ENSC-(n° 385)

THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Présentée par

Alexis DEPAUW

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :
CHIMIE

Sujet de la thèse :

Synthèse et étude photophysique de sondes fluorescentes pour la détection de cations alcalins en milieu aqueux

Thèse soutenue le 18 novembre 2014 à Cachan devant le jury composé de:

Nathan McClenaghan	Directeur de Recherche-CNRS	Rapporteur
Vincent Huc	Chargé de Recherche-CNRS	Rapporteur
Gilles Huberfeld	Maitre de Conférence-PH	Examinateur
Valérie Pichon	Professeur-UPMC	Examinatrice
Rachel Méallet-Renault	Professeur-Université Paris Sud	Examinatrice
Isabelle Leray	Directrice de Recherche-CNRS	Directrice de thèse

Laboratoire de Photophysique et de Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires
PPSM – UMR 8531
Ecole Normale Supérieure de Cachan
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et l'Ecole Doctorale des Sciences Pratiques de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan. Je remercie le Professeur *Keitaro Nakatani*, Directeur du Laboratoire de m'avoir acceuilli au sein du laboratoire.

Je tiens ensuite à remercier MM. *Nathan McClenaghan* et *Vincent Huc* pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteurs. De même, je remercie les Professeurs *Valérie Pichon*, *Rachel Méallet-Renaud* et M. *Gilles Huberfeld* pour leur participation au jury.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde reconnaissance à ma directrice de thèse *Isabelle Leray*, pour m'avoir accordé sa confiance durant ces trois années et pour l'encadrement qu'elle m'a prodigué.

Je remercie aussi *Gilles Huberfeld*, *Oana Chever*, *Helena Dossi* et *Nathalie Rouach* pour leur collaboration.

Je tiens également à remercier les différents membres de l'équipe au sein de laquelle j'ai travaillé, *Jean-Pierre Lefèbre, Laura Jonusauskaite, Valérie Génot et Minh Huong Ha Thi.*

Sommaire

Sommaire 5
Table des figures 11
Liste des tableaux 22
Table des formules 24
Abréviations 25
Introduction générale 27

Chapitre 1. Introduction aux sondes moléculaires fluorescentes de cations 31
I. Fluorescence et sondes moléculaires fluorescentes 32
A. Absorption de la lumière et fluorescence 32
B. Sondes moléculaires fluorescentes de cations 34
II. Choix de l'entité complexante 35
A. Théorie de HSAB 35
B. Différents ligands existants 35
1) Ligands chélatants 35
2) Ligands macrocycliques 36
3) Calixarènes fonctionnalisés par des ligands 37
4) Calixarènes hydrosolubles 39
III. Phénomènes photo-induits par le cation 41
A. Transfert d'électron photo-induit (PET) 41
B. Transfert de charge photo-induit (PCT) 43
1) Interaction du cation avec un groupement donneur 43
2) Interaction du cation avec un groupement accepteur 44
C. Formation d'excimère 45
D. Transfert d'énergie 46
IV. Conclusions sur les sondes moléculaires fluorescentes de cations 49

Chapitre 2. Détection du Césium : Mesures d'humidité en temps réel dans des canalisations à l'aide d'un traceur chimique 51
I. Introduction 52
A. Projet EDF 52
1) Fonctionnement des centrales thermiques 52
2) Mesure du taux d'eau liquide au sein de canalisations 53

3) Projet : mesure de traces de césium par fluorescence 55
B. Propriétés et méthodes de détection du césium 55
1) Propriétés du césium 55
2) Chromatographie d'échanges d'ions 56
3) Spectrométrie d'absorption atomique 57
4) Spectrométrie d'émission atomique 58
5) Spectrométrie de masse (ICP-MS) 58
6) Spectrométrie gamma 58
7) Spectrophotométrie de fluorescence 59
8) Résumé des performances des différentes méthodes de détection du césium 60
C. Présentation des systèmes complexants et des sondes moléculaires fluorescentes du césium existantes 61
1) Sondes fluorescentes à base d'éthers couronnes 61
2) Sondes fluorescentes à base de calixarènes couronnes 62
3) Complexants de paires d'ions du césium 63
4) Les Cryptophanes 64
5) Conclusions sur les sondes moléculaires existantes du césium 65
II. Synthèse et étude des propriétés photophysiques du Calix-Cou-Sulf 67
A. Rappel de la synthèse du Calix-COU-2 et Calix-COU-Sulf 67
B. Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-2 68
C. Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf et études dans le cadre du projet EDF 72
1) Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf 72
2) Etudes en cuve du Calix-COU-Sulf dans le milieu d'étude EDF 75
D. Conclusions sur l'utilisation du Calix-COU-Sulf 77
III. Synthèse et études photophysiques de nouvelles sondes 78
A. Nouvelles sondes envisagées 78
1) Etat de l'art sur les entités complexantes à base de calix[4]arène couronne hydrosoluble sélectif du césium 78
2) Cibles envisagées 80
B. Synthèses effectuées 80
1) Voie 1 : Bromation 80
2) Voie 2 : Formylation 84
3) Conclusions 86
C. Etudes photophysiques de Calix-COU-Acide 86
1) Etudes photophysiques 86

2) Influence du pH de travail 87
3) Etudes de complexation 90
4) Conclusions sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Acide 92
D. Etudes photophysiques de Calix-COU-Alcyne-Sulf et Calix-COU-CN-Sulf 93
1) Etudes de complexation du Calix-COU-Alcyne-Sulf dans l'eau 93
2) Etudes de complexation du Calix-COU-CN-Sulf dans l'eau 95
E. Conclusions sur la synthèse et l'étude des sondes réalisées 97
IV. Utilisation des sondes dans un dispositif de microfluidique 99
A. Présentation du système de mesure pour la détection d'espèces polluantes par fluorescence 99
B. Nouveau système de mesure permettant la mesure en continu de concentrations de césium par fluorescence 101
1) Description du nouveau système de mesure 101
2) Profil des paliers 105
3) Conclusions sur le nouveau système de mesure 109
C. Mesures de concentration de césium en microfluidique 109
1) Optimisation des paramètres du système 109
2) Comparaison des limites de détection du Calix-COU-Alcyne-Sulf en cuve et en circuit microfluidique 113
D. Conclusions et perspectives sur la mesure de césium en circuit microfluidique 114
V. Conclusions et perspectives 116

Chapitre 3. Sondes fluorescentes pour la mesure du potassium extracellulaire 118

I. Introduction 119
A. Rôle du potassium au niveau cellulaire 119
1) Rôle du potassium dans le potentiel membranaire 119
2) Rôle du potassium dans le fonctionnement neuronal 121
3) Potassium et crises épileptiques 123
4) Projet : mesure du potassium extracellulaire par imagerie de fluorescence 124
B. Sondes de potentiel membranaires 125
1) Sondes de potentiel électrochrome 125
2) Sondes de potentiel basées sur un transfert d'électron photo-induit (FRET) 126
3) Sondes de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit (PET) 127
C. Etat de l'art des sondes moléculaires fluorescentes du potassium 127
1) Sondes commerciales à base d'éthers couronnes 127
2) Sondes à base de triazacryptand 129

3) Sondes à base de complexe de lanthanides 130
4) Sondes à bases d'éthers couronnes modifiés 132
5) Sondes à base de Calix[4]arène-couronne 133
6) Conclusions sur les différentes sondes du potassium existantes 134
II. Sondes fluorescentes à base de Calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 135
A. Rappel de la synthèse et des propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy 135
1) Synthèse du Calix-Aza-Bodipy 135
2) Propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy 136
3) Effets de la protonation et de la complexation 137
4) Conclusions sur le Calix-Aza-Bodipy 138
B. Calix-Aza-Bodipy-Sulf 139
1) Rétrosynthèse envisagée 139
2) Première voie de synthèse 141
3) Synthèse et étude du Calix-Aza-krypto-Bodipy 144
4) Synthèse et étude du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf 145
5) Conclusions et perspectives 148
III. Sondes fluorescentes à base de Calix[4]arène-bis-couronne-6 150
A. Etudes de complexation du potassium par Calix-COU-Sulf 150
1) Etudes de complexation de Calix-COU-Sulf dans l'eau 150
2) Etudes de complexation de Calix-COU-Sulf dans des conditions proches des conditions physiologiques 151
3) Conclusions 152
B. Insertion de nouveaux fluorophores par condensation de Knoevenagel 152
1) Rétrosynthèse envisagée 152
2) Choix des groupements à insérer 154
3) Synthèse du Calix-Aldéhyde 156
4) Synthèse et études photophysiques du Calix-TCF-Sulf 157
5) Synthèse et études photophysiques du Calix-Ind-Sulf 161
6) Synthèse et études photophysiques du Calix-BODIPY-S-Sulf 163
7) Conclusions sur l'insertion de fluorophores par condensation de Knoevenagel 168
C. Remplacement du Bodipy par un Bodipy-E 168
1) Présentation des Bodipy-E 168
2) Retrosynthèse envisagée 170
3) Synthèses effectuées 170
4) Propriétés spectrales du Calix-BODIPY 172

5) Phénomènes photo-induits mis en jeu ... 173
6) Conclusions sur l'utilisation du Bodipy-E ... 174
D. Remplacement de la coumarine par une phénoxazin-3-one ... 175
1) Phénoxazin-3-ones et phénoxaziniums ... 175
2) Synthèse de la 7-8-dihydroxy-1-méthylphénoxazin-3-one ... 178
3) Conclusions sur le remplacement de la coumarine par une benzophénoxazin-3-one 184
E. Extension de la conjugaison de la coumarine ... 184
1) Coumarines modifiées ... 185
2) Synthèse et études photophysiques des composés modèles ... 192
3) Synthèse des analogues de Calix-COU-Sulf ... 199
4) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Alcyne-Sulf 202
5) Influence du milieu d'études sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Alcyne-Sulf ... 206
6) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Anilinium-Sulf dans l'eau ... 206
7) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-CN-Sulf dans l'eau ... 208
8) Etudes en deux photons et mesures in vitro effectuées ... 210
IV. Conclusions et perspectives ... 215

Conclusions et perspectives ... 218

Partie expérimentale ... 224
I. Synthèses effectuées ... 225
A. Généralités ... 225
1) Solvants et chromatographies ... 225
2) Spectres RMN ... 225
3) Spectroscopie de masse ... 225
B. Protocole de synthèse ... 225
II. Mesures spectroscopiques ... 248
A. Produits et solvants ... 248
B. Instrumentations ... 248
1) Spectroscopie d'absorption UV-visible ... 248
2) Spectroscopie de fluorescence stationnaire ... 248

C. Protocoles expérimentaux 248
1) Mesure du coefficient d'absorption molaire 248
2) Mesure du rendement quantique de fluorescence 249
3) Détermination des constantes de complexation 250

Annexes 251
I. Détermination du taux d'humidité à partir de la concentration en césium 252
II. Dimensionnement du dispositif de mesure 254
III. Modélisation de la forme des paliers 258

Bibliographie 261

Table des figures

Figure 1 - *Diagramme de Perrin-Jablonski et temps caractéristiques* 32
Figure 2 - *Principe de reconnaissance d'un cation par une sonde moléculaire fluorescente* 34
Figure 3 - *Différents ligands chélatants existants* 36
Figure 4 - *Différents ligands macrocycliques* 37
Figure 5 - *a) Cratère en calice lucanien, Ulysse interrogeant l'ombre de Tirésias b) Structure et possibilités de fonctionnalisation sur les calixarènes* 37
Figure 6 - *Différentes conformations possibles des calix[4]arènes* 38
Figure 7 - *Calixarènes fonctionnalisés par un éther couronne* 11 , *ou un ligand chélatant* 12 38
Figure 8 - *Calixarénes portant des groupements solubilsants sur l'éther couronne* 13, *ou sur le bord inférieur* 14, 15. 39
Figure 9 - *Positions para-activées du calixarène* 39
Figure 10 - *Calixarènes fonctionnalisés par des groupements sulfonates* 16, *phosphonates* 17, *carboxylates* 18 *et alcoolates* 19. 40
Figure 11 - *Calixarènes fonctionnalisés via un espaceur par des acides carboxyliques* 20 *et phosphoniques* 21 40
Figure 12 - *Calixarènes portants des fonctions amoniums* 22 *et guanidiniums* 21 40
Figure 13 - *Principe du transfert d'électron photo-induit réductif* 42
Figure 14 - *Fluoroionophore de type PET permettant la détection de potassium décrit par He et al.* 42
Figure 15 - *Principe du transfert d'électron photo-induit oxydatif* 43
Figure 16 - *Interaction d'un cation avec la partie donneuse d'un fluorophore à transfert de charge intramoléculaire* 43
Figure 17 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire au sein de la coumarine suite à la complexation d'un cation* 44
Figure 18 - *Interaction d'un cation avec la partie acceptrice d'un fluorophore à transfert de charge intramoléculaire* 44
Figure 19 - *Augmentation du transfert de charge intramoléculaire au sein de la coumarine suite à la complexation d'un cation* 45
Figure 20 - *Formation ou destruction d'excimère induite par la complexation d'un cation* 45
Figure 21 - *(a) effets photo-induits par la complexation de potassium et de cuivre. (b) exaltation de l'émission de l'excimère avec l'ajout de potassium. (c) inhibition de l'émission de l'excimère avec l'ajout de cuivre.* 46
Figure 22 - *Mécanisme de transfert d'énergie de type Förtser* 47
Figure 23 - *Modulation du transfert d'énergie entre fluorophores par ajout de cation* 48
Figure 24 - *Augmentation du transfert d'énergie suite à la complexation du césium* 48
Figure 25 - *Fonctionnement d'une centrale nucléaire* 52
Figure 26 - *Schéma d'une canalisation du circuit de vapeur* 53
Figure 27 - *Détail d'une canalisation au point de piquage* 53
Figure 28 - *Influence du débit sur la quantité de traceur mesuré* 54
Figure 29 - *Détermination de la concentration en ^{24}Na à partir d'une droite d'étalonnage* 54
Figure 30 - *Schéma du projet envisagé* 55
Figure 31 - *Schéma de désintégration radioactive du 137Cs* 56

