moins favorable avec ces groupements, portant des charges négatives. Cependant, ils présentent des rendements quantiques de fluorescence corrects et meilleurs que ceux des CTVs développés suivant la première stratégie. Les groupements acides phosphoriques permettent d'avoir un meilleur rendement quantique que les acides carboxyliques mais un plus faible déplacement de Stokes. Cette dernière observation est en accord avec le caractère électro-attracteur plus fort des acides carboxyliques.

Ces deux sondes fluorescentes (**53** et **55**) permettent la détection en milieu quasi-physiologique d'ammoniums quaternaires d'intérêt biologique tels que l'acétylcholine ou la choline. D'après les constantes d'association obtenues par spectrofluorimétrie, l'affinité des sondes pour ces deux ammoniums est semblable pour ces deux types de groupements (comprise entre 20 et 70 M⁻¹). Ces constantes sont plus faibles (environ un ordre de grandeur) que celles obtenus avec la sonde **45** développée selon la première stratégie. Cependant, les conditions de titrages n'étaient pas tout à fait les mêmes, la concentration en sels notamment était plus faible. Il est donc difficile de conclure. Seule l'intensité des spectres d'émission est modifiée lors du titrage, de façon « on-off » pour le CTV **55** et de façon « off-on » dans le cas du CTV **53**, comme pour le CTV **20**. Les variations d'intensité sont probablement liées aux modifications des voies de désexcitation non radiatives.

Des études RMN complémentaires ont été réalisées pour confirmer l'existence d'interactions. De même que pour les sondes précédemment développées au laboratoire, aucun déplacement significatif des protons de la sonde n'a permis de réaliser de titrage. Cependant, là encore, des analyses NOE et DOSY ont permis de mettre en évidence la formation de complexes. De même qu'avec le CTV **45**, les expériences NOE ont révélées que l'ammonium des cibles se rapprochait des aromatiques de la sonde. Les mêmes types d'interactions π -cations et/ou électrostatiques sont probablement mises en jeux quelque, soit la stratégie.

Toutefois, une sélectivité d'un facteur 2,8 a été observée dans le cas du CTV **53**. Celle-ci peut paraître faible, mais elle est comparable à la meilleure décrite dans la littérature pour une sonde non fluorescente fonctionnant dans le DMSO.⁷⁴ Une liaison hydrogène entre l'un des phosphonate de la sonde et l'alcool de la choline en serait responsable.²⁸ Ceci met en avant l'intérêt et l'importance d'avoir des interactions complémentaires, en plus des potentielles interactions π -cations et/ou électrostatiques drainant la complexation, pour d'avoir de meilleures affinités et une bonne sélectivité.

E. Conclusions générales sur les sondes fluorescentes aux structures peu étendues

Dans le prolongement du travail effectué par Marie-Laurence Dumartin, une petite librairie de dérivés de CTV fluorescents solubles en milieu aqueux, grâce à l'introduction de charges négatives, a été développée. Ces molécules ont été désignées pour être le siège d'un transfert de charge photo-induit, par introduction de groupements électro-donneurs et électro-attracteurs conjugués sur le squelette aromatique.

Afin d'introduire les divers groupements électro-attracteurs plusieurs types de réactions, souvent encore non explorées sur la structure CTV, ont été utilisées (Ronsenmund-Van Bran, Michaelis-Arbuzov ou encore une addition nucléophile aromatique en passant par un lithien). Toutes les voies de synthèses élaborées passent par un intermédiaire de synthèse halogéné. Aussi, une voie de synthèse efficace afin d'obtenir cet intermédiaire clé a été recherchée.

Le CTV tri-bromé **5** a tout d'abord été choisi pour des questions de solubilité. Une synthèse permettant d'obtenir **5** était déjà décrite dans la littérature.^{14,17} Lorsque nous avons tenté d'améliorer cette synthèse, en bromant directement l'alcool 3-méthoxybenzylique d'après différentes méthodes décrites, un souci de régiosélectivité est apparu. Pour l'instant aucune solution n'a été trouvée, mais ceci devrait être possible d'après la littérature en passant par un complexe métallique.

Une voie de synthèse efficace et simple, en 3 étapes, permettant de synthétiser à l'échelle du gramme des dérivés de CTV tri-iodés a finalement été mise au point.²⁸ L'obtention de divers dérivés iodés avec des éthers possédant des chaînes alkyles de différentes longueurs, voire substituées par un brome en vue de la synthèse de cryptophanes ou hémicryptophane, est possible par cette méthode. Ce qui la rend très attractive.

Les différents CTVs synthétisés sont fluorescents en milieu organique dans l'ultra-violet ou le visible. Les rendements quantiques de fluorescence sont corrects, sauf dans le cas des CTV fonctionnalisés par des cétones (**40** et **41**). Grâce à la présence de groupements électro-donneurs et électro-attracteurs conjugués, la plupart des CTVs sont le siège d'un transfert de charge photo-induit d'après des études de solvatochromisme et de modélisation. Ainsi, les spectres d'absorption et d'émission ont pu être déplacés de façon bathochrome par rapport à ceux du CTV **34**. Comme attendu, l'effet est plus important sur le spectre d'émission. Un déplacement de Stokes important (de plus de 150 nm) a été observé avec les meilleurs groupements électro-donneurs utilisés (*i.e.* cétones). Néanmoins, pour la majorité des fluorophores développés, les spectres d'absorption et d'émission restent dans l'ultra-violet, une application *in vivo* n'est donc pas envisageable. L'enrichissement du système π , en plus du PCT, afin d'obtenir des spectres décalés vers le visible doit être considéré à présent.

Deux stratégies basées sur l'introduction de charges négatives sur la structure avaient été envisagées afin d'obtenir des molécules solubles en milieu aqueux. L'introduction de groupements nitriles, comme électro-attracteurs conjugués aux phénols, a permis d'abaisser les pK_A de ces derniers. Le CTV **45** ainsi obtenu constitue une sonde pH fluorescente intéressante, fonctionnant autour du pH physiologique (pK_A moyen pour les trois phénols estimé à 7,6). Cette molécule présente un transfert de proton avec le solvant à l'état excité, qui a pour effet de déplacer de façon bathochrome son spectre d'émission dans le visible.

La seconde stratégie consistant à introduire des groupements carboxylates ou phosphonates fonctionne comme l'avait déjà montré M-L Dumartin. Deux nouveaux dérivés de CTV fluorescent en milieu aqueux physiologique ont ainsi été obtenus. Les groupements carboxylates et phosphonates étant de moins bons attracteurs le déplacement bathochrome des spectres est moins important. En revanche, les rendements quantiques de fluorescence de ces espèces sont plus importants (6 et 11%).

En ce qui concerne les propriétés de complexation, toutes les nouvelles sondes fluorescentes reconnaissent les ammoniums quaternaires tels que l'acétylcholine et la choline en milieu aqueux tamponné. Les constantes d'association en milieu quasi-physiologique sont modestes pour les sondes développées (66 M^{-1} pour la Ch, pour la meilleure, en tampon HEPES 100mM, pH 7,5). Les facteurs de variation d'intensité observés pour les sondes développées selon la stratégie 2 sont faibles ($\sim 20\%$). En revanche, celui pour la sonde **47**, utilisant les groupements phénolates est bonne, avec une augmentation de 120%.

L'affinité pour les sondes développées est donc plus faible que celles des sondes déjà décrites dans la littérature. La meilleure sonde fluorescente fonctionnant en milieu quasi-physiologique (tampon phosphate 100 mM, pH 7,4), développée par l'équipe de Nau, à une constante d'association pour l'Ach de 10^5 M^{-1} , et un facteur d'amplification de la fluorescence de 1,6.⁷⁵ Toutefois, il faut souligner que cette sonde fluorescente est indirecte et ne permet pas de réaliser de l'imagerie *in vivo*.

La sélectivité en faveur de la choline, avec un facteur 2,8 par rapport à l'Ach observée avec la sonde **55**, est très intéressante. En effet, celle-ci est comparable à la meilleure décrite dans la littérature pour une sonde non fluorescente, par Rebek *and co.*, en milieu organique avec un facteur 3.⁷⁴ L'existence d'une liaison hydrogène en plus des interactions électrostatiques et/ou π -cations dans le cas de la Ch, en est sûrement à l'origine. Ceci illustre l'intérêt de multiplier les interactions entre la sonde et la cible.

Dans la littérature, la plupart des sondes à ammoniums quaternaires telles que l'Ach et la Ch, sont basées sur des interactions électrostatiques ou π -cations.^{1, 28, 35, 74, 75-81} Dans le cas, où la sonde ne porte pas de charge, il a été montré que des interactions π -cations sont à l'origine de la reconnaissance, y compris dans l'eau.⁷⁸⁻⁸² Cependant, la plupart des sondes fonctionnant en milieu aqueux comporte des charges négatives. Des interactions

électrostatiques sont alors impliquées, y compris en milieu salin.^{1,35,76,77,82} Discriminer ces deux types d'interactions (électrostatiques ou π -cation) n'est pas évident lorsque les deux sont possibles, quelque soit la méthode (fluorescence, calorimétrie, RMN). Récemment, un exemple d'utilisation de la spectroscopie infrarouge, sur un dérivé fonctionnalisé par des acides carboxyliques de triphénylène, a permis de distinguer des interactions électrostatiques impliquant les carboxylates de la sonde, plutôt que des interactions π -cation.⁷¹ La bande correspondant à la liaison C=O des carboxylates a été utilisée pour cela.

Jusqu'à présent les différentes sondes développées, ont été utilisées à des pH permettant d'avoir des charges négatives sur leurs structures. Ainsi, il n'a pas été possible de déterminer les interactions mises en jeu dans les processus de reconnaissance. Les différentes études RMN ont montrées que l'ammonium des cibles se rapprochait des cavités aromatiques des sondes. Cependant, les groupements chargés négativement étant directement substitués sur les aromatiques, il n'est pas possible de savoir si ce sont des interactions électrostatiques ou π -cation qui sont responsables de ce rapprochement.

Des interactions complémentaires, comme des liaisons hydrogènes ou l'effet hydrophobe sont parfois également évoqués dans la littérature. Celles-ci permettent dans certains cas d'induire une certaine sélectivité en faveur d'une des cibles. Par exemple, Rebek *and co.* ont montré l'importance d'une liaison hydrogène pour obtenir une certaine sélectivité pour la choline (facteur 3) dans le DMSO.⁷⁴ Dans le cas de la sonde **53**, une liaison hydrogène semblerait également responsable de la sélectivité d'un facteur similaire (facteur 2,8) observée en faveur de la choline, dans l'eau cette fois.²⁸ Ceci illustre l'importance des interactions complémentaire (*i.e.* de l'effet coopératif) pour obtenir une bonne sélectivité. De meilleures constantes d'association pourraient également être obtenues en multipliant les interactions.

Finalement, le développement de ces premières sondes fluorescentes a montré que les sondes fluorescentes obtenues selon la stratégie de solubilisation 2, semblaient plus adaptées à une application biologique. En effet, celles-ci sont solubles en conditions physiologiques et présentent des rendements quantiques de fluorescence plus intéressants. Ces sondes présentent des spectres dans l'ultra-violet avec de faibles déplacements de Stokes à cause de la présence de ces groupements faiblement électro-attracteurs. Dès lors, l'extension du système π s'impose afin d'avoir des spectres d'absorption et d'émission plus adaptés à l'imagerie. Ceci va faire l'objet du chapitre suivant.

Références bibliographiques

- (1) Dumartin, M.-L.; Givelet, C.; Meyrand, P.; Bibal, B.; Gosse, I. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2725–2728.
- (2) Dumartin, M.-L. Synthèse de sondes fluorescentes pour la détection de l'acétylcholine **2007**.
- (3) Carey, F. A. *Organic Chemistry*; 4th edition.; McGraw-Hill Higher Education, 2000.
- (4) Malthête, J.; Collet, A. *Nouv. J. Chim.* **1985**, *9*, 151–153.
- (5) André, C. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5725–5759.
- (6) Atwood, J. L.; Lehn, J.-M.; Davies, J. E.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; F. Vögtle, Pergamon: Oxford, UK, 1996; Vol. 2.
- (7) Garcia, C.; Collet, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 52–58.
- (8) Collet, A.; Dutasta, J.-P.; Lozach, B.; Canceill, J. *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 103–129.
- (9) Hardie, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 516–527.
- (10) Brotin, T.; Dutasta, J.-P. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 88–130.
- (11) Mc Murry, J. *Organic Chemistry*; 7th ed.; Brooks Cole, 2008.
- (12) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*; 2nd ed.; Oxford University Press, 2012.
- (13) De Meijere, A.; Diederich, F. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*; 2nde ed.; Wiley-VCH, 2004; Vol. 1.
- (14) Canceill, J.; Collet, A. *Nouv. J. Chim.* **1986**, *10*, 17–23.
- (15) Garcia, C.; Collet, A. *Bull. Soc. Chim. France* **1995**, *132*, 52–58.
- (16) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- (17) Cram, D. J.; Tanner, M. E.; Keipert, S. J.; Knobler, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8909–8916.
- (18) Baker, R. W.; Liu, S.; Sargent, M. V.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Aust. J. Chem.* **1997**, *50*, 831–840.
- (19) Mewshaw, R. E.; Edsall, R. J. J. Dibenzo chromene derivatives and their used as ERbeta selective ligands **2005**.
- (20) Esumi, T.; Wada, M.; Mizushima, E.; Sato, N.; Kodama, M.; Asakawa, Y. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6941–6945.
- (21) Fukuyama, Y.; Yaso, H.; Nakamura, K.; Kodama, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 105–108.
- (22) Lee, C. K.; Koo, B. S.; Lee, Y. S.; Cho, H. K.; Lee, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1667–1670.
- (23) Speicher, A.; Backes, T.; Grosse, S. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11692–11696.
- (24) Adimurthy, S.; Patoliya, P. U. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 1571–1577.
- (25) Uemura, M.; Nishikawa, N.; Take, K.; Ohnishi, M.; Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Hayashi, Y. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2349–2356.
- (26) Semmelhack, Ma. F.; Chlenov, A. *Topics Organomet. Chem.* **2004**, *7*, 21–42.
- (27) Berger, A.; Djukic, J.-P.; Michon, C. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *225*, 215–238.
- (28) Peyrard, L.; Chierici, S.; Pinet, S.; Batat, P.; Jonusauskas, G.; Pinaud, N.; Meyrand, P.; Gosse, I. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8489–8494.
- (29) Speicher, A.; Backes, T.; Hesidens, K.; Kolz, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2009**, *5*.

- (30) Traoré, T.; Delacour, L.; Garcia-Argote, S.; Berthault, P.; Cintrat, J.-C.; Rousseau, B. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 960–962.
- (31) Brotin, T.; Roy, V.; Dutasta, J.-P. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6187–6195.
- (32) Canceill, J.; Gabard, J.; Collet, A. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1983**, 122–123.
- (33) Canceill, J.; Collet, A.; Gottarelli, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5997–6003.
- (34) Gosse, I.; Dutasta, J. P.; Perrin, M.; Thozet, A. *New J. Chem.* **1999**, *23*, 545–548.
- (35) Tan, S.-D.; Chen, W.-H.; Satake, A.; Wang, B.; Xu, Z.-L.; Kobuke, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2719–2721.
- (36) Hassner A.; Stumer C. *Organic Syntheses Based on Name Reactions*; 2nd ed.; Elsevier science, 2002.
- (37) Peyrard, L.; Dumartin, M.-L.; Chierici, S.; Pinet, S.; Jonusauskas, G.; Meyrand, P.; Gosse, I. *J. Org. Chem.* **2012**.
- (38) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; 4th ed.; John Wiley & Sons, 2007.
- (39) Demmer, C. S.; Krosggaard-Larsen, N.; Bunch, L. *Chem. Rev.* **2011**.
- (40) Beletskaya, I. P.; Kazankova, M. A. *Russ. J. Organ. Chem.* **2002**, *38*, 1391–1430.
- (41) Gelman, D.; Jiang, L.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2315–2318.
- (42) Thielges, S.; Bissere, P.; Eustache, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 681–684.
- (43) Huang, C.; Tang, X.; Fu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8328–8328.
- (44) Bhattacharya, A.; Thyagarajan, G. *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 415–430.
- (45) Neidlein, R.; Buseck, S. *Mon. Chem.* **1993**, *124*, 309–317.
- (46) Clark, T. E.; Makha, M.; Sobolev, A. N.; Rohrs, H.; Atwood, J. L.; Raston, C. L. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3931–3938.
- (47) Koizumi, T.; Yanada, R.; Takagi, H.; Hirai, H.; Yoshii, E. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 477–480.
- (48) Kalek, M.; Stawinski, J. *Organometallics* **2007**, *26*, 5840–5847.
- (49) Xu, D.; Warmuth, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7520–7521.
- (50) Farinotti, R.; Siard, P.; Bourson, J.; Kirkiacharian, S.; Valeur, B.; Mahuzier, G. *J. Chromatogr.* **1983**, *269*, 81–90.
- (51) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; 5th ed.; John Wiley & Sons, 2001.
- (52) Wardle Brian *Principles and Applications of Photochemistry*; 1st ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (53) Carsey, T. P.; Findley, G. L.; McGlynn, S. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4502–4510.
- (54) Murrell, J. N. *Tetrahedron* **1963**, *19*, Supplement 2, 277–287.
- (55) Weller, A. Z. *Prog. React. Kinet.* **1961**, *1*, 187–214.
- (56) Nishiya, T.; Yamauchi, S.; Hirota, N.; Fujiwara, Y.; Itoh, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3880–3884.
- (57) Herek, J. L.; Pedersen, S.; Banares, L.; Zewail, A. H. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 9046–9061.
- (58) Catalán, J.; Palomar, J.; De Paz, J. L. G. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 7914–7921.
- (59) Formosinho, S. J.; Arnaut, L. G. *J. Photoch. Photobio. A* **1993**, *75*, 21–48.
- (60) Lüdemann, H.-C.; Hillenkamp, F.; Redmond, R. W. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 3884–3893.
- (61) Kwon, J. E.; Park, S. Y. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3615–3642.
- (62) McDonnell, C. V.; Michailidis, M. S.; Martin, R. B. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 26–35.
- (63) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; 5th ed.; John Wiley & Sons, 2001.

- (64) Kaneko, S.; Yotoriyama, S.; Koda, H.; Tobita, S. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3021–3028.
- (65) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, 1999.
- (66) Schulman, S. G.; Vincent, W. R.; Underberg, W. J. M. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 4068–4071.
- (67) Förster, T. *Z. Elektrochem.* **1950**, *54*, 531–553.
- (68) Grabner, G.; Koehler, G.; Zechner, J.; Getoff, N. *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 3000–3004.
- (69) Pál, K.; Kállay, M.; Köhler, G.; Zhang, H.; Bitter, I.; Kubinyi, M.; Vidóczy, T.; Grabner, G. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 2627–2635.
- (70) Terrier, F.; Moutiers, G.; Xiao, L.; Le Guevel, E.; Guir, F. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1748–1754.
- (71) Fini, A.; De Maria, P.; Guarnieri, A.; Varoli, L. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 48–52.
- (72) Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*; Elsevier, 2008.
- (73) Desiraju, G. R.; Steiner, T. *The weak Hydrogen bond: In structural chemistry and biology*; Oxford University Press, 2001.
- (74) Ballester, P.; Shivanyuk, A.; Far, A. R.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14014–14016.
- (75) Bakirci, H.; Nau, W. M. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 237–242.
- (76) Givélet, C.; Buffeteau, T.; Arnaud-Neu, F.; Hubscher-Bruder, V.; Bibal, B. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5059–5062.
- (77) Korbakov, N.; Timmerman, P.; Lidich, N.; Urbach, B.; Sa'ar, A.; Yitzchaik, S. *Langmuir* **2008**, *24*, 2580–2587.
- (78) Murayama, K.; Aoki, K. *Chem. Commun.* **1997**, 119–120.
- (79) Bartoli, S.; Roelens, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11908–11909.
- (80) Wyman, I. W.; Macartney, D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 253–260.
- (81) Ngola, S. M.; Dougherty, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4566–4567.
- (82) Arena, G.; Casnati, A.; Contino, A.; Lombardo, G. G.; Sciotto, D.; Ungaro, R. *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 738–744.

Chapitre 3 Sondes fluorescentes obtenues par couplage de Sonogashira

Le développement d'une seconde génération de sondes a été envisagé afin d'améliorer les propriétés spectroscopiques mais également de reconnaissance. Ceci pour obtenir des sondes fluorescentes utilisables *ex/in vivo*.

Plus la conjugaison est importante au sein d'une molécule, plus l'énergie de la transition entre la HOMO et la LUMO sera petite, et donc plus ses longueur d'onde d'absorption seront décalées vers le rouge.^{1,2} *A fortiori*, son spectre d'émission également, sera décalé vers les faibles énergies. D'après les règles empiriques de Woodward, Fieser et Kuhn, permettant de prévoir la position des bandes d'absorption π - π^* pour des diènes, il faut plus de huit doubles liaisons conjuguées pour absorber dans le visible (> 400 nm).^{1,2}

Aussi, une extension de la conjugaison des trois unités aromatiques composant la structure des CTV a été envisagée. Pour maintenir une structure de bol rigide, nous avons choisi d'augmenter la conjugaison par des dérivés d'éthynylbenzène (cf. Figure 3-1). En effet, les travaux antérieurs visant à augmenter la conjugaison en formant des systèmes polycycliques impliquant les aromatiques du squelette CTV, n'ont pas abouti.³ La conjugaison *via* un lien alcyne, induisant moins de contrainte stérique, nous a paru plus réalisable. La cavité ainsi formée sera plus profonde, tout en restant très accessible.

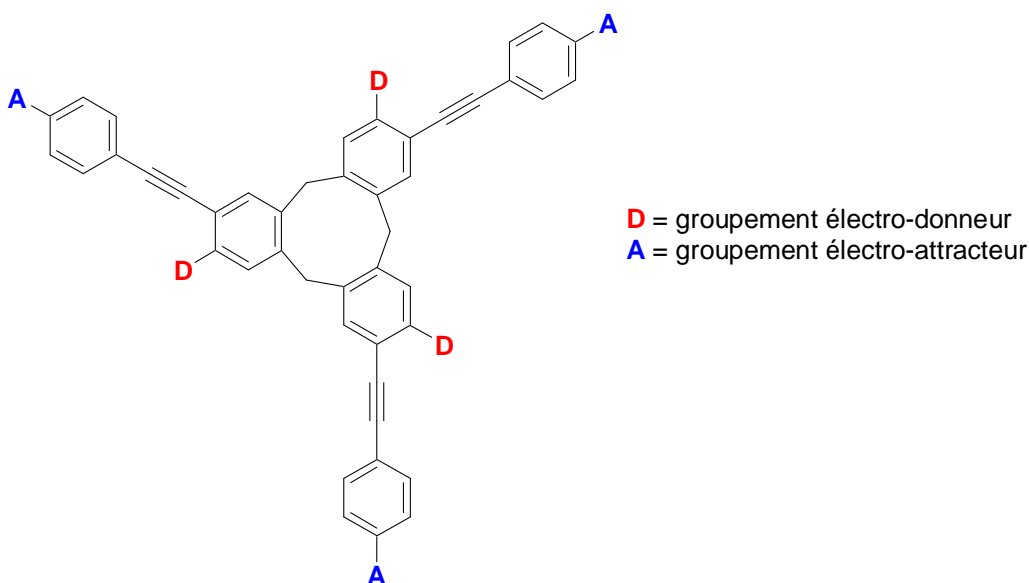


Figure 3-1 : Structures envisagées pour les dérivés de CTVs de la seconde génération.

Afin de maintenir des déplacements de Stokes importants, des couples de groupements électro-donneurs/électro-attracteurs ont été également introduits sur les unités aromatiques. La présence d'un groupement électro-donneur étant nécessaire à la formation du trimère, comme déjà souligné auparavant, ceux-ci seront placés sur les aromatiques du squelette (cf. Figure 3-1). En revanche, les groupements électro-attracteurs seront placés à l'extrémité des bras, sur les aromatiques introduits *via* les liens alcynes (cf. Figure 3-1). Ceci permet d'avoir un maximum de conjugaison entre les groupements.

Les dérivés de CTVs ainsi formés posséderont donc trois unités de type « push-pull » non conjuguées entre elles. Les structures « push-pull » sont connues dans la littérature

pour être propices à l'absorption multi-photonique,⁴⁻⁹ qui peut s'avérer intéressante dans le cas d'applications *in vivo* comme souligné dans le premier chapitre.

Concernant les propriétés de complexation, il a déjà été montré dans la littérature que l'hydrophobie pouvait jouer un rôle important dans la reconnaissance d'ammoniums quaternaires, tels que l'Ach. Ainsi, l'allongement des pans aromatiques, augmentant la profondeur de la cavité hydrophobe, pourrait également être intéressant pour la reconnaissance.

Les stratégies envisagées, afin d'avoir des molécules solubles en milieu aqueux, sont les mêmes que celles utilisées pour les premières sondes développées (cf. chapitre 2). Les rendements quantiques des sondes fluorescentes **53** et **55**, obtenues par l'introduction des groupements acides carboxyliques ou acides phosphoriques étant plus élevés, nous avons choisis de nous concentrer sur ces groupements électro-attracteurs.

En ce qui concerne la voie de synthèse, le couplage de Sonogashira a été envisagé pour introduire les dérivés d'éthylnylbenzène (substitué en *para* par des groupements électro-attracteurs). En effet, cette réaction est envisageable quel que soit le substituant de l'alcyne. Elle peut être conduite à partir de dérivés de CTV tri-iodés **6** et **37**, dont la synthèse a déjà été présentée. Ce type de couplage organométallique n'ayant jamais été testé auparavant sur la structure CTV, il a fallu vérifier sa faisabilité dans un premier temps avec un alcyne peu encombré.

Dans ce chapitre, les synthèses des divers dérivés de CTVs obtenus par couplage de Sonogashira seront présentées. Ensuite, comme dans le premier chapitre les propriétés spectroscopiques seront développées, en optique linéaire et non linéaire (excitation à deux photons). L'étude en milieu organique, avec des fluorophores possédant des éthers comme électro-donneurs, permettra de comparer les groupements électro-attracteurs et d'observer l'importance de la conjugaison (par comparaison avec les premières sondes développées). Enfin, les propriétés de reconnaissance des CTVs solubles en milieu aqueux seront présentées.

A. Synthèse de CTVs plus conjugués par couplage de Sonogashira

a. Couplage de Sonogashira à partir de CTVs iodés

La réaction de Sonogashira est un couplage organométallique entre un alcène terminal et un composé halogéné ou un triflate. Cette réaction est possible grâce à une double catalyse au palladium et au cuivre, en présence d'une base (cf. Figure 3-2).^{10,11} Depuis son développement par Sonogashira et Hagihara en 1975,¹² de nombreuses variantes, tant au niveau de la source de palladium, que de la base ou du solvant, ont été développées. La réaction de Sonogashira s'adapte à de nombreux substrats et a lieu dans des conditions plus douces (de température notamment) que d'autres couplages comme celui de Heck dont elle a été inspirée. De plus, l'alcyne terminal est plus facile à obtenir que son homologue alcène. Tout ceci fait de la réaction de Sonogashira une réaction très largement utilisée dans de multiples disciplines, dont le développement de fluorophores au système π étendu, excitables à deux photons.^{13,14,15}



Figure 3-2 : Schéma de synthèse général pour la réaction de couplage organométallique de Sonogashira.

Le mécanisme de cette réaction (cf. Figure 3-3) est globalement accepté même s'il existe encore des débats et des recherches sur la structure du complexe de palladium impliqué.^{10,1,12} Le composé comportant l'alcyne terminal est déprotoné à l'aide d'une base, pour former un composé à base de cuivre. En parallèle, une addition oxydante du composé halogéné en présence de palladium (0) conduit à la formation d'un complexe de palladium (II). Le complexe de cuivre subit une transmétallation et remplace l'halogène dans ce complexe de palladium (II). Le cuivre(I) est ainsi régénéré, le plus souvent sous forme d'iodure de cuivre, car l'halogène le plus couramment utilisé est l'iode. Ensuite, une élimination réductrice a lieu au niveau du nouveau complexe de palladium (II), entre les deux ligands organiques insérés, conduisant au composé désiré et régénérant le palladium (0). Le cycle catalytique est ainsi bouclé et le composé souhaité est formé.

Le palladium (0), est soit introduit directement (sous forme de tétrakis(triphénylphosphine) palladium(0), Pd(P(Ph)₃)₄ par exemple), soit obtenu suite à une réaction d'homocouplage entre deux alcynes terminaux, suite à une transmétallation (cf.

Figure 3-3).¹⁰ L'utilisation de palladium (0) est donc préférable si l'on veut éviter l'homocouplage de l'alcyne.

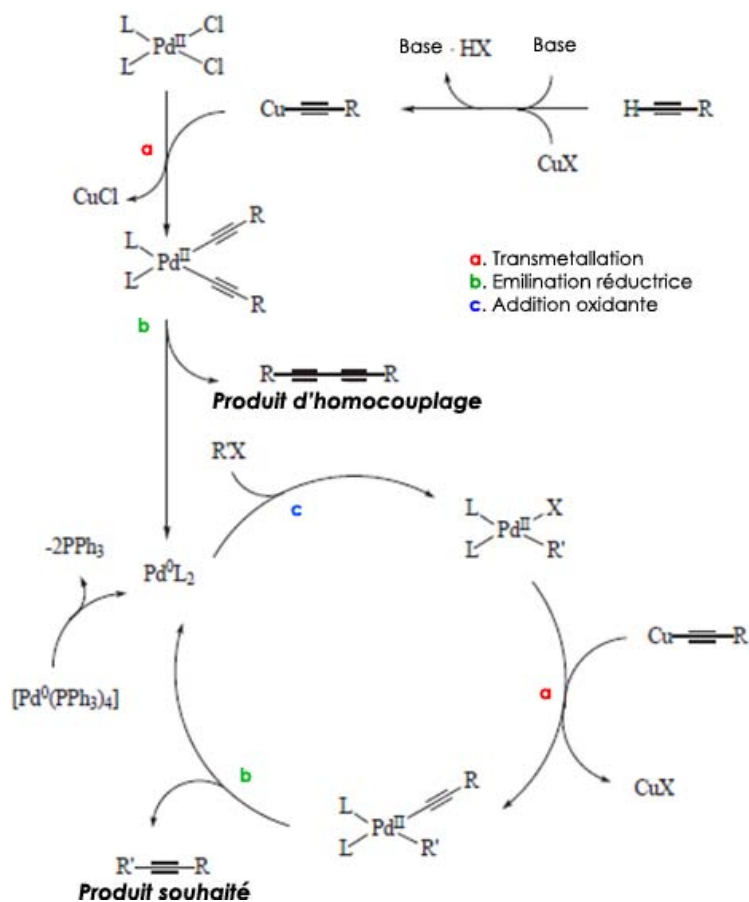


Figure 3-3 : Mécanisme du couplage de Sonogashira¹⁰

Ainsi, des réactions de Sonogashira à partir du dérivé de CTV tri-iodé, pour introduire différents benzènes substitués (par des nitriles, acides carboxyliques, acides phosphoriques, amines etc.), ont été envisagées. Un groupement électro-donneur a également été testé dans ce cas, afin d'observer les propriétés spectroscopiques d'un CTV composé d'unités type « push-pull » avec deux groupements électro-donneurs et non un couple électro-donneur/électro-attracteur.

Tout d'abord, la faisabilité de cette réaction sur la structure CTV a été évaluée avec deux alcynes commerciaux simples, le triméthylsilylacétylène ($R = \text{SiMe}_3$; Figure 3-4), et l'éthynylbenzène ($R = \text{Ph}$; Figure 3-4). Des conditions classiques ont été utilisées, avec comme catalyseurs l'iodure de cuivre (CuI) et du palladium (0) sous forme de tétrakis(triphénylphosphine) palladium(0) ($\text{Pd}(\text{P}(\text{Ph})_3)_4$), et de la triéthylamine comme base (cf. Figure 3-4).¹⁰

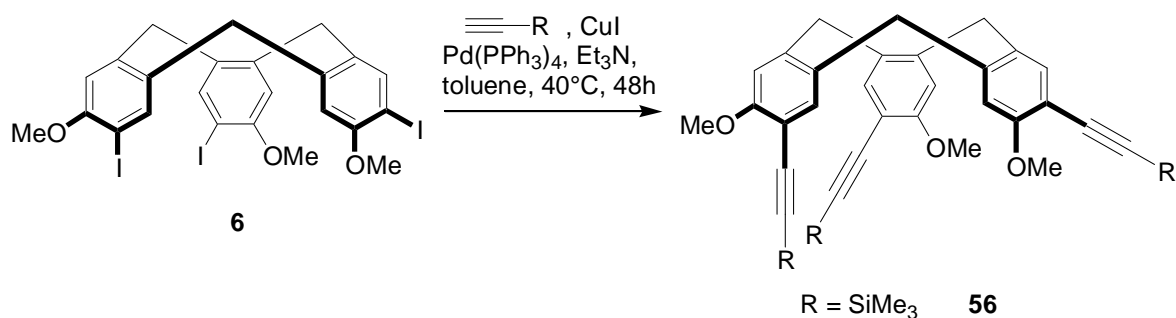


Figure 3-4 : Premier couplage de Sonogashira effectués en utilisant Pd(P(Ph)₃)₄.

Le premier essai avec le triméthylsilylacétylène pour former **56** a permis de montrer la faisabilité de ce type de couplage sur la structure CTV (d'après la RMN du brut) mais a également soulevé des difficultés de purification. En effet, le produit formé est retenu par la célite, or une filtration sur célite est couramment utilisée pour éliminer les restes de palladium. Une purification sur gel de silice, directement sur le brut, a donc été utilisée.

Malgré de nombreuses tentatives, il a été impossible d'éliminer totalement le palladium par purification sur gel de silice. Aussi, il a été envisagé de changer de forme de palladium et d'utiliser le dichlorure de bis(triphénylphosphine)palladium(II) (PdCl₂(Ph₃)₂). Celui-ci étant déjà sous forme oxydée (II), moins de produits dérivés se sont formés, et des conditions de purification sur colonne de silice ont pu être trouvées, afin d'isoler le produit **56** avec un rendement final de 77 %. Ces mêmes conditions (avec du PdCl₂(Ph₃)₂) ont été gardées pour réaliser les couplages suivants. L'étape suivante étant l'introduction d'un alcyne plus encombré l'éthynylbenzène, pour obtenir **57** (R = Ph sur Figure 3-5).

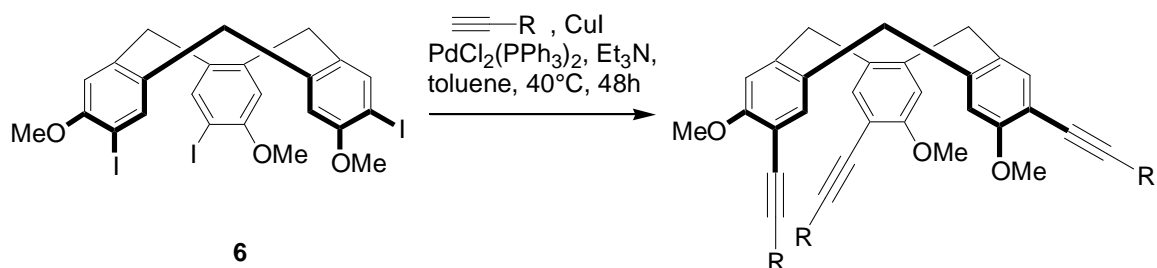


Figure 3-5 : Schéma général de la réaction de Sonogashira conduite en utilisant du PdCl₂(Ph₃)₂.

La réaction de couplage, puis la purification du produit **57**, ont été menées avec succès avec un rendement final de 64 %. La purification de **57** sur silice est plus complexe que pour **56**, car l'éthynylbenzène n'est pas éliminable par évaporation avant la colonne (son point d'ébullition étant un peu haut, 142°C). De plus, des produits d'homocouplage se sont formés (cf. Figure 3-3).

Dans les mêmes conditions de réaction, divers dérivés d'éthynylbenzène (substitués par des esters carboxyliques, de phosphore, ou des amines) ont été introduits sur la structure CTV. Les rendements des différentes réactions sont résumés dans le Tableau 3-1. La plupart du temps, nous avons eu recours à une purification sur colonne de silice, suivie par une digestion ou une recristallisation afin de purifier les produits formés. En particulier,

la difficulté de la purification explique le rendement moyen obtenu dans le cas du CTV **59**. Tous les autres rendements sont bons, voire très bons.

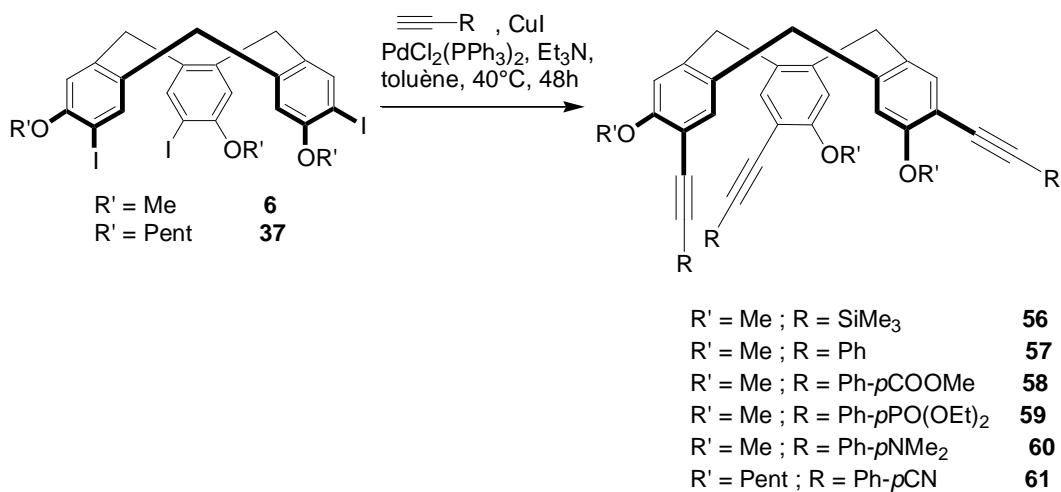


Figure 3-6 : Schéma de synthèse des réactions de couplage de Sonogashira réalisées.

R	Réactif iodé	Produit	Rendement (%)
TMS	CTV 6	CTV 56	77
Ph	CTV 6	CTV 57	64
<i>p</i> -Ph-COOMe	CTV 6	CTV 58	77
<i>p</i> -Ph-PO(OEt) ₂	CTV 6	CTV 59	45
<i>p</i> -Ph-NMe ₂	CTV 6	CTV 60	87
<i>p</i> -Ph-CN	CTV 37	CTV 61	74

Tableau 3-1 : Tableau récapitulatif des rendements obtenus pour les réactions de couplage de Sonogashira testées.

Dans le cas du dérivé nitrile, des problèmes de solubilité du produit formé à partir du CTV **6** ont été rencontrés. En effet, une poudre blanchâtre a été récupérée par lavages successifs dans divers solvants (afin d'éliminer tous les dérivés de palladiums et les restes de réactifs) mais celle-ci s'est révélée insoluble dans les solvants organiques classiques (DMSO y compris). Une caractérisation par RMN n'a pas pu être faite.