Figure 32 - *(a) Principe de la chromatographie à échanges d'ions, (b) chromatogramme* 57
Figure 33 --*Principe de la spectrométrie d'absorption atomique* 57
Figure 34 - Raies d'absorption du césium 57
Figure 35 - *Principe de la spectrométrie d'émission atomique* 58
Figure 36 - Raies d'émission du césium 58
Figure 37 - *Spectre Gamma d'un minerai d'Uranium : présence des radionucléides ^{226}Ra, ^{214}Pb, ^{214}Bi de la chaîne de désintégration de l'Uranium* 59
Figure 38 - *Ethers couronnes complexant le césium* 61
Figure 39 - *Sonde fluorescente moléculaire spécifique du césium et mode d'action* 62
Figure 40 - *Calix[4]arène bis-couronnes-6 sélectif du césium* 62
Figure 41 - *Fluoroionophore spécifique du césium* 63
Figure 42 - *Récepteur de paires d'ions du césium* 64
Figure 43 - *Remplacement du césium par le potassium* 64
Figure 44 - *(a) cryptophane MM-1 sélectif du césium, (b) déplacement RMN du césium libre et complexé par MM-1, (c) spectres de dichroïsme circulaire de MM-1 (Solvent : $CHCl_3$/LiOH,H_2O 0,1M) ; [Cs+] : 7,4.10^{-5} - 8,4.10^{-5} M)* 65
Figure 45 - *Synthèse du diéthylène glycol monotosylé 40* 67
Figure 46 - *Synthèse du Calix-COU-2* 68
Figure 47 - *Synthèse du Calix-COU-Sulf* 68
Figure 48 - *Influence de la complexation du césium et du potassium sur le spectre d'absorption du Calix-COU-2. Solvant = EtOH, [Calix-COU-2] = 3,24.10^{-5} M ; [Cs^+] = [K^+] = 1mM* 69
Figure 49 - *Evolution des spectres d'émission (a) et de l'intensité de fluorescence à 410 nm (b) du Calix-COU-2 avec l'ajout d'acétate de césium. (c) Spectres du ligand seul L et des complexe ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit. ([L] =19 µM) Solvent = EtOH; λ_{exc} = 310 nm* 69
Figure 50 - *Evolution des spectres d'émission (a) et de l'intensité de fluorescence à 410 nm (b) du Calix-COU-2 avec l'ajout de thiocyanante de potassium. (c) Spectres du ligand seul L et des complexe ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit. ([L] =19 µM) Solvent = EtOH; λ_{exc} = 310 nm* 70
Figure 51 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire lors de la complexation de cations* 71
Figure 52 - *Spectre d'absorption et d'émission normés du Calix-COU-Sulf. Solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 5,2 µM ; λ_{exc} = 330 nm* 72
Figure 53 - *(a) Evolution des spectres d'absorptions du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium Solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 33 µM ; λ_{exc} = 330 nm. (b) spectres d'absorption du ligand L et des complexes ML et M_2L reconstruits avec le logiciel specfit.* 73
Figure 54 - *(a) Evolution des spectres d'émissions corrigés du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium, solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 5,2 µM ; λ_{exc} = 330 nm. (b) spectres d'émission du ligand L et des complexes ML et M_2L reconstruits par le logiciel specfit.* 73
Figure 55 - *Effet de la complexation du césium sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf* 74
Figure 56 - *Intensité de fluorescence à 420 nm du Calix-COU-Sulf dans un tampon MES 50mM en présence de césium (55 µM) et de différents cations interférents.* 75
Figure 57 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission corrigé (b) du Calix-COU-Sulf dans un tampon MES 50 mM λ_{exc} = 337 nm.* 75
Figure 58 - *Augmentation linéaire de la fluorescence à 420 nm entre 0 et 50 mM de césium. [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm.* 76

Figure 59 - *Détermination de la limite de détection en cuve du Calix-COU-Sulf. [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm.* 76
Figure 60 - *Gamme de concentrations mesurables par le Calix-COU-Sulf* 76
Figure 61 - *Calix[4]arène-bis-couronne-6 portant des fonctions alcool et acide carboxylique* 78
Figure 62 - *Insertion de groupements alcools, aldéhydes et acides à partir de calix[4]arène-bis-couronnes-6 bromé* 79
Figure 63 - *Insertion de groupements alcools et acides à partir de calix[4]arène-bis-couronnes-6 formylé* 79
Figure 64 *Tétraformylation d'un calix[4]arène* 80
Figure 65 - *Analogues de Calix-COU-Sulf envisagé : Calix-COU-Alcool et Calix-COU-Acide* 80
Figure 66 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix-COU-2* 81
Figure 67 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix-COU-2* 81
Figure 68 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6* 82
Figure 69 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6* 82
Figure 70 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène tétraglycolé* 83
Figure 71 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du calix[4]arène-tetraglycolé* 83
Figure 72 - Formylation du Calix-COU-2 84
Figure 73 - *Essai d'oxydation de Bayer-Williger à l'aide de mCPBA* 85
Figure 74 - *Essais d'oxydation de Bayer-Williger à l'aide de H_2O_2* 85
Figure 75 - *Synthèse du Calix-COU-Acide* 86
Figure 76 - *Comparaison des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de la coumarine modèle (rose), du Calix-COU-Acide (rouge) et du Calix-COU-Sulf (bleu)* 87
Figure 77 --*(a) Influence du pH sur les spectres d'absorption du Calix-COU-Acide (a) (pH = 7,5/9,5/10,5/ 11,2/11,5/12) et de la coumarine modèle (b) (rouge pH 9, bleu pH 12,8)* 88
Figure 78 - *Influence du pH sur les spectres d'émission (a) et le rendement quantique (b) du Calix-COU-Acide* 88
Figure 79 - *Comparaison des déclins de fluorescence à pH 11 (rouge) et à pH 12 (bleu)* 89
Figure 80 - *Mécanisme d'hydrolyse de la lactone proposé par Killiç* 89
Figure 81 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Acide avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O pH 11 ; [L] = 5,2 µM, λ_{exc} = 365 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium.* 90
Figure 82 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Acide (a) et de l'intensité de fluorescence à 432 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O pH 11 ; [L] = 5,2 µM, λ_{exc} = 365 nm.* 91
Figure 83 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge) et du Calix-COU-Acide (bleu). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm.* 91
Figure 84 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de césium.* 93
Figure 85 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O ; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.* 94

Figure 86 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu) et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm.* 94

Figure 87 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O; [L] = 19 µM, λ_{exc} = 405 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de césium.* 95

Figure 88 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-CN-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 452 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O ; [L] = 4,4 µM, λ_{exc} = 405nm, $\lambda_{em\ max}$ = 454 nm.* 95

Figure 89 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu)et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose), Calix-COU-CN-Sulf (vert). Calix-COU-Sulf, [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide, [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf, [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm. Calix-COU-CN-Sulf, [L] = 4,4 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 452 nm.* 96

Figure 90 - *Remplacement envisageables des groupements sulfonates par des groupements phosphonates.* 97

Figure 91 - *(A) Schéma des lignes de flux au sein des sections de chevrons (B) Imagerie confocale des lignes de flux à l'entrée du circuit après ½ cycle et un cycle de chevrons* 99

Figure 92 - *Schéma du circuit micro-fluidique verre/PDMS* 100

Figure 93 - *(a) Schéma du dispositif de microfluidique initial, (b) dosage de traces de plomb à l'aide du Calix-Dans-4* 100

Figure 94 - *Schéma de l'alimentation du circuit microfluidique* 101

Figure 95 - *Schéma du nouveau système de mesure* 102

Figure 96 --*Photographie de l'intérieur du montage final* 103

Figure 97 - *Montage final fermé, avec l'ordinateur pilotant son fonctionnement* 104

Figure 98 - *Profil des signaux obtenus lors de l'injection de solution de sondes. 1) temps de latence, 2) temps de montée, 3) pallier, 4) descente* 104

Figure 99 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection avec les boucles d'injection* 105

Figure 100 - *Superposition du profil pour un écoulement piston pur (bleu) et du profil expérimental (rouge). Illustration du profil d'écoulement piston : (a) arrivée de la sonde dans la zone de détection, début du palier ; (b) arrivée de l'eau dans la zone de détection fun du palier* 106

Figure 101 - *(a) Injection d'une tranche de traceur. (b) Profil parabolique du traceur due à son élongation (c) Profil en 'bouchon' du traceur après dispersion radiale (d) Profil gaussien du taceur après N cycles* 107

Figure 102 - *Distribution du temps de résidence au sein d'un canal microfluidique de section rectangulaire pour un nombre de Péclet Pe de 10^4 (a) et de 10^3 (b). Canal lisse (noir), canal muni de mélangeurs à chevrons symétrique (vert), canal muni de mélangeurs à chevron dissymétrique (rouge)* 108

Figure 103 - *Superposition du profil pour un écoulement piston pur (bleu) et du profil expérimental (rouge). Illustration du profil expérimental : (a) arrivée de la sonde dans la zonde de détection; (b) début du palier ; (c) fin du palier.* 109

Figure 104 - *Signaux obtenus lors de l'injection d'une solution de sonde sur une et deux voies du circuit micro-fluidique pour un débit de 0,65 mL/h. Palier 1, 2 et 7 à 9 injection de la*

solution de sonde sur une seule voie. Palier 3 à 6 injections des solutions de sondes sur les deux voies du circuit. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 1,84 µM. 110
Figure 105 - *Signaux obtenus lors de l'injection de concentrations croissantes puis décroissantes de césium. [Calix-COU-Sul] = 4 µM* 111
Figure 106 - *Evolution du signal mesuré en fonction de la concentration en césium. Rouge : concentrations croissantes, blanc : concentrations décroissantes, Calix-COU-Sul] = 4 µM* 112
Figure 107 - *Exemple de paliers de césium encadrés par des paliers sans césium. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 1,84 µM.* 113
Figure 108 - *Comparaison de la limite de détection en cuve (bleu) et en circuit microfluidique (rouge) du Calix-COU-Alcyne-Sulf. [Calix-COU-Alcyne-Sulf]cuve = 4,7 µM, [Calix-COU-Alcyne-Sulf]circuit = 1,84 µM, solvant = H_2O.* 114
Figure 109 - *Gammes de concentrations de césium mesurables par le Calix-COU-Alcyne-Sulf, en cuve (bleu) et avec le dispositif de micro-fluidique (rouge)* 114
Figure 110 - *Remplacement envisageables des groupements sulfonates par des groupements phophonates.* 116
Figure 111 - *Répartition des espèces chargées de part et d'autre de la membrane plasmique* 119
Figure 112 - *Représentation d'un neurone* 121
Figure 113 - *Schématisation d'un potentiel d'action (a) et du rôle des différents canaux ioniques (b), jaune : canaux sodium, orange : canaux potassium, vert : pompe Na^+/K^+ ATPase* 122
Figure 114 - *Fonctionnement d'une synapse chimique* 122
Figure 115 - *Représentation d'une synapse et des sondes fluorescentes envisagées, avec les concentrations intracellulaire et extracellulaires en sodium, potassium et calcium.* 124
Figure 116 - *Principe de fonctionnement des différentes sondes de potentiel. (a) Sonde de potentiel électrochrome. (b) Sonde de potentiel basée sur un transfert d'énergie photo-induit. (c)Sonde de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit.* 125
Figure 117 - *Sondes de potentiel électrochrome* 126
Figure 118 - *Illustration du transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur : (a) au potentiel de repos, (b) lors d'une phase de dépolarisation* 126
Figure 119 - *Exemple d'une sonde de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit entre le groupement donneur (rouge) et le fluorohore(bleu)* 127
Figure 120 - *Sonde moléculaire fluorescente permettant la mesure de sodium et de potassium* 128
Figure 121 - *Structures des sondes du type Asante-Potassium-Green* 128
Figure 122 - *Inhibition du transfert d'électron photo-induit entre les azotes et la coumarine à la suite de la complexation du potassium.* 129
Figure 123 - *Cryptands où les azotes sont aromatiques pour diminuer l'influence du pH* 129
Figure 124 - *Inhibition du transfert d'électron photo-induit en présence de potassium.* 130
Figure 125 - *Sondes moléculaires fluorescentes du potassium à base de cryptands* 130
Figure 126 - *Sondes moléculaires fluorescentes basées sur l'inhibition d'un transfert d'électron entre l'entité complexante et l'antenne du complexe de lanthanide* 131
Figure 127 - *Exaltation de la luminescence du complexe de lanthanide suite à l'inhibition du transfert d'électron photo-induit* 131
Figure 128 - *Sondes moléculaires fluorescentes basées sur le changement de conformation de la molécule suite à la complexation de potassium.* 132
Figure 129 - *Exaltation de la luminescence du complexe de lanthanide suite au rapprochement de l'antenne de son complexe* 132
Figure 130 - *Sondes moléculaires fluorescentes à base d'éther de couronne fonctionnalisé* 133

Figure 131 - *Calix[4]arène-couronnes-5 et calix[4]arène-azacouronnes-5 sélectif du potassium* 134
Figure 132 - *Synthèse du Calix-Aza-Aldéhyde* 135
Figure 133 - *Synthèse du Calix-Aza-Bodipy* 136
Figure 134 - *Spectres d'absorption et d'émission du Calix-Aza-Bodipy dans différents solvants. (A) hexane, (B) 1,4-dioxane, (C)THF, (D) CH_2Cl_2, (E) CH_3CN, (F) EtOH* 136
Figure 135 - *La complexation du potassium entraîne une déstabilisation de l'état CT, augmentant la probabilité de désexcitation à partir de l'état LE.* 137
Figure 136 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) du Calix-Aza-Bodipy avec l'ajout de potassium. [L] = 0,7 µM, λ_{exc} = 475 nm, Solvant = EtOH. (c) Spectre d'émission du ligand L seul, et des complexes ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit* 138
Figure 137 - *Evolution de l'Intensité de la fluorescence du Calix-Aza-Bodipy avec l'ajout de potassium dans un mélange eau-méthanol (1/3). [L] = 0,-µM, λ_{exc} = 475 nm, λ_{em} = 515 nm. Concentration Na^+/K^+ ajoutées (mM): (a) 0/0; (b) 44/0; (c) 44/0.52; (d) 44/1.05; (e) 44/1.57; (f) 44/2.1; (g) 44/2.62; (h) 44/3.15; (i) 44/3.67; (j) 44/4.2; (k) 44/4.72.* 138
Figure 138 - *Modification du calix-Aza-Bodipy envisagée.* 139
Figure 139 - *Rétrosytnhèse envisagée du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf* 140
Figure 140 - *Insertion de groupements sulfonates en β en présence d'acide chlorosulfonique* 140
Figure 141 - *Synthèse décrite du Calix[4]-bis-aza-couronne-5 91* 140
Figure 142 - *Synthèse envisagée du Calix[4]-bis-aza-couronne-5 91* 141
Figure 143 - *Essai de déprotection du groupement nosyle* 141
Figure 144 - *Synthèse du calix[4]arène tétraglycolé* 97 142
Figure 145 - *Synthèse du calix[4]arène tétraglycolé tétratosylé* 98 142
Figure 146 - *Synthèse du composé dinosylé 99* 142
Figure 147 - *Déprotection du groupement nosyle* 143
Figure 148 - *Essai de couplage entre un composé modèle et un bodipy bromé* 143
Figure 149 - *Synthèse du Calix-Aza-Dans-Sulf* 144
Figure 150 (a) - *Principe de la détection du $Al(OH)_3$ par le Calix-Aza-Dans-Sulf (b) Evolution de la fluorescence suite à l'ajout d'aluminium* 144
Figure 151 - *Synthèse du Calix-Aza-Krypto-Bodipy-à partir du Calix-Aza-Aldéhyde* 145
Figure 152 - *(a) Spectre d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-Aza-Bodipy. Evolution des spectres d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 535 nm (c) avec l'ajout de potassium.Solvant = CH_3CN, [L] = 1,6 µM, λ_{exc} = 522 nm.* 145
Figure 153 - *Synthèse du Calix-Aza-Bodipy-Sulf à partir du Calix-Aza-Krypto-Bodipy* 146
Figure 154 - *Spectre d'absorption du Calix-Aza-krypto-Bodipy (rouge) et du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf (bleu).* 147
Figure 155 - *Evolution des spectres d'absorption (a), d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 536 nm (c) du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf avec l'ajout de potassium. Solvant = tampon MES pH 7, [L] = 7,7 µM, λ_{exc} = 510 nm* 147
Figure 156 - *La complexation du potassium entraîne une déstabilisation de l'état CT, augmentant la probabilité de désexcitation à partir de l'état LE.* 148
Figure 157 - *La complexation du potassium entraîne une stabilisation supplémentaire de l'état CT, empêchant une exaltation de fluorescence à la suite de la complexation du potassium.* 148
Figure 158 - *Remplacement envisagé du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf par le Calix-COU-Sulf* 149
Figure 159 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O, [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm. (b)*

Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de potassium. 150

Figure 160 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 420 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} max = 420 nm.* 151

Figure 161 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 3.2 µM λ_{exc} = 365 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de potassium.* 151

Figure 162 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 420 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 420 nm.* 152

Figure 163 - *Remplacement du Calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 par un Calix[4]arène-bis-couronne-6* 152

Figure 164 - *Insertion post-synthétique d'un fluorophore sur un triazacryptand aldéhyde* 153

Figure 165 - *Rétrosynthèse de la sonde envisagée faisant intervenir une condensation de Knoevenagel* 153

Figure 166 - *(a) Fonctionnement de la sonde moléculaire fluorescente du potassium. Evolution des spectres de fluorescence (b) et de la fluorescence à 561 nm (c) avec ajout croissant de potassium. Solvant = tampon HEPES pH = 7,2 λ_{exc} = 561 nm* 154

Figure 167 - *Sondes moléculaires fluorescentes incorporant un motif de type hémicyanine* 155

Figure 168 - *(a). Fluoroionophore du potassium associant un Triazacryptand et Bodipy. Evolution des spectres d'émission (b) et d'absorption (c) de la molécule avec l'ajout croissant de potassium. Solvant = tampon HEPES (pH = 7)/ CH_3CN (60/40), λ_{exc} = 560 nm. (d) Changement colorimétrique et fluorimétrique visible suite à l'ajout de potassium.* 156

Figure 169 - *Molécules envisagées* 156

Figure 170 - *Synthèse du Calix-Aldéhyde* 157

Figure 171 - *Synthèse du TCF* 157

Figure 172 - *Synthèse du Calix-TCF* 157

Figure 173 - *Essais de sulfonation du Calix-TCF* 158

Figure 174 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-TCF dans l'acétonitrile* 158

Figure 175 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et de l'absorbance à 430 nm du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-TCF] = 1,5 µM* 159

Figure 176 - *Evolution des spectres d'émission corrigés (a) et de l'intensité de la fluorescence à 575 nm (b) du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-TCF] = 1,5 µM; λ_{exc} = 430 nm; $\lambda_{em\ max}$ = 575 nm* 159

Figure 177 - *Evolution des spectres d'absorption (a), d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 580 nm (c) du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de K^+ et en présence de 150 mM de Na^+. Solvant = CH_3CN [Calix-TCF] = 1,5 µM λ_{exc} = 450 nm $\lambda_{em\ max}$ = 580 nm.* 160

Figure 178 - *Spectres d'absorption (bleu) et de d'émission (rouge) du composé dans l'eau $\lambda_{abs\ max}$ = 442 nm $\lambda_{em\ max}$ = 580 nm* 160

Figure 179 - *Evolution des spectres d'absorption (a) d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 580 nm (c) du Calix-TCF-Sulf en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = tampon MES 5 .10^{-2} M λ_{exc} = 485 nm $\lambda_{em\ max}$ = 585 nm* 161

Figure 180 - *Synthèse du 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium Ind* 161
Figure 181 - *Synthèse du Calix-Ind* 162
Figure 182 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-Ind dans l'acétonitrile* 162
Figure 183 - *Diminution de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps* 163
Figure 184 - *Evolution des spectres d'absorption du Calix-Ind en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-Ind] = 0,5 µM* 163
Figure 185 - *Retrosynthèse envisagée du Calix-Bodipy-S-Sulf* 164
Figure 186 - Synthèse du 1,3-diméthyle BODIPY 49 164
Figure 187 - *Essais de chloro-sulfonation sur Calix-aldéhyde* 165
Figure 188 - *Protection et essai de chloro-sulfonation sur le Calix-aldéhyde protégé* 165
Figure 189 - *Synthèse du Calix-Bodipy-S* 166
Figure 190 - *Spectres d'absorption et d'émission du Calix-Bodipy-S dans l'acétonitrile.* 166
Figure 191 *Structure du bodipy BD-139* 167
Figure 192 *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission du Calix-Bodipy-S avec l'ajout de potassium.* 167
Figure 193 - *Remplacement du bodipy par un bodipy-E* 168
Figure 194 - *Bodipy-E issu de la substitution B-F d'un Bodipy-F* 169
Figure 195 - *Exemple d'une cassette bodipy / pyrènes* 169
Figure 196 - *Groupement augmentant la solubilité des bodipy en milieu aqueux* 169
Figure 197 - *Rétrosynthèse du Calix-Bodipy-E-sulf envisagée* 170
Figure 198 - *Synthèse d'un bodipy-E et essai de sulfonation* 170
Figure 199 - *Synthèse du Calix-BODIPY et essai de synthèse du Calix-BODIPY-E* 171
Figure 200 - *Essais de synthèse du Calix-Boudipy-E* 171
Figure 201 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (b) de Calix-Bodipy dans l'acétonitrile* . 172
Figure 202 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) du Calix-Bodipy en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant =CH_3CN; [Calix-Bodipy] = 1,0 µM λ_{exc} = 521 nm $\lambda_{em\ max}$ = 533 nm* 172
Figure 203 - *Comparaison du mode de désexcitation majoritaire de différents bodipys* 173
Figure 204 - *Comparaison des propriétés spectrales des bodipys* 126 *et* 124 174
Figure 205 - *Modifications envisagées, extension de la conjugaison de la coumarine et remplacement de la coumarine par un dérivé de phénoxazine* 174
Figure 206 - *Structures de la coumarine, oxazinone, phénoxazin-3-one et benzophénoxazin-3one* 175
Figure 207 - *Structures du Nile Red et du Nile Blue* 175
Figure 208 - *Propriétés spectrales du Nile Red et du Nile Blue* 176
Figure 209 - *Propriétés spectrales d'analogues hydrosolubles du Nile Red et du Nile Blue* 176
Figure 210 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire suite à la complexation du mercure* 177
Figure 211 - *Spectres d'absorption et de fluorescence en absence (•) et en présence de mercure (°) dans l'eau* 177
Figure 212 - *Sondes fluorescentes du zinc incorporant un benzophénoxazinium* 177
Figure 213 - *Spectres d'excitation et d'émission de la molécule 82 dans l'eau (λ_{em} = 650, λ_{exc} = 579 nm)* 177
Figure 214 - *Remplacement de la coumarine par une phénoxazin-3-one* 178
Figure 215 - *Comparaison des propriétés spectrales de la Coumarine 460 et de la 7-diméthylaminophénoxazin-3-one* 178

Figure 216 - *Retrosynthèse envisagée pour l'obtention du Calix-Phen-Sulf* 179
Figure 217 - *Synthèse de phénoxazine par condensation entre un nitrosoarène et un phénol voie a) et un nitrosophénol et un phénol voie b)* 179
Figure 218 - *Retrosynthèse de la 7-amino-3,4-diméthylphénoxazin-3-one décrite* 180
Figure 219 - *Essais de nitrosation du 1,2-dihydroxybenzène en utilisant le nitrite de sodium* 180
Figure 220 - *Essais de nitrosation du 1,2-dihydroxybenzène en utilisant le nitrite d'isoamyle* 180
Figure 221 - *Réarrangement de Fischer-Hepp* 181
Figure 222 - *Essais de nitrosation du N-acéthyl-2-aminophénol en utilisant le nitrite de sodium* 181
Figure 223 - *Essais de nitrosation du N-acéthyl-2-aminophénol en utilisant le nitrite d'isoamyle* 181
Figure 224 - *Essai de condensation à partir du composé* 152 181
Figure 225 - *Essais de nitrosation du 3,4-diméthoxyphénol en utilisant le nitrite de sodium* 182
Figure 226 - *Essais de nitrosation du 3,4-diméthoxyphénol en utilisant le nitrite d'isoamyle* 182
Figure 227 - *Essai de condensation à partir du composé* 156 182
Figure 228 - *Rétrosynthèse de la dihydroxyphénoxazin-3-one envisagée* 183
Figure 229 - *Nitration du 4-fluoroveratrole* 183
Figure 230 - Formylation du composé 163 183
Figure 231 - *Synthèse des composés* 167 *à* 169 183
Figure 232 - Synthèse de l'éther d'aryle 170 184
Figure 233 - *Fonctionnalisation de la position 3 de la coumarine pour déplacer les spectres d'absorption et d'émission* 185
Figure 234 - *Comparaison des caractéristiques spectrales des coumarines 460 et 481* 185
Figure 235 - *Comparaison des caractéristiques spectrales de coumarines cyanées et non cyanées en position 3* 186
Figure 236 - *Synthèse de la 3-cyanocouamrine à partir de la 3-bromocoumarine* 186
Figure 237 - *Synthèse de 3-cyanocoumarines à partir de salicylaldéhyde* 186
Figure 238 - *Propriétés spectrales de coumarines portant ou étant dépourvue de groupements cyanos en position 4* 187
Figure 239 - *Synthèse de coumarine cyané en position 4* 187
Figure 240 - *Insertion de substituants insaturés en position 3 via des réactions pallado-catalysés* 187
Figure 241 - *Introduction de substituants en position 3 par C-H activation pallado-catalysé* 188
Figure 242 - *Formylation d'une coumarine suivie de l'ajout d'un substituant électroattracteur par condensation* 188
Figure 243 - *Synthèse de coumarine substituée en position 3 à partir de salicylaldéhyde* 188
Figure 244 - *Introduction de substituant en position 4 par C-H activation pallado-catalysé* 188
Figure 245 - *Modification de la position 3 de la coumarine* 189
Figure 246 - *Propriétés spectrales de deux hybrides coumarine-hémicyanines* 189
Figure 247 - *Sondes moléculaires permettant la détection d'ions cyanures* 190
Figure 248 - *Comparaison des propriétés spectrales de la 7-aminocoumarine et de la 7-amino-4-phenylacéthylènecoumarine* 190
Figure 249 - *Comparaison des propriétés spectrales de la coumarine 460 et de deux coumarines avec des groupements benzothiazole* 190
Figure 250 - *Analogues de la coumarine envisagés* 191
Figure 251 - *Iodation de la position 3 de la coumarine* 192