Afin de remédier à ce problème et d'obtenir un dérivé de CTV modifié par l'éthynylbenzonnitrile, il a été envisagé de remplacer les méthyles des éthers, par des chaînes pentyles, plus hydrophobes. Pour cela, le CTV **37** a été utilisé à la place du CTV **6**, dans les mêmes conditions de réaction. Le produit ainsi formé devient soluble dans le DCM et a pu être purifié de façon classique par chromatographie, suivi d'une digestion. Il a également été

possible d'obtenir des monocristaux du composé ainsi formé, permettant d'envisager une détermination de la structure par diffraction des rayons-X. Une ébauche de structure a été obtenue et montre une forme de bol comme attendue. Malheureusement, la qualité des cristaux n'étant pas suffisante pour déterminer la structure de façon précise, des essais de cristallisation par diffusion liquide-gaz sont en cours pour essayer d'obtenir des cristaux d'une meilleure qualité.

Finalement, après plusieurs ajustements et avec encore des purifications délicates, divers CTVs de type « push-pull » ont été obtenus. Certains peuvent être rendus solubles dans l'eau facilement en une étape, en suivant les stratégies développées pour la première génération de CTV, comme nous allons le voir à présent.

b. CTVs étendus, solubles en milieu aqueux

Les mêmes stratégies que précédemment ont été utilisées pour rendre certains dérivés de CTV de cette génération solubles dans l'eau. La première consiste à déprotéger les groupements éthers pour obtenir les phénolates à un pH adapté, dans le cas où les groupements électro-attracteurs sont forts, comme le nitrile. A l'inverse, dans la seconde stratégie, ce sont les groupements esters (carboxyliques ou de phosphore), électro-attracteurs, qui sont déprotégés afin de donner les acides correspondants, chargés négativement à pH physiologique. Les groupements méthoxyles, électro-donneurs, étant conservés dans ce cas.

1. Déprotection des éthers dans le cas du CTV **61**.

Les fonctions éthers du CTV **61** ont été déprotégées à l'aide du tribromure de bore pour donner les phénols correspondants, comme dans le cas de **44**. La réaction a lieu avec un très bon rendement de 84 %. Cette réaction n'ayant été faite qu'une fois, le rendement pourrait être encore optimisé.

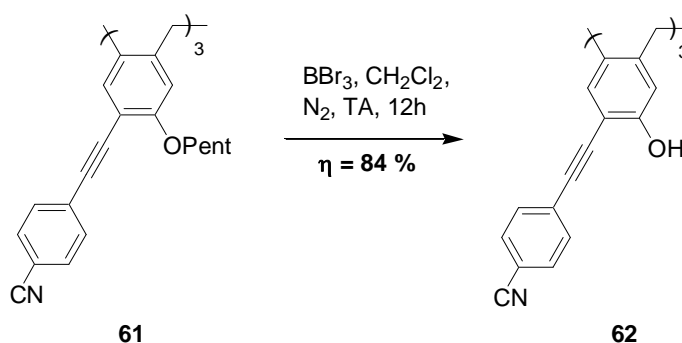


Figure 3-7 : Déprotection des groupements éthers pour obtenir le CTV **62**.

Ainsi, le CTV **62** a été synthétisé en deux étapes à partir du CTV **37** avec un bon rendement global de 62 %.

2. Saponification du CTV 58

La même méthode de saponification que pour le CTV **54**, avec de la soude dans un mélange THF/Eau à chaud, a été utilisée dans ce cas (cf. Figure 3-8). Le CTV **63** a ainsi été obtenu avec un rendement de 88%.

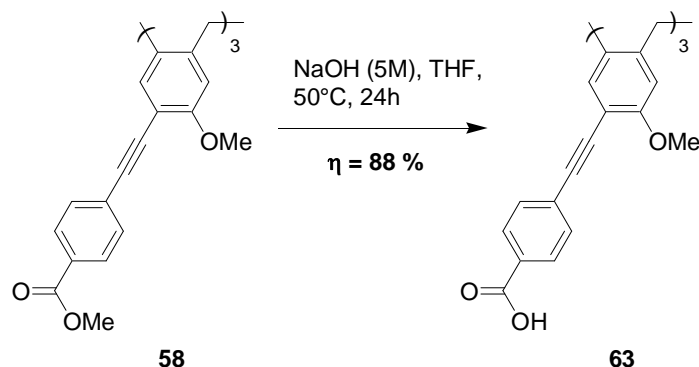


Figure 3-8 : Saponification du CTV 58.

Ainsi, en deux étapes, avec un très bon rendement global de 68%, un dérivé de CTV tri-acide carboxylique plus conjugué, a été obtenu.

3. Déprotection des esters de phosphore du CTV 59

Afin d'obtenir le CTV substitué par des acides phosphoriques, le même protocole que celui décrit pour obtenir **53** a été utilisé, avec du bromotriméthylsilane dans le méthanol. Cependant, dans ce cas, une déméthylation partielle des éthers a été observée, en même temps que la déprotection des esters de phosphore. En effet, d'après les RMN du proton et du phosphore, une partie des éthers méthyliques sont déprotégés alors que tous les groupements éthoxyles portés par les esters de phosphore n'ont pas été déprotégés. L'utilisation de l'iodotriméthylsilane pour déprotéger les éthers méthyliques portés par un aromatique, est connue dans la littérature.¹⁶ La déprotection des méthoxyles dans le cas du CTV **53** n'avait probablement pas lieu pour des questions de gêne stérique. La distance entre les éthers méthyliques et les esters de phosphore étant beaucoup plus grande dans le cas présent. La déprotection de l'éther devient compétitive avec celle du second éthoxyle porté par les phosphores.

Afin de garder les groupements électro-donneurs intacts (méthoxyles), une hydrolyse en milieu basique a été envisagée (cf. Figure 3-9). Cette méthode n'a permis d'hydrolyser qu'un seul des deux groupements éthoxyles portés par chaque phosphore. Ceci est probablement lié à la répulsion de charge, entre les ions hydroxyles et l'espèce en cours de formation. Finalement, le CTV **64** été synthétisé avec un excellent rendement de 99%.

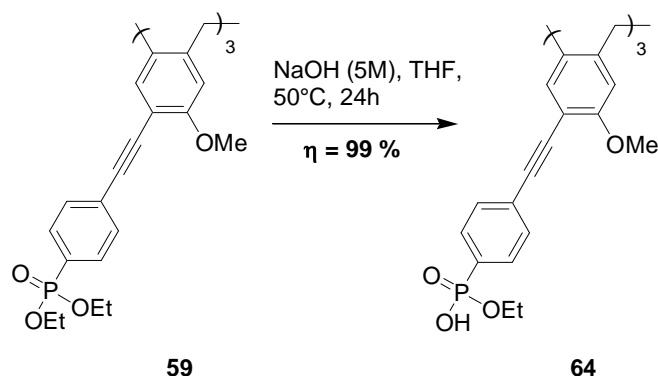


Figure 3-9 : Saponification du CTV 59.

Ainsi, le CTV **64** tri-phosphorylé, avec une structure π -plus riche, a été obtenu en deux étapes avec un rendement global de 45 %.

c. Conclusion

Divers dérivés de CTV aux structures π plus riches ont été synthétisés grâce à la réaction de couplage de Sonogashira. De plus, une grande variété de groupements a pu être introduite par cette méthode en suivant une procédure de synthèse optimisée. Seules les conditions de purification sont à adapter dans chaque cas. Le recours à un couplage organométallique pour augmenter la conjugaison, *via* un lien alcyne, s'est donc révélé efficace.

Dans trois cas, une étape supplémentaire de synthèse, a permis de conduire à des composés solubles en milieu aqueux à un pH adapté. La méthode de déprotection des esters phosphoriques a du être modifiée, afin de garder intacts les groupements éthers. Cependant, celle-ci ne conduit qu'à la déprotection d'un seul groupement éthoxyle, porté par chaque phosphore, pour former le CTV **64**.

Finalement, une seconde librairie de CTVs portant divers couples de groupements électro-donneur/électro-attracteur plus conjugués, a été obtenue. Dans la partie suivante, les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance de cette nouvelle génération vont être présentées, d'abord en milieu organique, puis pour certains en milieu aqueux.

B. Propriétés spectroscopiques des CTVs obtenus par couplage de Sonogashira, en milieu organique.

a. Propriétés spectroscopiques en optique linéaire

1. Propriétés spectroscopiques, en milieu organique

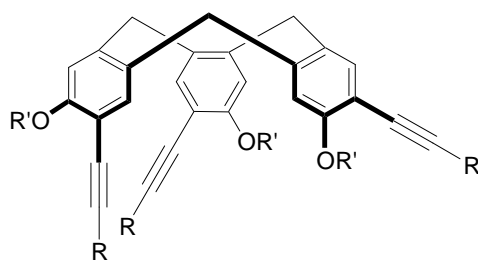
Tous les nouveaux fluorophores synthétisés par couplage de Sonogashira, portant des groupements éthers, ont été caractérisés dans un même solvant pour pouvoir les comparer (cf. Tableau 3-2). Le DMSO a été choisi comme pour l'étude des premiers CTVs fluorescents. Ceci pour des questions de solubilité mais surtout pour favoriser le transfert de charge photo-induit (PCT) et ainsi obtenir des déplacements de Stokes élevés. Le même solvant ayant été utilisé pour caractériser les premiers fluorophores développés, nous avons pu évaluer l'impact de la conjugaison sur les propriétés spectroscopiques.

Cependant, les coefficients d'absorption molaire des CTV **60** et **61** ont été déterminés dans le chloroforme pour des questions de solubilité.

En ce qui concerne le CTV **64**, un déplacement hypsochrome du spectre d'émission a été observé avec la diminution de la concentration, jusqu'à $5 \cdot 10^{-7}$ M dans le DMSO. Ceci est probablement lié à la formation d'assemblages de taille variable, dépendant de la concentration. En utilisant une solution contenant 0,5 % d'HEPES 100 mM, pH 7,5 dans le DMSO, aucun déplacement du spectre d'émission en fonction de la concentration n'est observé en dessous de $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Tout d'abord, comme pour la première génération, les longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption sont assez proches. L'augmentation du système π tend à diminuer la différence d'énergie entre la HOMO et la LUMO.¹ Un déplacement bathochrome de 20 nm est typiquement observé par rapport aux premiers CTVs développés, pour un même couple électro-donneur/électro-attracteur. L'effet est inférieur à celui prédit dans le cas des diènes par les règles de Woodward, Fieser et Kuhn (+ 30 nm pour une double liaison conjuguée supplémentaire).²

Au niveau des coefficients d'absorption molaire, ils sont relativement proches pour les différents fluorophores présentés, et du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour la première génération de CTVs moins-conjugués.



	R /R'	$\lambda_{\text{abs max}}^a$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ (nm)	Φ_F^b (%)	τ (ns)
CTV 57	Ph/Me	320	4,9	355	35	63	1,5
CTV 60	Ph- <i>p</i> NMe ₂ /Me	340	6,8 ^c	416	76	44	2,8
CTV 61	Ph- <i>p</i> CN/Pent	345	6,0 ^c	430	95	78	2,5
CTV 63	Ph- <i>p</i> COOH/Me	338	5,5	422	91	35	3,1
CTV 64	Ph- <i>p</i> POOH ₂ Et/Me	330	5,5	376 ^d	46 ^d	71 ^d	1,9 (46%) 0,8 (54%) ^d

^a Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maximum d'absorption est donnée ici

^b Rendements quantiques déterminés par rapport au bisulfate de quinine possédant un $\Phi_F = 0,55$ dans H_2SO_4 0,5M.¹⁷

^c Déterminé dans le chloroforme

^d Avec 0,5% d'HEPES (les phosphates sont donc chargés négativement)

Tableau 3-2 : Propriétés spectroscopiques des dérivés de CTVs obtenus par couplage de Sonogashira, dans le DMSO ou chloroforme, à 25 °C.

Les longueurs d'onde correspondant au maximum d'émission pour ces nouveaux fluorophores sont disparates. Comme attendu, plus le groupement attracteur est fort (le nitrile, l'acide carboxylique, le phosphonate, l'hydrogène), plus la longueur d'onde correspondant au maximum d'émission est élevée. Les déplacements de Stokes observés pour ces nouveaux fluorophores sont également plus importants. Ceux observés avec les attracteurs forts (nitrile et acide) approchent les 100 nm.

L'introduction de bons groupements électro-donneurs (amine) et non pas électro-attracteurs, permet également d'avoir un grand déplacement de Stokes (de 76 nm), comme déjà observé dans la littérature.^{13,14,18} Cependant, l'effet semble légèrement moins efficace par rapport à celui induit par un groupement électro-attracteur.

Afin de mettre en évidence le PCT et de voir son importance, en fonction des groupements introduits, nous avons enregistré les spectres d'absorption et d'émission de ces fluorophores dans différents solvants (cyclohexane, chloroforme, THF, DMSO) (cf. Tableau 3-3). Pour les CTV 63 et 64 les solvants moins polaires (cyclohexane, chloroforme) n'ont pu être testés pour cause d'insolubilité.

	CTV 60		CTV 61		CTV 63		CTV 64	
	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)
Cyclohexane	329	373	338	376	/	/	/	/
Chloroforme	329	380	339	383	/	/	/	/
THF	340	388	340	396	334	390	331	378
DMSO	340	416	345	430	338	422	330	376

Tableau 3-3 : Longueur d'onde correspondant au maxima d'absorption et d'émission pour différents CTVs obtenus par couplage de Sonogashira.

Comme attendu la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption ne varie quasiment pas, en fonction du solvant. En revanche, celle correspondant au maximum d'émission est déplacée de façon bathochrome, lorsque la polarité du solvant augmente, sauf pour le CTV **64**. Les déplacements de Stokes augmentent donc avec la polarité du solvant. Ceci met en évidence l'existence d'un transfert de charge photo-induit, au sein des différents fluorophore, sauf pour **64**. Le caractère très faiblement électro-attracteur du groupement phosphonate en est la raison. Les déplacements des Stokes des CTVS présentés ici, sont plus importants que ceux obtenus pour les premiers fluorophores développés (environ deux fois plus grand pour un même couple donneur/attracteur). L'extension de conjugaison entre les groupements électro-donneurs et les groupements électro-attracteurs, permet d'avoir une plus grande modification du moment dipolaire entre l'état fondamental et l'état excité. L'effet du PCT est donc plus important.

Le déplacement du spectre d'émission, grâce au PCT, est plus important (y compris pour de mauvais groupements électro-attracteurs) que le déplacement du spectre d'absorption lié à l'extension de conjugaison. Ceci met en avant l'intérêt d'avoir des fluorophores qui sont le siège d'un PCT, pour développer des sondes fluorescentes en milieu biologique (très polaire). Toutefois, un enrichissement du système π est tout de même nécessaire pour déplacer suffisamment les longueurs d'onde d'absorption, pour envisager une application *in vivo* avec des dérivés de CTVs.

Cette nouvelle génération fluorophores plus conjugués, présente de bons, voire d'excellents rendements quantiques de fluorescence dans le DMSO.

Enfin, on observe des temps de vie relativement courts, de l'ordre de quelques nanosecondes, proches de ceux obtenus au préalable pour les premiers fluorophores développés. Dans le cas du CTV **64**, deux temps de vie ont été observés, mettant en évidence l'existence de deux populations, en proportions relativement proches. Il se pourrait que

l'une des populations correspond à des particules ou agrégats. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour identifier les deux formes émissives.

L'enrichissement du système π semble donc profitable pour trois raisons, l'augmentation du rendement quantique de fluorescence, le déplacement bathochrome du spectre d'absorption, et celui du spectre d'émission grâce à un PCT plus important.

2. En milieu aqueux salin, tamponné à pH physiologique

1) Caractérisation du CTV **63** dans le PBS

Afin d'être dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le premier dérivé de CTV tri-acide **55**, les propriétés d'absorption et d'émission du CTV **63** ont été déterminées dans le tampon PBS (pH 7,4, concentration globale en sels de 140 mM) (cf. Tableau 3-4). Ceci permet également d'être dans des conditions physiologiques.

	$\lambda_{\text{abs max}}^a$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ (nm)	Φ_F^b (%)	τ (ns)
CTV 63	327	4,9	429	112	21	2,5 (62%) 9,0 (38%)

^a Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maximum d'absorption est donnée ici

^b Rendements quantiques déterminés par rapport au bisulfate de quinine possédant un $\Phi_F = 0,55$ dans H_2SO_4 0,5M.¹⁷

Tableau 3-4 : Propriétés spectroscopiques du CTV **63, dans le tampon PBS, à 25 °C.**

Ce fluorophore possède un grand déplacement de Stokes en milieu aqueux tamponné. Celui-ci est plus important qu'en milieu organique polaire (DMSO). Ceci à cause d'une longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption, plus faible en milieu aqueux qu'en milieu organique.

Le rendement quantique de fluorescence de ce fluorophore est de 21% en milieu aqueux tamponné hautement salin. Le rendement quantique de fluorescence de **63** est donc meilleur en milieu aqueux que dans le DMSO. La présence de charge sur les carboxylates ne semble donc pas défavorable.

Enfin, deux temps de vie sont observables en milieu aqueux, à l'inverse de ce qui est observé dans le DMSO. Deux espèces fluorescentes sont donc présentes en solution. Nous soupçonnons la formation de particules ou d'agrégats.

2) Caractérisation du CTV **64** dans l'HEPES

Les propriétés spectroscopiques du CTV **64** ont été déterminées dans le tampon HEPES (pH 7,5, 100 mM) (cf. Tableau 3-5), comme pour le premier dérivé phosphorylé **53** décrit auparavant.

	$\lambda_{\text{abs max}}^a$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ (nm)	Φ_F^b (%)	τ (ns)
CTV 64	325	4,7	399	74	43	1,6 (38%) 3,9 (62%)

^a Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maximum d'absorption est donnée ici.

^b Rendements quantiques déterminés par rapport au bisulfate de quinine possédant un $\Phi_F = 0,55$ dans H_2SO_4 0,5M.¹⁷

Tableau 3-5 : Propriétés spectroscopiques du CTV 64 dans le tampon HEPES, à 25°C.

Le coefficient d'absorption molaire ainsi que le rendement quantique sont diminués en milieu aqueux salins, comme déjà observés auparavant pour les premiers fluorophores développés. Malgré tout, le rendement quantique de fluorescence reste bon en milieu aqueux salin.

Le déplacement de Stokes de **64** est relativement important, plus qu'en milieu organique aprotique polaire (DMSO). Ceci pourrait s'expliquer par un meilleur transfert de charge grâce soit à la plus grande polarité du milieu soit, par l'existence de liaisons hydrogènes entre l'eau et les oxygènes chargés négativement.

Deux temps de vie correspondants chacun à une espèce ont été observés, comme dans le DMSO. Les deux espèces sont présentes en solution dans des proportions assez proches, même si elles sont un peu moins équilibrées que dans le DMSO. Là encore des particules ou agrégats pourraient expliquer l'existence de deux espèces émissives.

Tout comme pour les premiers fluorophores synthétisés, le CTV **63** portant des substituants acides carboxyliques, présente des longueurs d'onde d'excitation et d'émission plus intéressantes (car plus hautes) que le CTV **64** phosphorylé. En revanche, le rendement quantique de fluorescence est là encore, deux fois plus important pour le fluorophore portant les groupements phosphorylés.

b. Propriétés spectroscopiques en optique non linéaire, absorption à 2 photons

Une collaboration avec l'équipe PHOENIX de l'ISM, dirigée par Dr. Mireille Blanchard-Desce, a été mise en place afin de réaliser des expériences en optique non linéaire. Le laser utilisé permet d'exciter des chromophores à deux photons, à partir de 700 nm et au-delà. Ces mesures ont été faites avec l'aide de Vincent Hugues, ingénieur optique du PHOENIX.

Si la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption à deux photons n'est pas égale à deux fois celle, à un photon (cf. chapitre 1), cela permet d'avoir une estimation. Les dérivés de cette nouvelle génération présentant une absorption maximale à un photon pour des longueurs d'onde aux environs de 325 – 340 nm, l'absorption devrait être maximale à deux photons, dans une première approximation autour de 650 – 700 nm. Ainsi, bien que l'installation de nos collaborateurs ne soit pas totalement adaptée, il est envisageable de tester la capacité des fluorophores développés, à absorber à deux photons ou non. En effet, la majorité des fluorophores purement organiques développés pour avoir de bonnes propriétés d'absorption à deux photons, possèdent des structures multimodales totalement conjugués, voire dendrimérique.^{13-15,18} D'après nos recherches bibliographiques un seul exemple de structure acentrique multi-dipolaire, dérivant d'un cavitand (calix[4]arène, cf. Figure 3-11) a été décrite dans la littérature.¹⁹

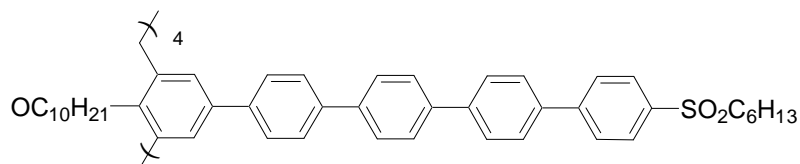


Figure 3-10 : Structure du dérivé de Calix[4]arène développé par Cheah *and co.*, excitable à deux photon.¹⁹

Au vue des propriétés d'absorption à un photon, des expériences d'absorption à deux photons ont été envisagées pour les fluorophores **60** et **61** dans le DMSO (avec 5 % de chloroforme pour la solubilité) et **63** et **64** directement en milieu aqueux (tampon PBS ou HEPES) (cf. Figure 3-11). Les solvants les plus polaires permettant d'avoir les spectres d'absorption et d'émission les plus hauts possibles ont été utilisés, pour optimiser les chances d'observer quelque chose.

Les mesures de section d'absorption à 2 photons ont été faites pour des solutions à 10^{-4} M pour des longueurs d'onde comprises entre 700-800 nm. La concentration utilisée pour les mesures à deux photons est très largement supérieure à celle à un photon. Seules les molécules se trouvant au point focal, pouvant être excitées à deux photons (cf. chapitre 1), le signal d'émission résultant est donc beaucoup plus faible que celui obtenu par excitation à un photon dans une cuve. L'utilisation d'une solution plus concentrée est donc nécessaire. La concentration choisie est classique pour des mesures à deux photons.

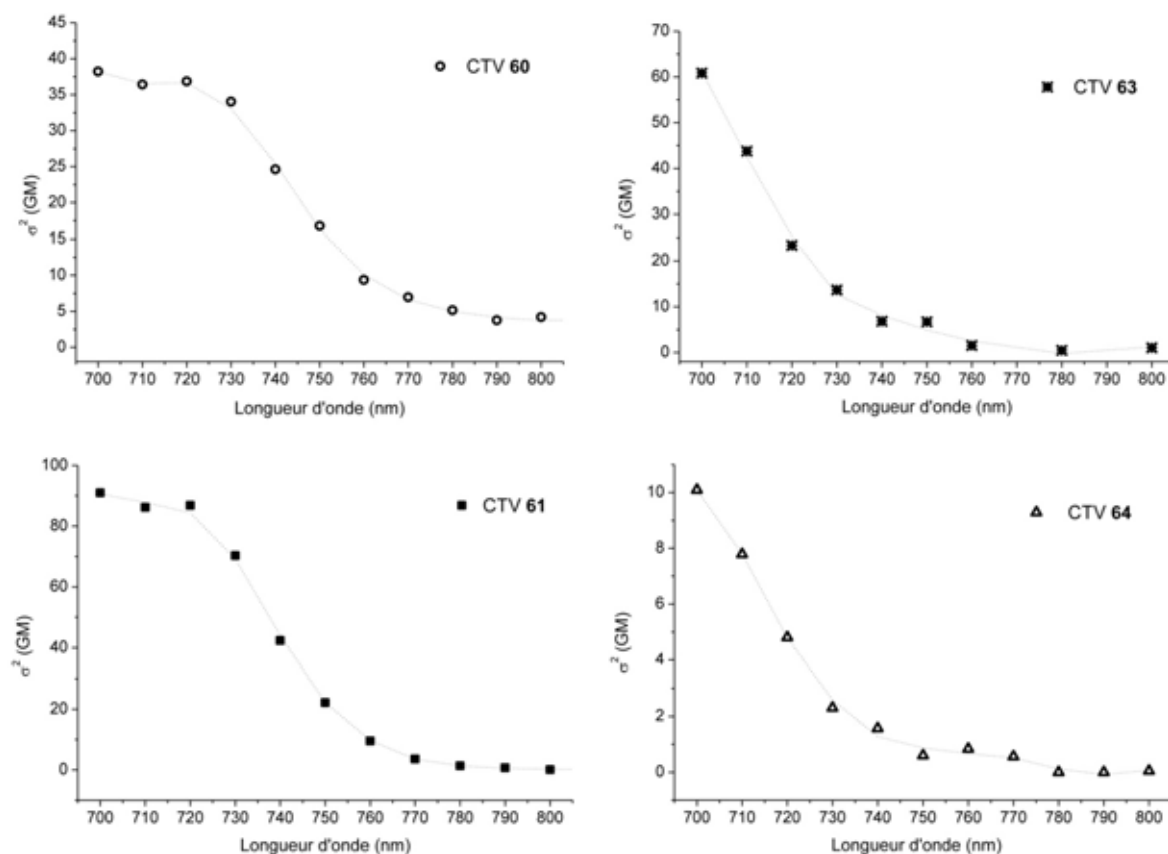


Figure 3-11 : Section d'absorption à deux photons pour les CTV 60 et 61 (à gauche) dans le DMSO, pour le CTV 63 (en haut à droite) dans le tampon PBS et pour le CTV 64 (en bas à droite) dans le tampon HEPES.

Ainsi, on peut voir que les dérivés de CTVs synthétisés par couplage de Sonogashira, et fonctionnalisés par divers groupements peuvent être excités à deux photons y compris en milieu aqueux tamponné. Comme attendu, la gamme de longueurs d'onde utilisée n'est pas optimale, car elle ne permet pas d'atteindre le maximum d'absorption à deux photons. Pour les fluorophores caractérisés dans le DMSO, il est difficile de savoir si le maximum est atteint. En revanche, pour les fluorophores caractérisés en milieu aqueux, celui-ci se trouve à une longueur d'onde $\leq 700\text{nm}$.

	$\lambda_{\text{TPA max}}$ (nm)	σ_2 (GM)*
CTV 60 dans le DMSO	≤ 700	≥ 38
CTV 61 dans le DMSO	≤ 700	≥ 91
CTV 63 dans le PBS	≤ 700	≥ 61
CTV 64 dans l'HEPES	≤ 700	≥ 10
Fluorescéine (pH = 11) ²⁰	780	38
Rhodamine B ²⁰	840	210
Coumarine 307 ²⁰	776	20

* 1 GM (Goepfert-Mayer) = $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$

Tableau 3-6 : Grandeurs caractéristiques à 2 photons pour certains dérivés de CTVs ainsi que celles des fluorophores commerciaux.²⁰

N'ayant pas accès aux valeurs maximales des sections d'absorption à deux photons, il est difficile de conclure sur ces valeurs. Toutefois, les valeurs de section d'absorption à deux photons obtenues, semblent bonnes si on les compare à celles de fluorophores commerciaux classiquement utilisés pour des applications biologiques, comme la fluorescéine, la coumarine 307 ou la Rhodamine B (cf. Tableau 3-6).²⁰

L'équipe de Cho, a développé une molécule possédant les mêmes couples donneurs/accepteurs que le CTV **61** mais tous conjugués au même système aromatique (cf. Figure 3-12).²¹ Cette molécule totalement conjuguée, possède une section d'absorption à deux photons maximale à 800 nm avec une valeur de 143 GM.²¹ Cette valeur est proche de celle obtenue pour le CTV **61**, alors que le maximum d'absorption n'a pas été atteint. En revanche, la valeur de la longueur d'onde correspondant au maximum de la section d'absorption à deux photons est très différente.

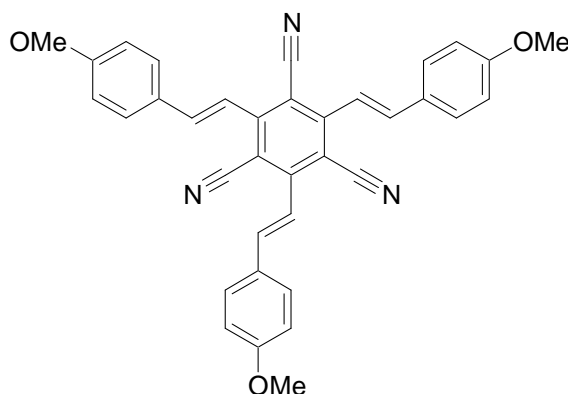


Figure 3-12 : Fluorophore à deux photons développé par l'équipe de Cho.²¹

Enfin, on peut souligner que les valeurs obtenues pour nos CTVs sont inférieures à celles des systèmes optimisés développés aujourd'hui, qui comportent des systèmes π plus étendus et sont souvent multi-modal.^{13,14,4} En effet, pour de tels systèmes, les valeurs de sections d'absorption à deux photons peuvent atteindre plusieurs milliers de GM.^{4,13-15,18} Cependant la majorité de ces fluorophores sont hydrophobes, et doivent être fonctionnalisés par des PEG, ou encapsulés au sein de polymères ou particules organométalliques, afin d'être utilisés *in vivo*.¹⁵

Les premières expériences d'optique non linéaire, avec les dérivés de CTV ont permis de mettre en évidence la capacité de ces structures à absorber deux photons simultanément. Les conditions expérimentales n'ont pas permis de caractériser totalement ces molécules en optique non-linéaire, ou de comparer l'importance des substituants. Toutefois, ces premiers résultats ouvrent d'intéressantes perspectives en vue d'une application biologique, notamment pour pouvoir utiliser des longueurs d'onde d'excitation plus adaptées au vivant.

c. Conclusion

L'enrichissement du système π s'est révélé intéressant pour trois raisons : l'augmentation du rendement quantique de fluorescence, le déplacement bathochrome du spectre d'absorption, mais également de celui d'émission. Le déplacement du spectre d'émission est plus conséquent grâce au transfert de charge photo-induit, induisant de grands déplacements de Stokes en milieu polaire (~ 100 nm). Pour les meilleurs fluorophores l'émission a lieu à des longueurs d'onde dans le visible en milieu organique polaire (**61** dans le DMSO) et aqueux (**63** dans le PBS).

Les nouveaux fluorophores développés sont excitables à deux photons d'après les premières expériences menées. Aucun dérivé de CTV développé dans la littérature ne présente une telle propriété. Les fluorophores présentés ayant des longueurs d'onde correspondant au maximum d'absorption, qui reste limitée en vue d'une application *in vivo*, la possibilité de les exciter par une absorption à deux photons, s'avère très intéressante en vue d'une application biologique (en plus des avantages intrinsèques de cette technique présentée au chapitre 1).

C. Etude en milieu aqueux des CTVs 63 et 64

a. Etude du CTV 63 dans le PBS

L'étude du CTV **63** a été menée dans le tampon PBS pH 7,4 (concentration totale en sels 140 mM) afin d'être au plus proche des conditions physiologiques (au niveau de la force ionique surtout).

1. Un CTV qui forme des nano-assemblages dans le PBS

La cage hydrophobe d'une part et les carboxylates chargés, hydrophiles d'autre part, pourraient constituer une structure de tensio-actif (cf. Figure 3-13). Lors de la préparation de la solution de CTV **63** à $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le tampon PBS, la formation d'une légère mousse a été observée suite à l'agitation au vortex-mixeur, qui se dissipe après passage aux ultrasons (pendant une minute environ).

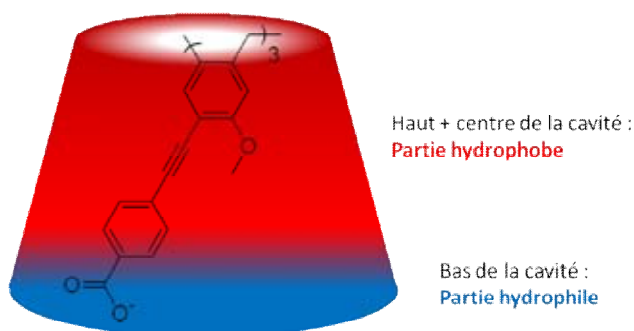


Figure 3-13 : CTV **63** schématisé pour mettre en avant les parties plus hydrophiles et plus hydrophobes de la structure.

Afin de caractériser un éventuel caractère de tensio-actif du CTV **63**, des mesures de tension de surface par la méthode de la goutte pendante, ont été réalisées (cf. Annexe 3). Les mesures ont été faites pour une concentration en **63** variant de 10^{-3} M à 10^{-5} M. Les tensions de surface mesurées aux diverses concentrations en **63**, n'ont pas variées, et sont identiques à celle du tampon PBS seul, de 69 Nm^{-1} . Le CTV **63** ne se comporte donc pas comme un tensio-actif.

Malgré tout, il est envisageable que le CTV **63** s'assemble en milieu aqueux afin de former des particules plus solubles que la molécule seule. Aussi, des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées afin d'observer d'éventuelles particules (cf. Annexe 5). En effet, cette technique permet de mettre en évidence l'existence de particules en solution, et d'obtenir une estimation de leur taille. Pour ce type de mesures des solutions de **63** à 10^{-4} M dans le tampon PBS ont été utilisées.

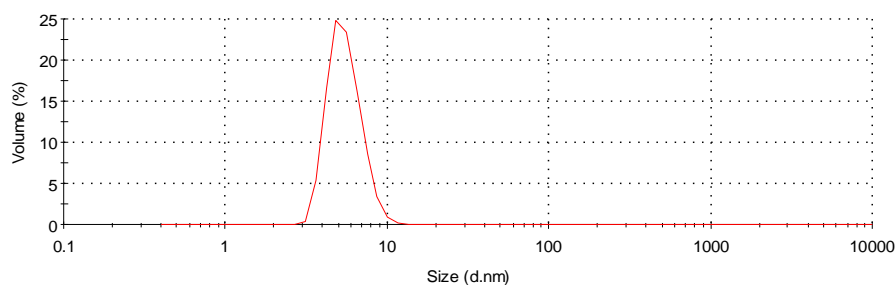


Figure 3-14 : Courbe de distribution de taille en fonction du diamètre obtenu pour une solution de CTV 63 à 10^{-4} M dans le PBS.

D'après les mesures en DLS, il semble que le CTV **63** s'auto-assemble pour former des particules de $5 \pm 1,7$ nm de diamètre (cf. Figure 3-14). Les particules qui semblent se former sont de tous petits objets qu'il est très difficile de visualiser, par la majorité des techniques. Cependant, il a été envisagé de confirmer l'existence de tels assemblages en réalisant de la microscopie électronique à transmission haute résolution (TEM) (cf. Annexe 4).

Pour cela, des grilles TEM ont été préparées avec les solutions de CTV **63** utilisées pour les mesures de DLS, à 10^{-4} M dans le PBS et analysées sur un microscope permettant d'avoir une haute résolution. A l'aide de Zarah Fattah, différents clichés (cf. Figure 3-15) témoignant de l'existence de petites particules plutôt homogènes, et d'un diamètre d'environ 5 à 10 nm, ont été pris. La taille des objets observés coïncide avec celle obtenue par DLS en solution. Ceci semble indiquer que ces assemblages, une fois formés, sont relativement stables et dépendent peu de l'état d'hydratation. Au vu de la taille des particules, proche des limites de la détection, il est difficile d'observer leur morphologie de façon précise. Toutefois, ces objets sont relativement homogènes.

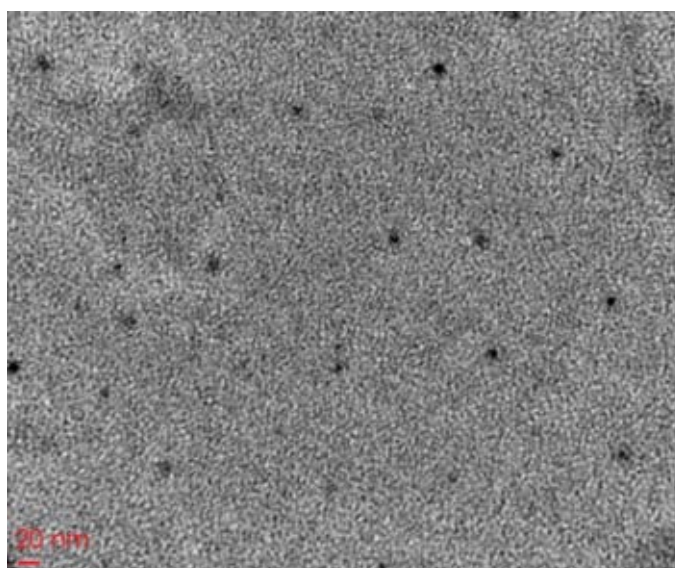


Figure 3-15 : Cliché TEM haute résolution (au grossissement maximal) obtenu pour le CTV 63 dans le tampon PBS.

L'équipe de Collet avait été la première à montrer que des dérivés de CTVs dendrimériques (*i.e.* portant des longues chaînes au niveau des éthers), pouvaient s'auto-assembler pour former des pyramides en forme de spirale (cf. Figure 3-16).^{22,23} Zimmermann *and co.* ont également étudié de tels assemblages et leurs propriétés chirales.²⁴⁻²⁶ Plus récemment, l'équipe de Percec, a montré que des CTVs dendrimériques pouvaient s'assembler sous forme de sphères (cf. Figure 3-16).^{27,28}

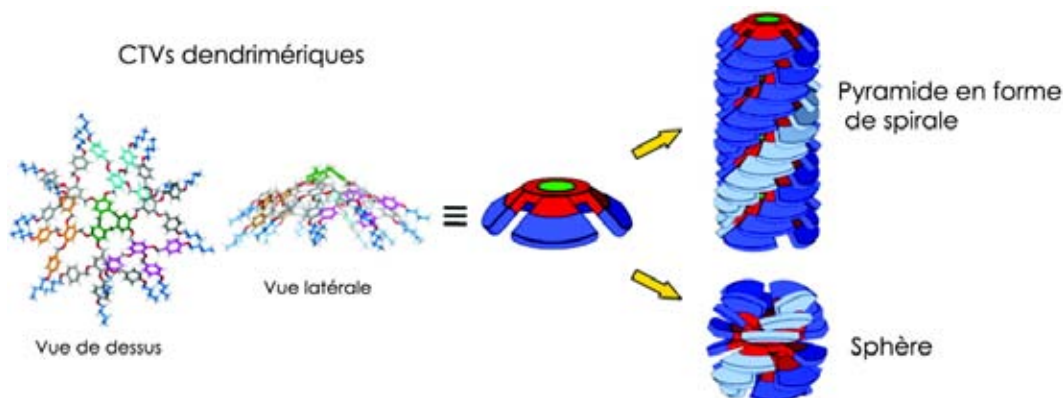


Figure 3-16 : Exemples de CTVs dendrimériques développés par Percec *and co.* et structures des assemblages qu'ils peuvent former.²⁷

Les sphères obtenues par Percec *and co.* sont vraisemblablement composées, non pas par des CTVs placés comme dans une micelle (« conical conformer », Figure 3-17), mais par des brins de pyramides en forme de spirale (« crown conformer », Figure 3-17). La concordance des diamètres obtenus par calcul selon chacun des modèles, avec ceux déterminés expérimentalement (par diffraction des rayons-X), ont permis de discriminer le bon modèle. Dans l'exemple choisi, les particules ainsi formées sont composées de 5 CTVs, et présente un diamètre de 47 Å (cf. Figure 3-17).