Figure 252 - *Couplage de Sonogashira effectué sur la coumarine* 192
Figure 253 - Synthèse de COU-Anilinium 193
Figure 254 - *Insertion d'un benzothiale en position 3* 193
Figure 255 - *Essai de synthèse de la 4-trifluorométhylcoumarine* 193
Figure 256 - *Synthèse de la 4-trifluorométhylcoumarine* 194
Figure 257 - *Essai d'iodation de 4-trifluorométhylcoumarine* 194
Figure 258 - *Synthèse de la 4-méthyl-3-cyanocoumarine* 194
Figure 259 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* COU *(violet)* COU-CF_3 *(bleu) et* COU-CN *(rouge) dans l'acétonitrile* 195
Figure 260 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* COU *(violet)* COU-Benz *(orange)* COU-Alcyne *(vert)* COU-Anilinium *(jaune)* COU-Benz-CN *(rouge) et* COU-Py *(bleu) dans l'acétonitrile* 196
Figure 261 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* COU-CF_3 *en présence de, 5, 10 et 15 mM de potassium dans l'acétonitrile* 197
Figure 262 - *Diminution du transfert de charge interne suite à la complexation d'un cation au niveau des oxygènes 6 et 7 de la coumarine* 197
Figure 263 - *Modifications du Calix-COU-Sulf envisagées* 199
Figure 264 - *Essais de diiodantion sélective de Calix-COU-2* 199
Figure 265 - *Diiodation de Calix-COU-SUlf dans un mélange CH_3CN /MeOH* 200
Figure 266 - *Couplages de Sonogashira effectués à partir du Calix-COU-I-Sulf* 200
Figure 267 - *Synthèse du Calix-COU-Anilinium-Sulf* 201
Figure 268 - *Synthèse de Calix-COU-CN-Sulf* 201
Figure 269 - *Analogues de Calix-COU-Sulf synthètisés* 202
Figure 270 - *(a) Spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rouge trait plein), COU-Alcyne (rouge trait pointillé), Calix-COU-Sulf (bleu trait plein), COU (bleu trait pointillé). (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rouge)* 203
Figure 271 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O, [L] = 2,4 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium.* 203
Figure 272 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.* 204
Figure 273 - *Evolution de la duré de vie du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium* 204
Figure 274 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O, [L] = 2,4 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruit à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium.* 205
Figure 275 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.* 205
Figure 276 - *Comparaison de l'évolution de la fluorescence à 445 nm en fonction des conditions ; H_2O (bleu), H_2O + Na^+ (turquoise), H_2O + Mg^{2+} (vert), H_2O + Ca^{2+} (orange), H_2O + Na^+, H_2O + Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} (rouge).* 206
Figure *277* - *Comparaison des spectres d'absorption (a) et d'emission (b) du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-Anilinium-Sulf (rouge).* 207

Figure 278 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Anilinium-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O [L] = 3,6 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Anilinium-Sulf avec l'ajout de potassium.* 207

Figure 279 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Anilinium-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 450 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O; [L] = 3,6 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 450 nm.* 208

Figure 280 - *(a) Spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf (rouge trait plein), COU-CN (rouge trait pointillé), Calix-COU-Sulf (bleu trait plein), COU (bleu trait pointillé). (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-CN-Sulf (rouge)* 208

Figure 281 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O ; [L] = 2,5 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de potassium.* 209

Figure 282 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-CN-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 455 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O; [L] = 3,6 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 454 nm.* 209

Figure 283 -- *(a) Spectres d'absorption à un photon (noir), à deux photons (rouge)et brillance de la molécule (bleu) du Calix-COU-Alcyne-Sulf. (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (bleu) et de la fluorescéine (rouge) λ_{exc} = 760 nm. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 109 µM, solvant H_2O, [Fluorescéine] = xx, solvant H_2O pH 12.* 210

Figure 284 - *(a) Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium (λ_{exc} = 760 nm). (b) Evolution de l'intensité de fluorescence à 475 nm (bleu λ_{exc} = 760 nm, rouge λ_{exc} = 800 nm) et de la durée de vie (noir, λ_{exc} = 760 nm) entre 0 et 40 mM de potassium. Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 108 µM.* 211

Figure 285 - *(a) photographie du réseau d'électrodes extracellulaires, (b) image d'une tranche d'hippocampe de rat sur un réseau d'électrodes extracellulaires, (c) schéma du montage* 212

Figure 286 - *(a) enregistrement de bursts d'activité neuronale induite par une drogue excitant le resau local, la picrotoxine en l'absence (contrôle) et en présence de 6,5 µM de sonde. (b) Comparaison de la fréquence des bursts mesurées sur 6 échantillons en l'absence et en présence de 6.5 µM de sonde.* 212

Figure 287 - *Schéma d'une coupe longitudinale de l'hippocampe d'un rat. (b) imagerie de fluorescence de la région CA3 de l'hippocampe en présence de 6,5 µM de Calix-COU-Alcyne-Sulf.* 213

Figure 288 *Evolution de la fluorescence mesurée en présence de 200 µM de $BaCl_2$.* 214

Figure 289 - *Remplacement de la dihydroxycoumarine par une aminocoumarine* 216

Figure 290 - *Modification de la structure de la sonde envisageable* 220

Figure 291 - *Sondes moléculaires de cations alcalins* 221

Figure 292 - *Structure d'un cryptophanes sélectif du césium, et d'un calixarène inspiré par cette structure* 222

Figure 293 *Dosage de cations avec une concentration constante en ligand et une concentration en métal croissante $[M]_1<[M]_2<...[M]_i...<[M]$* 250

Figure 294 - *Schéma d'une canalisation du circuit de vapeur* 252

Figure 295 - *Schéma du dispositif de piquage* 254

Figure 296 - *Schéma du dispositif de piquage comportant une garde hydraulique* 256

Figure 297 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection* 258

Liste des tableaux

Tableau 1 - *Classification de Pearson* 35

Tableau 2 - *Normes en vigueur concernant l'activité du 137Cs pour la commercialisation de denrées alimentaires au sein de l'Union Européenne* 56

Tableau 3 - *Récapitulatif des méthodes de détection de cations* 60

Tableau 4 - *Variation des caractéristiques photophysiques du Calix-COU-2 en fonction du complexe formé* 70

Tableau 5 - *Comparaison des constantes de complexation et des rendements quantiques des différents complexes formés* 71

Tableau 6 - *Comparaison des propriétés spectroscopiques de la coumarine modèle, du Calix-COU-Sul et du Calix-COU-Acide* 87

Tableau 7 - *Valeurs des déclins de fluorescence du Calix-COU-Acide à pH 11 et 12* 89

Tableau 8 - *Comparaison des constantes de formation des complexes ML et M_2L du Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Acide* 90

Tableau 9 - *Comparaison des propriétés complexantes et des propriétés photophysiques des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Acide* 92

Tableau 10 - *Comparaison des constantes de formation des complexes ML et M_2L du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-Alcyne-Sulf* 93

Tableau 11 - *Comparaison des propriétés complexantes et des propriétés photophysiques des Calix-COU-Sulf, Calix-COU-Acide et Calix-COU-Alcyne-Sulf.* 95

Tableau 12 - *Comparaison des constantes de complexation du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-CN-Sulf* 96

Tableau 13 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu)et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm.* 97

Tableau 14 - *Moyennes et écart-types des paliers de la figure 85* 111

Tableau 15 - *Résumé des caractéristiques des sondes commerciales existantes* 129

Tableau 16 - *Propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy dans différents solvants* 137

Tableau 17 - *Comparaison des propriétés spectrales du calix-Aza-Bodipy et du Calix-Aza-krypto-Bodipy* 145

Tableau 18 - *Comparaison des propriétés photophysiques du Calix-TCF dans l'acétonitrile et du TAC-TCF dans l'eau* 159

Tableau 19 - *Caractéristiques photophysiques du Calix-Ind* 162

Tableau 20 - *Comparaison des propriétés spectrales du Calix-Bodipy-S et de BD-139* 167

Tableau 21 - *Comparaison des caractéristiques photophysiques du Calix-Bodipy et du Calix-Aza-Bodipy* 172

Tableau 22 - *Temps de réaction nécessaire et rendement obtenu pour les couplages de Sonogashira* 192

Tableau 23 - *Déplacements spectraux des coumarines* 195

Tableau 24 - *Déplacements spectraux des coumarines à conjugaisons étendues* 196

Tableau 25 - *Comparaison de la différence d'énergie de stabilisation apportée par le groupement CF_3 et le groupement phénylacétylène pour des coumarines portant des groupements amines ou alcools* 198

Tableau 26 - *Comparaison des propriétés photophysqiues des composés modèle COU et COU-Alcyne et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Alcyne-Sulf* 203
Tableau 27 *Valeurs des déclins de fluorescence pour différentes concentrations de potassium* 204
Tableau 28 - *Comparaison des propriétés photophysqiues des composés modèles COU et COU-Anilinium et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Anilinium-Sulf* 207
Tableau 29 - *Comparaison des propriétés photophysiques des composés modèles COU et COU-CN et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-CN-Sulf* 209
Tableau 30 - *Comparaison des propriétés spectrales à 1 et 2 photons du Calix-COU-Alcyne-Sulf* 211
Tableau 31 - *Comparaison des propriétés spectroscopiques de COU-Benz et de la coumarine 6*. 215
Tableau 32 - *Nombres de Reynolds en fonction du débit* 255
Tableau 34 - *Nombres de Reynolds pour les diférentes sections de l'écoulement* 259

Table des formules

Formule 1 - *Loi de Beer-Lambert* 33
Formule 2 - *Rendement quantique de fluorescence* 33
Formule 3 - *Intensité de fluorescence* 33
Formule 4 - *Déclin monoexponentiel de la fluorescence* 34
Formule 5 - *Transfert d'électrons* 41
Formule 6 - *Equation de Rehm-Weller* 41
Formule 7 - *Transfert d'énergie entre deux fluorophores* 46
Formule 8 - *Expression de la constante de vitesse du transfert d'énergie* k_t 47
Formule 9 - *Expression du rayon de Förster* R_0 47
Formule 10 - *Loi de Beer-Lambert* 248
Formule 11 - *Expression du rendement quantique du composé X* 249
Formule 12 - *Expression du nombre de Reynolds* 254
Formule 13 - *Equation de Bernoulli* 255
Formule 14 - *Expression simplifiée de la hauteur h de la garde hydraulique nécessaire* 257
Formule 15 - *Expression du nombre de Reynolds* 258
Formule 16 - *Expression de la dimension caractéristique L pour une section rectangulaire* 259
Formule 17 - *Expression du nombre de Reynolds au sein de canalisation* 259
Formule 18 - *Expression de la vitesse lors d'un écoulement de Poiseuille* 259
Formule 19 - *Expression du nombre de Péclet* 259

Abréviations

µM	Micromoles par litre
$Al(OH)_3$	Hydroxyde d'aluminium
$B(OM)_3$	Triméthyl borate
$BaCl_2$	Chlorure de barium
BBr_3	Tribromure de bore
$BF_3.OEt_2$	Trifluorure de bore diéthyl étherate
Br_2	Dibrome
BuLi	Butyl lithium
BV	Orbitale moléculaire la plus basse vacante
$CaCl_2$	Chlorure de calcium
CCM	Chromatographie sur couche mince
$CDCl_3$	chloroforme
CH_2Cl_2	Dichlorométhane
CH_3CN	Acétonitrile
CH_3CO_2H	Acide Acétique
$CHCl_3$	Chloroforme
CO_2	Dioxyde de carbone
CsCl	Chlorure de césium
$CsCO_3$	Carbonate de césium
CsF	Fluorure de césium
CTV	Cyclotrivératrylène
CuCN	Cyanure de cuivre
CuI	Iodure de cuivre
D	Coefficient de diffusion
DCDHF	Dicyanomethylènedihydrofurane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ε	Coefficient d'absorption molaire
Et_3N	Triéthylamine
EtONa	Ethanolate de sodium
FRET	Transfert d'énergie de type Förster
GABA	Acide γ-aminobutyrique
H_2O_2	Péroxyde d'hydrogène
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide Chloridrique
HCO_2H	Acide formique
HO	Orbitale moléculaire la plus haute occupée
HSO_3Cl	Acide chlorosulfonique
I_2	Diiode
IC	Conversion interne
ICP	Torche à plasma
ICT	Transfert de charge intramoléculaire
iPrONO	Nitrite d'isoamyle
ISC	Croisement inter système
K_2CO_3	Carbonate de potassium
KCN	Cyanure de potassium
LD_{50}	Dose léthale médiane
LE	Etat localement excité
LED	Diode électroluminescente
LOD	Limite de détection
mCPBA	Acide métachloroperbenzoïque
MeI	Iodure de méthyl
MeOD	Méthanol deutéré
MeOH	Méthanol
MES	Acide 2-morpholinoéthanesulfonique
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium
mM	Millimoles par litre
MMPP	Monoperoxyphtalate de magnésium
MS	Spectrométrie de masse
Na(Hg)	Amalgame de sodium
Na_2HPO_4	Hydrogénophosphate de sodium
$Na_2S_2O_3$	Thiosulfate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
$NaClO_2$	Chlorite de sodium
NaH	Hydrure de sodium
$NaHCO_3$	Hydrogénocarbonate de sodiu
$NaNO_2$	Nitrite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NH_2SO_3H	Acide sulfamique
NIS	N-Iodosuccinimied
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
Ns	Groupement nosyle
O2	Dioxygène
PCT	Transfert de charge photoinduit
$Pd(PPH_3)_4$	Tetrakis(triphénylphosphine)palladium(0)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
Pe	Nombre de Péclet
PEG	Polyéthylène glycol
PET	Transfert d'électron photoinduit
pH	potentiel hydrogène
TA	Température ambiante
PMT	Tube photomultiplicateur
$POCl_3$	Oxychlorure de phosphore