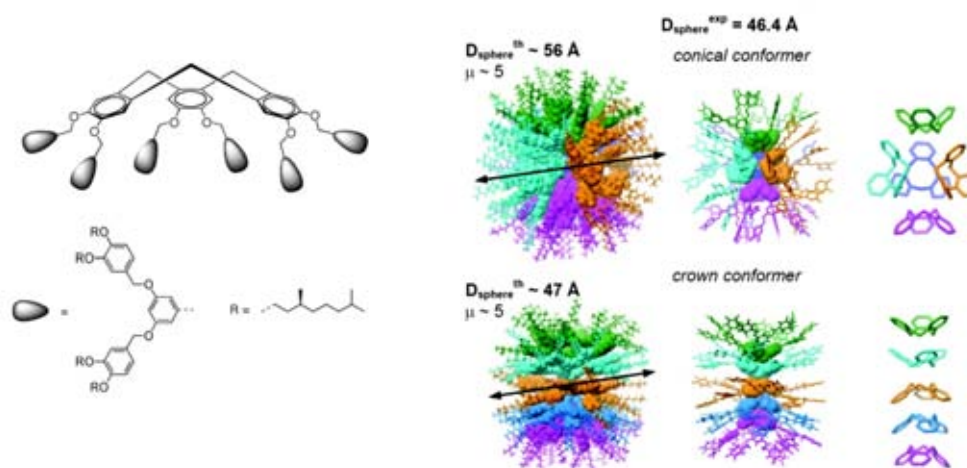


Figure 3-17 : Un exemple de structure chimique de CTV dendrimérique développé par Percec *and co.* formant des sphères (à gauche). Modélisation moléculaire (à droite) selon les deux modèles envisagés pour expliquer la construction de sphère, avec les diamètres des particules associées ainsi que le nombre de CTVs les composants.

Les structures développées par Percec *and co.* sont électriquement neutres. Dans notre cas, des charges négatives sont présentes, pouvant induire des répulsions électrostatiques entre les CTVs. La conformation micelle («conical conformer», Figure 3-17) pourrait-elle être alors plus stable ? Enfin, remarquons que la taille des sphères formées par Percec *and co.* est très proche de celles obtenue avec le CTV **63**.

Afin de mieux comprendre la structure de tels assemblages, un spectre en RMN du proton a été enregistré dans un tampon PBS deutéré. Un élargissement des pics est observable par rapport au spectre dans le DMSO, confirmant la formation d'assemblage, mais rendant une étude de leur structure difficile. Une étude de modélisation, en collaboration avec l'équipe d'Isabelle Baraille à l'IPREM à Pau, est en cours pour déterminer la structure des particules formées (conformation et le nombre de CTVs impliqués dans les assemblages formés).

L'observation de deux temps de vie pourrait être liée à la formation de ces particules. Il est possible d'envisager, que toutes les molécules de **63** ne sont pas assemblées sous forme de particules, expliquant l'existence de deux populations émissives. Une autre hypothèse pourrait être que toutes les molécules, au sein des assemblages formés, n'aient pas le même environnement et donc les mêmes durées de vie. Dans le cas d'une particule de conformation couronne (« crown conformer », Figure 3-17), on peut envisager que les molécules aux extrémités possèdent des temps de vie plus court alors que celles « protégées » au milieu possède des temps de vie plus long.

Il serait intéressant de connaître la structure des objets formés afin de déterminer l'impact de celle-ci sur les propriétés de reconnaissance et les propriétés spectroscopiques. Regardons à présent les propriétés de complexation.

2. Etude de complexation

1) Etude par spectrofluorimétrie

Au vu des résultats obtenus pour la première génération de CTVs faiblement conjugués, nous avons décidé de commencer par une étude de la complexation par fluorescence, avec l'Ach et la Ch. Une solution en CTV **63** à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M dans le PBS a été utilisée afin de travailler dans la zone de linéarité tout en gardant une bonne intensité d'émission.

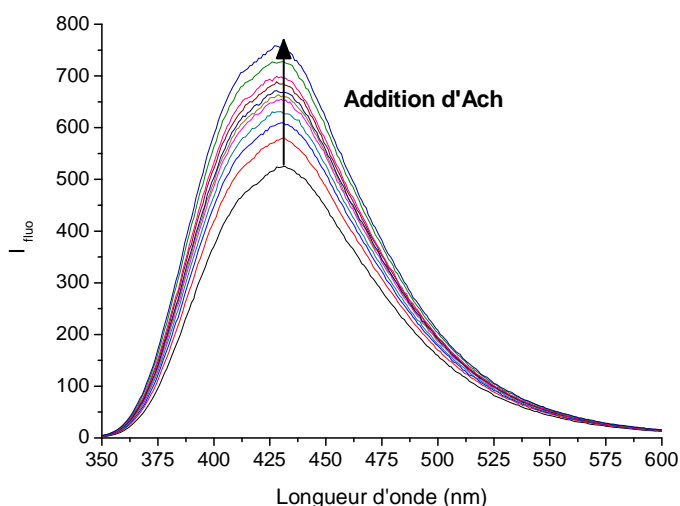


Figure 3-18 : Titrage par fluorescence, de l'ACh en présence de CTV 63 dans le PBS, à 25°C.

L'ajout d'Ach ou de Ch à la solution de CTV 63 exalte la fluorescence de celui-ci (cf. Figure 3-18), mais ne modifie pas son absorbance. Cette sonde fonctionne de façon « off-on ». L'exaltation de l'intensité de fluorescence est plus importante dans le cas de l'Ach (facteur d'augmentation de 40%) que pour la Ch (facteur d'augmentation de 25%) (cf. Figure 3-19).

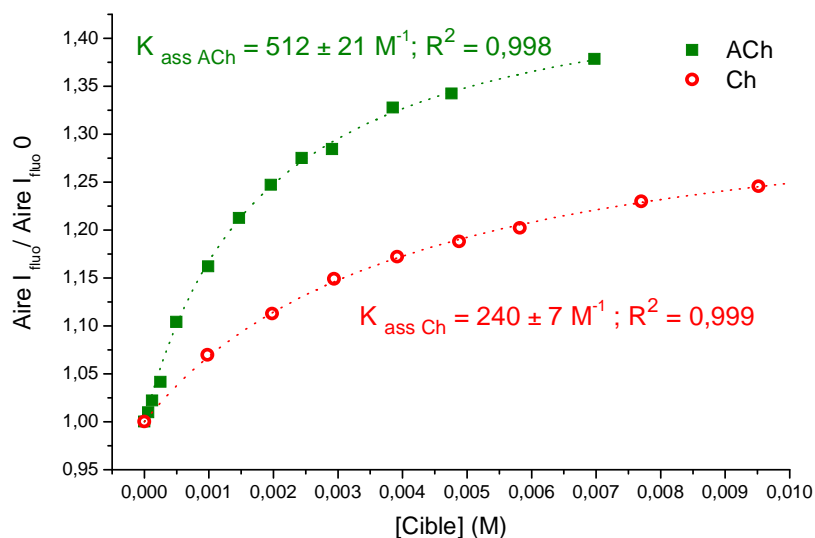


Figure 3-19 : Courbes d'évolution des aires correspondant à l'intensité de fluorescence au cours du titrage de l'Ach et de la Ch dans le PBS, en fonction de la concentration en cible ajoutée.

Les constantes d'affinité pour l'Ach et la Ch par spectrofluorimétrie, ont été obtenues en utilisant un modèle correspondant à une stœchiométrie 1:1 pour le complexe formé. Elles sont respectivement de $539 \pm 21 \text{ M}^{-1}$ et $240 \pm 7 \text{ M}^{-1}$ pour l'Ach et la Ch. Malgré l'existence d'assemblage, le modèle correspondant à une stœchiométrie 1:1 semble adéquat au vue des excellents coefficients de corrélation obtenus (R^2). Ces constantes sont bien supérieures (un ordre de grandeur) à celles obtenues pour le CTV 55 dans les mêmes conditions ($K_{\text{association Ach}} = 38 \pm 1,5 \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{association Ch}} = 62 \pm 1,6 \text{ M}^{-1}$).

La limite de détection ($A_{\text{fluo}}/A_{\text{fluo}}^0 \geq 5\%$) se situe à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M pour l'Ach et $5 \cdot 10^{-4}$ M pour la Ch, en utilisant une solution de CTV **63** à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M dans le PBS sur le spectrofluorimètre du laboratoire.

De plus, une inversion de la sélectivité en faveur de l'Ach cette fois, avec un facteur de 2,25 est observée avec cette sonde. Un seul exemple de sonde non fluorescente, permettant d'avoir une sélectivité supérieure pour l'Ach par rapport à la Ch en milieu aqueux tamponné existe, à notre connaissance.²⁹ Ce triphénylène substitués par des carboxylates, reconnaît l'Ach avec une constante de 94 M^{-1} d'après un titrage en RMN du proton (ou $41 \pm 4 \text{ M}^{-1}$ d'après un titrage par ITC) et pas la Ch.²⁹ La plus grande hydrophobie de l'Ach par rapport à la Ch en serait la raison.²⁹ Aucune sonde fluorescente ne permet d'avoir un tel facteur de sélectivité en faveur de l'Ach en milieu aqueux quasi-physiologique.

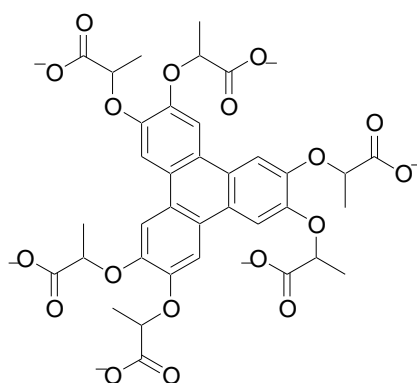


Figure 3-20 : Structure de la sonde non fluorescente développée par Bibal *and co.*, présentant la meilleure sélectivité entre l'Ach et la Ch.²⁹

Dans l'optique de mieux comprendre la sélectivité observée avec **63** en faveur de l'Ach, des titrages par spectrofluorimétrie pour d'autres ammoniums quaternaires, ont été menés (cf. Figure 3-21). Pour voir l'importance de l'hydrophobie, deux ammoniums quaternaires moins polaires que les cibles précédentes ont été testés, la méthylcholine (ChMe), portant une fonction éther et le triméthylpentylammonium (NMe₃Pent) ne portant que des chaînes alkyles. Ensuite, à l'inverse, la carnitine (ChCOO⁻), un zwitterion, qui est beaucoup plus polaire de part sa fonction carboxylate a été testée. Tous ces ammoniums ont été étudiés avec comme contre-ion, un chlorure.

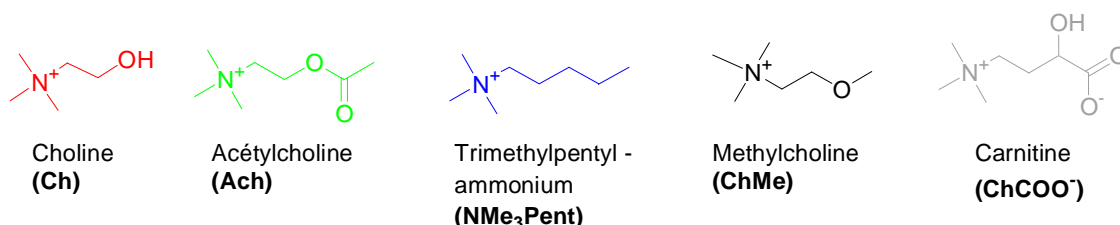


Figure 3-21 : Structures des différents ammoniums quaternaires testés avec le CTV **63** dans le PBS.

Tout d'abord, l'addition de NMe₃Pent et de MeCh sur une solution de sonde conduit, comme pour l'Ach et la Ch, à une exaltation de la fluorescence de celle-ci. Le facteur

d'augmentation le plus important est observé pour le NMe₃Pent avec 40%, et est comparable à celui-observé pour l'Ach (cf. Figure 3-22). Les constantes d'association pour ces deux espèces ont pu être déterminées en utilisant un modèle correspondant à une stœchiométrie 1:1 (cf. Tableau 3-7). Nous obtenons respectivement $2307 \pm 157 \text{ M}^{-1}$ et $832 \pm 58 \text{ M}^{-1}$ pour le NMe₃Pent et la ChMe.

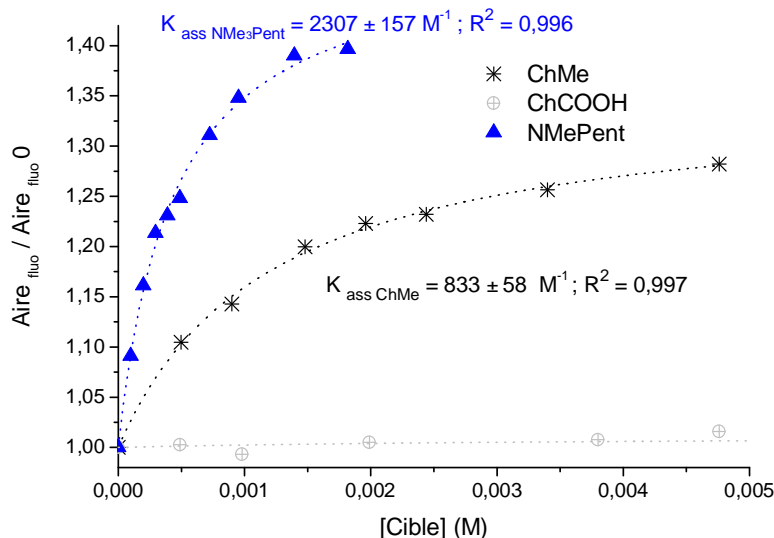


Figure 3-22 : Courbes d'évolution des aires correspondantes à l'intensité de fluorescence au cours des titrages de ChMe, ChCOO⁻, NMe₃Pent dans le PBS.

En revanche, l'addition de carnitine sur une solution de **63** n'induit pas de variation de fluorescence (cf. Figure 3-22). Celle-ci ne semble pas être reconnue par la sonde.

La variation des constantes d'association en fonction de l'hydrophobie de la chaîne latérale, portée par les ammoniums quaternaires titrés, semble indiquer que celle-ci est un paramètre important pour expliquer la sélectivité observée. Ainsi, l'affinité pour la sonde est d'autant plus grande que la cible est hydrophobe. L'absence d'affinité pour la carnitine pourrait s'expliquer dans ce contexte, par une plus grande hydrophilie de celle-ci. Cependant, la présence d'une charge négative sur le carboxylate pourrait également induire des interactions défavorables avec les carboxylates de la sonde (répulsion de charge).

Cibles	K _{association} (M ⁻¹)	R ²
Ach	512 ± 21	0,998
Ch	240 ± 7	0,999
ChMe	833 ± 58	0,997
NMe ₃ Pent	2307 ± 157	0,996
ChCOO ⁻	/	/

Tableau 3-7 : Récapitulatif des constantes d'association déterminées par fluorescence pour les différents ammoniums quaternaires en présence de **63** dans le PBS.

En ce qui concerne les interactions mises en jeu dans le processus de reconnaissance, elles sont probablement multiples. Des interactions électrostatiques ou π -Cation existent probablement comme dans le cas des premiers CTVs développés. De plus, un effet hydrophobe pourrait exister grâce à l'approfondissement de la cavité par l'allongement des pans aromatiques. Divers exemples de sondes fluorescentes ou non, ont été décrits dans la littérature, mettant en jeu de telles interactions, qui permettent d'expliquer une certaine sélectivité en faveur de l'Ach par rapport à la Ch.²⁹⁻³⁵ L'hydrophobie pourrait donc également être à l'origine de la meilleure affinité pour l'Ach par rapport à la Ch avec la sonde fluorescente **63**.

Plusieurs sondes (non fluorescentes pour la majorité) ont été développées dans la littérature, avec des structures comportant une partie hydrophobe pour encourager ce type d'interaction, en complément d'interactions électrostatiques ou π -cation. L'exemple le plus récent permettant d'obtenir une très bonne sélectivité pour l'Ach, a été décrit par Bibal *and co*. Divers exemples de sondes fluorescentes indirectes, fonctionnant avec des cavitands, de type calixarène ou curcubituril, ont permis de mettre en avant l'importance de ce type d'interactions.^{30,31} Les premiers travaux soulignant l'importance de l'effet hydrophobe, mais également de la complémentarité de taille (entre la cible et la cavité hôte), ont été réalisés avec des cryptophanes par l'équipe de Collet et Dustata³², puis par Rebek *and co*. sur des dérivés de résorcinols aux parois flexibles³³⁻³⁵.

En ce qui concerne la variation de l'émission de fluorescence, on observe que celle-ci est variable en fonction de la constante d'association et de la nature de la chaîne de l'ammonium. En effet, l'exaltation est plus importante pour le NMe₃Pent et l'Ach que pour la ChMe ou la Ch. Remarquons également que les variations d'intensité de fluorescence sont plus importantes pour cette sonde que pour la sonde **55**.

La façon dont la cible se place dans la cavité (plus ou moins profond, contre les parois ou non) modifie l'environnement du fluorophore. Ceci pourrait être à l'origine de l'augmentation du rendement quantique de fluorescence que l'on observe. En effet, les voies de désexcitation non-radiatives, sont plus ou moins favorisées suivant l'environnement de la sonde. La cible s'enfonce peut être d'autant plus dans la cavité qu'elle est hydrophobe et longue, en éjectant ainsi des molécules d'eau initialement présentes. Si tel est le cas, l'efficacité des voies de désexcitations non radiatives, peuvent être défavorisées. Cependant, si des particules de **63** sont formées par des brins de pyramide en forme de spirale, il est peu probable que les cibles aient accès à la cavité. Elles s'intercaleraient alors plutôt entre les différents CTVs. Une modification de la taille des particules pourrait alors être observée. D'après des mesures en DLS, en présence d'Ach il ne semble pas que ce soit le cas. Cependant, comme nous travaillons aux limites de l'appareil, une faible variation de la taille (de 1 à 2 nm) ne peut pas être détectée de façon précise. Ainsi, des variations de taille ne sont pas à exclure totalement. La microscopie TEM ne nous permettra pas non plus de distinguer de telles variations.

Enfin, l'absence de déplacement des spectres d'émission et d'absorption en présence d'une cible, par rapport à la sonde seule, semble indiquer que le transfert de charge n'est pas modifié par la complexation.

Des études RMN ont été entreprises pour mieux comprendre les interactions mises en jeu lors de la complexation.

2) Etude RMN de la complexation de l'Ach par la sonde **63**

Tout d'abord nous avons enregistré un spectre proton de la sonde fluorescente en présence d'Ach. Le même type de signaux larges a été obtenu. L'addition d'Ach ne permet pas d'augmenter la résolution du spectre RMN proton. Ceci suggère que la présence d'Ach ne casse pas les assemblages formés, au vue de la RMN du proton, elle pourrait néanmoins les modifier.

Malgré tout, des expériences NOE ont été réalisées pour voir si l'on pouvait détecter des interactions entre la sonde et la cibles.

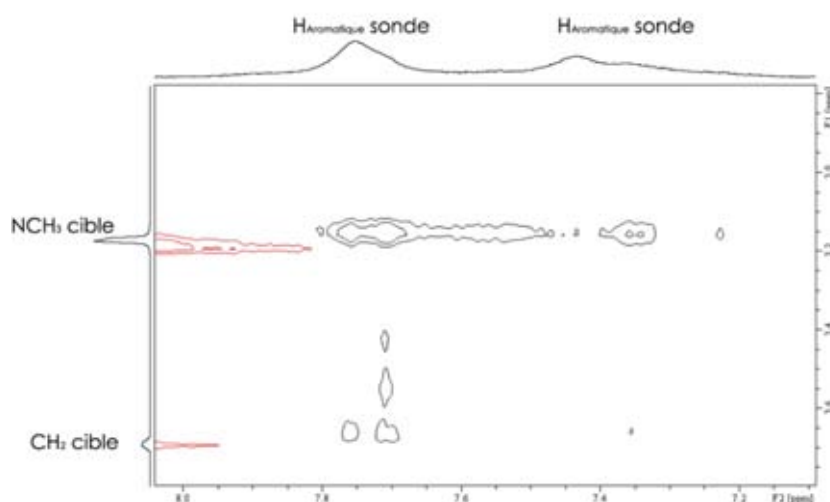


Figure 3-23 : Zoom sur une partie du spectre RMN-NOE obtenu pour le CTV 63 en présence d'Ach dans du PBS deutéré.

Ces expériences ont été faites par Noel Pinaud, du CESAMO à l'ISM. La qualité du spectre obtenu est très moyenne. Ceci est notamment dû à la largeur des signaux correspondants à la sonde. Cependant, des taches de corrélation sont visibles entre les signaux correspondants aux protons de la cible (NCH3 et CH2) et aux aromatiques de la sonde (cf. Figure 3-23). La partie ammonium de la cible semble pénétrer dans la cavité formée par la sonde. Il est nécessaire de tenter d'optimiser encore les conditions afin d'avoir des résultats plus fiables.

Etant donné la qualité insuffisante des spectres RMN, des calculs de modélisation moléculaire sont actuellement en cours, par l'équipe d'Isabelle Baraille à l'IPREM à Pau. Des

calculs seront faits en boîte d'eau, pour l'Ach en présence de plusieurs molécules de sondes associées. Cette étude, actuellement en cours, ne sera pas présentée dans ce manuscrit.

3) Etude de biocompatibilité et neurotoxicité

Cette sonde présentant des propriétés spectroscopiques, et de reconnaissance intéressantes, et avant de l'utiliser afin d'aborder des problèmes de physiologie cholinergique, il est indispensable d'évaluer sa toxicité vis-à-vis du système nerveux. Dans ce but sa biocompatibilité et sa neurotoxicité ont été testées sur des tissus neuronaux vivants. Ces expériences ont été réalisées avec le Dr. Pierre Meyrand, de l'institut des maladies neurodégénératives, de Bordeaux.

Pour évaluer la biocompatibilité et la neurotoxicité de notre sonde nous avons choisi le système nerveux stomatogastrique du homard et ceci pour plusieurs raisons. La première étant que le homard possède un système nerveux non centralisé, il est ainsi possible d'en isoler une partie (comme le système stomatogastrique). Ensuite, le système nerveux du homard présente l'avantage d'avoir des réseaux neuronaux fonctionnels constitués d'un petit nombre de neurones (une dizaine par réseau). Cette particularité permet d'identifier les différents neurones individuellement, et de comprendre leurs rôles fonctionnels au sein des réseaux. Ceci est totalement impossible chez les vertébrés (poissons, batraciens, reptiles, oiseaux, mammifères). Enfin, le système stomatogastrique choisi, est composé de quelques neurones connectés entre eux par des synapses électriques et chimiques. Ces dernières sont soit cholinergiques (fonctionnant avec de l'Ach) soit glutamatergiques (fonctionnant avec du glutamate, un autre neurotransmetteur). L'activité rythmique des réseaux du ganglion stomatogastrique, et particulièrement du réseau pylorique, est strictement dépendante de l'activité de deux neurones cholinergiques (les neurones PD). D'éventuelles interactions de la sonde avec l'Ach qui perturberait l'activité neuronales seront ainsi directement détectées.



Figure 3-24 : Le système nerveux stomatogastrique du homard *in vitro*. Photographie du système nerveux stomatogastrique reposant sur un film de sylgard et recouvert de liquide physiologie dans une boîte de Petri. Ce système consiste en 4 ganglions interconnectés par des nerfs. Trois sont localisés sur la partie droite de la photographie, deux sur les connectifs principaux (nerfs plus épais) situés dans la partie supérieure et inférieure du cliché d'où partent deux nerfs. Le troisième est localisé à la jonction des deux nerfs rostraux issus des connectifs. Ces trois ganglions projettent *via* un nerf unique, sur le ganglion stomatogastrique qui contient les réseaux de neurones (à gauche en bas de la photographie).

Afin d'évaluer l'impact de la sonde sur le fonctionnement des neurones de ce système, une expérience en cinq temps a été conduite.

Tout d'abord, le système stomatogastrique d'un homard est extrait de l'animal et fixé sur une résine électriquement neutre (sylgard). Ce système est continuellement perfusé avec une solution saline identique au milieu physiologique de celui-ci, afin de maintenir les cellules en vie (cf. Figure 3-24). Deux neurones sont alors choisis pour l'étude. Le premier, le neurone dilatateur pylorique (PD) qui est un neurone cholinergique, le second, le neurone gastrique glutamatergique (LPG).

Ensuite, les activités électriques intracellulaires de ces deux neurones sont enregistrées ainsi que l'activité globale des réseaux, via des enregistrements extracellulaires, sur les principaux nerfs. Ces enregistrements durent pendant un certain laps de temps afin de vérifier qu'ils sont toujours actifs et expriment une activité stable. Lorsque la préparation exprime une activité stable, le test peut démarrer.

Avant l'introduction de la sonde, on enregistre les différentes activités durant une heure, ceci est notre control. Puis, on introduit dans la solution, dans laquelle baigne les cellules, la sonde à une concentration de 10^{-3} M. Les activités électriques sont alors enregistrées pendant plusieurs heures (4h en moyenne).

Enfin, on rince le système avec une solution physiologique dépourvue de sonde et l'on continue l'enregistrement des activités électriques (rinsing). L'activité électrique des deux neurones étant restées inchangée, au cours des différentes étapes, on peut en conclure que la sonde est non-neurotoxique pour ce système (cf. Figure 3-25).

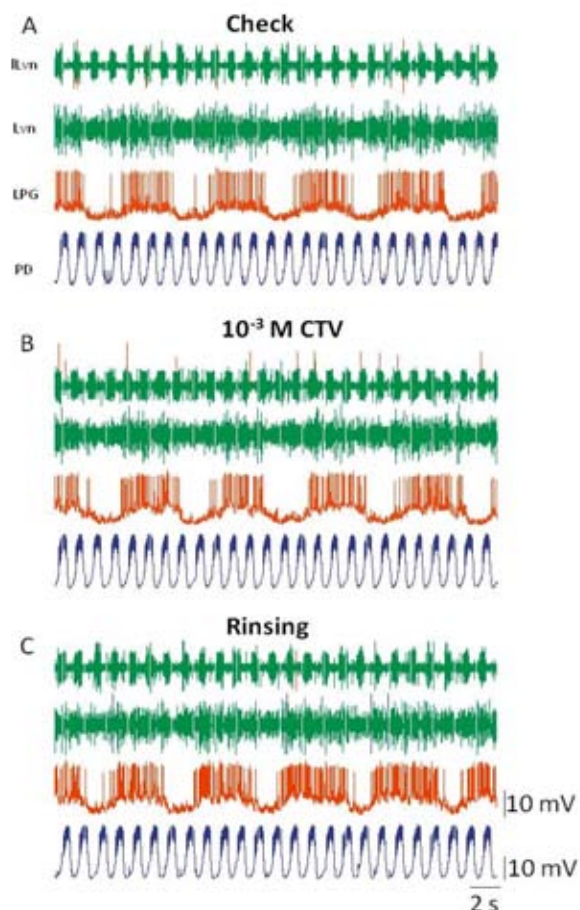


Figure 3-25 : Enregistrements simultanés des activités intracellulaire du neurone gastrique (LPG, en orange), du neurone pylorique (PD, en bleu) et des activités extracellulaires des deux réseaux (gastrique et pylorique) sur les nerfs llvn et lvn; dans des conditions de contrôle (A), en présence de sonde après une exposition de 4h (B) et après rinçage pendant 1h avec une solution physiologique neuve (C).

Bien que la sonde n'affecte pas les activités spontanées du système nerveux stomatogastrique (voir Figure 3-25), lors de l'expérience il a été observé l'apparition de précipités blanchâtres dans la solution. Les titrages par spectrofluorimétrie des différents sels présents dans la solution utilisée, ont été réalisés. Ainsi, il a pu être mise en évidence, que la sonde est sensible aux ions calciums. L'ajout de ceux-ci à une solution de sonde induit la formation de particules visibles à l'œil nu, qui restent en suspension et donnent un aspect laiteux au mélange. De plus, l'ajout de calcium induit un déplacement hypochrome des spectres d'émission et d'absorption. Des titrages sont en cours afin de déterminer la constante d'affinité de la sonde pour le calcium de façon précise. Le calcium étant un cation divalent il est probable qu'il se lie à deux sondes différentes, formant ainsi des ponts entre celles-ci. Bien que la sonde soit biocompatible, ces ponts calciques semblent altérer le fonctionnement de celle-ci, dont l'utilisation à des fins physiologiques reste à ce jour encore problématique.

3. Conclusion

Cette nouvelle sonde fluorescente présente tout d'abord des propriétés spectroscopiques plus intéressantes en milieu physiologique. En effet, les spectres d'absorption et d'émission sont décalés de façon bathochrome, grâce à l'enrichissement du système π et un transfert de charge efficace. Le spectre d'émission atteint le domaine du visible (> 400 nm). La possibilité d'utiliser une excitation à deux photons pour un tel fluorophore, soluble en milieu aqueux, a été montrée. Bien que le montage utilisé ne soit pas totalement adapté pour exciter de façon efficace le fluorophore, les premières expériences ouvrent de nouvelles perspectives prometteuses.

Cette sonde est intéressante pour ses propriétés de complexation de l'Ach en milieu physiologique. La stratégie consistant à allonger les unités aromatiques, s'est révélée efficace puisqu'elle permet d'obtenir une constante d'association de $512 \pm 21 \text{ M}^{-1}$ pour l'Ach. De plus, une sélectivité intéressante en faveur de l'Ach par rapport à la Ch (plus d'un facteur 2), jamais obtenu auparavant pour une sonde fluorescente, est observée. D'après, les différents titrages réalisés par spectrofluorimétrie, des interactions dispersives liées à l'hydrophobie, existent probablement entre la sonde et la cible, en plus de probables interactions électrostatiques ou π -cation. Toutefois, cette sonde s'organisant en particules, il est difficile de conclure quant aux structures des complexes [CTV **63**/Ach] formés. Des études de modélisation moléculaires sont en cours.

Cette sonde s'est révélée non neurotoxique sur le système stomatogastrique du homard, modèle couramment utilisé par les neurobiologistes pour étudier des neurones cholinergiques. La formation de particules de taille très faible (.5 nm) ne semble pas être un problème. Malgré tout, cette sonde n'est pas utilisable *in vivo* à cause de son affinité pour l'ion calcium, présent en concentration non négligeable en milieu physiologique. Afin de remédier à ce problème il pourrait être intéressant de déplacer les groupements carboxylates en *ortho* de la fonction alcyne, pour rendre celle-ci moins accessible à l'ion calcium, et éviter ainsi la formation d'agrégats par des ponts calcium. La synthèse d'une telle sonde est actuellement en cours.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au CTV **64**, lui aussi soluble en milieu aqueux tamponné, et nous avons étudié son comportement (formation de particules, reconnaissance). Ceci est l'objet de la partie suivante.

b. Etude des propriétés de reconnaissance du CTV 64 en milieu aqueux

De même que pour le premier CTV phosphorylé **53**, l'étude des propriétés de reconnaissance a été menée dans le tampon HEPES pH 7,5, à 100 mM et non dans le PBS pour éviter toute compétition entre les phosphates de la sonde et ceux du tampon.

Dans un premier temps, l'observation d'éventuelles particules a été réalisée par DLS comme pour le CTV **63**, puis, les propriétés de reconnaissance pour différentes cibles étudiées.

1. CTV 64 et formation d'assemblages en milieu aqueux

Le même phénomène d'élargissement des signaux de RMN du proton a été observé, avec le CTV **64**, lorsqu'on passe du DMSO-d₆ à D₂O. Des assemblages, comme observé avec le CTV **63** se forment probablement. Aussi, des expériences de DLS ont été réalisées pour le CTV **64** dans l'HEPES, avec une solution à 10⁻⁴ M.

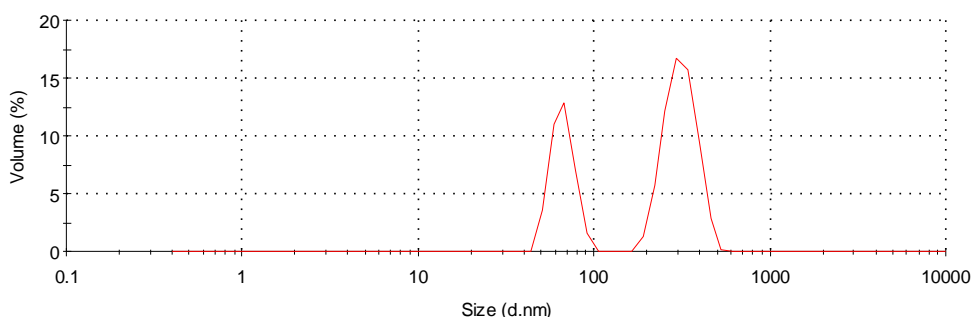


Figure 3-26 : Distribution de taille obtenue par DLS pour une solution de CTV 64 à 5 10⁻⁵M.

Ces expériences de DLS ont montré que, **64** s'auto-assemble en milieu tamponné. Cependant, dans le cas de **64** la distribution est bimodale (cf. Figure 3-26). Différentes mesures ont été effectuées en faisant varier la concentration entre 10⁻³M et 5 10⁻⁵M et le même type de distribution a été obtenu à chaque fois. La première population correspond à des objets d'une taille de 68 ± 11 nm et la seconde à des objets de 261 ± 56 nm d'après les mesures effectuées à 5 10⁻⁵ M. Des tailles similaires ont été obtenues pour les deux populations aux autres concentrations testées. Les assemblages formés par **64** sont beaucoup plus gros que ceux observés avec **63** (un ordre de grandeur de plus pour les plus petits).

La DLS n'apporte pas d'information quand à la morphologie des assemblages. Il est possible dans le cas de **64**, que les objets formés ne soient pas des sphères, mais des empilements en forme de spirale comme déjà observé dans la littérature (cf. Figure 3-16). Les dimensions de **64**, obtenues par modélisation moléculaire (de l'ordre de 2 nm de

diamètre) montrent qu'il faut considérer l'empilement d'un très grand nombre de CTV pour obtenir de tels assemblages, il sera donc très difficile de prouver la structure de l'assemblage par modélisation moléculaire. En revanche, des techniques de microscopie comme le TEM pourraient permettre d'observer ces assemblages de façon plus précise. Cependant nous avons pu le faire encore pour **63**. L'AFM pourrait également permettre d'obtenir des informations sur la morphologie des assemblages. Malheureusement, par faute de temps de telles expériences n'ont pu être encore réalisées.

Malgré ces observations, nous avons souhaité tester les propriétés de reconnaissance de **64** avec différentes cibles.

2. Etude de reconnaissance par spectrofluorimétrie

Une concentration en CTV de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M a été utilisée pour réaliser les titrages des différentes espèces en fluorescence. Celle-ci permettant d'être dans la zone de linéarité, et en même temps d'avoir un signal de fluorescence intéressant. Il est impossible de savoir si les assemblages sont identiques à cette concentration. Pour **64**, deux temps de vie, ont été observés en milieu aqueux. Ceci montre l'existence de deux populations différentes de fluorophore. Ces deux types d'espèces émissives pourraient provenir de deux types d'assemblages différents. Cependant, elles pourraient également provenir de différentes molécules de **64** situé au cœur ou à la surface des particules.

Dans la continuité des études précédentes, les premiers titrages ont été faits pour l'Ach et la Ch. Aucune modification de fluorescence n'a été observée lors de l'ajout de ces deux cibles. L'absence de modification en présence d'Ach ou de Ch, pourrait être liée à la structure des assemblages formés par **64**, différents de ceux formés par **63**. L'étude sur la première génération de sonde a montré que l'affinité pour l'Ach ou la Ch, dépendait peu des groupements, dans le cas où ils étaient chargés négativement.

Des titrages en présence d'autres neurotransmetteurs présentant des structures différentes ont été envisagés. La famille des catécholamines (dopamine, adrénaline, cf. Figure 3-27) a été choisie, car dans ce cas plusieurs types d'interactions sont envisageables. Tout d'abord, comme pour l'Ach ou la Ch, des interactions électrostatiques ou π -cations entre l'ammonium primaire de la cible et les aromatiques de la sonde sont possibles. Ensuite, des interactions π - π entre l'aromatique de la cible et ceux de la sonde pourraient avoir lieu. Enfin, une liaison hydrogène entre le phénol (de la fonction catéchole) de la cible et l'un des phosphonates de la sonde, pourraient également exister et renforcer l'interaction.

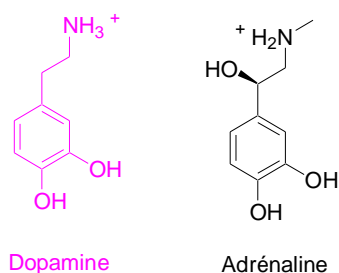


Figure 3-27 : Deux neurotransmetteurs de la famille des catécholamines, la dopamine et l'adrénaline.

L'ajout de dopamine ou d'adrénaline la solution de CTV **64** induit une extinction de sa fluorescence (cf. Figure 3-30). Ainsi **64** fonctionne comme une sonde « on-off », avec une extinction quasi-totale dans le cas de la dopamine, l'effet est un peu moins important dans le cas de l'adrénaline (~ 50 %) (cf. Figure 3-30).

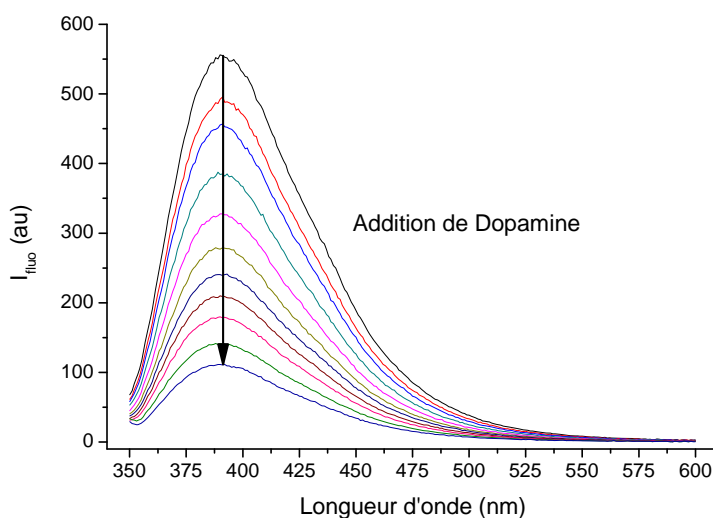


Figure 3-28 : Spectre d'émission du CTV **64** lors du titrage de la dopamine, dans l'HEPES à 25°C, avec une excitation à 345 nm.

Les constantes d'association ont été déterminées en faisant l'hypothèse de la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1 comme pour les cas précédents. Les constantes d'association sont respectivement de $312 \pm 22 \text{ M}^{-1}$ pour la dopamine, et de $253 \pm 15 \text{ M}^{-1}$ pour l'adrénaline. Ce modèle semble convenir vu les coefficients de corrélation obtenus (>0.99). La limite de détection se situe à $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, si la limite de détection choisie constitue une variation d'aire de la fluorescence supérieure à 5 %.