Re Nombre de Reynolds

TBSCl Chlorure de tert-Butyldimethylsilyl

TCF Tricyanofurane

TFA Acide trifluoroacétique

THF Tetrahydrofurane

RMN Résonance Magnétique Nucléaire

$TiCl_4$ Tétrachlorure de titane

TsCl Chlorure de tosyle

UV Ultra violet

w diamètre intérieur

Introduction générale

La détection de traces d'ions et la mesure de variations de concentrations ioniques sont d'un intérêt considérable dans de nombreux domaines tels que l'environnement, la biologie ou le diagnostic médical. En biologie, les concentrations en ions sodium, potassium, calcium et magnésium sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires. En médecine, le suivi des concentrations de ces mêmes ions dans des prélèvements sanguins ou autres est indispensable au diagnostic. De même, dans le domaine environnemental, la détection de traces de polluants comme les métaux lourds ou les éléments radioactifs est tout aussi importante.

Actuellement, la plupart des analyses pour la détection d'espèces ou de composés polluants - tout comme le diagnostic médical - utilisent des méthodes certes éprouvées telles la spectrométrie de masse (ICP-MS), l'électrochimie, la spectrométrie d'absorption ou d'émission atomique, mais les appareillages sont lourds et coûteux et uniquement adaptés à des mesures en laboratoire. Par ailleurs, ces techniques restent cantonnées à l'analyse d'échantillons préalablement prélevés, la mesure de concentrations ioniques in vitro ou in vivo étant impossible. Les méthodes fluorimétriques offrent une alternative intéressante à ces équipements. Ces méthodes de détection d'ions sont très sensibles et basées sur l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes spécifiques d'un ion donné. L'interaction de la sonde avec l'ion entraîne des variations de fluorescence proportionnelles à la concentration de l'ion. La conception de ces sondes relève à la fois de la chimie supramoléculaire et de la photophysique. Ce type de molécules peut être utilisé en imagerie de fluorescence afin d'appréhender des processus biologiques. Pour des applications environnementales, ces sondes peuvent aussi être utilisées au sein d'un dispositif de mesure. Les méthodes fluorimétriques sont peu coûteuses, et ont l'avantage d'être transportables sur le terrain et non-invasives, ce qui permet des mesures in vitro et in vivo en milieu biologique.

L'équipe du Dr. I. Leray travaille sur la synthèse et l'étude de sondes fluorescentes de métaux lourds et de cations alcalins. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la détection de cations alcalins en milieu aqueux, et plus particulièrement au césium et au potassium.

La présence de césium 137 hautement radioactif est une préoccupation environnementale majeure, renforcée depuis le récent accident de Fukushima. La mise au point de sondes moléculaires fluorescentes du césium hydrosolubles et intégrables à un dispositif de mesure pourrait permettre le développement d'appareils de détection transportables et à faible coût. Dans notre cas le césium a été utilisé comme traceur chimique afin de déterminer la teneur en eau liquide de canalisations du circuit de vapeur des centrales électriques. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de collaboration avec EDF.

Le potassium joue quant à lui un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes biologiques. Mais contrairement au calcium et au magnésium, peu de sondes hydrosolubles fiables existent à ce jour. Le développement de sondes moléculaires fluorescentes du potassium solubles en milieu aqueux, permettrait de mieux comprendre le rôle joué par le potassium dans certains processus cellulaires, dont la transmission neuronale.

L'objet de cette thèse a porté sur la conception, la synthèse organique et la caractérisation photophysique de sondes moléculaires fluorescentes du césium pour une application environnementale d'une part, et du potassium d'autre part pour une application en biologie.

Le manuscrit de cette thèse est composé de trois chapitres :

- le premier chapitre introduit au fonctionnement général des sondes fluorescentes de cations
- le second chapitre concerne la détection du césium. La problématique ainsi que les travaux déjà effectués dans ce domaine sont dans un premier temps présentés, avant d'aborder la synthèse et l'étude photophysique des sondes synthétisées. Puis l'utilisation de ces sondes au sein d'un dispositif de micro-fluidique est décrite
- enfin, le troisième chapitre est consacré à la mise au point de sondes fluorescentes pour la mesure du potassium extracellulaire par imagerie de fluorescence. Le rôle du potassium dans les processus cellulaires est présenté, ainsi que les travaux engagés dans le domaine. Les différentes synthèses effectuées sont ensuite décrites ainsi que les caractérisations photophysiques des molécules, et les résultats préliminaires d'imagerie obtenus.

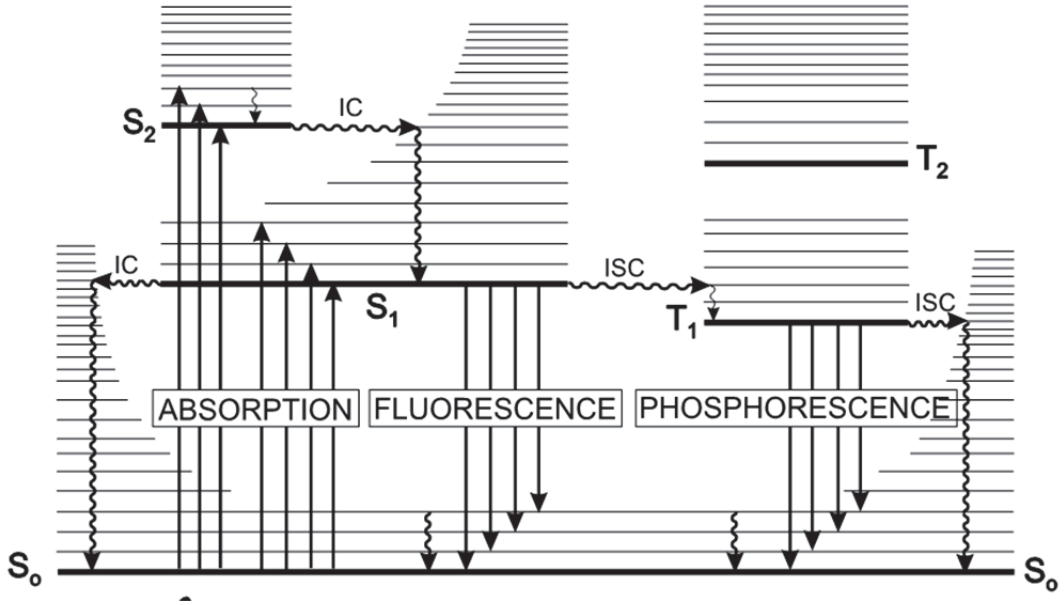
Chapitre 1. Introduction aux sondes moléculaires fluorescentes de cations

I. Fluorescence et sondes moléculaires fluorescentes

Les sondes moléculaires fluorescentes qui ont été synthétisées lors de cette thèse s'appuient sur des phénomènes photophysiques d'absorption de lumière et d'émission de fluorescence. Ces phénomènes vont être brièvement rappelés avant de présenter les sondes moléculaires fluorescentes de cations.

A. Absorption de la lumière et fluorescence

Le diagramme Perrin Jablonski[1,2] (Figure 1) illustre les différents processus possibles lors de l'excitation d'une molécule isolée dans son état fondamental S_0 : absorption d'un photon, conversion interne (IC), relaxation vibrationnelle, fluorescence, croisement intersystème et phosphorescence (ISC). Les états électroniques de la molécule sont décrits suivant leur état de spin, S pour singulet et T pour triplet et leur position par rapport à l'état fondamental S_0. A chaque état électronique sont associés plusieurs états vibrationnels. La conversion interne ou le croisement intersystème sont des processus dit non radiatifs, car ils ne mettent pas en jeu de photons. Au contraire des processus dits radiatifs qui acceptent un photon, comme l'absorption, ou produisent un photon, comme la fluorescence et la phosphorescence.



Temps caractéristiques	
Absorption : 10^{-15} s	Conversion interne : 10^{-11} à 10^{-9} s
Relaxation vibrationnelle : 10^{-12} à 10^{-10}s	Conversion inter-système : 10^{-10} à 10^{-8} s
Fluorescence : 10^{-10} à 10^{-7} s	Phosphorescence : 10^{-12} à 1 s

Figure 1 - *Diagramme de Perrin-Jablonski et temps caractéristiques*

L'absorption d'un photon est un phénomène très rapide (10^{-15} s) qui, suivant le principe de Franck-Condon, entraîne une réorganisation des électrons sans déplacement des noyaux. La capacité d'une molécule en solution à absorber de la lumière se traduit par une décroissance exponentielle du faisceau incident suivant la loi de Beer-Lambert (Formule 1) :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I_t} = \ell \varepsilon(\lambda) C$$

Formule 1 - *Loi de Beer-Lambert*

où :

- $A(\lambda)$: Absorbance à une longueur d'onde λ
- I_0 : Intensité du faisceau incident
- I_t : Intensité du faisceau transmis
- ℓ : Chemin optique
- $\varepsilon(\lambda)$: Coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde λ
- C : Concentration du chromophore

Une fois dans un état excité S_n, la molécule dispose de plusieurs possibilités pour revenir à son état fondamental S_0. La grande majorité des molécules organiques se désexcitent de manière non radiative sans émission de photons. Néanmoins, certaines molécules avec une liberté vibrationnelle réduite se désexcitent en émettant un photon : c'est la fluorescence. Comme on peut le voir dans le diagramme de Perrin-Jablonski, le retour à l'état fondamental ne se fait pas toujours vers le niveau vibrationnel de plus basse énergie. Le photon émis par la molécule est ainsi de plus faible énergie que celui qu'elle a absorbé. Cette différence d'énergie se traduit par un décalage du spectre d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes par rapport au spectre d'absorption. Ce décalage est appelé déplacement de Stokes.

Pour une molécule à l'état excité, l'émission d'un photon est en compétition avec des processus de désexcitation non radiatifs. L'efficacité de la désexcitation radiative peut être quantifiée par le rendement quantique de fluorescence φ qui est le ratio du nombre de photons émis par le nombre de photons absorbés

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Formule 2 - *Rendement quantique de fluorescence*

où :

- Φ_F : Rendement quantique de fluorescence de la molécule
- k_r : Constante de vitesse de désexcitation radiative
- k_{nr} : Constante de vitesse de désexcitation non-radiative

En solution diluée, l'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la concentration en fluorophore et peut être exprimée de la façon suivante:

$$I_F = k I_0(\lambda_{exc}) \Phi_F \ell \varepsilon(\lambda_{exc}) C$$

Formule 3 - *Intensité de fluorescence*

où :

- I_F : Intensité de fluorescence
- k : Constante liée à l'appareil
- $I_0(\lambda_{exc})$: Intensité incidente à la longueur d'onde d'excitation
- Φ_F : Rendement quantique de fluorescence de la molécule
- $\varepsilon(\lambda_{exc})$: Coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde d'excitation
- C : Concentration du fluorophore

Enfin, on définit le temps moyen de résidence des molécules à l'état excité comme la durée de vie de l'état excité. Lorsque N_0 molécules sont portées dans un état excité unique par absorption de lumière à un instant t = 0, le nombre N de molécules à l'état excité à un instant t, est défini par un déclin exponentiel.

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \text{ avec } \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \text{ et } k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC}$$

Formule 4 - *Déclin monoexponentiel de la fluorescence*

où :

- τ : Temps de vie
- k_{IC} : Constante de vitesse de la conversion interne
- k_{ISC} : Constante de vitesse de la conversion inter-système

B. Sondes moléculaires fluorescentes de cations

Les sondes moléculaires fluorescentes de cations aussi appelées fluoroionophore (contraction de fluorophore et de ionophore) (Figure 2) doivent répondre à deux attentes : reconnaître spécifiquement un cation et signaler cette reconnaissance de façon mesurable. Ces molécules peuvent être décomposées en deux parties distinctes : une partie de reconnaissance du cation, l'ionophore, et une partie de signalement, le fluorophore. La complexation d'un cation entraîne une modification des propriétés photophysiques du fluorophore. Cette modification permet le signalement de la complexation. Les contraintes liées au milieu du cation à détecter doivent aussi être prises en compte lors de la conception du fluoroionophore. En effet, la nature du solvant (proticité, polarité), le pH du milieu, la force ionique et la présence d'éventuels cations interférents sont autant de paramètres susceptibles de modifier l'affinité de l'ionophore pour un cation ou les propriétés photophysique du fluorophore.

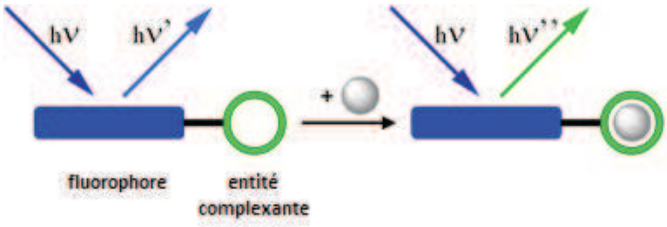


Figure 2 - *Principe de reconnaissance d'un cation par une sonde moléculaire fluorescente*

II. Choix de l'entité complexante

Le choix de l'entité complexante fait appel à la chimie supramoléculaire et à la chimie de coordination et constitue un important travail d'ingénierie moléculaire. Celle-ci doit posséder une bonne affinité et une bonne sélectivité pour le cation cible. Ainsi, plus les constantes des complexes formés sont élevées, plus il sera aisé de détecter de faibles concentrations en cations. Les atomes donneurs participant à la complexation, mais aussi l'architecture globale du ligand, doivent donc être choisis avec soin.

A. Théorie de HSAB

Le choix des atomes donneurs engagés dans la coordination du cation s'appuie sur la littérature relative au sujet, mais surtout sur la théorie de HSAB[3,4] (Hard and Soft Acids and Bases) introduite par Pearson dans les années 1960. Cette théorie a pour but de rendre compte de l'affinité de certains acides (cations métalliques) vis-à-vis de certaines bases (ligands donneurs). Les acides et les bases sont classés suivant leur dureté ou leur mollesse. Les acides et bases durs sont de petite taille, fortement chargés et peu polarisables, au contraire des acides et bases molles, de plus grande taille, peu chargés et facilement polarisables. Acides et bases sont ainsi classés en trois catégories : dur, intermédiaire et mou (Tableau 1). Suivant ce classement et les observations qu'il a faites, Pearson propose qu'une interaction dur-dur ou mou-mou est favorisée par rapport à une interaction dur-mou. Ainsi, de petits cations fortement chargés auront une bonne affinité avec des atomes donneurs tels que l'oxygène. Bien que cette théorie ne couvre pas l'ensemble des interactions acides-bases, elle demeure intéressante pour prévoir qualitativement un bon nombre d'affinités entre cations et ligands.

	Durs	**Intermédiaires**	**Mous**
Acides de Lewis	H^+, Li^+, Na^+, **K^+**, **Cs^+**, Be^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Sn^{2+}, Al^{3+}, Sc^{2+}, Ga^{3+}, In^{3+}, La^{3+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Fe^{3+}, As^{3+}, Ir^{3+}, Si^{4+}, Ti^{4+}, Zr^{4+}, Th^{4+}, Pu^{4+}	Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}	Cu^+, Ag^+, Au^+, Tl^+, Hg^+, Pd^{2+}, Cd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+},
Bases de Lewis	H_2O, OH^-, F^-, AcO^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}, Cl^-, ROH, RO^-, R_2O, NH_3, RNH_2	$C_6H_5NH_2$, C_5H_5N, N_3^-, Br^-, SO_3^{2-}	R_2S, RSH, RS^-, I^-, SCN^-, R_3P, $S_2O_3^{2-}$, CN^-, CO, H^-, R^-, C_2H_4, C_6H_6

R = alkyle ou aryle

Tableau 1 - *Classification de Pearson*

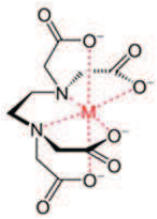
B. Différents ligands existants

En plus des atomes participant à la complexation, le choix de l'architecture du ligand est aussi important, celui-ci pouvant apporter une stabilisation supplémentaire.

1) Ligands chélatants

La chélation est un phénomène au cours duquel un complexe, le chélate, est formé entre un cation métallique et un ligand. Le chélate se différencie du simple complexe par le fait qu'un de ses ligands effectue au moins deux liaisons avec le métal. Le chélate formé est ainsi thermodynamiquement plus stable qu'un complexe équivalent composé uniquement de ligands

monodentés. Les cycles à 5 et à 6 chaînons sont aussi favorisés, minimisant la gêne stérique et les phénomènes de torsion[5]. Ces ligands peuvent être bidentés **1**[6], tridentés **2**[7], quadridentés **3**[8], ou hexadentés **4**[9,10], (Figure 3) durs ou mous et chélater tout type de cation.



1 **2** **3** **4**

Figure 3 - *Différents ligands chélatants existants*

2) Ligands macrocycliques

La famille des ligands macrocycliques est vaste. Elle regroupe des ligands tel que les éthers couronnes, les cryptants, les porphyrines, les calixarènes ou encore les cyclodextrines (Figure 4). L'utilisation de ligands macrocycliques entraîne une plus grande stabilisation du complexe cation-macrocycle que le complexe cation-ligand multidentate. En effet, les ligands linéaires doivent modifier considérablement leur conformation et donc dépenser de l'énergie pour se rapprocher de celle d'un macrocycle.

Les éthers couronnes **5**, **6**[11], sont des polyéthers macrocycliques qui miment la coordination du cation par des molécules d'eau. De taille variable, ils peuvent discriminer des cations en fonction de leur rayon ionique. Ce concept « hôte-invité » est surtout valable pour des cycles de petite taille rigides. Les cycles de plus grande taille ont une flexibilité plus grande leur permettant d'adopter différentes conformations. La relation entre la taille de la cavité et le rayon ionique est alors plus aléatoire. Un cycle va pouvoir être déformé pour coordinner deux petits cations, ou un cation de rayon ionique supérieur au diamètre intérieur pourra tout de même être complexé, ce qui entraîne une perte de sélectivité.

Un moyen d'accroître la sélectivité consiste à augmenter le niveau de préorganisation du ligand. Les cryptands **7**[12,13], macrocycles plus rigides, ont ainsi une meilleure sélectivité que les éthers couronnes. Il y a alors une réelle relation entre la taille de la cavité et la taille du cation complexé. Les constantes de stabilité de ces complexes sont plus importantes, avec une bonne affinité pour les cations alcalins. La rigidité de la cage entraîne cependant une diminution de la cinétique de complexation, gênante pour la détection en temps réel de processus rapides.

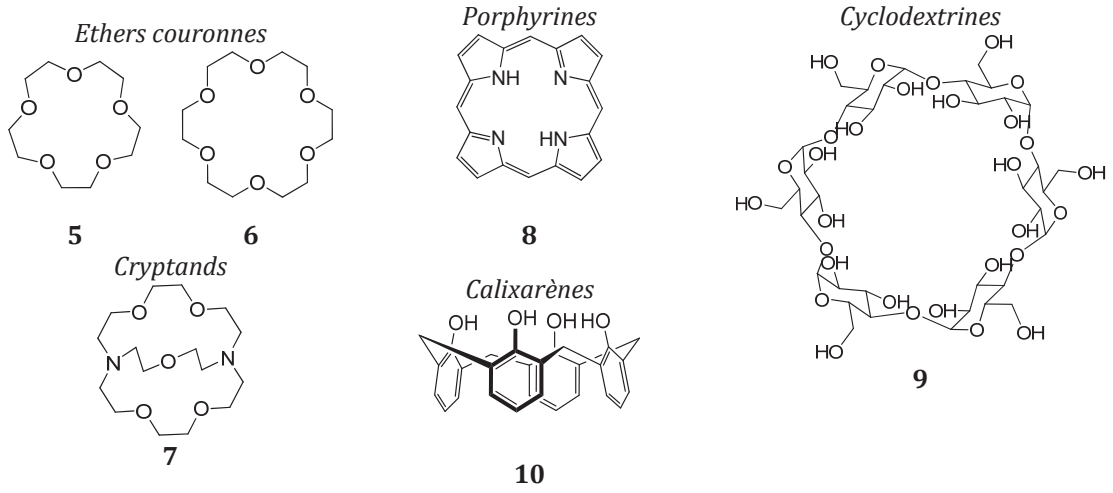


Figure 4 - *Différents ligands macrocycliques*

Les porphyrines **8**[14] et cyclodextrines **9**[15,16] sont d'autres ligands macrocycliques de plus grande taille plus ou moins rigides. Leurs structures variées font d'eux des ionophores aussi très utilisés. Un bon compromis en termes de préorganisation et de vitesse de complexation pour obtenir des entités sélectives d'un cation donnée consiste à associer plusieurs types d'ionophores. Le greffage de fonctions complexantes sur des structures macrocycliques préorganisées telles que les calixarènes est un bon moyen d'obtenir des ionophores très sélectifs.

3) Calixarènes fonctionnalisés par des ligands

Les calixarènes **10** sont des macrocycles formés de *n* unités phénoliques reliées entre elles par des ponts méthylènes sur les positions *ortho* des cycles phénols. Ils sont obtenus par condensation de formaldéhydes et de *p*-alkylphénols. Leur nom vient de leur ressemblance avec un type de vase grec, les cratères en calice (Figure 5). Ils sont connus depuis le début du 20eme siècle avec les premières expériences de condensation de phénols et d'aldéhydes[17]. Ce n'est toutefois que vers la fin des années 1970 et les travaux de Gutsche[18] qui permirent l'obtention de calixarènes en une étape, avec de bons rendements et le contrôle du nombre d'unités phénoliques de la structure, que la chimie des calixarènes se développa.

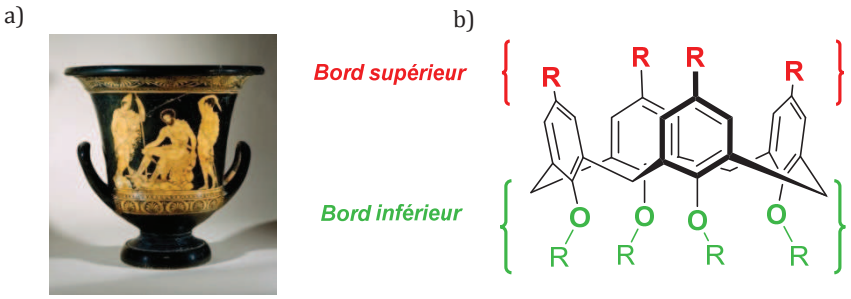


Figure 5 - *a) Cratère en calice lucanien, Ulysse interrogeant l'ombre de Tirésias b) Structure et possibilités de fonctionnalisation sur les calixarènes*

Leur intérêt est d'être préorganisés et rigides, ce qui leur donne une bonne sélectivité. Ils sont aussi suffisamment flexibles pour disposer de constantes de complexation élevées et de grandes

vitesses de complexation. Le taille du cycle peut être variable mais les calix[4]arènes avec quatre unités phénoliques sont les plus intéressants pour la complexation de petits cations. Les calix[6]arènes et calix[8]arènes ont une plus grande cavité et sont plus adaptés à la complexation de gros cations ou de molécules neutres ou chargées[19,20]. Les calix[4]arènes peuvent adopter quatre différentes conformations (Figure 6) identifiables par RMN ^1H[21] grâce aux signaux caractéristiques des protons des ponts méthylènes, la conformation cône étant la plus stable. La fonctionnalisation par des groupements encombrants peut permettre de figer le calix[4]arène dans une conformation donnée. Cette conformation est importante car elle influence les propriétés de complexation finale de la molécule. En effet Shinkai et al.[22] ont montré que la conformation cône favorisait la complexation du sodium, celui-ci étant coordiné par les atomes d'oxygènes des cycles phénoliques. Au contraire, les conformations cône partiel, 1,2 alternée ou 1,3 alternée favorisent la complexation du potassium et du césium qui établissent des interactions π avec un ou plusieurs cycles aromatiques.

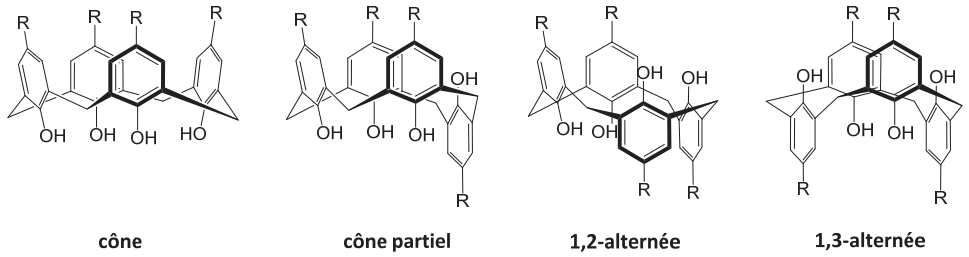


Figure 6 - *Différentes conformations possibles des calix[4]arènes*

Un des intérêts majeurs des calixarènes se situe dans leurs importantes possibilités de fonctionnalisation qui améliorent grandement leurs capacités complexantes[23].

La fonctionnalisation peut avoir lieu en para des fonctions phénol sur le bord supérieur (Figure 5), via des réactions d'halogénation, de nitration, de sulfonation, de formylation, ou de substitution électrophile aromatique. Les fonctions phénols sur le bord inférieur peuvent aussi être éthérifiées **11** ou estérifiées **12** permettant aussi l'insertion de groupement (Figure 7). Tout ceci permet d'obtenir des entités très différentes permettant la complexation aussi bien de cation alcalin ou alcalino-terreux que de métaux lourds.