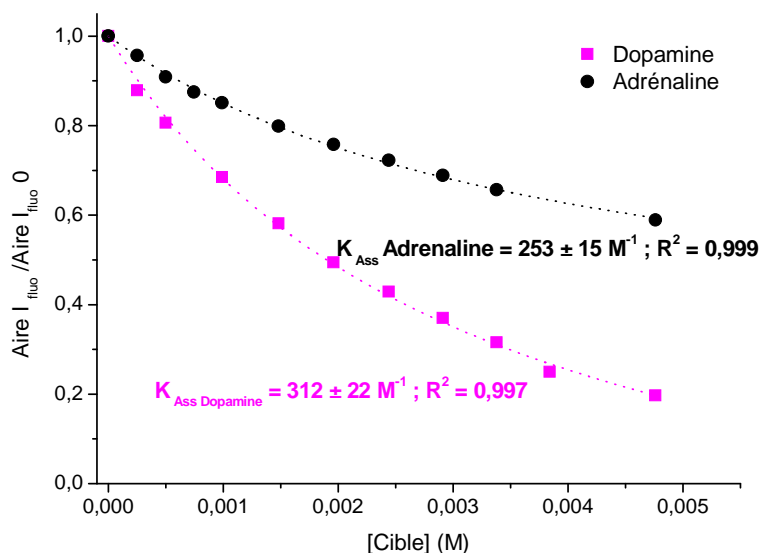


Figure 3-29 : Courbes représentant les aires du spectre d'émission du CTV 64, lors du titrage de la dopamine et de l'adrénaline en présence dans l'HEPES, à 25 °C.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des interactions observées, des titrages par spectrofluorimétrie complémentaires ont été réalisés. Tout d'abord, afin de tester l'importance de l'ammonium primaire, le 2-phényléthylammonium (PhRNH₃) a été titré (cf. Figure 3-30). Aucune modification de la fluorescence n'ayant été observée, il semblerait que celui-ci ne soit pas reconnu par la sonde (cf. Figure 3-31). La fonction ammonium ne semble donc pas jouer un rôle dans le processus de reconnaissance. Si des interactions électrostatiques ou π -cation peuvent exister, elles ne sont pas suffisantes. De même, au vu des résultats pour le 2-phényléthylammonium, il semble que des interactions π - π ne puissent pas expliquer l'affinité de la sonde **64** pour la dopamine et l'adrénaline.

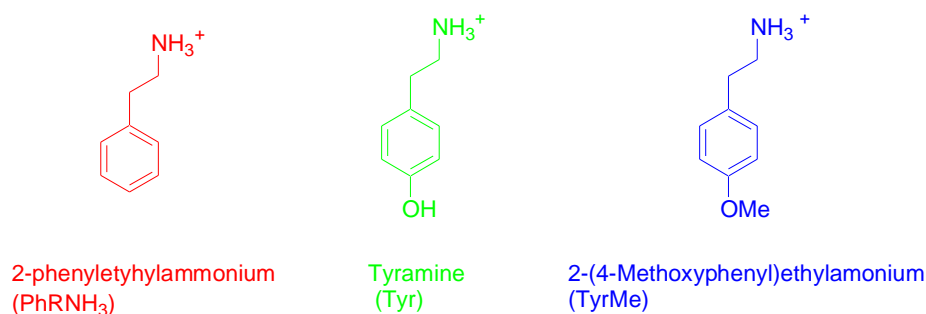


Figure 3-30 : Molécules complémentaires ayant été testées comme cibles potentielles avec le CTV 64, dans le tampon HEPES, par spectrofluorimétrie.

Ensuite, pour mieux comprendre le rôle du groupement catéchol, les titrages de la tyramine (cf. Tyr, Figure 3-30) qui ne possède qu'un seul phénol, ainsi que de son analogue méthylé, le 2-(4-méthoxyphényl)éthylammonium (cf. TyrMe, Figure 3-30) ont été réalisés. Ce dernier nous permettant également de mettre en évidence l'importance d'une éventuelle liaison hydrogène. Les cibles testées en complément, gardent une fonction ammonium primaire pour des questions de solubilité en milieu aqueux (surtout pour le dérivé éther).

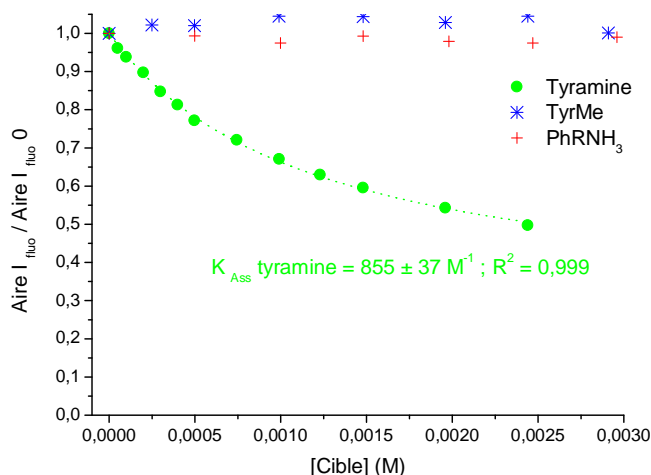


Figure 3-31 : Titrage par spectrofluorimétrie de la tyramine, du 2-(4-méthoxyphényl)éthylammonium, et du 2-phényléthylammonium en présence du CTV 64, dans l'HEPES, à 25 °C.

De même que pour l'adrénaline et la dopamine, l'ajout de tyramine éteint la fluorescence de la sonde (cf. Figure 3-31). En revanche, la fluorescence en présence du 2-phényléthylammonium est stable (cf. Figure 3-31). La constante d'association pour la tyramine a pu être déterminée en utilisant l'équation correspondant à la formation d'un complexe de stœchiométrie 1:1 pour le complexe formé, comme dans les cas précédents (cf. Tableau 3-8).

Cibles	$K_{\text{Association}} (M^{-1})$	R^2
Dopamine	312 ± 22	0,999
Adrénaline	253 ± 15	0,997
Tyramine	855 ± 37	0,999
TyrMe	/	/
PhRNH3	/	/

Tableau 3-8 : Récapitulatif des constantes d'association obtenues par spectrofluorimétrie pour divers cibles en présence du CTV 64 dans le tampon HEPES.

Les résultats obtenus montrent le rôle essentiel de la fonction phénol. En effet, la tyramine qui possède une fonction phénol, est détectée de même que les cibles portant des groupements catéchols, alors que la cible ne portant pas de phénol (RPhNMe3) ne l'est pas. L'absence d'interactions entre la sonde et l'analogue étheré de la tyramine (TyrMe), confirme l'importance de la fonction phénol. Celle-ci intervenant très probablement dans la reconnaissance à travers une liaison hydrogène. D'après les constantes d'association, l'affinité pour la tyramine qui ne possède qu'une fonction phénol est plus importante que pour les cibles de type catécholamine (cf. Tableau 3-8). Une solvataion plus importante du groupement catéchol, de part la présence de deux phénols, pourrait expliquer cette différence (plus grande difficulté à former une liaison hydrogène car la désolvataion est plus difficile).

Le tampon HEPES comporte une fonction amine primaire, aussi nous avons voulu vérifier que celle-ci n'entraîne pas en compétition avec nos cibles en changeant de tampon. Le titrage de la dopamine a donc été fait dans le PBS, 140 mM, pH 7,4. Une extinction de la fluorescence comparable à celle observée dans l'HEPES a été obtenue. La constante d'association déterminée est de $324 \pm 16 \text{ M}^{-1}$ ($R^2 = 0,999$), indiquant que le tampon ne semble pas entrer en compétition lors de la reconnaissance.

De façon générale, la reconnaissance de cibles aromatiques par cette sonde **64**, induit une extinction de la fluorescence. Un transfert d'électron photo-induit est souvent évoqué dans la littérature, pour expliquer l'extinction de la fluorescence pour les sondes à catécholamine (PET, du groupement catéchol riche en électrons vers la sonde).³⁶⁻⁴⁰ Il en est peut être de même dans le cas de la sonde **64**.

Des expériences de calorimétrie ont été envisagées, afin de confirmer la reconnaissance et de mieux comprendre les interactions observées.

*3. Etude de reconnaissance du CTV **64** par microcalorimétrie*

Les expériences de titrages calorimétriques isothermes ont été réalisées en collaboration avec le Prof. Gilles Sigaud et le Dr. François Dole de l'équipe des auto-assemblages et biomolécules du Centre de Recherche Paul Pascal (CRPP) de Bordeaux.

Tout d'abord, le titrage de la tyramine a été envisagé car c'est l'espèce la mieux reconnue d'après les titrages en fluorescence (cf. Figure 3-32). Ensuite, il n'a pas été possible de réaliser le titrage pour la dopamine et l'adrénaline car celles-ci s'oxydent trop rapidement à l'échelle d'une expérience d'ITC (la solution d'injectant ne pouvant être changée au cours du titrage, contrairement au cas de la spectrofluorimétrie). En revanche, le titrage par microcalorimétrie pour une espèce non reconnue par fluorescence, le 2-phényléthylammonium (PhRNH_3) a été réalisé pour voir ce qu'il en était d'un point de vue thermodynamique (cf. Figure 3-32). Des solutions à 20 mM dans l'HEPES en cible ont été ajoutées sur une solution de sonde à 10^{-3} M dans l'HEPES.

D'après les thermogrammes, seule la tyramine semble être reconnue. Ceci confirme les résultats obtenus par spectrofluorimétrie. De plus, il confirme l'importance de la fonction phénol, pour qu'il y ait reconnaissance par la sonde **64** de la cible. Une liaison hydrogène forte a probablement lieu entre la cible et la sonde fluorescente **64**. Elle semble être la force motrice de la reconnaissance. Des études sur l'un des récepteurs à dopamine présent chez l'être humain, ont permis de mettre en avant l'importance de deux liaisons hydrogènes entre le groupement catéchols et deux sérines présentes sur le récepteur, dans le processus de reconnaissance *in vivo*.^{41,42}

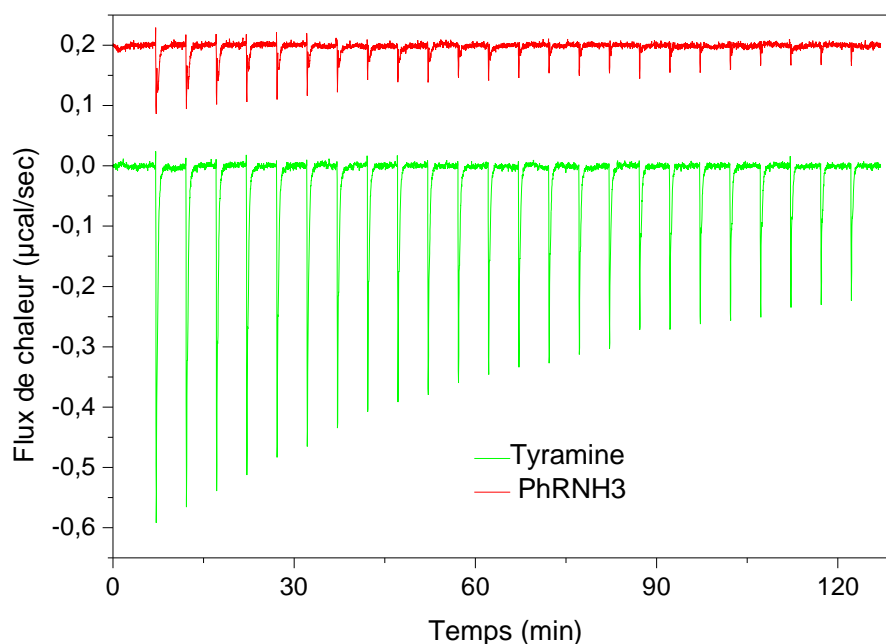


Figure 3-32 : Thermogrammes correspondant aux titrages de la tyramine et du 2-phényléthylammonium (PhRNH₃) avec le CTV 64 dans le tampon HEPES. Le thermogramme pour le 2-phényléthylammonium a été décalé en ordonnée, pour plus de lisibilité.

L'enthalpie (ΔH) du processus de reconnaissance de la tyramine est de -1746 ± 70 cal.mol⁻¹ et l'entropie (ΔS) de $5,25$ cal.mol⁻¹.K⁻¹. La reconnaissance est un processus exothermique, avec une composante enthalpique et entropique favorable ($\Delta H < 0$ et $-T\Delta S < 0$). Les valeurs des termes enthalpiques ($\Delta H = -1746$ cal.mol⁻¹) et entropiques ($-T\Delta S = -1564,5$ cal.mol⁻¹) sont très proches. Ainsi, il est difficile d'avoir des informations sur la nature des interactions mises en jeux.

Rebek *and co.* ont développé un cavitant permettant de complexer des ammoniums quaternaires telles que la Ch ou l'Ach dans l'eau (cf.

Figure 3-33).⁴³ Les résultats obtenus par microcalorimétrie pour les complexes formés ont révélés que la contribution enthalpique était favorable, tout comme celle entropique, et que celles-ci étaient proches.⁴³ D'après les auteurs, deux types d'interactions différentes pourraient être à l'origine de chacune d'entre elles. Des interactions électrostatiques ou π -cations seraient à l'origine du terme enthalpique, alors que des effets hydrophobes expliqueraient le terme entropique relativement fort.⁴³ Peu après, les capacités de reconnaissance de ce même cavitant envers des cibles non chargées ont également été étudiées par microcalorimétrie. Ils ont alors observés une contribution entropique majoritaire.⁴⁴ D'après les auteurs celle-ci était lié, là encore, à des effets hydrophobes plus forts que dans le cas précédent (à cause de l'absence de charge notamment).⁴⁴

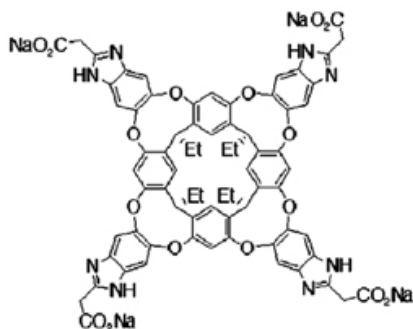


Figure 3-33 : Structure du cavitant développé par l'équipe de Rebek et dont les propriétés de reconnaissance ont été évaluées par ITC.

Dans le cas de la sonde **64** développée au laboratoire, la liaison hydrogène entre le phénol de la cible et l'un des phosphonates semble jouer un rôle important dans la reconnaissance. Par ailleurs, des interactions de type π -cation ou électrostatiques entre l'ammonium de la cible et les aromatiques ou les phosphonates ont peut-être lieu. Celles-ci, en plus de la liaison hydrogène, pourraient être à l'origine du terme enthalpique favorable. Des interactions complémentaires π - π (entre l'aromatique de la cible et ceux de la cage) ou des effets hydrophobes, voire d'autres liaisons hydrogènes entre l'ammonium et les éthers sont également envisageables. Si la complexation de la cible au sein de la cavité ou des assemblages, s'accompagne de l'expulsion de molécules de solvant, on comprend que le terme entropique soit favorable et non négligeable.

La constante d'association du complexe entre la sonde et la tyramine a pu être déterminée (cf. Figure 3-34) en faisant l'hypothèse d'une stœchiométrie 1:1 pour le complexe formé. Celle-ci vaut $269 \pm 18 \text{ M}^{-1}$ d'après le titrage par microcalorimétrie. Celle-ci est trois fois plus faible que celle obtenue par spectrofluorimétrie de $855 \pm 37 \text{ M}^{-1}$.

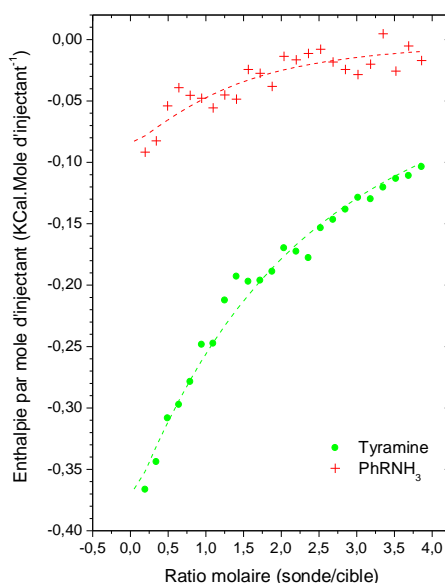


Figure 3-34 : Courbes représentant l'enthalpie par mole d'injectant en fonction du ratio (sonde/cible), pour les titrages de la tyramine (en vert) et du PhRNH₃ (en rouge).

La différence obtenue pour les constantes d'association (par fluorimétrie et par microcalorimétrie) pourrait venir du fait que, par calorimétrie les interactions entre la sonde et la cible sont observées à l'état fondamental, alors que par spectrofluorimétrie on mesure des interactions entre la sonde à l'état excitée et la cible. A l'état excité, plusieurs paramètres sont influencés, comme par exemple la densité électronique des fluorophores possédant d'un PCT. Les interactions observées avec la cible peuvent donc être différentes. En particulier, une liaison hydrogène qui serait possible entre le phénol de la tyramine (donneur) et le phosphonate (accepteur) peut être influencée par la densité électronique du groupement phosphonate.

4. Conclusions

Le CTV **64** permet la détection par fluorescence de neurotransmetteurs de la famille des catécholamines telles que la dopamine ou l'adrénaline. Celle-ci fonctionne en « on-off » avec un facteur d'extinction plus important dans le cas de la dopamine (90 %) par rapport à l'adrénaline (40 %). L'extinction est probablement liée à un transfert de proton photon-induit entre la cible et la sonde. Les constantes d'association déterminées par spectrofluorimétrie pour ces deux espèces en milieu quasi-physiologique sont proches ($K_{\text{Association}} \text{ dopamine} = 312 \pm 22 \text{ M}^{-1}$ et $K_{\text{Association}} \text{ adrénaline} = 253 \pm 15 \text{ M}^{-1}$). Les constantes d'association obtenues sont plus faibles (deux ordres de grandeur) que celles décrites dans la littérature par Glass *and co.*, avec une sonde fluorescente fonctionnant en tampon aqueux à pH 7.³⁶ Cependant, contrairement à celle développée au laboratoire, la sonde développée par Glass *and co.* détecte la dopamine grâce à la formation de liaisons covalentes. De telles sondes peuvent perturber l'activité neuronale *in vivo*. De plus, il est fort probable que de telles structures ne soient pas inertes envers les sucres, présent dans le système nerveux.

Comme pour les sondes développées dans la littérature, aucune sélectivité n'est observée entre la dopamine et l'adrénaline avec la sonde fluorescente **64**.^{30,31,32} La noradrénaline restant à tester. En revanche cette sonde est sélective par rapport à d'autres neurotransmetteurs possédant des ammoniums quaternaires tels que l'Ach et la Ch.

La limite de détection par spectrofluorimétrie pour les catécholamines est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. La limite de détection la plus basse, décrite dans la littérature par Chang *and co.* en tampon aqueux, avec encore une sonde basée sur une liaison covalente entre la fonction catéchole et un boronate, est de 10^{-4} M.³⁹ La sonde développée au laboratoire est donc comparable.

L'étude des interactions potentielles entre la sonde et ces cibles, grâce aux titrages d'espèces complémentaires par spectrofluorimétrie, a révélé l'importance du groupement catéchol probablement pour sa capacité à donner une liaison hydrogène, avec l'un des groupements phosphonate de la sonde (cf. constantes d'association pour les autres espèces titrées, notamment l'analogue méthylé, TyrMe).

En parallèle une étude par microcalorimétrie a été réalisée en collaboration avec le Prof. G. Sigaud et le Dr. F. Dole. Celle-ci n'a pas pu être faite directement sur les cibles d'intérêt biologique à cause de leur trop grande instabilité en tampon HEPES. Ainsi, elle a été menée sur deux molécules commerciales, la tyramine et le PhRNH₃. Seule la tyramine est détectée par la sonde d'après cette méthode. Ces résultats sont donc en accord avec ceux observés en spectrofluorimétrie. Le processus de reconnaissance est favorable d'un point de vue enthalpique (donc exothermique) mais également d'un point de vue entropique. De plus, ces deux contributions sont quasiment identiques. Ainsi, il est difficile d'aller plus loin dans la détermination des interactions mises en jeux. Néanmoins, cette méthode a permis de confirmer le rôle essentiel du groupement phénol sur la cible, pour avoir une reconnaissance.

La constante d'association obtenue pour la tyramine, par ITC est plus de trois fois plus faible que celle obtenue par spectrofluorimétrie. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en microcalorimétrie on observe les interactions avec la sonde à l'état fondamental, alors que la spectrofluorimétrie permet d'observer celles qui ont lieux avec la sonde à l'état excité. Dans le cas de la sonde développée, les interactions seraient amplifiées à cause du transfert de charge photo-induit.

La formation d'assemblages à été mise en évidence par DLS. Cependant, il n'a pas encore été possible de déterminer leurs structures, des expériences de TEM et d'AFM doivent être réalisées dans cette optique. Ainsi, il est difficile de comprendre les interactions observées avec certaines cibles (dopamine et adrénaline notamment).

D. Conclusions générales

Tout d'abord, la possibilité d'étendre les unités aromatiques par conjugaison grâce au couplage de Sonogashira a été démontrée. De nombreux groupements (électro-donneurs ou électro-attracteurs) ont ainsi été introduits sur le squelette du CTV. Cette réaction a été menée à partir du CTV tri-iodé **6**, réaffirmant ainsi son intérêt comme intermédiaire de synthèse. Dans le cas de nitriles, très fortement attracteurs, des soucis de solubilité nous ont amené à utiliser le CTV tri-iodé **37**, portant des chaînes plus longues sur les éthers. La déprotection de différents groupements acido-basiques (acides carboxyliques, phosphonate, ou phénol) ont permis en une étape d'obtenir des CTVs solubles dans l'eau.

L'enrichissement du système π des unités aromatiques composant les CTVs a permis de déplacer de façon bathochrome les spectres d'absorption (de 20 nm en moyenne par rapport aux analogues moins conjugués substitués par les mêmes groupements). Les spectres d'émission ont été déplacés de façon plus importante vers le visible, grâce à l'effet combiné de l'extension de conjugaison et d'un transfert de charge photo-induit. Ce dernier permet d'avoir des déplacements de Stokes proches de 100 nm pour les meilleurs couples électro-donneurs/électro-attracteurs en milieu polaire (DMSO ou eau). Les rendements quantiques de fluorescence sont plus élevés en moyenne pour ces nouveaux CTVs comparés aux analogues moins conjugués.

Les deux sondes **63** et **64** s'auto-assemblent pour former des particules en milieu aqueux tamponné. Le CTV **63** forme des particules relativement sphériques d'une taille de l'ordre de 5 nm d'après des expériences de DLS et TEM. La sonde **64** en revanche forme des assemblages beaucoup plus gros dont la morphologie n'a pas encore été identifiée. Dans les deux cas des expériences complémentaires doivent être menées afin de mieux comprendre les structures de ces assemblages.

En ce qui concerne les propriétés de complexation, le CTV **63**, reconnaît avec une bonne affinité l'Ach en milieu physiologique ($K_{\text{association Ach}} = 512 \text{ M}^{-1}$). Cette sonde fonctionne de façon « off-on » avec un facteur d'amplification de 40 %. De plus elle présente une sélectivité de l'ordre d'un peu plus d'un facteur 2 pour l'Ach par rapport à la choline ($K_{\text{association Ch}} = 240 \text{ M}^{-1}$). Un titrage de la dopamine avec cette sonde a également été réalisé. L'ajout de dopamine induit une extinction de la fluorescence d'environ 80 %, et la constante d'affinité pour la dopamine est de $227 \pm 16 \text{ M}^{-1}$. Les interactions observées n'ont pas pu être déterminées précisément, mêmes si des effets hydrophobes semblent intervenir d'après les études en fluorescence. La formation de particules de **63**, mise en évidence par DLS et imagerie TEM, est également à prendre en considération pour comprendre ces interactions. Aussi, des études de modélisation moléculaire sont en cours, afin de déterminer la structure des particules formées ainsi que les interactions potentielles expliquant la reconnaissance de l'Ach.

La sonde **64**, quant à elle, ne reconnaît pas l'Ach et la Ch. En revanche, elle présente une certaine affinité pour la dopamine et l'adrénaline. La présence de dopamine dans une solution de **63**, induit une extinction de la fluorescence de celle-ci. Les constantes d'affinité obtenues par spectrofluorimétrie sont respectivement de 312 M^{-1} pour la dopamine, et 253 M^{-1} pour l'adrénaline. L'existence d'interactions entre la sonde **64** et des dérivés de phénol comme les catéchol a été confirmée par des études en microcalorimétrie. D'après ces études le processus de reconnaissance pour de telles espèces est exothermique et entropiquement favorable. Les interactions à l'origine de ces cibles n'ont pu être déterminées clairement. Néanmoins, les études en microcalorimétrie et en fluorescence, ont permis de mettre en évidence l'importance de la fonction phénol qui forme, probablement, une liaison hydrogène avec la sonde. Les interactions observées pourraient être liées à la structure des assemblages formés.

Les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance du CTV **62**, n'ont pas encore été explorées totalement faute de temps mais sont à l'étude.

Finalement, l'extension de conjugaison s'est révélée être intéressante à de nombreux titres : déplacements bathochromes des spectres plus intéressants, rendement quantique de fluorescence meilleurs, et affinités pour les cibles plus grandes. Ainsi, nous avons décidé de continuer dans cette voie, en explorant un autre type de conjugaison. Ceci fera l'objet du chapitre suivant.

Références bibliographiques

- (1) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic Chemistry*; 2nd ed.; Oxford University Press, 2012.
- (2) Silverstein, R. M.; Basler, C. G.; Morill, T. C. *Identification spectrométrique de composés organiques*; De Boeck, 2004.
- (3) Dumartin, M.-L. Synthèse de sondes fluorescentes pour la détection de l'acétylcholine **2007**.
- (4) Mongin, O.; Porrès, L.; Charlot, M.; Katan, C.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1481–1498.
- (5) Marsden, J. A.; Miller, J. J.; Shirtcliff, L. D.; Haley, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2464–2476.
- (6) Barzoukas, M.; Blanchard-Desce, M. *J Chem Phys* **2000**, *113*, 3951–3959.
- (7) Leu, W. C. W.; Fritz, A. E.; Digianantonio, K. M.; Hartley, C. S. *J. Org. Chem.* **2012**.
- (8) Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J.-L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J.-Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Röckel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X.-L.; Xu, C. *Science* **1998**, *281*, 1653–1656.
- (9) Belfield, K. D.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Schafer, K. J.; Negres, R. A. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1575–1578.
- (10) De Meijere, A.; Diederich, F. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*; 2nde ed.; Wiley-VCH, 2004; Vol. 1.
- (11) Laue, T.; Plagens, A. *Named Organic Reactions*; 2nd ed.; John Wiley & Sons, 2005.
- (12) Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Letters* **1975**, *16*, 4467–4470.
- (13) He, G. S.; Tan, L.-S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.
- (14) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- (15) Yao, S.; Belfield, K. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3199–3217.
- (16) Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; 4th ed.; John Wiley & Sons, 2007.
- (17) Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 229–235.
- (18) Terenziani, F.; Katan, C.; Badaeva, E.; Tretiak, S.; Blanchard-Desce, M. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4641–4678.

- (19) Fan, H. H.; Li, K. F.; Zhang, X. L.; Yang, W.; Wong, M. S.; Cheah, K. W. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 3879–3881.
- (20) Diaspro, A.; Bianchini, P.; Vicidomini, G.; Faretta, M.; Ramoino, P.; Usai, C. *BioMedical Engineering OnLine* **2006**, 5, 36.
- (21) Cho, B. R.; Son, K. H.; Lee, S. H.; Song, Y.-S.; Lee, Y.-K.; Jeon, S.-J.; Choi, J. H.; Lee, H.; Cho, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10039–10045.
- (22) Malthête, J.; Collet, A. *Nouv. J. Chim.* **1985**, 9, 151–153.
- (23) Malthete, J.; Collet, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7544–7545.
- (24) Poupko, R.; Luz, Z.; Spielberg, N.; Zimmermann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6094–6105.
- (25) Lesot, P.; Merlet, D.; Sarfati, M.; Courtieu, J.; Zimmermann, H.; Luz, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10071–10082.
- (26) Zimmermann, H.; Bader, V.; Poupko, R.; Wachtel, E. J.; Luz, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 15286–15301.
- (27) Percec, V.; Imam, M. R.; Peterca, M.; Wilson, D. A.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1294–1304.
- (28) Peterca, M.; Percec, V.; Imam, M. R.; Leowanawat, P.; Morimitsu, K.; Heiney, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14840–14852.
- (29) Givélet, C.; Buffeteau, T.; Arnaud-Neu, F.; Hubscher-Bruder, V.; Bibal, B. *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5059–5062.
- (30) Wyman, I. W.; Macartney, D. H. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 253–260.
- (31) Korbakov, N.; Timmerman, P.; Lidich, N.; Urbach, B.; Sa'ar, A.; Yitzchaik, S. *Langmuir* **2008**, 24, 2580–2587.
- (32) Garel, L.; Lozach, B.; Dutasta, J. P.; Collet, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11652–11653.
- (33) Berryman, O. B.; Sather, A. C.; Rebek, J. *Org. Lett.* **2011**, 13, 5232–5235.
- (34) Ballester, P.; Shivanyuk, A.; Far, A. R.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14014–14016.
- (35) Hof, F.; Trembleau, L.; Ullrich, E. C.; Rebek, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 3150–3153.
- (36) Secor, K. E.; Glass, T. E. *Org. Lett.* **2004**, 6, 3727–3730.
- (37) Yoon, J.; Czarnik, A. W. *Bioorgan. Med. Chem.* **1993**, 1, 267–271.
- (38) Lee, J.-S.; Kim, H. K.; Feng, S.; Vendrell, M.; Chang, Y.-T. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2339–2341.
- (39) Guo, Z.; Shin, I.; Yoon, J. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5956–5967.

- (40) Jang, Y.-J.; Jun, J.-H.; Swamy, K. M. K.; Nakamura, K.; Koh, H.-S.; Yoon, Y.-J.; Yoon, J.-Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2005**, *26*, 2041–2043.
- (41) Liapakis, G.; Ballesteros, J. A.; Papachristou, S.; Chan, W. C.; Chen, X.; Javitch, J. A. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 37779–37788.
- (42) Kalani, M. Y. S.; Vaidehi, N.; Hall, S. E.; Trabanino, R. J.; Freddolino, P. L.; Kalani, M. A.; Floriano, W. B.; Kam, V. W. T.; Goddard, W. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 3815–3820.
- (43) Biro, S. M.; Ullrich, E. C.; Hof, F.; Trembleau, L.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2870–2876.
- (44) Hooley, R. J.; Van Anda, H. J.; Rebek, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13464–13473.
- (45) Raymo, F. M.; Cejas, M. A. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3183–3185.

Chapitre 4 Sondes fluorescentes obtenues par « chimie click »

Afin de modifier les propriétés spectroscopiques et de reconnaissance, le développement d'une nouvelle série de CTVs a été envisagé. L'intérêt d'un point de vue spectroscopique, d'avoir un système fortement conjugué riche en électrons π , ainsi que des couples de groupements électro-donneurs/électro-accepteurs sur les unités aromatiques du CTV a été démontré dans le chapitre précédent. Aussi, il a été envisagé de conserver la structure générale des CTVs de seconde génération, formée de trois unités type « push-pull », mais d'assembler les éléments donneur/accepteur de ces unités, *via* un lien triazole (cf. Figure 4-1). En effet, il a été montré récemment dans la littérature, que les triazoles se comportent comme des liens π permettant d'étendre la conjugaison entre des groupements électro-donneurs et électro-attracteurs.^{1,2,3,4,5,6,7}

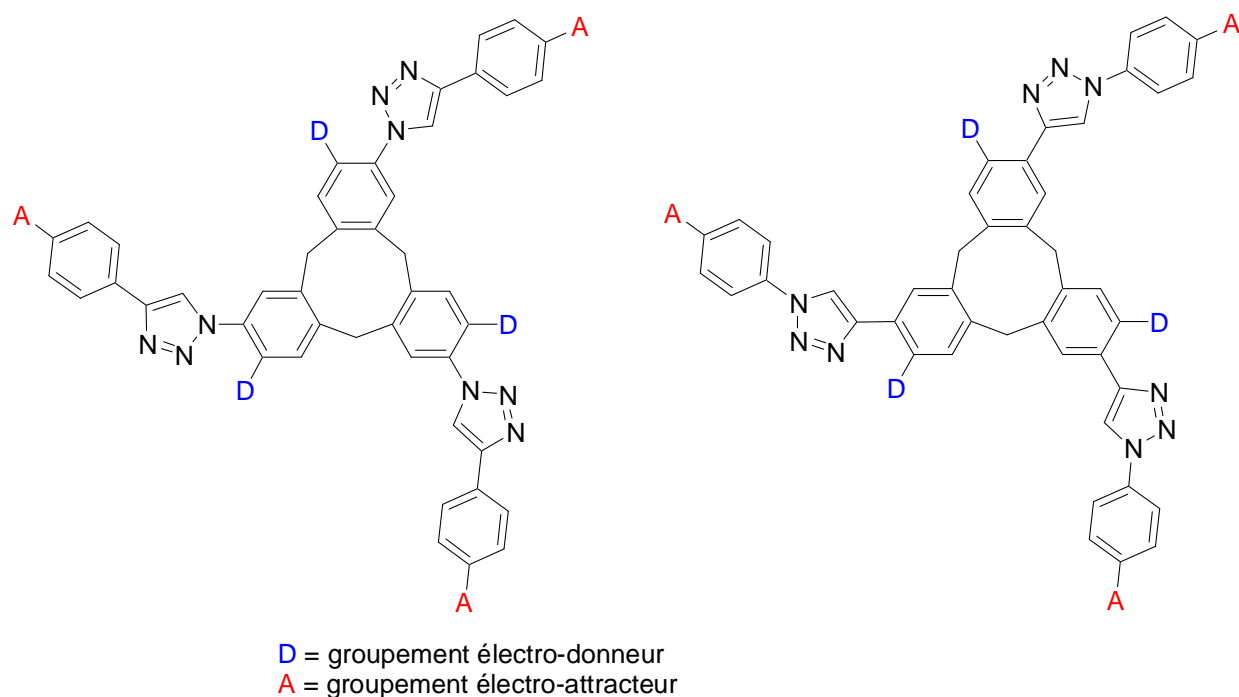


Figure 4-1 : Structures des CTVs envisagés au cours de cette étude.

La géométrie des CTVs de cette nouvelle génération sera probablement différente et ceci pourrait avoir un effet sur la formation d'éventuels assemblages et sur la reconnaissance. De plus, les liens triazoles, de par la présence de trois hétéroatomes, pourrait être le siège d'interactions supplémentaires avec les cibles ; les azotes du triazole étant par exemple, des accepteurs de liaisons hydrogènes.

D'un point de vue synthétique, la formation du triazole peut se faire par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre, entre un alcyne vrai et un azoture.⁸ Deux possibilités sont alors envisageables, selon que le CTV de départ soit substitué par des alcynes vrais ou des azotures (cf. Figure 4-1). Il est à noter qu'aucune voie de synthèse de tels CTVs intermédiaires n'a été décrite jusqu'à présent dans la littérature.

Peu d'études ont été faites quant à l'impact sur les propriétés spectroscopiques de la position respective des groupements électro-donneurs et électro-attracteurs sur le lien triazole, notamment au niveau du transfert de charge photo-induit.^{3,5} Il semblerait d'après une étude faite par Bag *et al.* que les rendements quantiques soient meilleurs quand le groupement électro-donneur est apporté par l'azoture, et le groupement électro-attracteur par l'alcyne.⁵

Dans ce chapitre, la synthèse des premiers CTVs possédant une extension de conjugaison par des liens triazoles, sera présentée. Ensuite, les propriétés spectroscopiques de ces CTVs seront étudiées. Enfin, les premiers résultats quant aux propriétés de reconnaissance d'un de ces CTVs soluble dans l'eau seront discutés.

A. Synthèse de CTVs conjugués par « chimie click »

a. Triazole et Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre

La première réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture, conduisant à la formation d'un 1,2,3-triazole, a été décrite par Huisgen en 1963 (cf. Figure 4-2).⁹ Cette réaction nécessite une activation thermique. De plus, elle conduit à la formation de deux régioisomères 1,4- et 1,5-disubstitués (cf. Figure 4-2) le plus souvent en proportions équivalentes, pas toujours évidents à séparer. Aussi, l'absence de régiosélectivité et les conditions de température élevée (souvent > 100°C pendant plusieurs heures) ont limité l'utilisation de cette cycloaddition de Huisgen.⁸

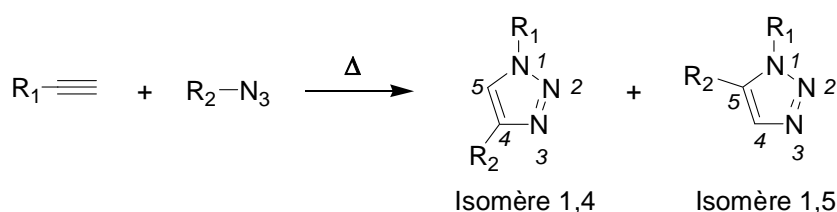


Figure 4-2 : Schéma de synthèse d'une cycloaddition de Huisgen.⁹

Le recours à une catalyse au cuivre (I) afin d'améliorer cette réaction sera proposé simultanément par l'équipe de Sharpless, et celle de Meldal, en 2002.^{10,11} La cycloaddition catalysée au cuivre (CuAAC) permet d'obtenir sélectivement le régioisomère 1,4 avec de très bons rendements (cf. Figure 4-3). De plus, celle-ci a lieu dans des conditions douces de température, dans divers solvants y compris l'eau, et rapidement.^{12,8} Enfin, elle tolère de très nombreux groupements (électro-attracteurs, électro-donneurs, encombrés).⁸

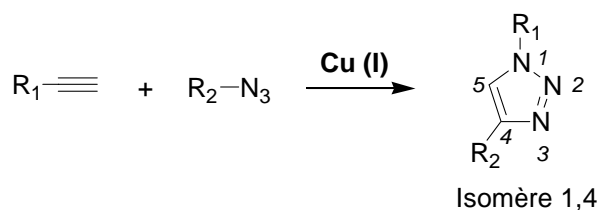


Figure 4-3 : Schéma de synthèse de la cycloaddition 1,3 catalysée au Cuivre (CuAAC).

Le mécanisme de la CuAAC a été proposé par Fokin *and co.* en 2002 (cf. Figure 4-4).¹⁰ La première étape (étape A) consiste en une insertion du cuivre au niveau de l'alcyne, en présence d'une base permettant la déprotonation de ce dernier. Un acétylure de cuivre (espèce b) est ainsi formé. Ensuite (étape B), l'azoture va substituer un des ligands de l'acétylure de cuivre précédemment formé. Un nouveau complexe acyclique est ainsi formé (espèce c). Le doublet non liant de l'azote terminal de l'azoture va alors attaquer l'alcyne conduisant à la formation d'un metallocène (espèce d). Le cycle formé va subir une contraction (espèce e) et finalement, une protéolyse va conduire à la formation du triazole attendu substitué en 1,4 et à la régénération du catalyseur. Ce mécanisme est simplifié et de

nombreuses inconnues (comme le nombre de cuivre impliqué dans les complexes) persistent, notamment pour expliquer la régiosélectivité.^{8,12}

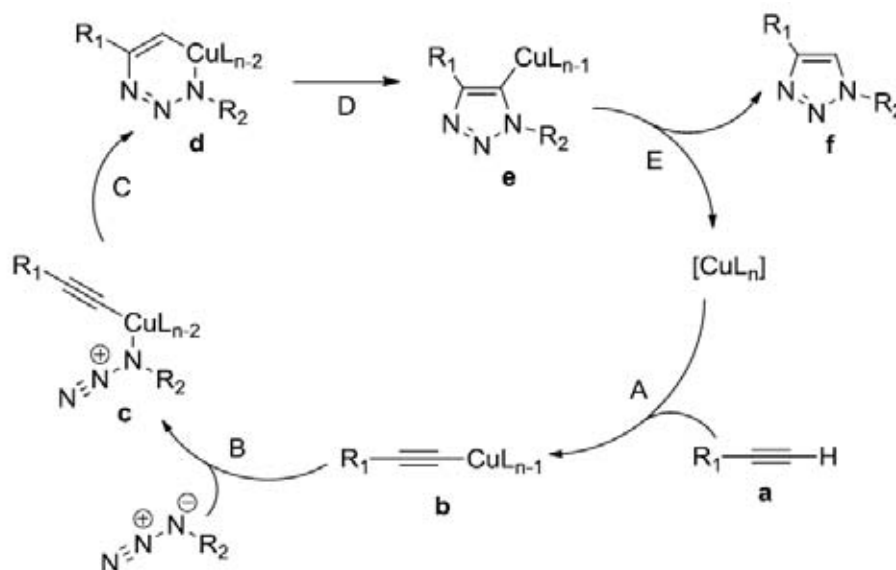


Figure 4-4 : Mécanisme simplifié de la CuAAC adapté de celui proposé par Fokin *and co.*¹⁰

L'espèce active est le cuivre (I). Celui-ci peut être introduit par exemple directement sous la forme d'iodure de cuivre (CuI).¹¹ Cependant, son instabilité à l'air rend son utilisation peu commode. Une solution pour le rendre moins sensible peut être l'utilisation d'un ligand tel la tris(triazolylmethyl)amine.^{13,14} Toutefois, le cuivre (I) est le plus souvent formé *in situ* à partir de Cuivre (II) en présence d'un réducteur.^{8,12} Le sulfate de cuivre (II) en présence d'ascorbate de sodium est couramment utilisé pour former du cuivre (I), entre autres à cause de sa solubilité en milieu aqueux, milieu largement employé pour les réactions de CuAAC.

Suivant le degré d'oxydation de l'espèce cuivrée utilisée, une base plus ou moins forte est nécessaire. En effet, dans le cas où le cuivre (I) est formé *in situ* celle-ci n'a pas besoin d'être forte. Dans le cas où l'on utilise du sulfate de cuivre en présence d'ascorbate de sodium, le sulfate suffit par exemple.^{8,12} En revanche, dans le cas où l'on utilise du cuivre (I) sous forme notamment d'halogénure de cuivre, une amine est nécessaire.^{8,12}

L'utilisation de la CuAAC et donc du lien triazole pour préparer des CTVs conjugués n'a jusqu'alors pas été exploitée. Les deux voies de synthèse possibles ont été envisagées, à savoir soit l'introduction d'alcynes vrais sur le CTV ou soit d'azotures pour ensuite coupler des azotures ou alcynes aromatiques complémentaires. Pour chaque stratégie, la synthèse des CTVs intermédiaires (CTV tri-alcyne ou CTV tri-azoture) sera détaillée dans un premier temps, avant de présenter les réactions de cycloaddition.

b. CuAAC à partir d'un CTV tri-alcyne intermédiaire

1. Synthèse d'un CTV substitué par des alcynes vrais

L'introduction d'alcynes, et notamment de triméthylsilylacétylènes, à partir du CTV tri-iodé **6** par couplage de Sonogashira, a déjà été présentée au chapitre précédent. La déprotection des alcynes a pu être réalisée en présence de fluorure de tétrabutylammonium dans le THF, en conditions inertes, avec un rendement de 95 %.

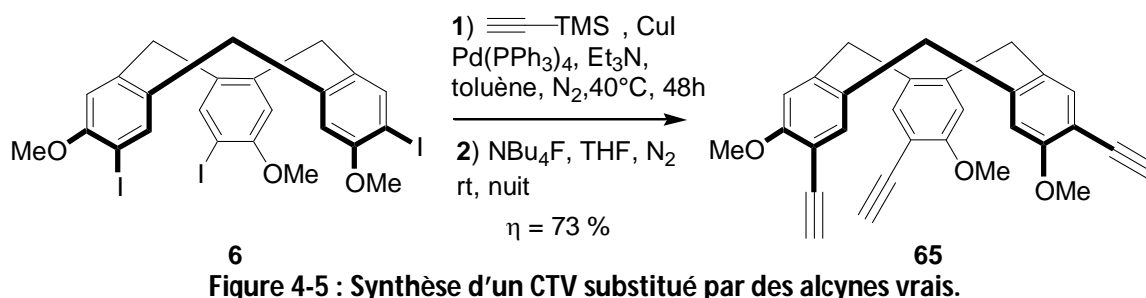


Figure 4-5 : Synthèse d'un CTV substitué par des alcynes vrais.

Ainsi, le premier CTV intermédiaire permettant d'envisager une CuAAC a été obtenu en deux étapes à partir du CTV tri-iodé **6** avec un rendement global de 73%.

2. « Chimie click » à partir du CTV tri-alcyne

L'azoture de phényle a été utilisé comme prototype d'azotures, dans un premier temps, pour tester la réactivité du CTV tri-alcyne intermédiaire **65** et pour valider la possibilité de réaliser une CuAAC directement sur le squelette aromatique CTV.

Des conditions classiques de réaction ont été utilisées (cf. Figure 4-6).⁸ Le cuivre (I) a été formé *in situ* à partir du sulfate de cuivre (II) en présence d'ascorbate de sodium comme réducteur. Un mélange DMSO/eau a été utilisé comme solvant, la solubilité du CTV tri-alcyne **65** étant très limitée dans le mélange *tert*-butanol/eau communément utilisé pour faciliter la précipitation du produit de cycloaddition formé.

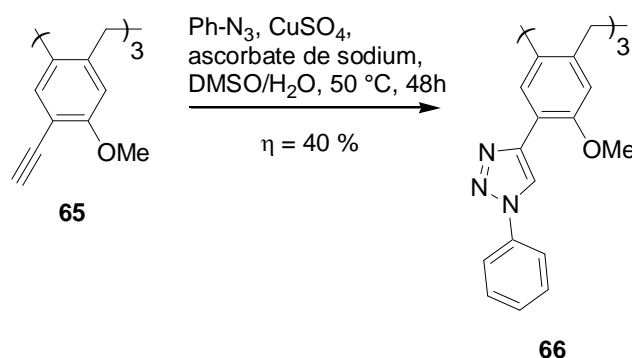


Figure 4-6 : CuAAC à partir du CTV tri-alcyne **65** et de l'azoture de phényle.

Le rendement obtenu de 40% n'a pas été optimisé mais pour la première fois, la possibilité de réaliser une CuAAC directement sur le squelette CTV a été démontrée. Peu de dérivés aromatiques azotures à « clicker » sont disponibles commercialement, aussi nous sommes concentrés d'avantage sur l'autre stratégie, une CuAAC à partir d'un CTV tri-azido intermédiaire.

c. CuAAC à partir d'un CTV tri-azido intermédiaire

1. Synthèse d'un CTV fonctionnalisé par des groupements azotures

1) Méthodes décrites pour obtenir un azoture aromatique

Diverses méthodes sont décrites dans la littérature pour former un azoture aromatique, à partir soit du dérivé halogéné, soit de l'amine primaire correspondante.^{8,15}

A partir d'un dérivé halogéné deux voies sont possibles. La première consiste en une substitution nucléophile aromatique par l'ion azoture.^{8,15} Celle-ci est favorisée par la présence d'un groupement électro-attracteur sur l'aromatique, et est très utilisée dans le cas des aromatiques fluorés.⁸ Une méthode basée sur une catalyse au cuivre (I) a été proposée par Zhu et Ma en 2004, pour obtenir des azotures aromatiques à partir de dérivés halogénés substitués par des groupements électro-donneurs.¹⁶ Dans ce cas, l'azoture de sodium est utilisé en présence de cuivre (I) (sous forme de iodure de cuivre), de L-proline comme ligand, et d'une base dans le DMSO, à haute température (cf. Figure 4-7).^{16,17}

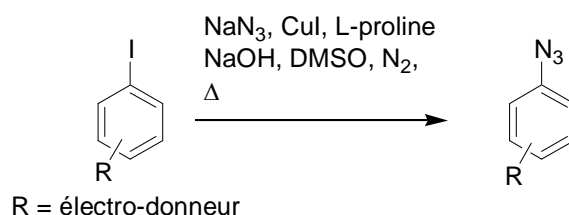


Figure 4-7 : Synthèse d'azotures aromatiques selon la méthode proposée par Zhu et Ma.¹⁶

Auparavant, plusieurs méthodes avaient été développées pour obtenir un azoture aromatique par couplage organométallique en passant notamment par un réactif de Grignard ou un lithien.^{18,19} Bruner *and co.* ont développé une méthode passant par un réactif de Grignard, qui après réaction avec l'azoture de tosylate et traitement au pyrophosphate conduit à l'azoture aromatique souhaité avec un bon rendement (cf. Figure 4-8).¹⁸

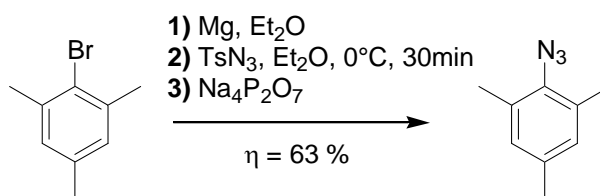


Figure 4-8 : Méthode pour obtenir un azoture aromatique proposé par Bruner *and co.*¹⁸

En 2002, l'équipe de Tilley a proposé une synthèse en passant par le lithien (formé à partir du dérivé halogéné en présence de *n*-butyllithium), puis utilisant comme électrophile l'azoture de tosylo (cf. Figure 4-9).¹⁹ Cette réaction est quasi quantitative dans l'exemple proposé.

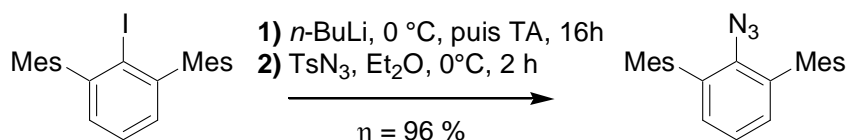


Figure 4-9 : Voie de synthèse pour obtenir un azoture aromatique proposé par Tilley *and co.*¹⁹

L'obtention d'un azoture aromatique est également possible en partant d'une amine primaire et en passant par un diazonium (cf. Figure 4-10).^{8,20,21} Cette méthode est l'une des plus couramment décrite dans la littérature et a déjà été testée par Reinaud *and co.* sur un calix[6]arène, et sur des dérivés d'adamantanes par l'équipe de Bräse.^{8,22,17} La formation du diazonium se fait généralement à partir de l'amine en présence de nitrite de sodium en milieu acide (acide chlorhydrique aqueux, acide acétique ou trifluoroacétique). Ensuite, une substitution nucléophile a lieu suite à l'ajout de l'ion azoture (le plus souvent sous forme d'azoture de sodium), pour former après libération de diazote, l'azoture aromatique souhaité.^{8,23,24} De très bons voire d'excellents rendements sont souvent obtenus pour cette transformation.

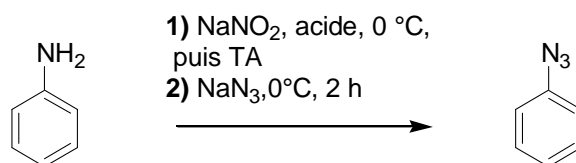


Figure 4-10 : Schéma de synthèse général de la formation d'un azoture aromatique *via* un diazonium.

Ainsi, plusieurs voies de synthèses sont envisageables à partir de l'intermédiaire tri-iodé **6** ou du CTV tri-amine **33** dont la synthèse a déjà été décrite dans la littérature, par l'équipe de Collet.²⁵

2) Synthèse à partir du CTV tri-iodé

Au vu des grandes quantités de CTV tri-iodé **6** synthétisées au laboratoire, les premiers essais ont été conduits à partir de ce dernier selon la méthode décrite par Zhu et Ma (cf. Figure 4-11).¹⁶ Cependant, le CTV tri-amine **33** a été obtenu et non le CTV tri-azido **67**

attendu. Faute de temps, l'origine de cette réduction n'a pas été élucidée. Néanmoins, nous pouvons supposer que ceci est lié à la plus grande quantité de cuivre (I) utilisée, comparé aux conditions décrites dans la littérature, pour tenter de déplacer l'équilibre de la réaction vers le CTV tri-azoture. L'excès de cuivre (I) entraîne peut être la réduction de l'azoture en amine, alors que celui-ci est oxydé en cuivre (II). De très faibles rendements sont décrits dans la littérature (3 à 34%), pour la formation d'azoture dans des conditions proches, sur des adamantanes et dérivés.¹⁷

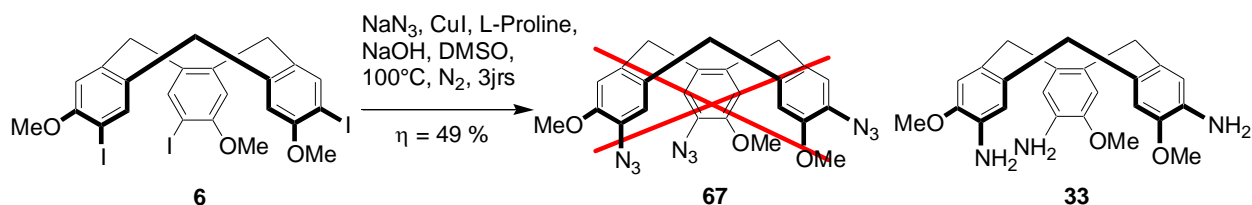


Figure 4-11 : Essai de synthèse du CTV tri-azido selon la méthode de Zhu et Ma.

A partir de là, il a été envisagé de synthétiser le CTV tri-azido **67**, non plus à partir du CTV tri-iodé **6**, mais du CTV tri-amine **33**, en passant des diazoniums.

L'introduction d'un groupement azido sur le squelette CTV à partir du CTV tri-iodé **6** en passant par un lithien n'a pas été testée faute de temps. Cependant, la formation du lithien ayant déjà été validé lors de la synthèse du CTV tri-ester carboxylique **56**, il est fort possible que cette voie constitue une alternative.

3) Synthèse du CTV tri-azido **67** à partir du CTV tri-amine **33**.

Une synthèse du CTV tri-amine **33** avec un très bon rendement global a déjà été décrite dans la littérature par l'équipe de Collet (cf. Figure 4-12).²⁵ Cette synthèse se fait en quatre étapes à partir de l'alcool 3-methoxy 4-nitrobenzyle commercial. La première étape consiste en la réduction du groupement nitro en amine, à l'aide d'une catalyse au palladium sur charbon en présence d'hydrazine. Ensuite, l'amine et l'alcool réagissent avec l'anhydride acétique afin de former l'amide et l'ester correspondants. L'amine, nucléophile est ainsi protégée, pour ne pas perturber la réaction de trimérisation par substitution électrophile. La déprotection de l'ester et la réaction de trimérisation se font « one pot » grâce à un mélange acide perchlorique/acide acétique. Le rendement de cette réaction de trimérisation excellent, est le meilleur décrit pour ce type de réactions dans la littérature. Enfin, les amides du CTV **32** sont réduits dans l'éthylène glycol en présence de nitrite de sodium afin d'obtenir **33**. Une amélioration de cette dernière étape, a été proposée par Bohle et Stasko, par hydrolyse en milieu acide à chaud.²⁶

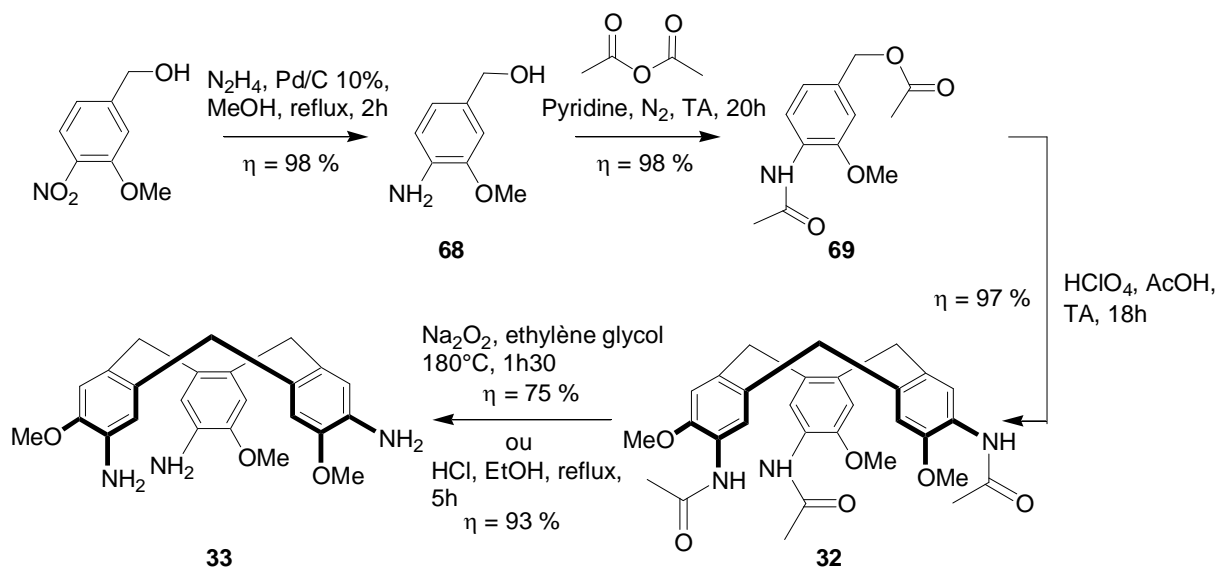


Figure 4-12 : Synthèse du CTV tri-amine **33** proposée dans la littérature.^{25,26}

La synthèse du CTV tri-amine **33** comme décrite dans la littérature a été réalisée plusieurs fois. Certains lots de CTV tri-amide **32** n'ont pu être réduits, que ce soit avec la méthode décrite par Collet *and co.* ou celle de Bohle et Stasko. La très faible solubilité de **32** y compris à chaud en est peut être la raison.

Le CTV tri-azido **67** a été obtenu, à partir du CTV tri-amine **33** par substitution nucléophile du sel de diazonium formé in situ, dans des conditions classiques avec un rendement de 79 % (cf. Figure 4-13).⁸ Ce rendement est moins bon que celui obtenu sur les calixarènes par l'équipe de O. Renaud, mais identique à celui obtenu pour des dérivés d'adamantanes.^{22,27} Ceci s'explique probablement, par la plus faible solubilité des CTVs et adamantanes, par rapport aux calixarènes dans les conditions réactionnelles.

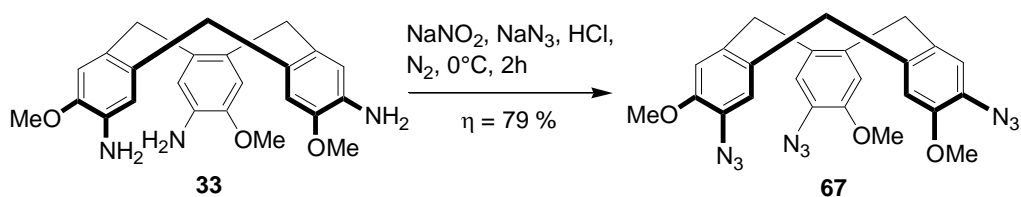


Figure 4-13 : Synthèse du CTV tri-azido **67** à partir du CTV tri-amine **33**, en passant par un diazonium.

Néanmoins, l'obtention du CTV tri-azido **67** en une étape à partir du CTV tri-amine **33** permet d'envisager la conjugaison d'alcynes aromatiques via CuAAC.

2. « Chimie click » à partir du CTV tri-azido **67**

1) Premier essai avec l'éthynylbenzène

La possibilité d'effectuer une CuAAC à partir du CTV tri-azido **67** a été testée avec l'éthynylbenzène, tout d'abord. Les conditions classiques, sulfate de cuivre (II) en présence d'ascorbate de sodium, ont été utilisées et un rendement moyen mais non optimisé de 39 % a été obtenu pour le CTV conjugué **70** (cf. Figure 4-14).

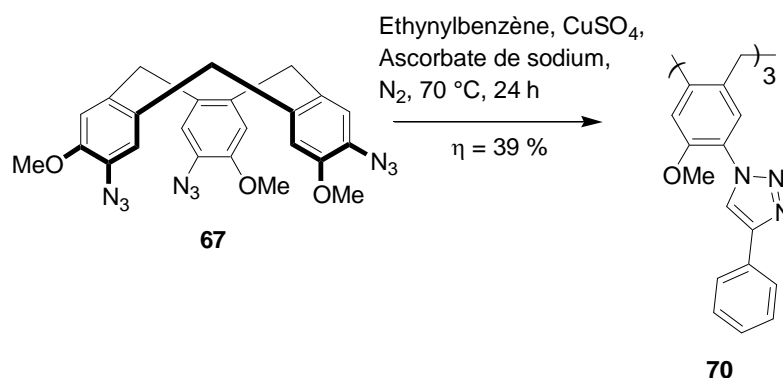


Figure 4-14 : CuAAC entre le CTV tri-azido **67** et l'éthynylbenzène.

Ainsi, nous avons validé la possibilité de faire de la « chimie click » sur le squelette CTV à partir du CTV tri-azido **67** également. Des CuAAC à partir d'azotures aromatiques substitués ont donc pu être envisagées, comme nous allons le voir à présent.

2) Synthèse d'un CTV fonctionnalisé par un groupement arylphosphonate via un triazole

Afin d'obtenir un CTV soluble dans l'eau, nous avons décidé d'introduire par CuAAC sur le CTV tri-azido **67** l'éthynylbenzène substitué par un groupement phosphonate. Pour pouvoir solubiliser le produit obtenu en milieu organique, en vue d'une éventuelle purification nous avons choisi de passer par le dérivé ester, puis de le saponifier (cf. Figure 4-15).

La réaction de « chimie click » a été réalisée avec un excellent rendement de 95 %. La saponification du CTV **71** ainsi obtenu permet ensuite, d'obtenir un composé soluble dans l'eau à pH physiologique. Le CTV **72** est donc obtenu en deux étapes à partir du CTV tri-azido **67** avec un très bon rendement global de 82 %.

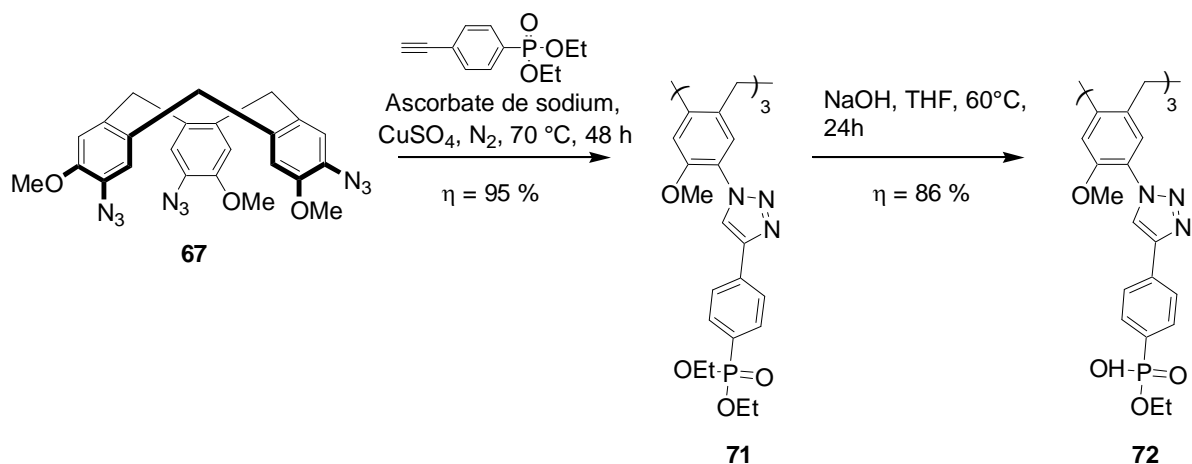


Figure 4-15 : CuAAC pour introduire des arylphosphonates sur le CTV tri-azido **67**.

3) Synthèse d'un CTV fonctionnalisé par un groupement acide carboxylique via un triazole

L'introduction de fonctions acides carboxyliques a été envisagée en passant par les esters méthyliques correspondants, afin de simplifier d'éventuelles purifications. Les mêmes conditions de CuAAC que précédemment ont été utilisées (cf. Figure 4-16).

Les premiers essais avec le réactif ester (4-éthynylbenzoate de méthyle) indiquent qu'il y a eu conversion au moins partielle mais nous ne sommes pas arrivés à isoler le produit **73** pur, à cause notamment d'un souci de solubilité de l'espèce formée. Des problèmes de solubilité ont été observés lors de réaction de CuAAC avec des réactifs substitués par des groupements très polaires, sur des adamantanes par l'équipe de Bräse, Muller *and co.*²⁷

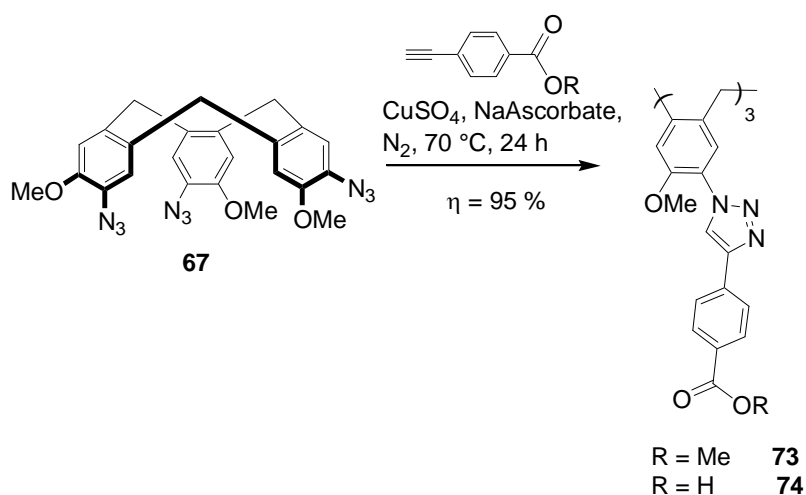


Figure 4-16 : CuAAC pour introduire un arylester ou acide carboxylique à partir du CTV tri-azido **67**.

Ainsi nous avons décidé de nous tourner directement vers le réactif sous sa forme acide (l'acide 4-éthynylbenzoïque). Celui-ci pouvant être solubilisé grâce aux charges négatives en milieu basique. Un seul essai a été fait, et d'après la RMN du proton du brut

réactionnel, il semblerait que la réaction de cycloaddition ait eu lieu. Cependant, le produit **74** pur n'a pas encore pu être isolé faute de temps.

d. Conclusion

La possibilité de réaliser une CuAAC directement sur le squelette CTV a été démontrée pour la première fois, à partir du CTV tri-alcyne **65**, comme du CTV tri-azido **67**. La synthèse à partir du CTV tri-azido **67** a été utilisée pour obtenir un premier dérivé de CTV soluble dans l'eau (**72**), au système π étendu grâce à la conjugaison *via* l'unité triazole.

Une alternative de la synthèse du CTV tri-azido **67**, en passant par un lithien, reste à explorer. Si celle-ci fonctionne elle pourrait être appliquée sur le CTV tri-iodé **37**, dont les éthers sont substitués par des chaînes alkyles plus longues (pentyles). Ainsi, un CTV tri-azido avec des éthers aux chaînes alkyles plus longues pourrait être utilisé pour réaliser des CuAAC avec l'arylester, afin d'améliorer la solubilité du produit formé en milieu organique et faciliter sa purification.

Les propriétés spectroscopiques des premiers CTVs portant des groupements triazoles sont présentées dans la partie suivante.

B. Propriétés spectroscopiques des CTVs obtenus par « chimie click ».

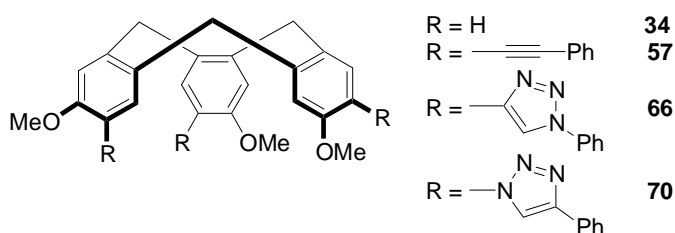
a. Propriétés spectroscopiques des CTVs conjugués via un lien triazole 66 et 70

Les caractéristiques spectroscopiques des deux CTVs **66** et **70**, substitués par des groupements phényles *via* des liens triazoles ont été déterminées dans le DMSO (cf. ²⁸

Tableau 4-1). L'incidence de la position de l'unité triazole, par rapport au squelette CTV et aux substituants phényles, sur les propriétés spectroscopiques a pu être évaluée. Ensuite, les propriétés spectroscopiques de **66** et **70** ont été comparées à celles du CTV **57** (substitué par des phényles conjugués *via* des alcynes, cf. ²⁸

Tableau 4-1) et au CTV **34** de référence (portant des hydrogènes comme substituants, cf. ²⁸

Tableau 4-1).



	$\lambda_{\text{abs max}}^*$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}$ (nm)	Φ_{F}^{**} (%)	τ (ns)
CTV 66	302	3,2	377	75	<1	0,9
CTV 70	302	2,3	362	60	1	1,6
CTV 57	320	4,9	355	35	63	1,5
CTV 34	290	4,1	305	15	21	4,5

* Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maximum d'absorption est donnée ici.

** Rendements quantiques déterminés par rapport au bisulfate de quinine, possédant un $\Phi_{\text{F}} = 0,55$ dans le H_2SO_4 0,5M.²⁸

Tableau 4-1 : Propriétés spectroscopiques des CTVs 34, 57, 66 et 70 dans le DMSO.

Comme attendu, les unités triazoles permettent d'étendre la conjugaison du squelette aromatique CTV vers les groupements phényles. Ainsi, les spectres d'absorption et d'émission de **66** et **70** sont déplacés de façon bathochrome par rapport au CTV **34**. Le déplacement de Stokes est légèrement plus important pour le CTV **66**. De même, le rendement quantique de fluorescence est meilleur pour **70** que pour **66**. Cependant, la

position du groupement triazole semble avoir peu d'influence sur les propriétés spectroscopiques dans ce cas (cf.28

Tableau 4-1). Ceci s'explique probablement par le fait que les phényles ne comportent aucun substituant (ni électro-attracteur, ni électro-donneur). Aussi le transfert de charge est peu influencé par la position de ces derniers en 1 ou en 4 du triazole.

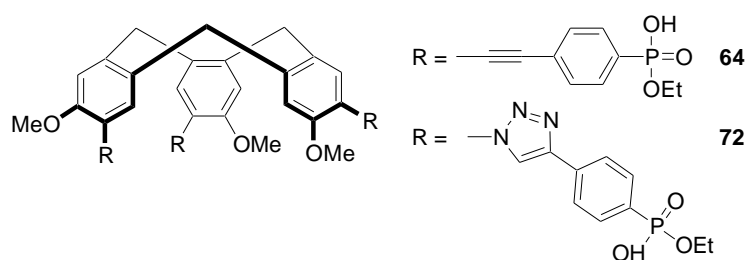
Le coefficient d'absorption molaire et le rendement quantique sont faibles pour les CTVs **66** et **70**, comportant des triazoles, par rapport au CTV **57**. La diminution est d'un facteur 2 environ pour le coefficient d'absorption molaire, contre un facteur plus de 10 pour le rendement quantique de fluorescence (cf. 28

Tableau 4-1). Bunz *and co.* ont également observé de faibles rendements quantiques dans le cas de dérivés branchés par des liens triazoles.⁶ Un couplage entre un niveau vibrationnel de S_0 et l'état excité atteint après transfert de charge (PCT) pourrait en être la cause selon les auteurs.

Les propriétés spectroscopiques, puis les premiers essais de complexation, avec le CTV **70**, soluble dans l'eau, vont être présentés dans la partie suivante.

b. Propriétés spectroscopiques et de reconnaissance du CTV 70

Les propriétés spectroscopiques du CTV **72**, portant des fonctions phosphonates ont été déterminées, comme pour les précédents CTVs phosphorilés, dans le tampon HEPES 100mM, pH 7,5. Ainsi, les propriétés spectroscopiques du CTV **72** pourront être comparées à celle du CTV **64** portant les mêmes fonctions mais conjugués via des liens alcynes sur le squelette CTV.



	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	ϵ ($10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{Stokes}}^*$ (nm)	Φ_{F}^{**} (%)	τ (ns)
CTV 72	306	1,9	384	78	3	0,2 (94%) 3,3 (6%)
CTV 64	325	4,7	399	74	43	1,6 (38%) 3,9 (62%)

* Seule la longueur d'onde de plus basse énergie, correspondant à un maximum d'absorption est donnée ici.

** Rendements quantiques déterminés par rapport bisulfate de quinine, possédant un $\Phi_{\text{F}} = 0,55$ dans le H_2SO_4 0,5M.

Tableau 4-2 : Propriétés spectroscopiques des CTVs substitués par des phosphonates dans l'HEPES 100 mM, pH= 7,5.

L'existence d'un transfert de charge photo-induit est visible à travers les grands déplacements de Stokes observés. Cependant, là encore, le lien triazole induit un déplacement bathochromique plus faible des spectres d'absorption et d'émission que le lien alcyne. Le fait que le triazole n'est pas une unité permettant la conjugaison par mésomérie contrairement à l'alcyne en est peut-être la raison. Ceci a déjà été observé dans la littérature, notamment par l'équipe de M. Blanchard-Desce pour des systèmes « push-pulls ».^{2,29}

Ensuite, le coefficient d'absorption molaire ainsi que le rendement quantique de fluorescence sont beaucoup plus faibles (facteur dix environ pour le rendement quantique de fluorescence) pour le CTV **72** que pour le CTV **64**. Dans un solvant protique, le faible rendement quantique de fluorescence pour des composés comportant des unités triazoles s'expliquerait par l'existence de liaisons hydrogènes (entre les azotes du triazole et le solvant), qui favorisent les voies de désexcitation non-radiatives.⁵

Comme pour le CTV **64** deux temps de vie sont observés, correspondant à deux populations de fluorophore différentes. Néanmoins pour **72**, l'une des formes est très largement majoritaire. On peut envisager qu'une population correspond à **72** en solution et l'autre à **72** impliqué dans des assemblages. Des expériences complémentaires (de DLS notamment) doivent être faites afin de mettre en évidence la formation d'assemblages ou non pour **72**.

L'ajout d'Ach et de Ch sur une solution de CTV **72**, n'induit aucune modification de la fluorescence. Comme dans le cas du CTV **64**, ces deux cibles ne semblent pas reconnues. D'après des titrages en fluorescence, le CTV **72** ne reconnaît pas non plus la dopamine contrairement au CTV **64**. Les autres dérivés de la même famille n'ont pas pu être testés, faute de temps. Les unités triazoles modifient donc les propriétés de reconnaissance, en plus de celles spectroscopiques. L'absence de reconnaissance dans ce cas, peut avoir divers origines. La formation d'éventuelles particules n'a pas encore été élucidée et pourrait également expliquer les différences observées au niveau des interactions. La fonction triazole est une unité plus hydrophile que l'alcyne, qui peut notamment former des liaisons hydrogènes avec le solvant *via* ses azotes. Ceci rend la cage moins hydrophobe que dans le cas précédent avec l'alcyne. Ceci peut jouer un rôle important dans la formation d'assemblages, tout comme au niveau de la reconnaissance. La densité du système π n'est pas la même non plus, ce qui peut également entraîner des modifications des propriétés de reconnaissance si l'on considère qu'il y a des interactions π -cations entre la sonde et la dopamine, par exemple.

Il serait intéressant de voir si le CTV substitué par des acides carboxyliques **74**, se comporte de la même manière, ou non, que son homologue substitué *via* l'alcyne, le CTV **63**. Ceci permettrait d'évaluer le rôle des triazoles plus en détail.

Dans la littérature, quelques exemples de sondes fluorescentes comportant des triazoles ont été développés pour des cations métalliques tels que le zinc (II), ou le cuivre (II) et les lanthanides (europium et iridium).^{6,7} Ainsi, nous avons réalisé quelques tests préliminaires de reconnaissance de certains cations métalliques avec le CTV **70**, dans une solution tamponnée d'HEPES. Aucun changement n'a été observé lors des premiers essais d'ajouts de zinc, ou de cuivre. En revanche, l'ajout de calcium éteint la fluorescence de la sonde, en même temps qu'il induit un faible déplacement du spectre d'absorption. Ces premières observations sont intéressantes et devront être approfondies.

C. Conclusion

La synthèse de CTV par « chimie click » directement sur le squelette aromatique a été réalisée pour la première fois. Des réactions de CuAAC peuvent être envisagées à partir du CTV tri-alcyne **65**, comme il a été illustré avec l'azoture de phényle. Elles peuvent également être réalisées à partir du CTV tri-azido **67**. Deux CTVs ont été synthétisés par cette voie, dont l'un, le CTV **72**, soluble dans l'eau à pH physiologique. De nouvelles possibilités de fonctionnalisation en vue de diverses applications sont ainsi envisageables.

Du point de vue des propriétés spectroscopiques, ce type de couplage permet d'étendre le système π des CTVs. Comme attendu l'extension de la conjugaison est moins efficace qu'avec des liens alcynes, mais non négligeable pour autant. Par contre, la présence d'hétéroatomes sur les liens triazoles, semble augmenter les voies de désexcitations non-radiatives, en milieu aqueux notamment, conduisant à des rendements quantiques de fluorescence assez faibles.

Les propriétés de reconnaissance du CTV **72** soluble en milieu aqueux ont été brièvement explorées. Les premières observations ont montré une modification des propriétés de reconnaissance par rapport à son homologue alcyne. L'unité triazole semble avoir un rôle important puisque le CTV **72** ne reconnaît plus ni l'Ach ou la Ch, ni la dopamine. Toutefois, ce lien semble pouvoir permettre la reconnaissance d'autres cibles, comme le calcium, qui sont aujourd'hui à l'étude. L'observation d'éventuels assemblages de **72** est en cours et permettra peut-être de mieux comprendre ces observations quant aux propriétés de reconnaissance.