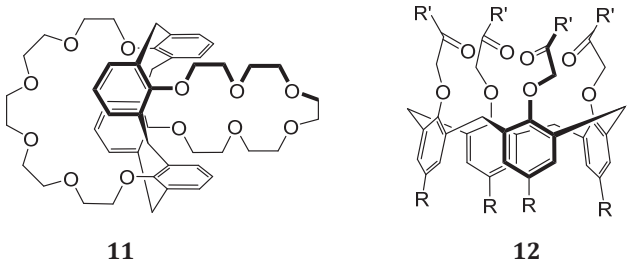
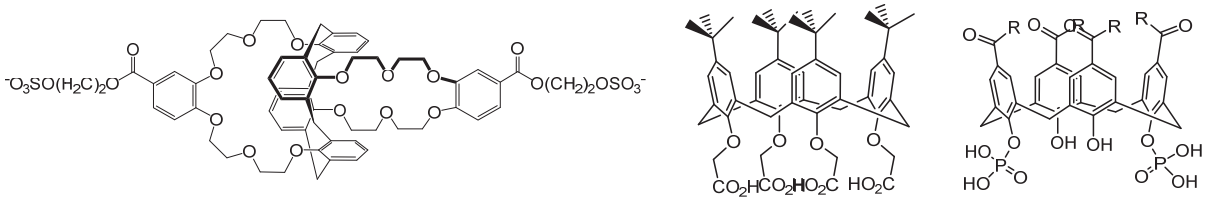


Figure 7 - *Calixarènes fonctionnalisés par un éther couronne* **11** *, ou un ligand chélatant* **12**

Les calixarènes tels quels sont malheureusement uniquement solubles en milieu organique, leur utilisation en milieu aqueux nécessite l'ajout de groupements solubilisant qui sont eux aussi très diversifiés.

4) Calixarènes hydrosolubles

La détection de cations pour des applications biologiques ou environnementales implique généralement de travailler en milieu aqueux. Les calixarènes étant peu solubles dans l'eau, ceux-ci sont rendus hydrosolubles par ajout de groupements hydrophiles neutres ou chargés. Cette fonctionnalisation peut être effectuée directement sur le cœur calixarène ou sur des chaînes latérales présentes sur celui-ci. Ainsi, les éthers couronnes présents sur un calixarène peuvent porter des groupements hydrophiles aidant à la solubilisation de l'ensemble **13**[24]. La fonctionnalisation du cœur calixarène peut avoir lieu sur les fonctions phénols présentes sur le bord inférieur du calixarène. Des groupements carboxylates **14**[25] ou phosphonates **15**[26] peuvent être introduits (Figure 8) mais aussi des sucres par glycosylation[27,28].



13 **14** **15**

Figure 8 - *Calixarénes portant des groupements solubilsants sur l'éther couronne* **13**, *ou sur le bord inférieur* **14**, **15**.

Néanmoins, la majorité des groupements solubilisants sont introduits en para des fonctions phénols. Ces positions sont fortement activées du fait de l'effet mésomère donneur des oxygènes (Figure 9). Ces groupements sont aussi majoritairement anioniques ou cationiques.

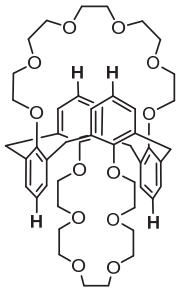


Figure 9 - *Positions para-activées du calixarène*

Les groupements anioniques regroupent les groupements sulfonates **16**, phosphonates **17**, carboxylates **18** et alcoolates **19** (Figure 10). Les acides sulfoniques et phosphoniques ont l'avantage d'être déprotonnés dans l'eau à pH neutre. Au contraire, les calixarènes portant des groupements alcools ou acides carboxyliques nécessitent de travailler en conditions basiques pour que l'ensemble des groupements soient déprotonnés.

Les calixarènes sulfonés peuvent être obtenus par *ipso*-sulfonation de *tert*-butylcalixarène ou bien par sulfonation directe ou chlorosulfonation d'un calixarène dé-tert-butylé[29]. Les réactions d'ipso-sulfonation[30] et de sulfonation directe[31'32] se font à chaud en présence d'acide sulfurique concentré. La chlorosulfonation[33,34] permet en deux étapes via un intermédiaire chlorosulfoné l'obtention de calixarènes sulfonés avec de bons rendements et dans des conditions plus douces. Les calixarènes phosphonés sont obtenus à partir de calixarènes bromés via une réaction d'Arbuzof catalysée en présence de nickel[35]. Les fonctions acides carboxyliques peuvent aussi être introduites à partir d'un calixarène bromé[36] mais aussi à partir de calixarène formylé en oxydant les fonctions aldéhydes en acides[37]. De même, les fonctions alcools peuvent être

obtenues à partir d'un calixarène bromé[38] ou d'un calixarène formylé via un réarrangement de Bayer-Williger[39].

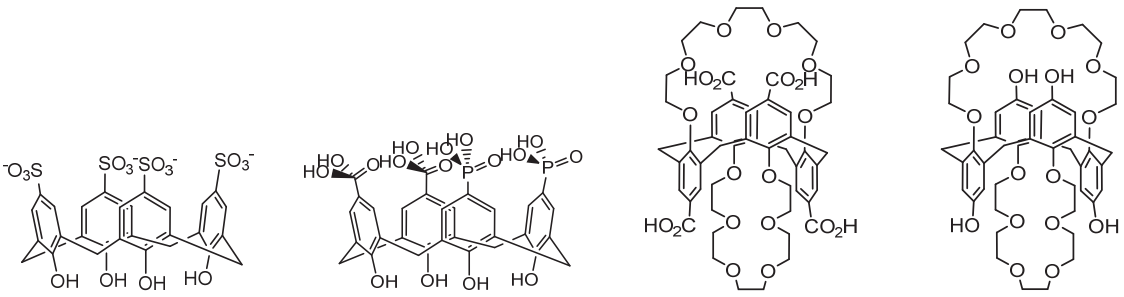


Figure 10 - *Calixarènes fonctionnalisés par des groupements sulfonates* **16**, *phosphonates* **17**, *carboxylates* **18** *et alcoolates* **19**.

Les acides carboxyliques **20**[40,41] et phosphoniques **21**[42,43] peuvent être attachés sur les cycles aromatiques via un espaceur (Figure 11).

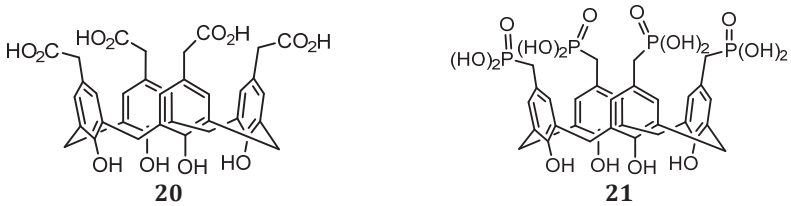


Figure 11 - *Calixarènes fonctionnalisés via un espaceur par des acides carboxyliques* **20** *et phosphoniques* **21**

Les groupements cationiques sont issus de la protonation de groupements aminos **22**[44,45] ou guanidiniums **23**[46,47]. Ces groupements peuvent aussi être soit directement attachés au cycle benzénique soit via un espaceur (Figure 12).

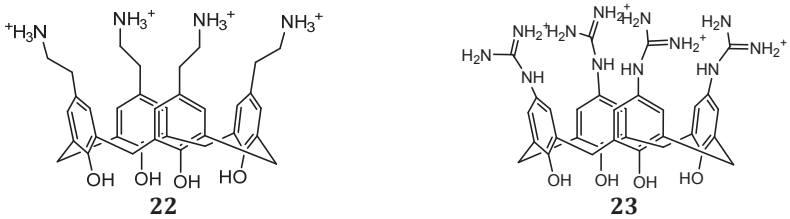


Figure 12 - *Calixarènes portants des fonctions amoniums* **22** *et guanidiniums* **21**

Après avoir vu certains des différents ligands existants, les effets photo-induits par la complexation de cations vont maintenant être présentés.

III. Phénomènes photo-induits par le cation

Une fois l'entité complexante choisie, un ou plusieurs fluorophores lui sont greffés pour obtenir le fluoroionophore. Du choix des fluorophores et de la façon dont ceux-ci sont attachés à l'entité complexante dépend l'efficacité du fluoroionophore. La complexation de cations perturbe des processus photo-induits qui ont lieu suite à l'excitation du fluorophore induisant des modifications des propriétés photophysiques du fluorophore. Les différents fluoroionphores peuvent ainsi être classés en fonction des effets photo-induits lors de la complexation.

A. Transfert d'électron photo-induit (PET)

De nombreux fluoroionphores sont basés sur un transfert d'électron photo-induit ou PET[48,49] entre l'ionophore et le fluorophore. Celui-ci peut induire une exaltation de la fluorescence ou une inhibition de celle-ci. Lorsque le fluorophore excité accepte un électron, le transfert est dit réductif. Lorsque celui-ci donne un électron, le transfert est dit oxydatif.

$A^* + D \rightarrow A^{-\bullet} + D^{+\bullet}$ *Transfert d'électron réductif*
$D^* + A \rightarrow D^{+\bullet} + A^{-\bullet}$ *Transfert d'électron oxydatif*

Formule 5 - *Transfert d'électrons*

L'équation de Rehm-Weller permet de calculer la variation d'enthalpie libre standard et de prédire la possibilité des modifications des propriétés photophysiques en présence d'un cation. Si la variation d'enthalpie libre standard est négative, alors le processus de transfert d'électron photo-induit est possible.

$$\Delta G^0 = F\left[E^0\left(D^{\bullet+}/D\right) - E^0\left(A/A^{\bullet-}\right) - \Delta E_{00}(D)\right] - \Delta H_{solv} - w \quad [Ox]$$
$$\Delta G^0 = F\left[E^0\left(D^{\bullet+}/D\right) - E^0\left(A/A^{\bullet-}\right) - \Delta E_{00}(A)\right] - \Delta H_{solv} - w \quad [Red]$$

Formule 6 - *Equation de Rehm-Weller*

où :

- F : Constante de Faraday ($9{,}65.10^4$ C.mol^{-1})
- $E^0(D^{\bullet+}/D)$: Potentiel standard d'oxydation du donneur (V)
- $E^0(A^{\bullet-}/A)$: Potentiel standard de réduction de l'accepteur (V)
- $\Delta E_{00}(D)$: Energie de l'état excité fluorescent du donneur (eV)
- $\Delta E_{00}(A)$: Energie de l'état excité fluorescent de l'accepteur (eV)
- ΔH_{solv} : Enthalpie de solvatation (J.mol^{-1})
- w : Energie coulombienne de la paire d'ion formée (J.mol^{-1})

Dans le cas d'un transfert d'électron réductif, le fluorophore excité peut recevoir un électron d'un groupement donneur. En l'absence de cation, la molécule est peu fluorescente à cause d'un transfert d'électron intervenant entre un atome ou groupement donneur de l'ionophore vers le fluorophore (Figure 13). Lors de l'excitation du fluorophore, un électron de son orbitale la plus haute occupée (HO) est promu dans son orbitale la plus basse vacante (BV). Un transfert d'électron est alors possible entre l'orbitale (HO) de l'ionophore voisin et l'orbitale (HO) du

fluorophore. Ce transfert d'électron oblige le fluorophore à se désexciter de façon non radiative, expliquant la faible fluorescence de l'espèce en absence de cation.

La complexation d'un cation par le groupement donneur de l'ionophore entraîne une diminution de son caractère donneur. Cela se traduit par une plus grande stabilisation de son orbitale HO, qui devient plus basse en énergie que la HO du fluorophore. Ainsi, lors de l'excitation du fluorophore, le transfert d'électron entre l'ionophore et le fluorophore n'est plus possible, ce qui permet à la molécule de se désexciter de façon radiative. La complexation du cation entraîne donc l'inhibition d'un transfert d'électron photoionduit, entraînant une exaltation de fluorescence sans déplacement des spectres suivant un processus « off-on »

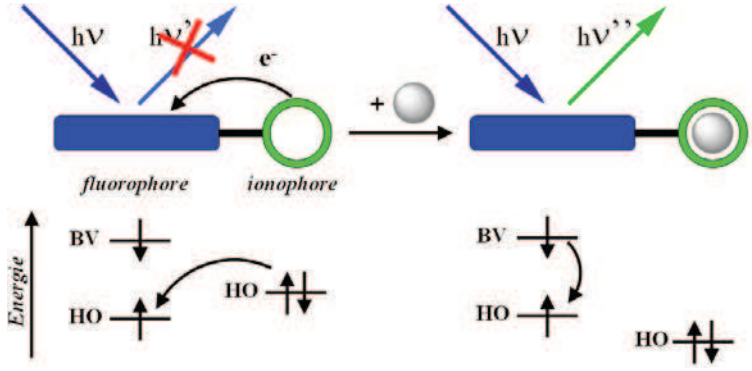
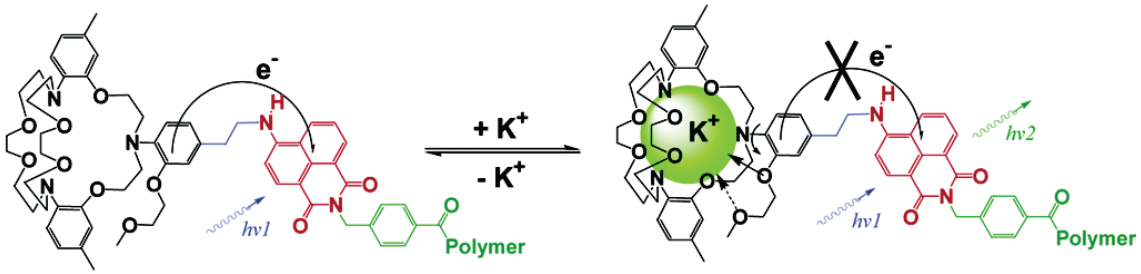


Figure 13 - *Principe du transfert d'électron photo-induit réductif*

Un exemple de fluoroionophore de type PET est présenté Figure 14[50]. La molécule **24** se compose d'un triazacryptand, l'entité complexante attachée à un fluorophore de type naphtalimide. Le triazacryptand permet la complexation sélective du potassium. En l'absence de potassium, l'espèce n'est pas fluorescente à cause d'un transfert d'électron entre l'azote donneur du groupement anisidine et la naphtalimide. La complexation du potassium permet l'inhibition du transfert d'électron, entraînant une exaltation de fluorescence suite à la désexcitation radiative de la naphtalimide. Ce fluoroionophore a été greffé sur une matrice polymère pour permettre la mesure de concentrations de potassium d'échantillon sanguin.