Références bibliographiques

- (1) Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.
- (2) Parent, M.; Mongin, O.; Kamada, K.; Katan, C.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Commun.* **2005**, 2029–2031.
- (3) Jarowski, P. D.; Wu, Y.-L.; Schweizer, W. B.; Diederich, F. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3347–3350.
- (4) González-Vera, J. A.; Luković, E.; Imperiali, B. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7309–7314.
- (5) Bag, S. S.; Kundu, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3348–3356.
- (6) Schweinfurth, D.; Hardcastle, K. I.; Bunz, U. H. F. *Chem. Commun.* **2008**, 2203–2205.
- (7) Meudtner, R. M.; Ostermeier, M.; Goddard, R.; Limberg, C.; Hecht, S. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834–9840.
- (8) Bräse, S.; Banert, K. *Organic Azides: Synthesis and Applications*; John Wiley & Sons, 2010.
- (9) Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
- (10) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- (11) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- (12) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- (13) Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.
- (14) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192–3193.
- (15) Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 297–368.
- (16) Zhu, W.; Ma, D. *Chem. Commun.* **2004**, 888–889.
- (17) Schilling, C. I.; Brase, S. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3586–3588.
- (18) Smith, P. A. S.; Rowe, C. D.; Bruner, L. B. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3430–3433.
- (19) Gavenonis, J.; Tilley, T. D. *Organometallics* **2002**, *21*, 5549–5563.
- (20) Kim, J.; Chang, S. *Chem. Commun.* **2008**, 3052–3054.
- (21) Xu, H.; Wolf, C. *Chem. Commun.* **2009**, 3035–3037.
- (22) Colasson, B.; Save, M.; Milko, P.; Roithová, J.; Schröder, D.; Reinaud, O. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4987–4990.
- (23) Wallis, J. D.; Dunitz, J. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 910–911.

- (24) N. Butler, R.; Fox, A.; Collier, S.; A. Burke, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 2243–2248.
- (25) Garcia, C.; Malthete, J.; Collet, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, 130, 93–95.
- (26) Bohle, D. S.; Stasko, D. J. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 5768–5770.
- (27) Plietzsch, O.; Schilling, C. I.; Tolev, M.; Nieger, M.; Richert, C.; Muller, T.; Brase, S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 4734–4743.
- (28) Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, 65, 229–235.
- (29) Mongin, O.; Porrès, L.; Charlot, M.; Katan, C.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 1481–1498.

Conclusion Générale et Perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de concevoir, synthétiser et étudier de nouvelles sondes fluorescentes pour la détection d'acétylcholine et de dopamine *in vivo*. Ceci pour apporter un outil analytique aux neurobiologistes afin de mieux comprendre le rôle de ces neurotransmetteurs et de leurs dysfonctionnements dans certaines maladies neuro-dégénératives.

Les sondes fluorescentes envisagées ont comme structure commune de base un squelette cyclotrivrérylène (CTV), cavitand, connu pour ses propriétés de reconnaissance de petites molécules organiques. Diverses approches ont été étudiées dans ce manuscrit, pour accéder à des sondes fluorescentes et sélectives.

Dans la continuité des travaux antérieurs réalisés au laboratoire, la première approche envisagée a consisté à introduire, de façon conjuguée, un groupement électro-attracteur et un groupement électro-donneur, sur chacune des unités aromatiques composant le CTV. Dans la mesure où la synthèse du trimère ne peut pas se faire à partir d'un aromatique substitué par un groupement électro-attracteur, les synthèses de tels composés ont été réalisées en passant par un intermédiaire tri-iodé, commun. Les groupements électro-donneurs, de type éthers (méthoxyles en particulier), ont pu quant à eux, être introduits avant la formation du trimère. L'introduction de trois nouveaux groupements électro-attracteurs (nitrile, acide carboxylique et acide phosphorique) a été ainsi réalisée avec succès, conduisant à une petite librairie de CTV composés d'unité « push-pull » simples.

Ensuite, des dérivés de CTVs aux structures aromatiques plus étendues ont été synthétisés. Tout d'abord, nous avons eu recours à des réactions de couplage organo-métallique de Sonogashira, menées à partir de l'intermédiaire tri-iodé. Différents groupements ont été ainsi introduits avec de bons rendements. Enfin, nous avons envisagé des réactions de « chimie click » afin d'étendre la conjugaison entre les groupements donneurs et attracteurs. Ce type de réaction de CuAAC a été réalisé avec succès, à partir de deux nouveaux intermédiaires tri-azoture ou tri-alcyne, et doit encore être approfondi pour introduire différents groupements. Toutes ces réactions permettent de modifier le squelette des CTVs, par des substituants variés, en conservant la conjugaison. Ainsi, dans toutes ces structures, la conformation rigide de bol est maintenue. Ces nouveaux systèmes constituent un élargissement du champ d'application des CTVs.

L'étude des propriétés spectroscopiques des premières molécules développées, peu conjuguées, mais de type « push-pull », a permis de mettre en avant l'intérêt d'avoir un transfert de charge photo-induit, afin d'avoir un bon déplacement de Stokes. Cette première étude a également souligné la nécessité d'un compromis entre un bon rendement quantique de fluorescence et un spectre d'émission décalé vers le rouge, en fonction des groupements introduits. Pour une application en milieu aqueux, il semble plus intéressant de développer des structures avec des charges négatives, portées par les groupements électro-attracteurs.

L'étude de la seconde série de fluorophore aux structures aromatiques plus étendues a confirmé l'intérêt d'augmenter le système π des structures développées. Ceci permet d'avoir des longueurs d'onde plus adaptées à une application biologique, et un meilleur rendement quantique de fluorescence, y compris en milieu aqueux. Ces nouveaux fluorophores composés de trois unités « push-pull », non-conjuguées entre elles, possèdent également d'intéressantes propriétés en optique non linéaire. En effet, il a été montré pour la première fois, que de telles structures pouvaient être excitables à deux photons. L'extension de conjugaison par « chimie click », *via* un lien triazole, est apparue intéressante afin de décaler des spectres vers le rouge, même si celui-ci l'est dans une moindre mesure. Par contre, les rendements quantiques des premiers fluorophores ainsi développés sont très faibles.

Les propriétés de reconnaissance des diverses sondes élaborées ont été évaluées par spectrofluorimétrie, RMN, et microcalorimétrie. L'étude des premières sondes a illustré la possibilité de complexer l'acétylcholine en milieu physiologique avec des dérivés de CTVs. Ceci probablement grâce à des interactions électrostatiques et/ou π -cations. De plus, il est possible de détecter la formation du complexe par fluorescence, grâce à une modification de l'intensité de fluorescence. La nature des groupements utilisés a peu d'influence sur l'affinité des structures pour l'acétylcholine (cf. constantes d'association pour les différentes sondes de la première série). En revanche, l'importance d'une interaction complémentaire telle qu'une liaison hydrogène, permettant d'améliorer la sélectivité, a été mise en avant dans le cas d'une des sondes développées.

Lors de l'étude des propriétés de complexation des sondes obtenues par couplages de Sonogashira, nous avons pu observer, par DLS et microscopie TEM, que ces dernières s'auto-assemblaient en tampon aqueux. Les assemblages formés ont des tailles variables en fonction des substituants. En particulier, des études complémentaires de modélisation de certaines sondes sont en cours, afin de déterminer leurs structures.

En ce qui concerne la reconnaissance, la sonde substituée par des acides carboxyliques, s'auto-assemble dans l'eau, sous la forme de particules sphériques de 5 nm environ, et reconnaît l'acétylcholine. Les constantes d'association obtenues pour cette sonde, ainsi que les variations de fluorescence, sont plus élevées que celles observées avec les sondes précédentes. De plus, une plus grande affinité pour l'acétylcholine, par rapport à la choline, a été observée cette fois. D'après des titrages complémentaires en fluorescence, cette sélectivité partielle s'explique par le caractère plus hydrophobe de l'acétylcholine.

La seconde sonde fluorescente, obtenue par couplage de Sonogashira, substituée par des phosphonates, ne reconnaît pas l'acétylcholine mais reconnaît la dopamine et ses dérivés. Des études en fluorescence et microcalorimétrie ont permis de mettre en avant l'importance d'une liaison hydrogène entre la cible et la sonde. Cette sonde s'auto-assemble également, en tampon aqueux, mais de façon différente de la précédente.

Dans les deux cas, il serait intéressant de pouvoir relier la structure des assemblages formés aux propriétés de reconnaissance. Dans cette perspective, diverses études, telle que de la modélisation moléculaire, sont toujours en cours.

Les premières observations avec une sonde obtenue par « chimie click » ont montré que les propriétés de reconnaissance, sont modifiées par la présence des groupements triazoles. Une étude plus approfondie doit être menée avec cette sonde.

Finalement, les sondes fluorescentes développées, fonctionnant en milieu physiologique, avec des affinités correctes pour les cibles choisies, possèdent encore des limites et des améliorations doivent être apportées.

Il faut noter que les objets obtenus par auto-assemblage moléculaire, possèdent des diamètres trop élevés pour l'application *in vivo*. Ils peuvent être néanmoins utilisés pour d'autres applications. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin de modifier partiellement les structures fluorescentes, pour limiter la formation de ces assemblages. Tout d'abord, les chaînes alkyles des éthers pourraient être modifiées par des groupements plus hydrophiles, tels que des PEG. Une autre voie, consisterait à développer des cryptophanes ou hémicryptophanes, à partir des CTVs synthétisés. La formation de ces structures fermées, pouvant posséder une partie complémentaire plus hydrophile, permettant d'envisager d'autres interactions est attractive. Ceci fera l'objet d'un prochain travail.

Partie Expérimentale

A. Organic synthesis

a. General methods and materials

✓ *Reagents and solvents*

All commercial reagents were performed from Sigma-Aldrich, Acros or Fisher Chemical, and used without purification. The solvents with spectrophotometric grade were purchased from Scharlau or Sigma-Aldrich. Dichloromethane was freshly distilled from calcium hydride, and tetrahydrofuran from sodium benzophenone ketyl under nitrogen atmosphere. Anhydrous N,N-dimethylformamide was kept under argon atmosphere and used without further purification. Acetone and diethyl ether were dried over MgSO₄ before use.

✓ *Chromatography*

Purification by chromatography were performed on silica gel column prepared with silica gel from Scharlau 60 (40 – 60 μm) or Fluka Analytical 60 (40 – 63 μm). Thin layer chromatography (TLC) were done using silica layers 60W F₂₅₄S (60 Å) from Merck.

✓ *NMR analysis*

¹H, ¹³C and ³¹P NMR spectra were recorded on a Bruker Ultrashield Avance 400 spectrometer, at 400 MHz for ¹H, 162 MHz for ³¹P and 100 MHz for ¹³C. Chemical shifts are reported using tetramethylsilane or the residual solvent peak as internal reference for ¹H or for ¹³C. The following notation is used for the ¹H NMR spectral splitting patterns: singlet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet (m) doublet of doublet (dd), triplet of triplet (tt) and broad signal (br).

NOESY and DOSY experiments were performed on a Avance II Bruker 400 MHz spectrometer or an Avance III Bruker 600 MHz spectrometer.

✓ *Infrared analysis*

Infrared spectra were recorded on a Nicolet iS10 FT-IR spectrometer in the range 4000–1000 cm⁻¹.

✓ *Melting points*

Melting points were measured using Koffler Heizbank melting point benches from REICHERT (model 7841, 150 Watts, 220 Volts or model WME, 100 Watts, 230 Volts).

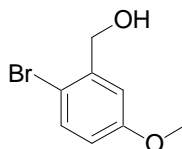
✓ *Mass analysis*

Mass spectra were performed by the CESAMO (Bordeaux, France) on a QStar Elite mass spectrometer (Applied Biosystems). The instrument is equipped with an ESI source and spectra were recorded in the positive mode. The electrospray needle was maintained at 5000 V and operated at room temperature. Samples were introduced by injection through a 10 μ L sample loop into a 200 μ L/min flow of methanol from the LC pump.

MALDI-MS spectra were performed by the CESAMO (Bordeaux, France) on a Voyager mass spectrometer (Applied Biosystems). The instrument is equipped with a pulsed N₂ laser (337 nm) and a time-delayed extracted ion source. Spectra were recorded in the positive-ion mode using the reflectron and with an accelerating voltage of 20 kV. Samples were dissolved in 50:50 DMSO/H₂O (VWR, 99%). The matrix solution was prepared by dissolving 10 mg of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Fluka >98.5 %) in 1 ml of 50:50 CH₃CN/H₂O 0.1% TFA. The solutions were combined in a 10:1 volume ratio of matrix to sample. One to two micro-liters of the obtained solution was deposited onto the sample target and vacuum-dried.

✓ *X-Ray analysis*

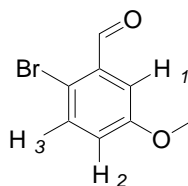
X-Ray structure data were performed on a R-Axis Rapid Rigaku MSC diffractometer using the CuK α radiation and a graphite monochromator. All reflections were used for unit cell refinement. The program ORTEP¹ was used for drawing figure. The structure was solved by direct methods and refined using Shelx 97 suite of programs.^{2,3} The positions of the H atoms were deduced from coordinates of the non-H atoms and confirmed by Fourier synthesis. The non-H atoms were refined with anisotropic temperature parameters. H atoms were included for structure factor calculations but not refined.

b. Experimental synthetic procedure**2-bromo-5-methoxybenzyl alcohol (28)**

Following the procedure described by C. K. Lee et al.,⁴ the 3-methoxybenzyl alcohol (0.63 mL, 5 mmol) gave **28** (0.759 g, 70 % yield) as a pale yellow oil. Applying the procedure described S. Adimurthy and co.,⁵ the same 3-methoxybenzyl alcohol (0.25 mL, 2 mmol) afforded **28** (390 mg, 90% yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.06 (d, J = 3.0 Hz, 1H, H₁), 6.71 (dd, 1H, H₂), 4.70 (d, J = 6 Hz, 2H, CH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 2.03 (t, 1H, OH).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 159.2 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 133.1 (C_{Ar}), 114.7 (C_{Ar}), 114.2 (C_{Ar}), 112.5 (C_{Ar}), 64.9 (OCH₃), 55.5 (CH₂).

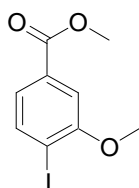
2-bromo-5-methoxybenzaldehyde (29)

To a suspension of 2-iodoxybenzoic acid (1.68 g, 6 mmol) in 10 mL of dried acetonitrile, under argon atmosphere, **28** was added (432 mg, 2 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 days and then cooled down to 0°C and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum. After trituration in diethyl ether, **29** was obtained as a white powder. Thin crystals were obtained by slow evaporation from ethanol.

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 10.32 (s, HCO), 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.06 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H₁), 6.71 (dd, 1H, H₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃).

CCDC-814593 contains the crystallographic data for this compound. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

methyl 4-iodo-3-methoxybenzoate (35)



The 3-hydro-4-iodobenzoic acid (1g, 3.8 mmol) was dissolved in 50 mL of dried DMF under nitrogen atmosphere and potassium carbonate (2.1g, 15.2 mmol) was added. The reaction mixture became white and cloudy, traducing the apparition of a precipitate. The iodomethane (1.42 mL, 22.8 mmol) was added slowly and the reaction mixture was warmed to 35°C under stirring overnight. Then, acetone is evaporated under vacuum. The crude product was dissolved in 80 mL of diethylether and washed with distilled water until neutrality of the aqueous phase. The organic phase was dried with magnesium sulfate and concentrated under vacuum. **35** was obtained as a bright-yellow oil (1.1 g, 98% yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.83 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (d, *J* = 2 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (dd, *J* = 8 Hz, 2 Hz, 1H, Ar-H), 3.93 (s, 3H, COOCH₃), 3.90 (s, 1H, OCH₃)

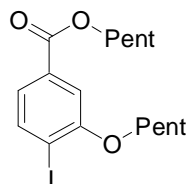
¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 166.2 (COOCH₃), 157.9 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 123.1 (C_{Ar}), 110.9 (C_{Ar}), 92.5 (C_{Ar}), 56.3 (COOCH₃), 52.2 (OCH₃).

IR (neat, ν cm⁻¹): 3021; 2971; 2857; 1728; 1586; 1485; 1442; 1228; 1186; 1100; 1042; 1013.

HRMS (ESI, TOF, positive mode): m/z for C₉H₉O₃I, Na adduct: calculated, 314.9488; found, 314.9500.

The same procedure was followed to synthesis the others derivatives with different alkyl or bromoalkyl chaine. The products were purified by chromatography on a silica gel short column eluted by cyclohexane followed by ethyl acetate. As mentioned in the text these syntheses were done by undergraduate student (L3) and were not totally optimized and the products are not fully characterized.

pentyl 4-iodo-3-(pentyloxy)benzoate

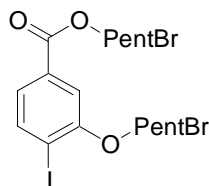


From 2 g (7.6 mmol) of 3-hydro-4-iodobenzoic acid, 2.92 g of pentyl 4-iodo-3-(pentyloxy)benzoate (7.22 mmol) were obtained (95 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.89 (d, *J* = 12 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (d, *J* = 3Hz, 1H, Ar-H), 7.4 (dd, *J* = 12 Hz et *J'* = 3 Hz, 1H, Ar-H), 4.08 (t, *J* = 9 Hz, 2H, COOCH₂C₄H₉), 3.66 (t, *J* = 9 Hz,

2H, OCH₂C₄H₉), 1.7-1.9 (m, 12H, CH₂ alkyl), 1.26 (t, J = 7 Hz, 3H, OC₄H₈CH₃), 1.12 (t, J = 7 Hz, 3H, COOC₄H₈CH₃).

5-bromopentyl 3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodobenzoate

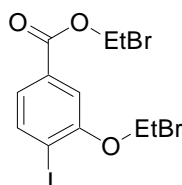


From 4 g (15.2 mmol) of 3-hydro-4-iodobenzoic acid, 2.92 g of 5-bromopentyl 3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodobenzoate (13.4 mmol) as a yellow oil were obtained (88 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.84 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (d, J = 2 Hz, 1H, Ar-H), 7.35 (dd, J = 8 Hz et J' = 2 Hz, 1H, Ar-H), 4.32 (t, J = 7 Hz, 2H, COOCH₂C₄H₈Br), 4.09 (t, J = 7 Hz, 2H, OCH₂C₄H₈Br), 3.46 (t, J = 7 Hz, 2H, CH₂Br), 3.43 (t, J = 7 Hz, 2H, CH₂Br), 2.02 - 1.85 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.85 - 1.75 (m, 2H, CH₂ alkyl), 1.66 - 1.53 (m, 6H, CH₂ alkyl).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 166.2 (COOC₅H₁₀Br), 157.7 (C_{Ar}OC₅H₁₀Br), 139.5 (C_{Ar}), 131.8 (C_{Ar}), 123.3 (C_{Ar}), 112.2 (C_{Ar}), 93.4 (C_{Ar}I), 69.1 (OCH₂), 65.0 (COOCH₂), 33.7 (CH₂Br, alkyl), 32.5 (CH₂, alkyl), 28.3 (CH₂, alkyl), 25.0 (CH₂, alkyl).

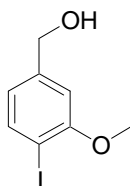
2-bromoethyl 3-(2-bromoethoxy)-4-iodobenzoate



From 4.66 g (17.7 mmol) of 3-hydro-4-iodobenzoic acid, 2.92 g of 2-bromoethyl 3-(2-bromoethoxy)-4-iodobenzoate (9.9 mmol) as a yellow oil were obtained (59 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.74 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar-H), 6.77 (d, J = 2 Hz, 1H, Ar-H), 6.69 (dd, J = 8 Hz et J' = 2 Hz, 1H, Ar-H), 4.62 (t, J = 6 Hz, 2H, COOCH₂CH₂Br), 4.39 (t, J = 6 Hz, 2H, OCH₂CH₂Br), 3.71 (t, J = 6 Hz, 2H, COOCH₂CH₂Br), 3.64 (t, J = 7 Hz, 2H, OCH₂CH₂Br).

4-Iodo-3-methoxybenzyl alcohol (36)



35 (2.4 g, 8.2 mmol) was diluted in 40 mL of dried THF under argon atmosphere. The mixture was cooled to -80°C before the dropwise addition of diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) (41.1 mL of 1M solution in hexane, 41.1 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight and then quenched at 0°C by addition of 150 mL of 1 M HCl solution. The product was extracted with dichloromethane (150 mL x 3). All the combined organic phases were washed with distilled water until neutrality of the aqueous phase and then dried over magnesium sulfate. After concentration under vacuum, **36** was obtained as a bright-yellow oil (2.07 g, 96% yield). The product **36** is sensitive to light and must be stored in the dark.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.68 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.81 (s, 1H, Ar-H), 6.64 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Ar-H), 4.59 (s, 2H, CH_2OH), 3.84 (s, 1H, OCH_3), 2.44 (br, 1H, OH).

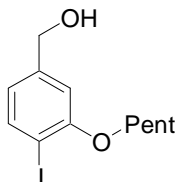
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 158.2 (C_{Ar}), 143.0 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 120.8 (C_{Ar}), 109.5 (C_{Ar}), 84.6 (C_{Ar}), 64.7 (CH_2OH), 56.4 (OCH_3).

IR (neat, ν cm^{-1}): 3329; 2950; 2857; 1593; 1464; 1393; 1257; 1043; 1014.

HRMS (ESI, TOF, positive mode): m/z for $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2\text{I}$, Na adduct: calculated, 286.9539; found, 286.9539.

Other derivatives were synthesized by the undergraduate students also, and they are not totally characterized. The same procedure as described for **36** was used.

[4-iodo-3-(pentyloxy)phenyl]methanol

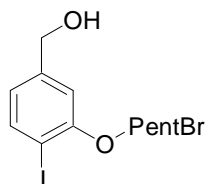


From the pentyl 4-iodo-3-(pentyloxy)benzoate (5.06g, 12.5 mmol), the [4-iodo-3-(pentyloxy)phenyl]methanol (3.6g, 11.25 mmol) was obtained as a yellow oil (90 % yield).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.72 (d, $J = 8$ Hz, 1H, Ar-H), 6.84 (d, $J = 2$ Hz, 1H, Ar-H), 6.68 (dd, $J = 8$ Hz, $J' = 2$ Hz, 1H, Ar-H), 4.65 (d, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2OH), 4.02 (t, $J = 6$ Hz, 2H, OCH_2), 1.85 (m, 2H, CH_2 alkyl), 1.67 (t, $J = 6$ Hz, 1H, OH), 1.52 (m, 2H, CH_2 alkyl), 1.41 (m, 2H, CH_2 alkyl), 0.95 (t, $J = 7$ Hz, 3H, CH_3).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 158.0 (C_{Ar}), 142.9 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 120.7 (C_{Ar}), 110.6 (C_{Ar}), 85.5 (C_{Ar}), 69.4 (OCH₂C₄H₉), 65.0 (CH₂OH), 28.9 (CH₂ alkyl), 28.4 (CH₂ alkyl), 22.5 (CH₂ alkyl), 14.2(CH₃).

{3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodophenyl}methanol

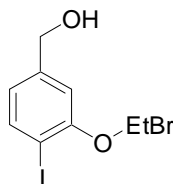


From the 5-bromopentyl 3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodobenzoate (5.06g, 12.5 mmol), the {3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodophenyl}methanol (3.6g, 11.25 mmol) was obtained as a yellow oil (90 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.72 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar-H), 6.84 (d, *J* = 2Hz, 1H, Ar-H), 6.68 (dd, *J* = 8 Hz et *J'* = 2 Hz, 1H, Ar-H), 4.65 (s, 2H, CH₂OH), 4.04 (t, *J* = 6 Hz, 2H, OCH₂), 3.46 (t, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂Br), 2.069 - 1.80 (m, 4H, CH₂ alkyl), 1.80 - 1.63 (m, 2H, CH₂ alkyl).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 157.9 (C_{Ar}), 142.9 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 120.9 (C_{Ar}), 110.6 (C_{Ar}), 85.4 (C_{Ar}), 68.9 (OCH₂), 64.95 (CH₂OH), 33.8 (CH₂Br), 32.6 (CH₂ alkyl), 28.4 (CH₂ alkyl), 25.08 (CH₂ alkyl).

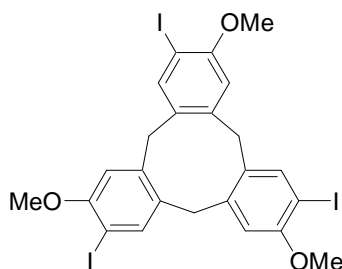
[3-(2-bromoethoxy)-4-iodophenyl]methanol



From the 2-bromoethyl 3-(2-bromoethoxy)-4-iodobenzoate (5.0g, 10.5 mmol), [3-(2-bromoethoxy)-4-iodophenyl]methanol (2.77 g, 7.86 mmol) was obtained as a yellow oil (74 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.74 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar-H), 6.87 (d, *J* = 2Hz, 1H, Ar-H), 6.74 (ds, *J* = 8 Hz et *J'* = 2 Hz, 1H, Ar-H), 4.66 (d, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂OH), 4.35 (t, *J* = 6 Hz, 2H, OCH₂), 3.69 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH₂Br), 1.7 (t, *J* = 6 Hz, 1H, OH).

2,7,12-Triiodo-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (6)



A suspension of phosphorus pentoxide P_2O_5 (1.7 g, 8.2 mmol) in 15 mL of dried diethyl ether was added under nitrogen to a vigorously stirred mixture of **36** (650 mg, 2.46 mmol) in 2 mL of anhydrous diethyl ether. The reaction mixture was warmed to the reflux and the stirring stopped, but the nitrogen conditions were maintained. After 48h, the diethyl ether was evaporated. The crude product was triturated with dichloromethane (50 mL) and filtered through silica gel in a large, coarse-fritted glass funnel. The silica gel was rinsed with dichloromethane (50 mL x 4). The filtrate was concentrated under vacuum. The obtained solid was finally digested with diethyl ether/dichloromethane (95/5) (10 mL x 3) to give **6** as a white solid (292 mg, 48%).

1H MNR (400 MHz, $CDCl_3$) (δ ppm): 7.72 (s, 3H, Ar-H), 6.74 (s, 3H, Ar-H), 4.65 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2), 3.86 (s, 9H, OCH_3), 3.58 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2).

^{13}C MNR (100 MHz, $CDCl_3$) (δ ppm): 158.4 (C_{Ar}), 142.0 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 134.5 (C_{Ar}), 113.3 (C_{Ar}), 84.4 (C_{Ar}), 56.9 (OCH_3), 36.2 (Ar- CH_2).

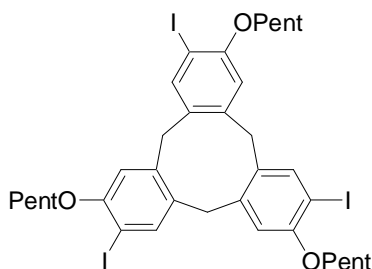
IR (neat, ν cm^{-1}): 3010; 2914; 2839; 1585; 1448; 1470; 1431; 1249; 1039.

Melting point: Decomposition over 265°C

HRMS (ESI, TOF, positive mode): m/z for $C_{24}H_{21}O_3I_3$, Na adduct: calculated, 760.8517; found, 760.8535.

Following the same procedure as described for **6**, three others derivatives of CTV iodinated were synthesized, by the undergraduate students.

2,7,12-triiodo-3,8,13-tris(pentyloxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (37)

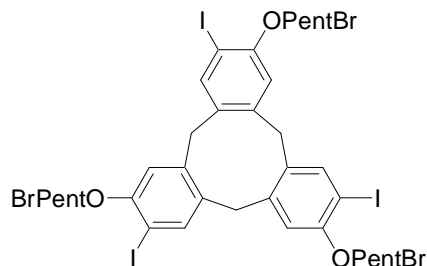


From [4-iodo-3-(pentyloxy)phenyl]methanol (1.48g, 4.6 mmol), **37** was obtained as a white solid (840 mg, 0.93 mmol, 60 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.69 (s, 3H, Ar-H), 6.70 (s, 3H, Ar-H), 4.58 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.99 (m, 6H, OCH₂), 3.52 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 1.80 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.46 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.41 (m, 6H, CH₂ alkyl), 0.94 (t, *J* = 7 Hz, 9H, CH₃).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 156.8 (C_{Ar}), 140.9 (C_{Ar}), 140.5 (C_{Ar}), 133.0 (C_{Ar}), 113.6 (C_{Ar}), 85.1 (C_{Ar}), 69.6 (OCH₂), 36.2 (Ar-CH₂), 28.9 (CH₂ alkyl), 28.4 (CH₂ alkyl), 22.6 (CH₂ alkyl), 14.3 (CH₃).

2,7,12-tris[(5-bromopentyl)oxy]-3,8,13-triiodo-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene

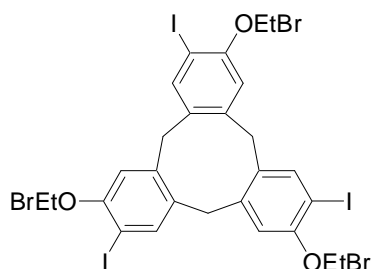


From {3-[(5-bromopentyl)oxy]-4-iodophenyl}methanol (4.6 g, 11.5 mmol), 2,7,12-tris[(5-bromopentyl)oxy]-3,8,13-triiodo-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (1.14 g, 0.97 mmol) was obtained as a white solid (26 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.69 (s, 3H, Ar-H), 6.70 (s, 3H, Ar-H), 4.55 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.96 (m, 6H, OCH₂), 3.50 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.44 (d, *J* = 7 Hz, 6H, CH₂Br), 1.96 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.83 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.66 (m, 6H, CH₂ alkyl).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 156.5 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 140.4 (C_{Ar}), 133.1 (C_{Ar}), 113.5 (C_{Ar}), 84.9 (C_{Ar}), 69.1 (OCH₂), 36.1 (Ar-CH₂), 33.8 (CH₂Br), 32.5 (CH₂ alkyl), 28.9 (CH₂ alkyl), 24.9 (CH₂ alkyl).

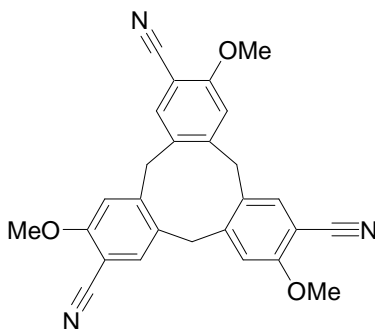
2,7,12-tris(2-bromoethoxy)-3,8,13-triiodo-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene



From [3-(2-bromoethoxy)-4-iodophenyl]methanol (1.6 g, 4.5 mmol), 2,7,12-tris(2-bromoethoxy)-3,8,13-triiodo-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (458 mg, 0.45 mmol) was obtained as a white solid (30 % yield).

$^1\text{H MNR}$ (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.69 (s, 3H, Ar-H), 6.70 (s, 3H, Ar-H), 4.55 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2), 3.96 (m, 6H, OCH_2), 3.50 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2), 3.44 (d, $J = 7$ Hz, 6H, CH_2Br), 1.96 (m, 6H, CH_2 alkyl), 1.83 (m, 6H, CH_2 alkyl), 1.66 (m, 6H, CH_2 alkyl).

3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*]cyclononene-2,7,12-tricarbonitrile
(44)



CTV **6** (250 mg, 0.34 mmol) was dissolved in 12 mL of dried DMF under nitrogen atmosphere and copper cyanide (250 mg, 5.6 mmol, 17 eq.) was added. The reaction was warmed up to 130 °C. After 24 h and 48 h, 250 mg of copper cyanide were added again to the mixture. After 3 days, the reaction was allowed to cool down to room temperature. The crude was poured into 250 mL of 1M HCl. The precipitate formed was filtered and washed with 200 mL of 1M HCl, followed by saturated $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{aq})}$ up to neutrality of the water phase, and then with ether. The solid obtained was dissolved in hot dichloromethane and filtered through silica gel. After evaporation under vacuum of the dichloromethane CTV **44** was obtained as a white solid (125 mg, 85 % yield).

$^1\text{H MNR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) (δ ppm): 8.08 (s, 3H), 7.46 (s, 3H), 4.88 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 3.90 (s, 9H), 3.77 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H).

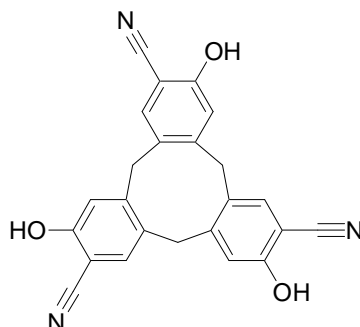
$^{13}\text{C MNR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) (δ ppm): 159.6, 147.2, 135.4, 131.4, 116.4, 113.5, 99.1, 56.7, 34.9.

IR (neat, ν cm^{-1}): 2933, 2851, 2224, 1605, 1566, 1498, 1459, 1391, 1309, 1274, 1209, 1138, 1074, 1002.

Melting point: Decomposition over 265°C

MALDI-MS (with a dithranol + AgTFA matrix): m/z for $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$, Ag adduct: calculated, 542.06 ; found 542.02.

3,8,13-trihydroxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene-2,7,12-tricarbonitrile
(45)



CTV **44** (145 mg, 0.33 mmol) was dissolved in 15 mL of dried DCM, under nitrogen atmosphere. The solution was cooled down to 0 °C, and boron tribromide (460 μL, 5 mmol, 15 eq.) was added slowly. Then, the reaction was allowed to warm up at room temperature. After 24h, boron tribromide (460 μL) was added again at 0 °C, and the reaction warmed up to room temperature then. After 48h, 50mL of distilled water was added to the reaction mixture at 0°C. The crude solution was filtered on a büchner. The crude solid obtained was rinsed with HCl 1M solution (200mL) followed by distilled water up to neutrality of the filtrate, and diethylether. After, drying overnight under vacuum at 50 °C, CTV **45** was obtained as a white solid (88 mg, 67 % yield).

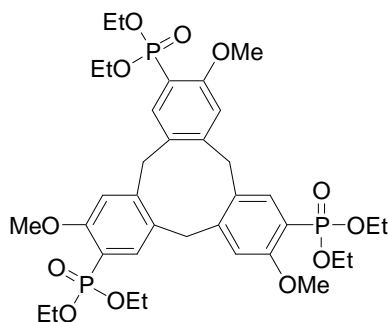
¹H MNR (400 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 10.87 (s, 3H, OH), 7.62 (s, 3H, Ar-H), 7.10 (s, 3H, Ar-H), 4.73 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.73 (d, *J* = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂).

¹³C MNR (100 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 158.6 (s, C_{Ar}), 147.2 (s, C_{Ar}), 134.5 (s, C_{Ar}), 130.4 (s, C_{Ar}), 117.1 (s, C_{Ar}), 116.9 (s, CN), 97.7 (s, C_{Ar}), 34.4(Ar-CH₂).

IR (neat, ν cm⁻¹): 3218, 2355, 2337, 2220, 1609, 1503, 1413, 1275, 1197, 1134, 1062

HRMS (ESI, TOF, negative mode): m/z for C₂₄H₁₄N₃O₃: calculated, 392.104 ; found 392.105

Diethyl 12-[bis(hydroxymethoxy)(methylene)phosphoranyl]-7-(diethoxyphosphoryl)-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene-2-ylphosphonate (52)



The CTV **6** (150 mg, 0.2 mmol) was diluted in 6 mL of benzonitrile under argon atmosphere. Nickel chloride (31.6 mg, 0.4 mmol) and triethylphosphite (660 μL, 3 mmol)

were added, and the solution was allowed to react at 150 °C overnight. The reaction mixture was cooled down to room temperature. The crude solution was diluted in 50 mL of toluene and washed three times with a 5% aqueous ammoniac solution. Then the organic phase was washed with water to get neutrality of the aqueous phase, dried over magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was finally purified by chromatography on silica gel, eluted with ethyl acetate/methanol 100/0 up to ethyl acetate/methanol, 90/10. The CTV **52** was obtained as a white solid (106 mg, 68% yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.88 (d, $J_{P-H} = 15$ Hz, 3H, Ar-H), 6.96 (d, $J_{P-H} = 7$ Hz, 3H, Ar-H), 4.78 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar-CH₂), 4.07 (br, 12H, OCH₂CH₃) 3.86 (s, 9H, OCH₃), 3.75 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar-CH₂), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, OCH₂CH₃), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, OCH₂CH₃).

³¹P MNR (162 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 16.8 (s).

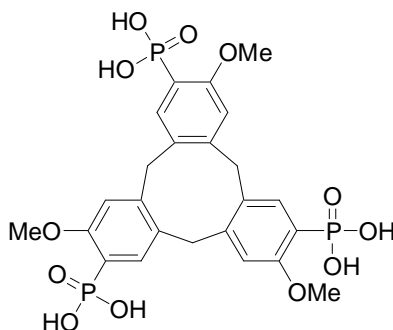
¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 160.2 (s, C_{Ar}), 146.2 (s, C_{Ar}), 137.5 (s, $J_{P-C} = 8$ Hz, C_{Ar}), 130.4 (d, $J_{P-C} = 15$ Hz, C_{Ar}), 115.3 (d, $J_{P-C} = 187$ Hz, C_{Ar}), 112.8 (d, $J_{P-C} = 10$ Hz, C_{Ar}), 62.2 (OCH₂CH₃), 56.1(OCH₃), 36.7 (Ar-CH₂), 16.5 (OCH₂CH₃).

IR (neat, ν cm⁻¹): 2980; 2908; 1599; 1488; 1469; 1242; 1064; 1024.

Melting point: 245 °C.

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for C₃₆H₅₁O₁₂P₃, Na adduct: calculated, 791.2485 ; found, 791.2485.

3,8,13-Trimethoxy-7,12-diphosphono-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononen-2-ylphosphonic acid (53)



The CTV **52** (50 mg, 0.065 mmol) was diluted in 3 mL of dried dichloromethane, under argon atmosphere. The bromotrimethylsilane (155 μL, 1.17 mmol) was added, and the reaction mixture was left at room temperature overnight. Then the dichloromethane was evaporated and 8 mL of methanol were added to the crude mixture. The reaction mixture was warmed to reflux. After 6h, the solution was cooled down to room temperature and filtered. The crude solid was rinsed with methanol and dried overnight under vacuum at 40°C to give the CTV **52** (34 mg, 88% yield).

¹H MNR (400 MHz, D₂O) (δ ppm): 7.78 (d, $J = 15.2$ Hz, 3H, Ar-H), 7.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Ar-H), 4.83 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.85 (s, 9H, OCH₃), 3.78 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar-CH₂).

³¹P MNR (162 MHz, D₂O) (δ ppm): 12.1 (s).

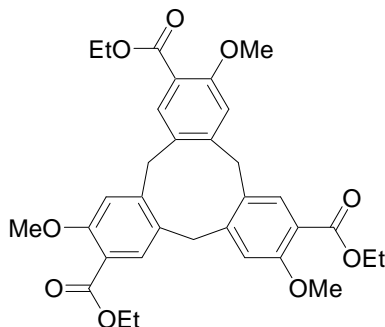
^{13}C MNR (100 MHz, D_2O) (δ ppm): 159.6 (s, C_{Ar}), 145.2 (s, C_{Ar}), 135.6 (d, $J_{\text{P-C}} = 7$ Hz, C_{Ar}), 130.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 13$ Hz, C_{Ar}), 120.3 (d, $J_{\text{P-C}} = 175$ Hz, C_{Ar}), 112.8 (d, $J_{\text{P-C}} = 9$ Hz, C_{Ar}), 55.7 (OCH_3), 35.8 (Ar-CH_2).

IR (neat, ν cm^{-1}): 3372; 2940; 1595; 1491; 1463; 1260; 1063; 989; 907.

Decomposition: > 265 °C.

MALDI-MS m/z for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{O}_{12}\text{P}_3$, Na adduct: calculated, 623.3813 ; found, 622.9.

trimethyl 3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene-2,7,12-tricarboxylate (54).



CTV **6** (400 mg, 0.54 mmol) was dissolved in 25 mL of dried THF under argon atmosphere. The reaction mixture was cooled down to -80 °C and then butyllithium (1.95 mL of 2.5 M in hexane solution, 4.9 mmol, 9 eq.) was added slowly. The reaction was allowed to warm up to 0 °C for 1 h, and then up to room temperature for 1 h. The reaction was cooled down to -80 °C again before the addition of ethyl chloroformate (2 mL, 20.8 mmol, 39 eq.). Then, the reaction was allowed to warm up to room temperature. After 3h at room temperature, the reaction mixture was cooled down to 0 °C and 80 mL of saturated $\text{NH}_4\text{Cl}(\text{aq})$ were added slowly. The crude mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 100 mL). Then the organic phases were washed with water, before being dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The residue was finally purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/ethyl acetate first from 0 to 25 % ethyl acetate). The CTV **54** was obtained as a white solid (170 mg, 55 % yield).

^1H MNR (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.83 (s, 3H), 6.97 (s, 3H), 4.77 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 4.29 (m, 6H), 3.88 (s, 9H), 3.73 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H), 1.33 (t, $J = 6.8$ Hz, 9H).

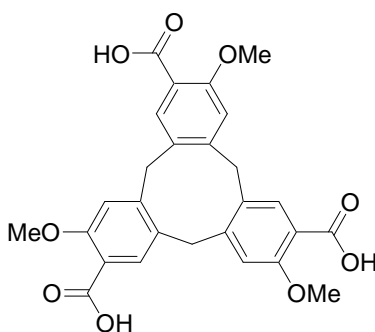
^{13}C MNR (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 165.8, 158.3, 145.4, 133.6, 130.2, 119.1, 113.7, 60.8, 56.3, 36.5, 14.4.

IR (neat, ν cm^{-1}): 2977, 2932, 2901, 2859, 2832, 1723, 1692, 1609, 1503, 1403, 1389, 1244, 1196, 1110, 1058, 1020.

Melting point: 130°C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) : m/z for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_9$, Na adduct: calculated, 599.2258 ; found 599.2275.

3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*]cyclononene-2,7,12-tricarboxylic acid (55).



CTV **54** (60 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 6 mL of THF. A 5M sodium hydroxide solution (4 mL, 20 mmol, 200 eq.) was added and the solution was allowed to react at 50°C for 24 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature, and the THF was removed under vacuum. A 37 % HCl solution was added to the crude to reach pH < 1. The precipitate formed was collected and rinsed twice with 0.1M HCl, followed by 0.01M HCl. The solid obtained was dried under vacuum at 50°C overnight. CTV **55** was obtained as a beige solid (50 mg, 98 % yield).

¹H MNR (400 MHz, DMSO-*d*₆) (δ ppm): 12.38 (s, 3H), 7.848 (s, 3H), 7.23 (s, 3H), 4.84 (d, J = 13.2 Hz, 3H), 3.78 (d, J = 13.2 Hz, 3H), 3.77 (s, 9H).

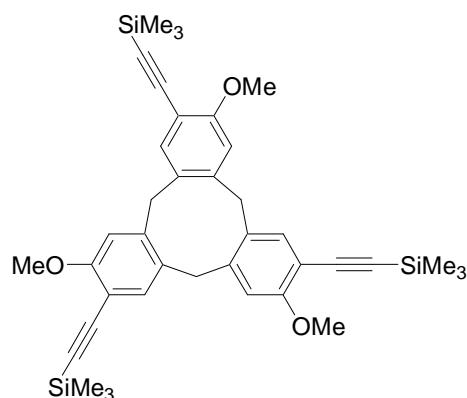
¹³C MNR (100 MHz, DMSO-*d*₆) (δ ppm): 166.9, 156.7, 145.1, 132.5, 130.8, 119.9, 113.7, 55.9, 34.9.

IR (neat, ν cm⁻¹): 3490, 3231, 2925, 2859, 2839, 1709, 1602, 1492, 1458, 1406, 1334, 1317, 1285, 1155, 1055, 983.

Melting point: Decomposition from 255 °C

HRMS (ESI, TOF, negative mode): m/z for C₂₇H₂₃O₉: calculated, 491.1347; found 491.1356.

trimethyl(2-{3,8,13-trimethoxy-7,12-bis[2-(trimethylsilyl)ethynyl]-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*]cyclononen-2-yl}ethynyl)silane (56).



CTV **6** (300 mg, 0.406 mmol) and trimethylsilylacetylene (509 μ L, 3.65 mmol, 9 eq.) were dissolved in 12 mL of toluene under argon atmosphere. After 20 minutes of argon sparging,

Partie Expérimentale

copper iodide (46.4 mg, 0.24 mmol, 0.6 eq.), bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride (171 mg, 0.24 mmol, 0.6 eq.) and dried triethylamine 3 mL were added and the solution was heated to 40°C under argon atmosphere. After 48 hr, the solution was cooled down to room temperature and evaporated under vacuum. The crude was purified by chromatography on silica gel, using cyclohexane/dichloromethane (7/3) as eluent, to give **56** as a white powder (200 mg, 77 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.39 (s, 3H, Ar-*H*), 6.80 (s, 3H, Ar-*H*), 4.65 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.87 (s, 9H, OCH₃), 3.57 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 0.23 (s, 18H, SiCH₃).

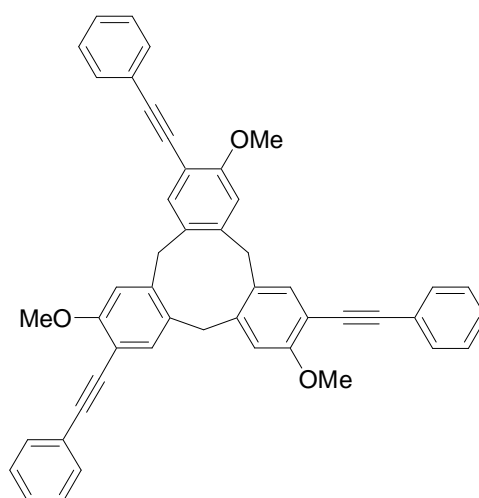
¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 159.2 (s, C_{Ar}), 141.7 (s, C_{Ar}), 135.6 (s, C_{Ar}), 130.8 (s, C_{Ar}), 112.3 (s, C_{Ar}), 111.4 (s, C_{Ar}), 101.3 (s, C ≡ CSiMe₃), 98.2 (s, C ≡ CSiMe₃), 56.3 (OCH₃), 36.6 (Ar-CH₂).

IR (neat, ν cm⁻¹): 2958, 2920, 2846, 2152, 1600, 1492, 1445, 1388, 1267, 1246, 1182, 1140, 1085.

Melting point: Decomposition over 210 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for C₃₉H₄₈O₃Si₃, Na adduct: calculated, 671.2803; found, 671.2781.

2,7,12-trimethoxy-3,8,13-tris(2-phenylethynyl)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[*a,d,g*]cyclononene (**57**).



The same reaction procedure as described for **56** was used, from CTV **6** (200 mg, 0.27 mmol) using ethynylbenzene (267 μL, 2.4 mmol, 9 eq.). The crude product was purified by chromatography on silica gel, using cyclohexane/dichloromethane (1/1) as eluent, to give CTV **57** as a white powder (114 mg, 64 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.53 (br, 6H, Ar-*H*), 7.46 (s, 3H, Ar-*H*), 7.31 (br, 9H, Ar-*H*), 6.87 (s, 3H, Ar-*H*), 4.69 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.91 (s, 9H, OCH₃), 3.62 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂)

Partie Expérimentale

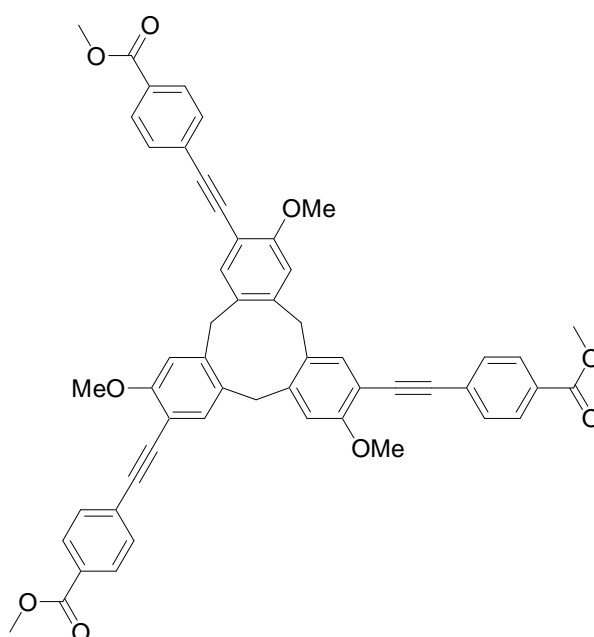
^{13}C MNR (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 159.0 (s, C_{Ar}), 141.5 (s, C_{Ar}), 135.0 (s, C_{Ar}), 131.8 (s, C_{Ar}), 131.0 (s, C_{Ar}), 128.4 (s, C_{Ar}), 128.2 (s, C_{Ar}), 123.8 (s, C_{Ar}), 112.6 (s, C_{Ar}), 112.6 (s, C_{Ar}), 93.2 (s, $\text{C}\equiv\text{CPh}$), 85.8 (s, $\text{C}\equiv\text{CPh}$), 56.3 (OCH_3), 36.7 (Ar-CH_2).

IR (neat, ν cm^{-1}): 3033, 2969, 2937, 2851, 2822, 2225, 1591, 1502, 1481, 1441, 1391, 1295, 1242, 1199, 1071, 1003.

Melting point: Decomposition over 253 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for $\text{C}_{48}\text{H}_{36}\text{O}_3$, Na adduct: calculated, 683.2565; found, 683.2556

methyl 4-[2-(3,8,13-trimethoxy-7,12-bis{2-[4-(methoxycarbonyl)phenyl]ethynyl}-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl)ethynyl]benzoate (58)



The same reaction procedure as described for **56** was used, from CTV **6** (196 mg, 0.27 mmol) using methyl 4-ethynylbenzoate (390 μL , 2.4 mmol, 9 eq.). The crude product was purified by chromatography on silica gel, using cyclohexane/dichloromethane (25/75) as eluent, followed by dichloromethane and dichloromethane/ethyl acetate (95/5) finally. The solid product was recrystallised from diethylether/dichloromethane (80/20), to give after drying CTV **58** as a pale yellow powder (170 mg, 77 % yield).

The methyl 4-ethynylbenzoate was synthesized following the procedure described by Li *et al.*⁶

^1H MNR (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 8.01 (d, $J = 8.6$ Hz, 6H, Ar- H), 7.58 (d, $J = 8.6$ Hz, 6H, Ar- H), 7.48 (s, 3H, Ar- H), 6.91 (s, 3H, Ar- H), 4.78 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2), 3.94 (s, 9H, OCH_3), 3.93 (s, 9H, COOCH_3), 3.69 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2).

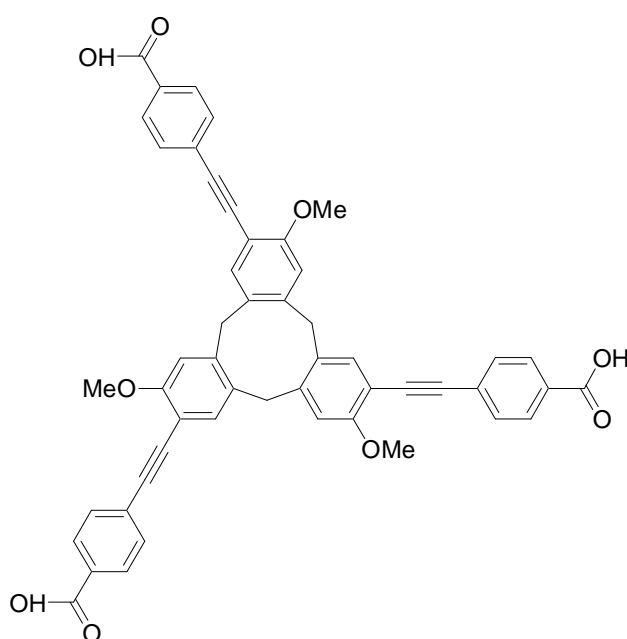
^{13}C MNR (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 166.8 (s, COOMe), 159.3 (s, C_{Ar}), 142.1 (s, C_{Ar}), 135.14 (s, C_{Ar}), 131.8 (s, C_{Ar}), 131.0 (s, C_{Ar}), 129.7 (s, C_{Ar}), 129.5 (s, C_{Ar}), 128.6 (s, C_{Ar}), 112.7 (s, C_{Ar}), 111.2 (s, C_{Ar}), 92.6 (s, $\text{C} \equiv \text{C}$), 88.9 (s, $\text{C} \equiv \text{C}$), 56.5 (OCH_3), 52.4 (COOCH_3), 36.9 (Ar-CH_2).

IR (neat, ν cm^{-1}): 3001, 2954, 2844, 2822, 2205, 1713, 1598, 1491, 1431, 1392, 1270, 1245, 1163, 1102, 1074.

Melting point: 256 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for $\text{C}_{54}\text{H}_{42}\text{O}_9$, Na adduct: calculated, 857.2721; found, 857.2729.

4-(2-(7,12-bis[2-(4-carboxyphenyl)ethynyl]-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl)ethynyl)benzoic acid (63)



CTV **58** (100 mg, 0.12 mmol) was dissolved in 10 mL of THF, and 5 mL of 5M sodium hydroxyde solution was added. The reaction mixture was warmed up to 50 °C. After 24h, THF was removed under vacuum, and 1M HCl solution was added to remaining solution to reach pH 1. The precipitate was collected and then rinsed with 0,1 M HCl solution (80 mL) and diethylether. Finally, the solid was dried under vacuum overnight at 45 °C. CTV **63** was obtained as a white solid (77 mg, 88 %).

^1H MNR (400 MHz, DMSO-d_6) (δ ppm): 13.1 (br, 3H, COOH), 7.96 (d, $J = 8$ Hz, 6H, Ar-H), 7.79 (s, 3H, Ar-H), 7.60 (d, $J = 8$ Hz, 6H, Ar-H), 7.32 (s, 3H, Ar-H), 4.85 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2), 3.87 (s, 9H, OCH_3), 3.76 (d, $J = 13.6$ Hz, 3H, Ar- CH_2).

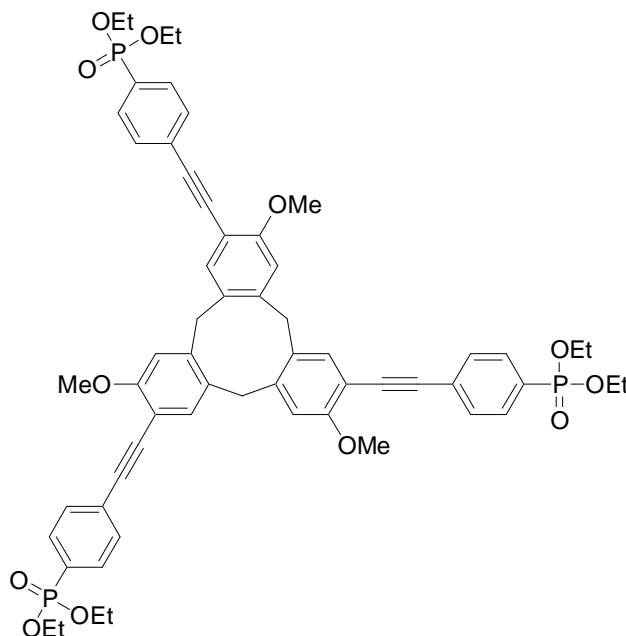
^{13}C MNR (100 MHz, DMSO-d_6) (δ ppm): 166.7 (s, COOH), 158.5 (s, C_{Ar}), 143.0 (s, C_{Ar}), 134.8 (s, C_{Ar}), 131.4 (s, C_{Ar}), 131.3 (s, C_{Ar}), 130.2 (s, C_{Ar}), 129.5 (s, C_{Ar}), 127.1 (s, C_{Ar}), 112.9 (s, C_{Ar}), 109.3 (s, C_{Ar}), 91.8 (s, $\text{C} \equiv \text{C}$), 89.1 (s, $\text{C} \equiv \text{C}$), 56.2 (OCH_3), 35.1 (Ar-CH_2).

IR (neat, ν cm^{-1}): 2929, 2851, 2822, 2654, 2208, 1688, 1598, 1556, 1491, 1406, 1388, 1271, 1245, 1163, 1070.

Melting point: Decomposition from 255 °C.

HRMS (ESI, TOF, negative mode) m/z for C₅₁H₃₅O₉: calculated, 791.2286 ; found, 791.2309.

diethyl 4-[2-(7,13-bis(2-[4-(diethoxyphosphoryl)phenyl]ethynyl)-3,8,12-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononen-2-yl)ethynyl]phenylphosphonate (59)



The same reaction procedure as described for **56** was used, from CTV **6** (400 mg, 0.54 mmol) using diethyl (4-ethynylphenyl)phosphonate (1.162 mg, 4.9 mmol, 9 eq.). The crude product was purified by chromatography on silica gel, using dichloromethane/ethylacetate (100/0) up to (0/100) as eluent. CTV **59** was obtained as a white solid (258 mg, 45 % yield).

The diethyl (4-ethynylphenyl)phosphonate was synthesized following the procedure described by Yashima *and co.*⁷

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 7.77 (dd, J = 8 Hz, J' = 13 Hz, 6H, Ar-H), 7.60 (m, 6H, Ar-H), 7.47 (s, 3H, Ar-H), 6.90 (s, 3H, Ar-H), 4.78 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 4.11 (m, 6H, OCH₂CH₃), 3.93 (s, 9H, OCH₃), 3.68 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 1.32 (t, J = 6.8 Hz, 9H, OCH₂CH₃).

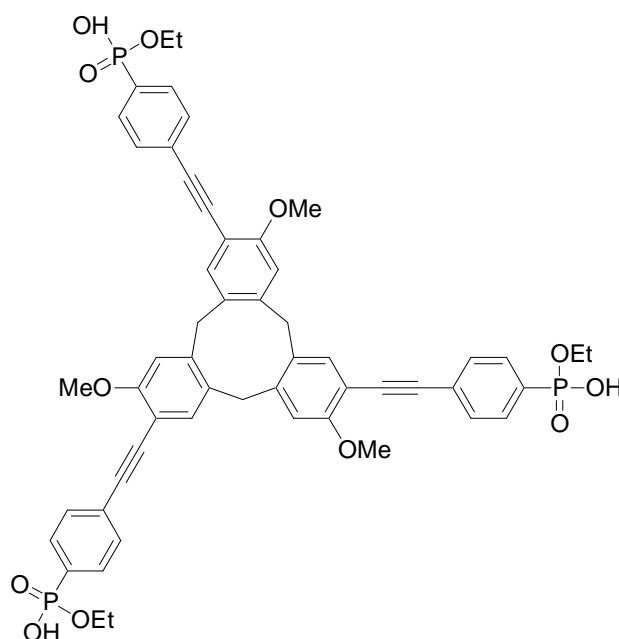
³¹P MNR (162 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 18.1 (s).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 159.2 (s, C_{Ar}), 142.0 (s, C_{Ar}), 135.0 (s, C_{Ar}), 131.7 (d, J = 5 Hz, C_{Ar}), 131.6 (d, J = 7.5 Hz, C_{Ar}), 130.9 (s, C_{Ar}), 128.0 (d, J = 1.5 Hz, C_{Ar}), 127.9 (d, J_{C-P} = 94 Hz, C_{Ar}), 112.6 (s, C_{Ar}), 111.0 (s, C_{Ar}), 92.3 (s, C ≡ C), 88.6 (s, C ≡ C), 62.3 (s, OCH₂CH₃), 56.4 (OCH₃), 36.9 (Ar-CH₂), 16.5 (s, OCH₂CH₃).

Melting point: Decomposition over 265 °C.

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for C₆₀H₆₃O₁₂P₃, Na adduct: calculated, 1091.3424 ; found, 13091.3415

ethyl hydrogen 4-{2-[7,13-bis(2-{4-[ethoxy(hydroxy)phosphoryl]phenyl}ethynyl)-3,8,12-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl]ethynyl}phenyl}phosphonate
(64)



CTV **59** (150 mg, 0.14 mmol) was dissolved in 10 mL of THF. A 5M sodium hydroxide solution (5 mL, 25 mmol, 180 eq.) was added and the solution was allowed to react at 50°C for 24 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature, and the THF was removed under vacuum. A 1 M HCl solution was added to the crude to reach pH < 1. The precipitate formed was filtered and rinsed third with 0.1M HCl, followed by diethylether. The solid obtained was dried under vacuum at 45°C for one day. CTV **64** was obtained as a beige solid (138 mg, 99 % yield).

¹H MNR (400 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 7.78 (s, 3H, Ar-H), 7.70 (dd, J = 12 Hz, J' = 8 Hz, 6H, Ar-H), 7.60 (m, 6H, Ar-H), 7.31 (s, 3H, Ar-H), 4.83 (d, J = 13 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.90 (m, 6H, OCH₂CH₃), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 3.74 (d, J = 13 Hz, 3H, Ar-CH₂), 1.18 (t, J = 7 Hz, 6H, OCH₂CH₃).

³¹P MNR (162 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 14.0

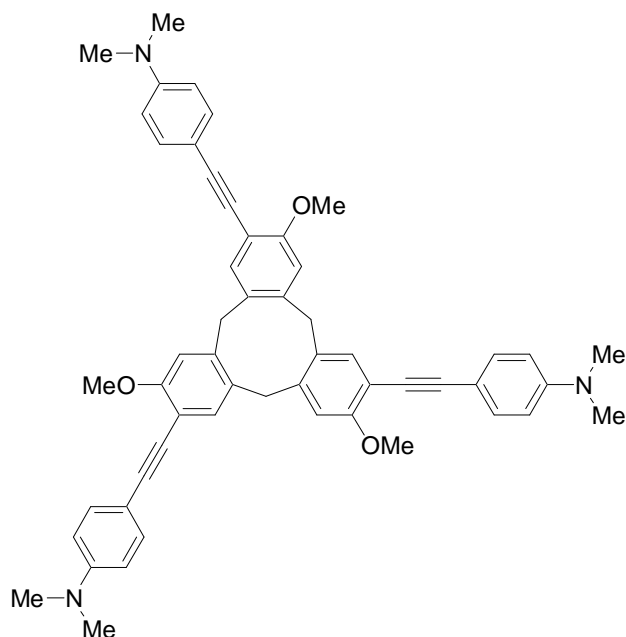
¹³C MNR (100 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): running

IR (neat, ν cm⁻¹): 2979, 2929, 2904, 2848, 2826, 2208, 1591, 1506, 1488, 1441, 1388, 1299, 1245, 1199, 1159, 1124.

Melting point: Decomposition over 265 °C

HRMS : running

4-[2-(7,13-bis[2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethynyl]-3,8,12-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononen-2-yl)ethynyl]-N,N-dimethylaniline (60)



The same reaction procedure as described for **56** was used, from CTV **6** (300 mg, 0.4 mmol) using (530 mg, 3.65 mmol, 9 eq.). After evaporation the crude is dissolved into hot DCM (10 mL) and poured into diethylether (60 mL) at 0°C. The precipitate obtained was collected and rinsed with diethylether/DCM (80/20) up to get a white solid. The crude solid was finally purified by chromatography on silica gel, using dichloromethane/methanol (95/5) as eluent. CTV **60** was obtained as a yellow solid (280 mg, 87 % yield).

¹H MNR (400 MHz, **CDCl₃**) (δ ppm): 7.44 (s, 3H, Ar-*H*), 7.41 (d, *J* = 9Hz, 6H, Ar-*H*), 6.87 (s, 3H, Ar-*H*), 6.42 (d, *J* = 9 Hz, 6H, Ar-*H*), 4.73 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H, CH₂-Ar), 3.91 (s, 9H, OCH₃), 3.62 (d, *J* = 13,6 Hz, 3H, CH₂-Ar), 2.98 (s, 18H, NCH₃).

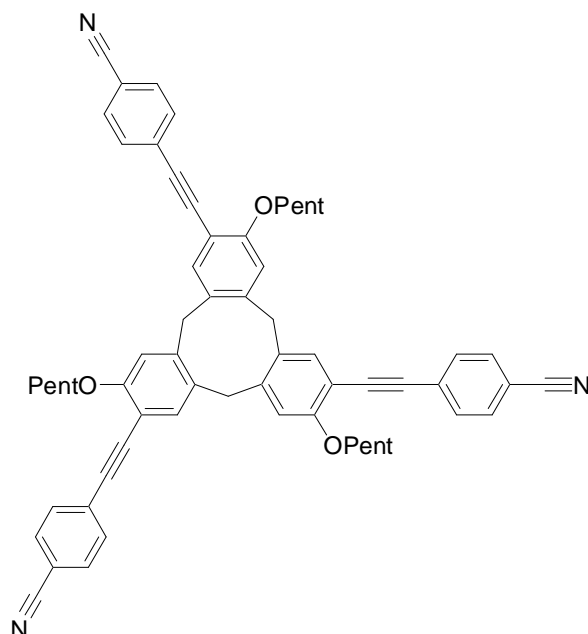
¹³C MNR (100 MHz, **CDCl₃**) (δ ppm): 158.7 (C_{Ar}), 150.2 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 132.9 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 112.8 (C_{Ar}), 112.4 (C_{Ar}), 112.0 (C_{Ar}), 110.8 (C_{Ar}), 94.3 (C ≡ C), 83.7 (C ≡ C), 56.5 (OCH₃), 40.5 (NCH₃), 36.9 (Ar-CH₂).

IR (neat, ν cm⁻¹): 2937, 2848, 2794, 2623, 2205, 1606, 1520, 1450, 1441, 1392, 1354, 1298, 1248, 1202, 1158, 1127, 1070.

Melting point: Decomposition over 265 °C.

HRMS (FD, negative mode) *m/z* for C₅₄H₅₁N₃O₃: calculated, 789.39304 ; found, 789.38994.

4-{2-[7,13-bis[2-(4-cyanophenyl)ethynyl]-3,8,12-tris(pentyloxy)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl]ethynyl}benzonitrile (**61**)



The same reaction procedure as described for **56** was used, from CTV **37** and not **6** (200 mg, 0.22 mmol) using 4-ethynylbenzonitrile (252 mg, 1.99 mmol, 9 eq.). The crude was purified by chromatography on silica gel, using cyclohexane/dichloromethane from (80/20) up to (0/100) as eluent. CTV **61** was obtained as a white solid (148 mg, 74 % yield).

¹H MNR (400 MHz, **CDCl₃**) (δ ppm): 7.61 (d, J = 8 Hz, 6H, Ar-H), 7.56 (d, J = 8 Hz, 6H, Ar-H), 7.44 (s, 3H, Ar-H), 7.89 (s, 3H, Ar-H), 4.75 (d, J = 13 Hz, 3H, CH₂-Ar), 4.08 (m, 6H, OCH₂), 3.66 (d, J = 13 Hz, 3H, CH₂-Ar), 1.83 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.49 (m, 6H, CH₂ alkyl), 1.39 (m, 6H, CH₂ alkyl), 0.88 (t, J = 7 Hz, 9H, CH₃).

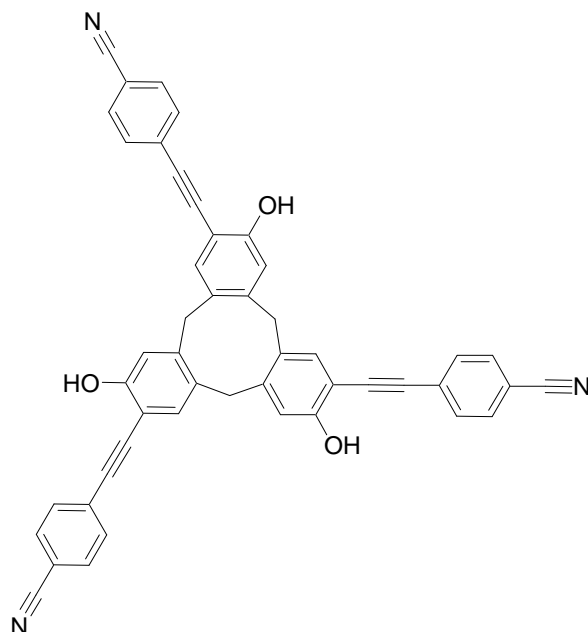
¹³C MNR (100 MHz, **CDCl₃**) (δ ppm): 159.1 (C_{Ar}), 142.4 (C_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 132.2 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 130.9 (C_{Ar}), 118.9 (C_{Ar}), 118.8 (CN), 114.0 (C_{Ar}), 111.3 (C_{Ar}), 111.1 (C_{Ar}), 91.7 (C≡C), 90.7 (C≡C), 69.3 (OCH₂), 36.9 (Ar-CH₂), 29.0 (CH₂ alkyl), 28.4 (CH₂ alkyl), 22.6 (CH₂ alkyl), 14.3 (CH₃).

IR (neat, ν cm⁻¹): 2450, 2926, 2860, 2852, 2210, 1598, 1506, 1492, 1468, 1404, 1389, 1310, 1248, 1196, 1158, 1069.

Melting point: Decomposition over 265 °C.

HRMS (FD, positive mode) m/z for C₆₃H₅₇N₃O₃: calculated, 903.43999 ; found, 903.44093.

4-(2-(7,13-bis[2-(4-cyanophenyl)ethynyl]-3,8,12-trihydroxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononen-2-yl)ethynyl)benzotrile (62)



CTV **61** (60 mg, 0.066 mmol) was dissolved in 5 mL of dried dichloromethane, under nitrogen atmosphere. The solution was cooled down to 0 °C, and 1M boron tribromide in DCM (3 mL, 5.9 mmol, 45 eq.) was added slowly. Then, the reaction was allowed to warm up at room temperature. After 12h, 40mL of distilled water was added to the reaction mixture at 0°C. Then the aqueous solution was extracted with ethylacetate (3 x 50 mL). Then the organic phases were washed with water, before being dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The solid obtained was digested with diethylether and dichloromethane. After, drying overnight under vacuum at 50 °C, CTV **62** is obtained as a white solid (38 mg, 84 % yield).

¹H MNR (400 MHz, **DMSO-d₆**) (δ ppm): 9.95 (s, 3H, OH), 7.87 (d, J = 9Hz, 6H, Ar-H), 7.67 (d, J = 9Hz, 6H, Ar-H), 7.44 (s, 3H,, Ar-H), 7.02 (s, 3H,, Ar-H), 4.72 (d, J = 13 Hz, 3H, CH₂-Ar), 3.61 (d, J = 13 Hz, 3H, CH₂-Ar).

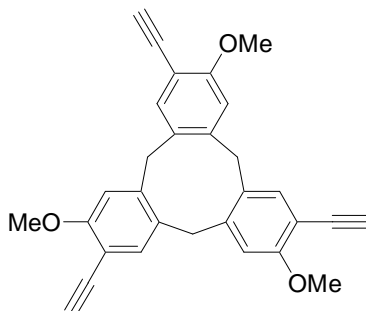
¹³C MNR (100 MHz, **DMSO-d₆**) (δ ppm): 157.2 (C_{Ar}), 143.4 (C_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 132.6 (C_{Ar}), 131.9 (C_{Ar}), 130.2 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 118.5 (C_{Ar}), 116.7 (CN), 110.4 (C_{Ar}), 107.5 (C_{Ar}), 91.1 (C ≡ C), 90.9 (C ≡ C), 34.9 (Ar-CH₂).

IR (neat, ν cm⁻¹): 2983, 2911, 2858, 2223, 2212, 1595, 1563, 1502, 1484, 1406, 1306, 1274, 1245, 1209, 1170, 1145, 1056.

Melting point: Decomposition over 265 °C.

HRMS : running

2,7,12-triethynyl-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (65)



CTV **56** (200 mg, 0.308 mmol) was dissolved in 10 mL of dried THF under nitrogen atmosphere. Tetrabutylammonium fluoride (4.62 mL of 1M in THF, 4.62 mmol, 15 eq.) was added and the solution was allowed to react at 25°C under argon atmosphere overnight. The THF was evaporated under vacuum and distilled water (150 mL) was added to the crude. This one was extracted three times (100 mL) with dichloromethane. The organic phases were washed with water, dried with anhydrous magnesium sulfate and concentrated under vacuum. The solid obtained was rinsed with diethyl ether and dried under vacuum. CTV **65** was obtained as a white powder (127 mg, 95 % yield).

¹H MNR (400 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 7.64 (s, 3H, Ar-H), 7.19 (s, 3H, Ar-H), 4.75 (d, J = 13.2 Hz, 3H, Ar-CH₂), 4.12 (s, 9H, OCH₃), 3.78 (d, J = 13.2 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.66 (s, 3H, SiCH₃).

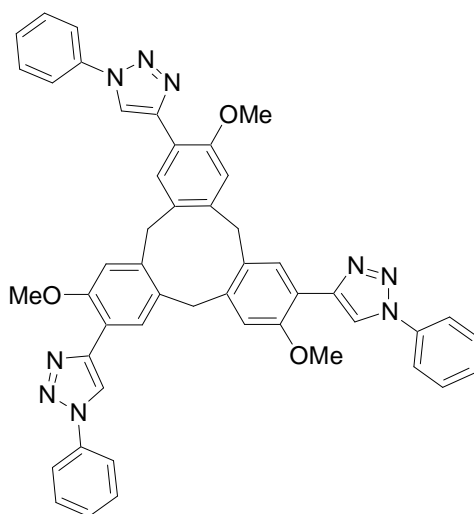
¹³C MNR (100 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 158.8 (s, C_{Ar}), 142.4 (s, C_{Ar}), 135.0 (s, C_{Ar}), 131.2 (s, C_{Ar}), 112.6 (s, C_{Ar}), 109.2 (s, C_{Ar}), 83.9 (s, C≡CH), 80.1 (s, C≡CH), 56.3 (OCH₃), 36.6 (Ar-CH₂).

IR (neat, ν cm⁻¹): 3276, 2929, 2847, 2098, 1606, 1559, 1492, 1463, 1388, 1199, 1134, 1074.

Melting point: Decomposition over 200 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for C₃₀H₂₄O₃, Na adduct: calculated, 455.1617; found, 455.1637.

1-phenyl-4-[3,8,13-trimethoxy-7,12-bis(1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl]-1H-1,2,3-triazole (66)



Partie Expérimentale

CTV **65** (30 mg, 0.069 mmol) and 1-azidobenzene (74.4 mg, 0.062 mmol, 9 eq.) were dissolved in 5 mL of DMSO/water (2/3) under argon atmosphere. After 20 minutes of argon sparging, copper sulfate (17 mg, 0.014 mmol, 1.5 eq.), and sodium ascorbate (41 mg, 0.02 mmol, 3 eq.) were added and the solution was heated to 50°C under argon atmosphere. After 48 hr, the solution was cooled down to room temperature and 50 mL of distilled water were added. The crude was extracted with dichloromethane. The organic phases were dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The solid was rinsed with diethyl ether and then dried under vacuum at 40°C overnight. CTV **66** was obtained as a yellow powder (22 mg, 40 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 8.48 (s, 3H), 8.32 (s, 3H), 7.77 (d, J = 7.4 Hz, 6H), 7.5 (t, J = 7.4 Hz, 6H), 7.4 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 7.16 (s, 3H), 4.86 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.96 (s, 9H, OCH₃), 3.87 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂).

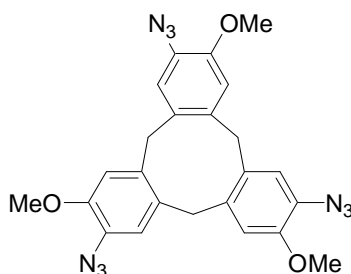
¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 154.8, 143.8, 141.2, 137.4, 131.6, 129.8, 129.0, 128.5, 120.7, 120.5, 117.7, 112.6, 55.98, 36.8.

IR (neat, ν cm⁻¹): 2919, 2851, 1595, 1495, 1463, 1420, 1378, 1256, 1235, 1149, 1113, 1031.

Melting point: Decomposition over 265 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for C₄₈H₃₉N₉O₃, Na adduct: calculated, 812.3068, found 812.3053.

2,7,13-triazido-3,8,12-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononene (67)



CTV **33** (140 mg, 0.35 mmol) was dissolved in 1.5 mL of 10 M hydrochloric acid, under nitrogen atmosphere. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and sodium nitrite (143 mg, 2.1 mmol, 6 eq.) diluted in 1.5 mL of water was added slowly. After 5 min, the sodium azide (269 mg, 4.1 mmol, 12 eq.) dissolved in 4 mL of water was slowly added to the reaction mixture. After 2h, at 0 °C, distilled water (80mL) was added and the reaction mixture was allowed to warmed up at room temperature. The crude was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic phases were dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The solid was filtered through silica gel, eluted by dichloromethane. CTV **67** was obtained as a white powder (132 mg, 79 % yield).

¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 6.91 (s, 3H), 6.80 (s, 3H), 4.69 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.85 (s, 9H, OCH₃), 3.55 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂).

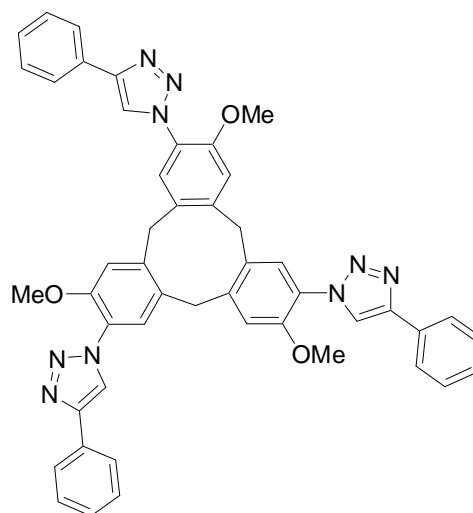
Partie Expérimentale

^{13}C MNR (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 151.1 (s, C_{Ar}), 136.8 (s, C_{Ar}), 132.0 (s, C_{Ar}), 127.0 (s, C_{Ar}), 121.6 (s, C_{Ar}), 113.6 (s, C_{Ar}), 56.3 (OCH_3), 36.3 (Ar-CH_2).

IR (neat, ν cm^{-1}): 2937, 2930, 2844, 2830, 2358, 2340, 1604, 1494, 1445, 1396, 1316, 1196, 1065.

HRMS (FD, positive mode) m/z for $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_9\text{O}_3$: calculated, 483.17673, found 483.17516.

4-phenyl-1-[3,8,13-trimethoxy-7,12-bis(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclononen-2-yl]-1H-1,2,3-triazole (70)



CTV **67** (50 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 6 mL of DMSO/water (5/1) mixture and 4-ethynylbenzene (102 μL , 0.93 mmol, 9 eq.) was added. After 20 minutes of nitrogen sparging, copper sulfate (25 mg, 0.15 mmol, 1.5 eq.), and sodium ascorbate (61 mg, 0.3 mmol, 3 eq.) and triethylamine (1 mL) were added and the solution was heated to 70°C under nitrogen atmosphere. After 24 h, the solution was cooled down to room temperature and distilled water (80 mL) were added. The crude was extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The organic phases were dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The solid was rinsed with diethyl ether and then dried under vacuum at 40°C overnight. CTV **70** was obtained as a yellow solid (32 mg, 39 % yield).

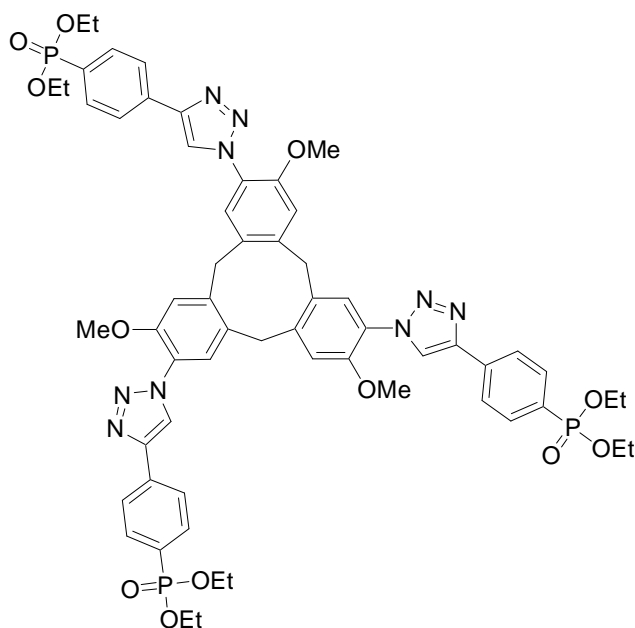
^1H MNR (400 MHz, DMSO-d_6) (δ ppm): 8.81 (s, 3H), 8.02 (s, 3H), 7.90 (d, $J = 8$ Hz, 6H), 7.57 (s, 3H), 7.46 (t, $J = 7$ Hz, 6H), 7.35 (t, $J = 7$ Hz, 3H), 5.05 (d, $J = 13$ Hz, 3H, Ar-CH_2), 3.94 (d, $J = 13$ Hz, 3H, Ar-CH_2), 8.08 (s, 9H, OCH_3).

IR (neat, ν cm^{-1}): 2926, 2860, 2362, 2337, 1599, 1513, 1484, 1456, 1441, 1263, 1149, 1024.

Melting point: decomposition over 220 °C

HRMS (ESI, TOF, positive mode) m/z for $\text{C}_{48}\text{H}_{39}\text{N}_9\text{O}_3$, Na adduct: calculated, 312.3068, found 812.3034.

diethyl 4-[1-(7,12-bis[4-[4-(diethoxyphosphoryl)phenyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]phenylphosphonate (71)



CTV **67** (50 mg, 0.1 mmol) was dissolved in 6 mL of DMSO/water (5/1) mixture and diethyl 4-ethynylphenylphosphonate (221 μ L, 0.9 mmol, 9 eq.) was added. After 20 minutes of nitrogen sparging, copper sulfate (30 mg, 0.3 mmol, 3 eq.), and sodium ascorbate (50 mg, 0.3 mmol, 3 eq.) were added and the solution was heated to 70°C under nitrogen atmosphere. After 48 h, the solution was cooled down to room temperature and distilled water (150 mL) were added. The crude was filtered on a büchner and the solid rinsed with distilled water. The solid was dissolved into dichloromethane. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under vacuum. The solid was rinsed with diethyl ether until as far as the diethyl ether was uncolored. After drying under vacuum at 40°C overnight, CTV **71** was obtained as a yellow solid (117 mg, 95 % yield).

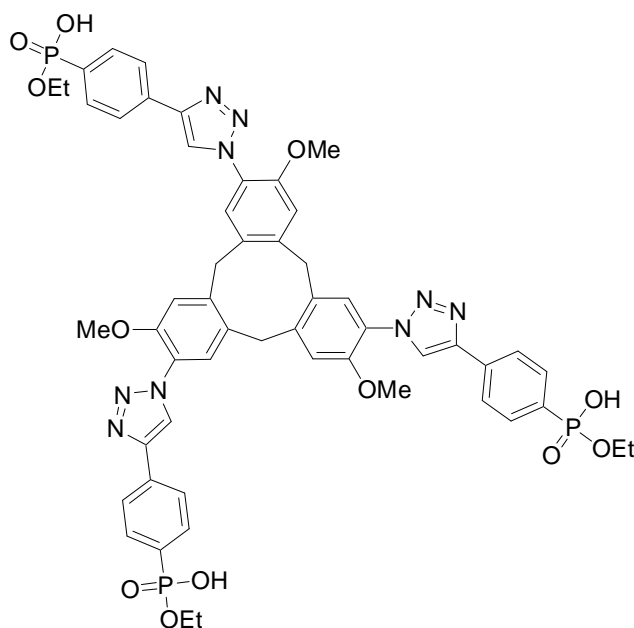
¹H MNR (400 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 8.41 (s, 3H, CH triazole), 8.01 (s, 3H, Ar-H), 7.98 (m, 6H, Ar-H), 7.88 (dd, J = 8 Hz, J' = 13 Hz, 6H, Ar-H), 7.15 (s, 3H, Ar-H), 4.91 (d, J = 14 Hz, 3H, Ar-CH₂), 4.13 (m, 12H, OCH₂CH₃), 3.93 (s, 9H, OCH₃), 3.89 (d, J = 14 Hz, 3H, Ar-CH₂), 1.33 (t, J = 7.5 Hz, 18H, OCH₂CH₃).

³¹P MNR (162 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 14.7 (s).

¹³C MNR (100 MHz, CDCl₃) (δ ppm): 150.7 (s, C_{Ar}), 145.3 (s, C_{triazole}), 142.9 (s, C_{Ar}), 133.4 (d, J = 3 Hz, C_{Ar}), 131.8 (d, J = 7 Hz, C_{Ar}), 131.7 (s, C_{Ar}), 130.6 (d, J = 183 Hz, C_{Ar}), 127.7 (d, J = 14 Hz, C_{Ar}), 124.4 (s, C_{Ar}), 124.3 (s, C_{Ar}), 114.38 (s, C_{triazole}), 60.7 (s, OCH₂CH₃), 56.6 (OCH₃), 35.1 (Ar-CH₂), 16.2 (s, OCH₂CH₃).

Partie Expérimentale

ethyl hydrogen 4-{1-[7,12-bis(4-{4-[ethoxy(hydroxy)phosphoryl]phenyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3,8,13-trimethoxy-10,15-dihydro-5H-tribenzo[a,d,g]cyclonon-2-yl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}phenylphosphonate (72)



CTV **71** (50 mg, 0.04 mmol) was dissolved in 5 mL of THF. A 5 M sodium hydroxide solution (2.5 mL, 12.5 mmol, 310 eq.) was added and the solution was allowed to react at 50°C for 24 h. The reaction mixture was cooled down to room temperature, and the THF was removed under vacuum. After filtration, a 1 M HCl solution was added to the filtrate to reach pH < 1. The precipitate formed was collected and rinsed third with 1M HCl, followed by diethylether. The solid obtained was dried under vacuum at 45°C for overnight. CTV **72** was obtained as a yellow solid (35 mg, 86 % yield).

¹H MNR (400 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 8.94 (s, 3H, CH triazole), 8.04 (s, 3H, Ar-H), 8.02 (m, 6H, Ar-H), 7.78 (dd, J = 8 Hz, J' = 12 Hz, 6H, Ar-H), 7.59 (s, 3H, Ar-H), 5.06 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.95 (d, J = 13.6 Hz, 3H, Ar-CH₂), 3.88 (m, 6H, OCH₂CH₃), 3.81 (s, 9H, OCH₃), 1.18 (t, J = 7 Hz, 9H, OCH₂CH₃).

³¹P MNR (162 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): 14.6 (s).

¹³C MNR (100 MHz, DMSO-d₆) (δ ppm): running

IR (neat, ν cm⁻¹): 2958, 2919, 2851, 1606, 1509, 1491, 1463, 1392, 1302, 1249, 1163, 1131, 1074;

Melting point: Decomposition over 165 °C

HRMS (ESI, positive mode) : running

B. Spectroscopy

a. General methods and materials

UV-Vis spectra were recorded on a CARY 100 scan spectrophotometer and fluorescence spectra on a CARY Eclipse spectrophotometer for the titrations, fluorescence quantum yield and absorption coefficient determination. The temperature is regulated in the spectrophotometer thanks to a Peltier Varian Cary type SPVF 1x0.

Fluorescence quantum yields were measured by using standard methods on air-equilibrated samples at room temperature. The fluorescence quantum yields were obtained by using 7-methoxycoumarin-4-acetic acid in methanol as a reference ($\Phi_{\text{ref}} = 0.18$)⁸ or the quinine bisulfate in 0.5M H₂SO₄ ($\Phi_{\text{ref}} = 0.546$)⁹. The reported fluorescence quantum yields are within $\pm 10\%$.

For the CTV of the first generation, time-resolved fluorescence experiments were performed using a frequency-tripled Nd-YAG laser (355 nm, 8 ns pulse) for excitation. Right-angle detection was used to collect the luminescence spectra using a gated CCD camera and spectrograph at variable delays.

For the extended CTV (by Sonogashira and click reactions) fluorescence lifetimes were measured by time correlated single-photon counting (TCSPC) by using an Edinburgh Instruments (FLS 920) fluorimeter, at room temperature. Excitation was achieved by a hydrogen-filled nanosecond flashlamp (repetition rate 40 kHz). The instrument response (FWHM ca. 1 ns) was determined by measuring the light scattered by a Ludox suspension. The TCSPC traces were analyzed by standard iterative deconvolution methods implemented in the software of the fluorimeter. All compounds displayed a monoexponential or a biexponential fluorescence decays (with $\chi^2 < 1.5$).

Two-photon-absorption (TPA) measurements were conducted by investigating the two-photon-excited fluorescence (TPEF) of the fluorophores in DMSO or aqueous buffers (PBS or HEPES) at RT on air-equilibrated solutions (10^{-4} M), by using a Ti:sapphire laser delivering 150-fs excitation pulses, according to the experimental protocol established by Xu and Webb.¹⁰ This protocol avoids contributions from excited-state absorption that are known to result in largely overestimated TPA cross sections. The quadratic dependence of the fluorescence intensity on the excitation intensity was verified for each data point, indicating that the measurements were carried out in intensity regimes in which saturation or photodegradation do not occur. TPEF measurements were calibrated relative to the absolute TPEF action cross sections determined by Xu and Webb for fluorescein (10^{-4} M in 0.01M aqueous NaOH) in the 690–1000 nm range.¹⁰ This procedure provides the TPEF-action cross section $\sigma^2\Phi$ from which the corresponding σ^2 value is derived. The experimental

uncertainty of the absolute action cross sections determined by this method has been estimated to be $\pm 20\%$. Titrations

b. Titrations

Guest aliquots were added to a solution of receptor CTV aqueous buffer, placed in the fluorimeter cell at 293 K. After each guest addition, the cell was carefully shaken and allowed to equilibrate for at least 2 min before recording the absorption spectrum followed by the emission one. Intensity changes in the emission spectra of the CTV were monitored. The integration of the signal is done in order to obtain the area of the curve as a function of the guest concentration. This curve can be analyzed using a specifically written nonlinear least square curve-fitting program implemented within Origin8®. The volume change due to the guest addition is taken into account in the calculation. Assuming a 1:1 stoichiometry, the binding constants (K_{ass}) were calculated.

For the CTV substituted by carboxylic acids the titrations were performed in PBS pH 7.4, buffer (total salts concentration of 140 mM), and for thus with phosphonate substituents in HEPES pH 7.5, 100 mM.

The concentration of the probe without extension of conjugation were typically of $5 \cdot 10^{-6}$ M. For the probe with extended aromatic system (by Sonogashira) the concentration was set at $2.5 \cdot 10^{-6}$ M.

C. Microcalorimetry

All ITC measurements were carried out on an ITC₂₀₀ titration calorimeter (Microcal, Inc., Northampton, MA/GE Healthcare). They were repeated at least two times. All the experiments were run at the same temperature 298.15 K in conventional titration mode: the ligand solution is added sequentially in 1.5 μL aliquots (except for the first injection: 0.5 μL) for a total of 24 (+1) injections, each at 5 s (1s) duration at 300 s intervals in order to give the system enough time to recover the experimental baseline and at a syringe rotating speed of 250 rpm, which ensures the homogeneity of the calorimetric cell solution ($V = 200 \mu\text{L}$) containing initially the receptor solution.

Fits of the binding curves corrected for the dilutions enthalpies obtained from blank experiments (ligand solution injected in buffer, buffer injected in receptor solution) have been made with the standard built-in Origin 7[®] (Microcal) program using the One site model.

The solution of CTV had a concentration of 10^{-3} M and the target (aliquot) a concentration of 20 mM.

D. DLS measurements

The size of the objet formed by the CTVs, were determined with a Zetasizer Nano ZS ou S-90 (Malvern Instruments) with a laser HeNe and a detection angle of $\theta_{\text{diff}} = 173^\circ$. All the experiments were carried at 25 °C with solutions of CTV **63** and **64** at $5 \cdot 10^{-4}$ M or 10^{-4} M, in physiological buffer (PBS or HEPES).

E. TEM microscopy

The structure of the assembly formed by the CTV **63** in PBS buffer was visualized by transmission electron microscopy (TEM). One drop of the solution at 10^{-4} M in PBS buffer was deposited on a copper grid coated with a layer of formavar polymer covered by a carbon membrane. The grid was observed with HITACHI H7650 (120 kV) instrument, using "high resolution" mode.

Références bibliographiques

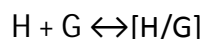
- (1) Farrugia, L. *Journal of Applied Crystallography* **1997**, 30, 565.
- (2) Sheldrick, G. M. *SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution*; University of Göttingen, Germany, 1997.
- (3) Sheldrick, G. M. *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen, Germany, 1997.
- (4) Lee, C. K.; Koo, B. S.; Lee, Y. S.; Cho, H. K.; Lee, K. J. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 1667–1670.
- (5) Adimurthy, S.; Patoliya, P. U. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 1571–1577.
- (6) Li, Q.; Rukavishnikov, A. V.; Petukhov, P. A.; Zaikova, T. O.; Jin, C.; Keana, J. F. W. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 4862–4869.
- (7) Onouchi, H.; Maeda, K.; Yashima, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7441–7442.
- (8) Farinotti, R.; Siard, P.; Bourson, J.; Kirkiacharian, S.; Valeur, B.; Mahuzier, G. *J. Chromatogr.* **1983**, 269, 81–90.
- (9) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- (10) Xu, C.; Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B-Opt. Phys.* **1996**, 13, 481–491.

Annexes

Annexe 1 : Détermination d'une constante d'affinité par spectrofluorimétrie¹

Définition des constantes d'équilibre

Dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1:1, l'équilibre de la réaction de complexation par le récepteur noté H (pour Host), de la cible, notée G (pour Guest) s'écrit :



La stabilité du complexe [H/G] est caractérisée par la constante d'équilibre, pour laquelle différentes dénominations sont employées : constante de stabilité, constante de liaison, constante d'association, constante d'affinité (notée $K_{\text{Association}}$ dans ce manuscrit). Parfois on utilise également la constante de dissociation qui est égale à l'inverse de la constante d'association ($K_{\text{Dissociation}}$). Du point de vue thermodynamique, la constante d'équilibre dépend uniquement de la température, et doit être corrélée avec les activités (a_i) des espèces :

$$K_{\text{Association}} = \frac{a_{[H/G]}}{a_H \cdot a_G} \quad (1)$$

Lorsque la solution est suffisamment diluée, les activités peuvent être approximées aux fractions molaires (quantités sans dimension), mais en solution elles sont généralement remplacées par les concentrations molaires (C_i), ainsi :

$$K_{\text{Association}} = \frac{C_{[H/G]}}{C_H \cdot C_G} \quad (2)$$

Titrages par spectrophotométrie et spectrofluorimétrie

Par la suite, la relation entre absorbance ou intensité de fluorescence est concentration sera considérée comme étant vérifiée. Par ailleurs, nous considérerons uniquement le cas où le récepteur absorbe la lumière ou émet la fluorescence mais pas la cible aux longueurs d'onde considérées.

Au cours d'une expérience de titrage, la concentration en récepteur est conservée constante et la cible est progressivement additionnée. Le spectre d'absorbance et de fluorescence sont enregistrés au départ et suite à chaque ajout. Des changements de spectre, ici des variations d'intensité de fluorescence, permettent de déterminer la constante de stabilité des complexes.

Plusieurs longueurs d'onde peuvent être utilisées au cours d'un même titrage, notamment dans le cas où différents complexes se forment. Dans ce manuscrit nous avons utilisée qu'une seule longueur d'onde.

Soit Y_0 l'absorbance ou l'intensité de fluorescence du récepteur seul, à une longueur d'onde donnée. En fluorimétrie, l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation doit être inférieure à 0,1, afin d'éviter les phénomènes de réabsorption.

Au départ, Y_0 est proportionnelle à la concentration totale en récepteur C_H de telle sorte que :

$$Y_0 = a.C_H^{\text{tot}} \quad (3)$$

et en présence d'un excès de sonde permettant d'avoir tout le récepteur complexé, Y atteint une valeur limite Y_{lim} proportionnelle à la concentration en complexe, *i.e.* à la concentration initiale en récepteur CH , d'après la loi de conservation de la matière :

$$Y_{\text{lim}} = b.C_H^{\text{tot}} \quad (4)$$

En spectrophotométrie, a et b sont les produits de la longueur du trajet optique d'absorption par les coefficients d'absorption molaire du récepteur et du complexe, respectivement. En spectrofluorimétrie, a et b sont proportionnels aux coefficients d'absorption molaire (à la longueur d'onde d'excitation) et au rendement quantique de fluorescence du récepteur et du complexe, respectivement.

Après ajout d'une quantité donnée de cible, l'absorbance ou l'intensité de fluorescence devient :

$$Y = a.C_H + b.C_{[H/G]} \quad (5)$$

Les équations de conservation de la matière pour le récepteur est :

$$C_H^{\text{tot}} = C_H + C_{[H/G]} \quad (6)$$

A partir des équations (2) à (6), on obtient,

$$K_{\text{Association}} * C_G = \frac{Y - Y_0}{Y_{\text{lim}} - Y} \quad (7)$$

Cette relation (7) est utilisée afin de déterminer $K_{\text{Association}}$ à condition que la concentration en sonde libre C_G , puisse être assimilable à la concentration totale en cible $C_G^{\text{tot}} = C_G + C_{[H/G]}$. Dans ce cas le tracé de $\frac{Y - Y_0}{Y_{\text{lim}} - Y}$ en fonction de C_G devrait être linéaire et la pente conduite à $K_{\text{Association}}$.

Lorsque Y_{lim} n'est pas mesurable en raison du fait que la complexation totale ne peut être obtenue à une concentration raisonnable en cible, il est préférable d'utiliser la relation :

$$\frac{Y}{Y - Y_0} = \frac{\alpha}{K_{Association} * C_G} + \alpha \quad \text{où } \alpha = \frac{a}{b-a} \quad \text{(8)}$$

On trace alors $\frac{Y}{Y - Y_0}$ en fonction de $\frac{1}{C_G}$, à condition toujours que $C_G^{tot} \approx C_G$ soit vérifiée. Le rapport de l'ordonnée à l'origine, à la pente de la droite construit à $K_{Association}$.

Une expression explicite de Y dans le cas de la formation d'un complexe 1 : 1 peut être obtenue à partir des équations précédente sans approximations. Les combinaisons appropriées de ces équations conduisent à l'équation du second-ordre suivant :

$$0 = C_H * x^2 - \left(C_H^{tot} + C_G^{tot} + \frac{1}{K_{Association}} \right) * x + C_G^{tot} \quad \text{avec } x = \frac{Y - Y_0}{Y_{lim} - Y_0} \quad \text{(9)}$$

Et finalement on obtient,

$$Y = Y_0 + \frac{Y_{lim} - Y_0}{2} * \left\{ 1 + \frac{C_G^{tot}}{C_H^{tot}} + \frac{1}{K_{Ass} * C_H^{tot}} - \left[\left(1 + \frac{C_G^{tot}}{C_H^{tot}} + \frac{1}{K_{Ass} * C_H^{tot}} \right)^2 - 4 * \frac{C_G^{tot}}{C_H^{tot}} \right]^{1/2} \right\}$$

On peut alors déterminer $K_{Association}$ par régression non linéaire des moindres carrés de Y en fonction de C_G^{tot} , à l'aide d'un logiciel tel qu'Origin®.

Afin de vérifier l'hypothèse $C_G^{tot} \approx C_G$, il faut que $K_{Association} * C_H^{tot} \ll 1$, sinon la cible sera majoritairement sous forme complexée et non sous forme libre.

(1) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.

Annexe 2 : Détermination d'un rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence traduit la probabilité de désexcitation par émission d'un photon suite à l'absorption d'un photon. En d'autre terme c'est le rapport du photon émis par nombre de photons absorbés. Celui-ci n'a pas d'unité et est toujours inférieur à 100 %.

La méthode la plus couramment utilisée afin de le déterminer est comparative, et nécessite l'utilisation de fluorophores dont les propriétés sont bien déterminées. En bref, l'émission du fluorophore de référence va être comparée à celle du fluorophore dont on souhaite déterminer le rendement afin d'obtenir celui-ci. Afin que cette comparaison est un sens plusieurs choses sont à respecter comme nous allons le voir.

Tout d'abord, le fluorophore de référence doit être choisit de façon à avoir une absorption quasi identique à celle du fluorophore à caractériser. Ensuite, les mêmes conditions expérimentales (puissance, filtre etc....) doivent être utilisées pour enregistrer les spectres d'absorption des deux espèces. Ceci permet d'envoyer une quantité de photon identique afin d'exciter les fluorophores. Il peut également être intéressant d'avoir une émission proche pour les deux espèces, malgré qu'un facteur de correction soit normalement fourni par les fournisseurs des spectrofluorimètres afin de prendre en compte les variations du signal détecté, en fonction de la longueur d'onde d'émission.

Une liste de fluorophores de référence est disponible dans l'ouvrage de J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New-York, 1999, Second Edition.

Les solutions utilisées ne doivent pas avoir une absorbance supérieure à 0,1 afin d'éviter tout phénomène parasite de réabsorption.

Lorsque les deux fluorophores utilisés sont solubilisés dans différent solvant il faut prendre en compte les indices de réfractions de ceux-ci.

D'un point de vue expérimental la procédure à suivre est la suivante :

1. Enregistrer les spectres d'absorption et d'émission du solvant utilisé pour l'échantillon de référence.
2. Enregistrer les spectres d'absorption et d'émission de plusieurs solution du fluorophore de référence, an faisant attention d'avoir une absorbance inférieure à 0,1.
3. Répéter les étapes 1 et 2 avec pour le fluorophore à caractérisé.

4. Soustraire les spectres des solvants à ceux des solutions contenant les fluorophores dans chacun des cas.
5. Tracer les graphiques représentant l'aire sous la courbe d'émission en fonction de l'absorbance maximale pour chacune des deux espèces (référence et échantillon) à partir des différentes mesures effectuées. Fitter les courbes obtenues à l'aide d'un modèle linéaire du type $y = \text{Grad} * x$. Le fit d'autant plus fiable que le nombre de points sera grand.
6. Le rendement quantique de fluorescence de l'échantillon ($\Phi_{\text{échantillon}}$) est donné par la relation suivante :

$$\Phi_{\text{échantillon}} = \Phi_{\text{référence}} * \left(\frac{\text{Grad}_{\text{échantillon}}}{\text{Grad}_{\text{référence}}} \right) * \left(\frac{\eta_{\text{échantillon}}^2}{\eta_{\text{référence}}^2} \right)$$

où $\Phi_{\text{référence}}$ est le rendement quantique de fluorescence de la référence, $\text{Grad}_{\text{échantillon}}$ et $\text{Grad}_{\text{référence}}$ la valeur des pentes obtenues à l'étape précédente pour l'échantillon et la référence respectivement, $\eta_{\text{échantillon}}$ et $\eta_{\text{référence}}$, les indices de réfractifs de solvants dans lesquels ont été solubiliser respectivement l'échantillon et la référence.

Afin de vérifier la référence il peut être intéressant de déterminer le rendement quantique de fluorescence d'une espèce connue avec cette dernière. La valeur obtenue doit être identique à $\pm 10 \%$ à celle décrite dans la littérature, sinon il faut revoir la référence (souples de pureté, etc.).

La précision du rendement quantique déterminé ainsi est de l'ordre de $\pm 10 \%$ au vue des différentes erreurs expérimentales et calculatoires qui s'accumule.

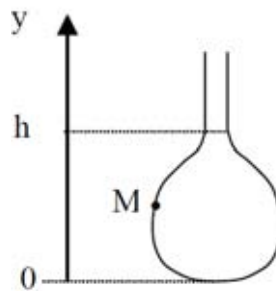
Enfin, il est important de souligner que le rendement quantique de fluorescence dépend de la température, il faut donc être vigilant, et si possible thermostatier les solutions, ainsi que faire attention à la température associé au rendement quantique de fluorescence donné pour la référence.

Annexe 3 : Mesure d'une tension de surface par la méthode de la goutte pendante²

Le principe de cette méthode consiste à laisser pendre à l'extrémité d'un fin tube capillaire une goutte, qui prend la forme d'une ampoule. Cette forme particulière est déterminée par la compétition entre les forces capillaires, qui tendent à la rendre sphérique, et la gravité, qui a pour effet de déformer la sphère. Le contour de la goutte en tout point M d'ordonnée y (figure ci dessous) est décrit par l'équation de Laplace-Young :

$$\gamma \left(\frac{1}{R1} + \frac{1}{R2} \right) = \Delta\rho g * (y - h) + \frac{2\gamma}{b}$$

où *h* et *b* sont respectivement l'ordonnée et le rayon de courbure au sommet de la goutte, *R1* et *R2* les rayons de courbures principaux au point considéré et $\Delta\rho$ la différence de densité entre les deux liquides.



En déterminant le profil de la goutte à l'équilibre (par numérisation d'image avec une caméra CCD et traitement numérique de celle-ci), on peut calculer la valeur de la tension interfaciale γ . Cette mesure est d'autant plus précise que la goutte formée est volumineuse. Plusieurs clichés sont pris à différents instants pour une même goutte en formation avant la rupture (et chute de celle-ci) pour plus de précision.

(2) De Gennes, P.-G.; Brochard-Wyart, F.; Quéré, D. *Gouttes, bulles, perles et ondes*; Belin, 2002.

Annexe 4 : Microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (TEM, de l'anglais Transmission Electron Microscopy) est une technique d'analyse utilisée pour étudier la structure d'objets ou de matériaux avec une résolution pouvant aller jusqu'à quelques nanomètres. Un faisceau d'électrons est envoyé sur l'échantillon dont l'épaisseur est suffisamment fine pour assurer la traversée des électrons incidents. Les interactions entre ces électrons et les atomes constituant l'échantillon (particule, couche de matériaux ect.) permettent d'obtenir une image de celui-ci.

La préparation des échantillons observés au cours de ce travail est relativement simple dans le cas des assemblages observés dans ce travail. Elle consiste à déposer une goutte de la solution contenant les assemblages à observer, à la surface d'une grille de microscopie en cuivre recouverte d'une fine couche de carbone amorphe. La grille est ensuite rincée à l'eau milliQ. Enfin, on sèche la grille, en appliquant un papier absorbant, au dessous de la grille.

Annexe 5 : Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), est une technique développée pour mesurer la taille des particules dans le domaine sub-micronique. Elle est basée sur la mesure du mouvement brownien, aléatoire des particules, lié aux impacts des molécules de solvant à la surface de celui-ci. Si les particules sont soumises à d'autres mouvements liés par exemple à la sédimentation, l'utilisation de cette technique n'est pas possible.

La fréquence et l'amplitude du mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. Pour une viscosité donnée, plus la particule sera petite plus son mouvement brownien sera important (en fréquence et en amplitude). De même, plus la viscosité du solvant est faible plus le mouvement brownien est rapide et ample, pour une particule de taille donnée. Il est donc nécessaire de connaître la viscosité du milieu et de la garder constante notamment en gardant la température fixe au cours de la mesure. La stabilisation de la température permet également d'éviter tout mouvement de convection qui pourrait apparaître.

Afin de mesurer le mouvement brownien des particules un faisceau laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) est irradié l'échantillon, et la lumière diffusée est collectée à un angle autour de 90° (173° pour les mesures effectuées au cours de cette étude car les solutions étaient très diluées) (cf. schéma suivant). La lumière diffusée par les particules fluctue en fonction du mouvement brownien. Il est alors possible de remonter au diamètre hydrodynamique de particule. En effet, cette technique ne permet pas de mesurer le diamètre des particules mais leurs diamètres hydrodynamiques, *i.e.* le diamètre de la sphère composée de la particule et de sa couche de solvatation. Cette technique est donc adaptée aux particules de forme relativement sphérique. Cette technique permet de déterminer la disparité des particules grâce à l'indice de polydispersité.

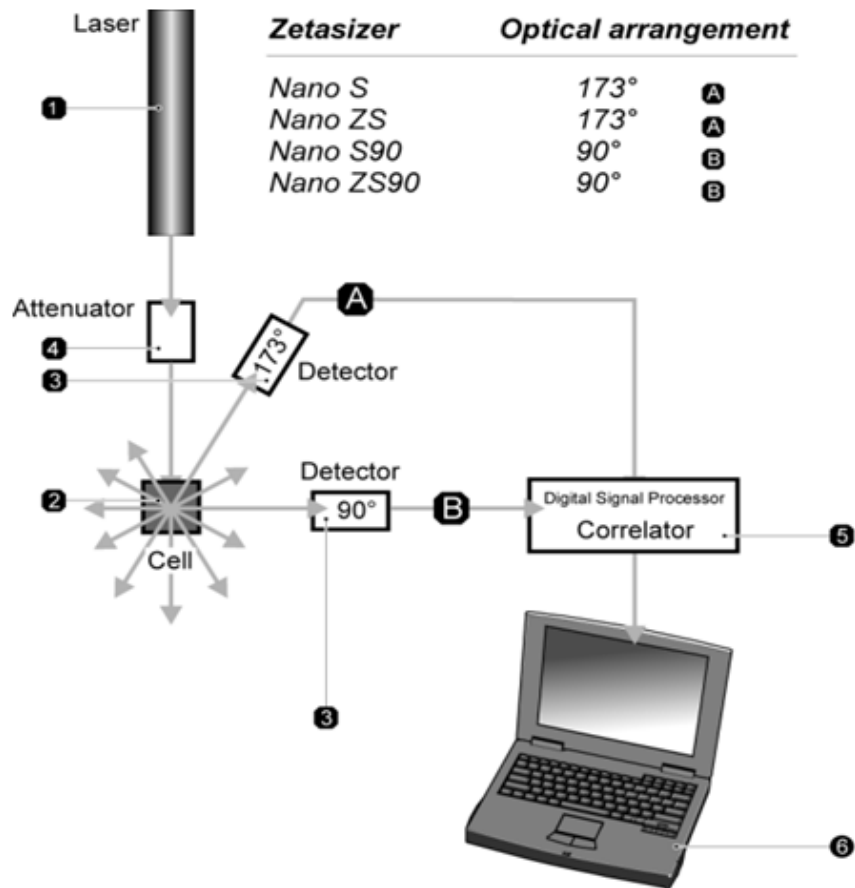
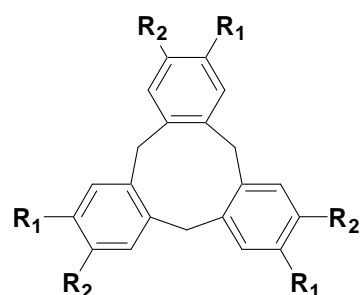


Schéma de fonctionnement des appareils de DLS utilisés

Annexe 6 : Numéros et Structures des CTVs

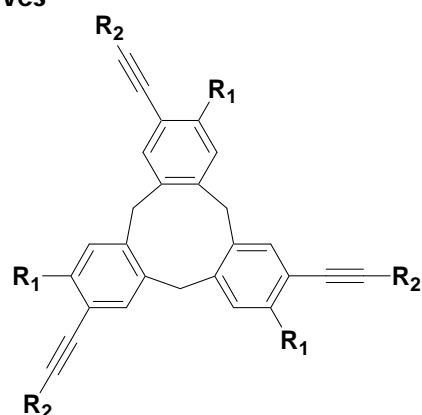
✓ CTV peu conjugués

Numéro	R ₁	R ₂
1	OMe	OMe
2	OH	OH
3	OH	OMe
4	OMe	NH ₂
5	OMe	Br
6	OMe	I
7	OMe	CHO
20	OMe	OP(O)(C ₄ H ₉)(OLi)
21	OMe	COC ₃ H ₇
22	OMe	COCH ₃
32	OMe	NHCOCH ₃
33	OMe	NH ₂
34	OMe	H
37	OPent	I
40	OH	COCH ₃
41	OH	COC ₃ H ₇
44	OMe	CN
45	OH	CN
52	OMe	P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
53	OMe	P(O)(OH) ₂
54	OMe	COOCH ₃
55	OMe	COOH
67	OMe	N ₃

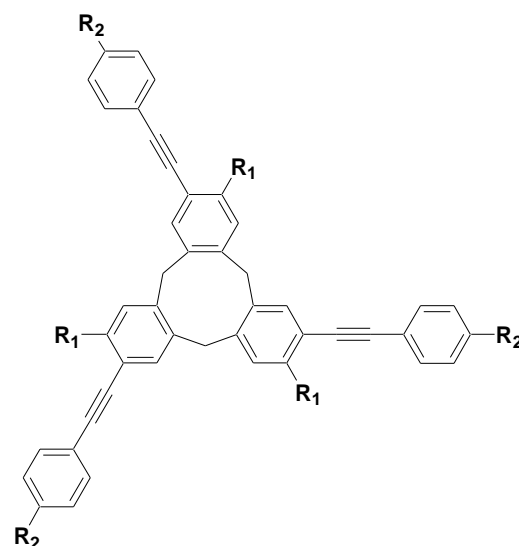


✓ CTVs obtenus par couplage de Sonogashira et dérivés

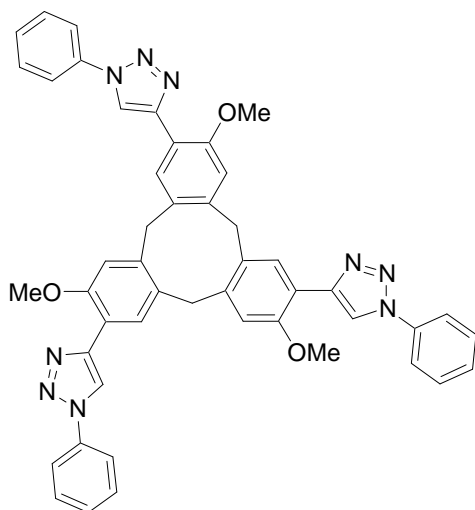
Numéro	R ₁	R ₂
56	OMe	SiMe ₃
65	OMe	H



Numéro	R ₁	R ₂
57	OMe	H
58	OMe	COOCH ₃
59	OMe	P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
60	OMe	N(CH ₃) ₂
61	OPent	CN
62	OH	CN
63	OMe	COOH
64	OMe	P(O)(OC ₂ H ₆)(OH)

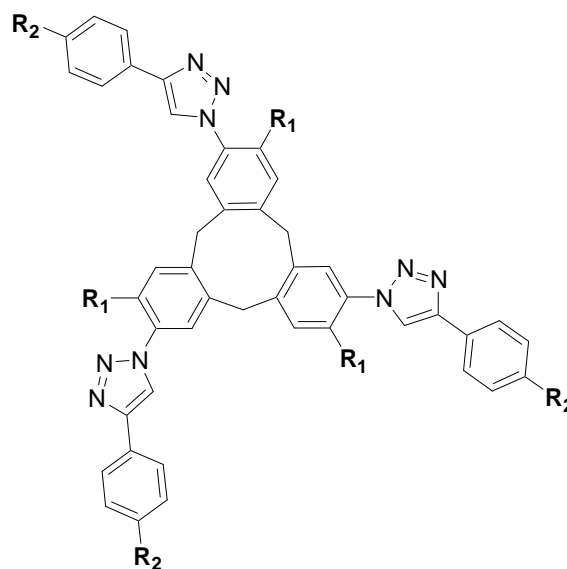


✓ CTVs obtenus par « chimie click »



66

Numéro	R ₁	R ₂
70	OMe	H
71	OMe	P(O)(OC ₂ H ₆) ₂
72	OMe	P(O)(OC ₂ H ₆)(OH)



Cyclotrivéatrylènes fluorescents pour la détection d'ammoniums d'intérêt biologique

Le développement de sondes moléculaires fluorescentes pour le suivi *ex vivo* de phénomènes biologiques (communication nerveuse, par exemple) est en plein essor. Dans cette optique, des dérivés fluorescents de cyclotrivéatrylènes (CTV), cavitands propices à la complexation de petites molécules organiques, ont été synthétisés. La stratégie utilisée consiste à introduire des groupements électro-donneurs et électro-attracteurs conjugués sur chaque unité aromatique du CTV afin d'avoir des systèmes de type « push-pull ». L'extension de la conjugaison entre les groupements électro-attracteurs et électro-donneurs a été envisagée afin d'améliorer les propriétés spectroscopiques des sondes. Dans ce but, des réactions de couplage organométallique de Sonogashira, ainsi que des cycloadditions alcynes-azotures catalysées par le cuivre (CuAAC), ont été conduites sur le squelette CTV. La caractérisation spectroscopique des différentes sondes fluorescentes développées a été réalisée en milieu organique et en conditions physiologiques, pour celles dont la solubilité le permettait. L'étude des propriétés de reconnaissance de ces dernières, pour des ammoniums d'intérêt biologique (tels que les neurotransmetteurs, acétylcholine, dopamine et dérivés) en conditions physiologiques, a également été menée par spectrofluorimétrie, ainsi que par d'autres techniques (RMN, calorimétrie). La formation d'assemblages moléculaires en milieu aqueux a également été mise en évidence (expériences de diffusion dynamique de la lumière, microscopie électronique en transmission).

Mots Clés : Cyclotrivéatrylènes, sondes fluorescentes, reconnaissance moléculaire, acétylcholine, choline, dopamine, assemblage moléculaire, micro-calorimétrie.

Fluorescent cyclotrimeratrylenes for the detection of biological ammoniums

The development of fluorescent probes for the *ex vivo* detection of biological phenomena (neuronal communication, for example) presents a growing interest. In this context, fluorescent cyclotrimeratrylene (CTV) derivatives have been developed, as these cavitands are known to complex small organic molecules. The strategy used to get interesting spectroscopic properties, was to introduce conjugated electron-donating and electron-withdrawing groups on each aromatic unit of the CTV (leading to "push-pull" systems). To improve the spectroscopic properties of the probes, the conjugation between the electron-donating and the electron-withdrawing groups was extended. Hence, the Sonogashira organometallic coupling reaction and the copper catalyzed cycloaddition directly on CTV skeleton were used. The spectroscopic characterization of the new fluorescent probes synthesized was done, in organic solvent but also in physiological conditions when the solubility permits it. The recognition studies for biological ammoniums, such as neurotransmitters (acetylcholine, dopamine, and derivatives) were performed in physiological conditions by spectrofluorimetry but also other methods (like MNR or micro-calorimetry). The formation of molecular assemblies was also observed (by dynamic light scattering and transmission electron microscopy) during this work.

Key words: Cyclotrimeratrylenes, fluorescent probes, molecular recognition, acetylcholine, choline, dopamine, molecular assembly, micro-calorimetry.

Cette thèse a été réalisée au sein du laboratoire NanoSystèmes Analytiques (NSysA) de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux.