24

Figure 14 - *Fluoroionophore de type PET permettant la détection de potassium décrit par He et al.*[51]

Le cas du transfert d'électron oxydatif est rencontré avec les métaux de transition[52,53], qui sont facilement oxydables ou réductibles. Dans ce cas, le transfert d'électron a lieu entre le ligand et le cation (Figure 15). En l'absence de cation, le fluorophore excité peut revenir à l'état fondamental de manière radiative, l'espèce est donc fluorescente. En présence d'un cation, l'électron promu dans l'orbital BV du fluorophore peut être transféré vers une orbitale vacante du métal, ce qui entraîne une désexcitation non radiative du fluorophore entraînant une

inhibition de la fluorescence. Le cas du transfert d'électron oxydatif est un système « on-off ». Ce cas concernant uniquement les métaux de transition, aucun exemple avec des cations alcalins n'existe.

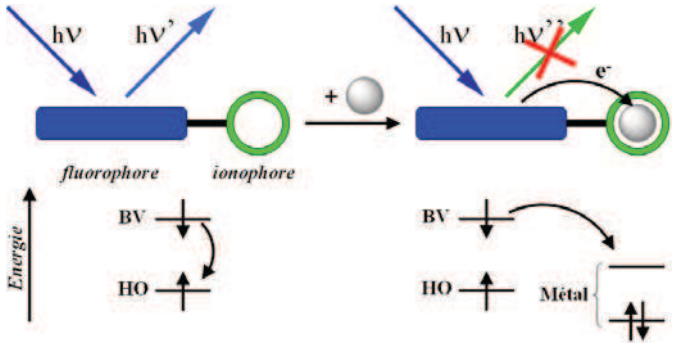


Figure 15 - *Principe du transfert d'électron photo-induit oxydatif*

B. Transfert de charge photo-induit (PCT)

Le transfert de charge photo-induit concerne les fluorophores qui possèdent une partie donneuse d'électrons (NR_2, OMe) conjuguée à une partie acceptrice d'électrons (C=O, CN…). L'absorption d'un photon entraîne chez ces fluorophores un transfert de charge intramoléculaire entre le groupement donneur et accepteur. Ce transfert est responsable des propriétés photophysiques du fluorophore. Pour les fluoroionophores à transfert de charge photo-induit[54,55], le cation interagit soit avec le groupement donneur, soit avec le groupement accepteur. L'interaction du cation avec un des deux groupements modifie le transfert de charge intramoléculaire et donc les propriétés photophysiques du fluorophore. Deux cas sont envisageables suivant que le cation interagit avec le groupement donneur ou accepteur.

1) Interaction du cation avec un groupement donneur

Lorsque qu'un cation interagit avec la partie donneuse d'un fluorophore (Figure 16), son caractère donneur est diminué. Le transfert de charge intramoléculaire est donc moins important, ce qui peut se traduire par une moins grande conjugaison du fluorophore. Ceci entraîne un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption et d'émission et une diminution du coefficient d'absorption molaire.

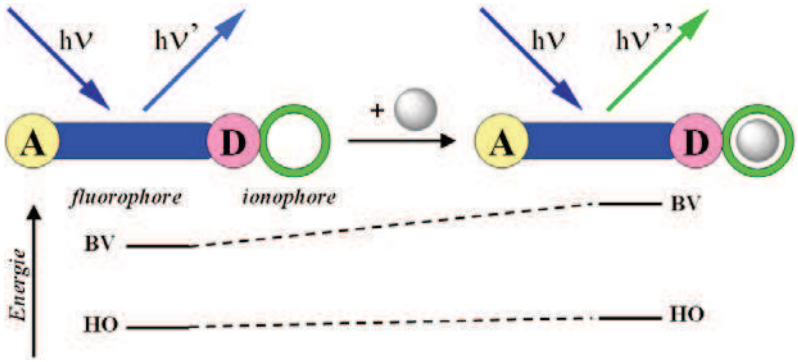
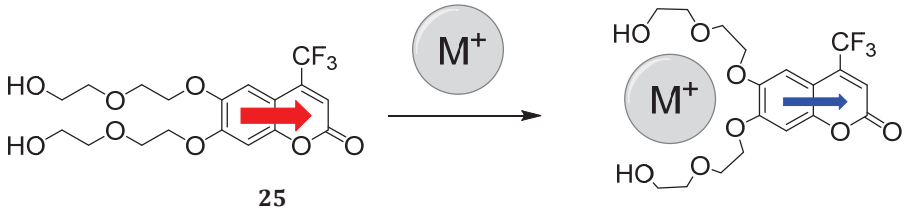


Figure 16 - *Interaction d'un cation avec la partie donneuse d'un fluorophore à transfert de charge intramoléculaire*

La coumarine **25** (Figure 17) capable de complexer des cations alcalins (Na^+, K^+, Cs^+) est un fluoroionophore de type PCT. Les cations sont complexés par les oxygènes 6 et 7 donneurs de la coumarine, la lactone étant la partie acceptrice. La complexation du cation entraîne donc une diminution du transfert de charge intramoléculaire, ce qui se traduit par un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption et une diminution de la fluorescence.



25

Figure 17 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire au sein de la coumarine suite à la complexation d'un cation*

Dans ce cas, les spectres d'émission ne subissent pas de déplacement. Ceci est dû au fait qu'a l'état excité le transfert de charge photo-induit diminue fortement la densité électronique des oxygènes. Ceux-ci deviennent non coordinants et ne complexent plus le cation. Dans ce cas, le spectre d'émission du complexe est peu différent de celui du ligand libre. On parle alors de photorupture de l'intéraction cation-atome à l'état excité.

2) Interaction du cation avec un groupement accepteur

Au contraire, lorsque qu'un cation interagit avec la partie acceptrice d'un fluorophore (Figure 18), son caractère accepteur est renforcé. Le transfert de charge intramoléculaire est dans ce cas plus important, ce qui se traduira par une plus grande conjugaison du fluorophore. Ceci entraîne un déplacement bathochrome des spectres d'absorption et d'émission et une augmentation du coefficient d'absorption molaire.

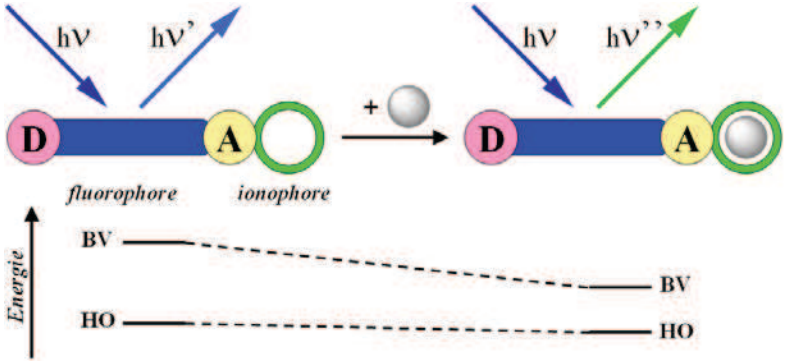
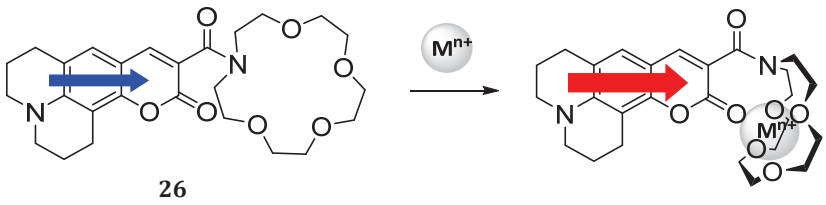


Figure 18 - *Interaction d'un cation avec la partie acceptrice d'un fluorophore à transfert de charge intramoléculaire*

La coumarine **26** Figure 19[56] où un éther couronne a été inséré en position 3 illustre ce cas. L'éther couronne permet la complexation de cation, celle-ci est renforcée par la participation de la liaison carbonyle. L'interaction du cation avec le groupement carbonyle renforce son caractère accepteur, ce qui renforce le transfert de charge intramoléculaire. Ceci se traduit par un déplacement bathochrome des spectres d'absorption et d'émission et une augmentation du coefficient d'absorption molaire.



26

Figure 19 - *Augmentation du transfert de charge intramoléculaire au sein de la coumarine suite à la complexation d'un cation*[57]

C. Formation d'excimère

Un excimère est un dimère issu de la collision entre deux molécules identiques, l'une étant à l'état excité et l'autre à l'état fondamental. L'émission de l'excimère est déplacée vers les plus hautes longueurs d'ondes par rapport au monomère et sa bande est déstructurée. Il possède aussi une durée de vie propre. Aux faibles concentrations, la formation d'excimère intermoléculaire est peu probable. La formation d'excimère intramoléculaire est par contre possible si le temps de formation de celui-ci est plus faible que la durée de vie de l'état excité du monomère. Les molécules doivent pour cela être proches spatialement, et leurs orbitales parallèles pour permettre un bon recouvrement. Ainsi, les fluorophores aromatiques plans comme le pyrène ou l'anthracène forment facilement des excimères.

Des fluoroionophores portant au moins deux fluorophores identiques sont ainsi basés sur la formation ou la destruction d'excimères suite à la complexation d'un cation[58,59](Figure 20).

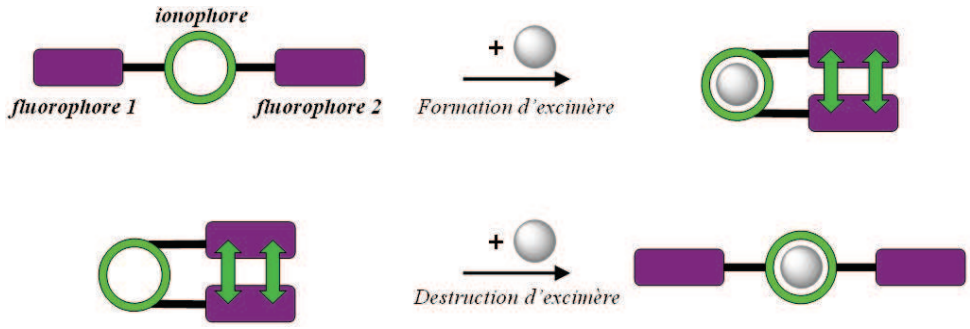


Figure 20 - *Formation ou destruction d'excimère induite par la complexation d'un cation*

La molécule **27** (Figure 21) présente un fonctionnement de type « on-off » basé sur la formation et la destruction d'excimères[60]. Ce thiacalix[4]arène comporte deux sites de complexations différents. L'éther couronne sur la partie supérieure permet la complexation du potassium, alors que la partie inférieure avec les fonctions imines et thiols plus molles permet la complexation de Cu^{2+}. En l'absence de cations, les deux pyrènes attachés au thiacalixarène via des fonctions imines forment un excimère intense en solution.

L'ajout de Cu^{2+} entraîne la disparition de l'excimère. La conformation du thiacalixarène en présence de Cu^{2+} ne permet plus le recouvrement des deux pyrènes nécessaire à la formation de l'excimère. L'inhibition de la fluorescence du monomère est en plus observée à la disparition de l'excimère. Ceci est dû à un transfert d'électron photo-induit oxydatif entre le pyrène et le cuivre. Au contraire l'ajout de potassium n'entraîne pas la disparition de l'excimère, mais renforce son intensité. La complexation du potassium par les oxygènes de l'éther couronne permet d'inhiber un faible transfert d'électron photo-induit existant entre les oxygènes de la couronne et les deux pyrènes (Figure 21 (a)).

De plus, le passage d'un état à l'autre est aussi possible. L'ajout d'un excès de potassium au complexe de cuivre entraîne l'éjection du cuivre et restaure la fluorescence de l'excimère (Figure 21 (b)). De même l'ajout d'un excès de cuivre au complexe de potassium entraîne l'inhibition de la fluorescence suite au remplacement du potassium par le cuivre (Figure 21 (c)).

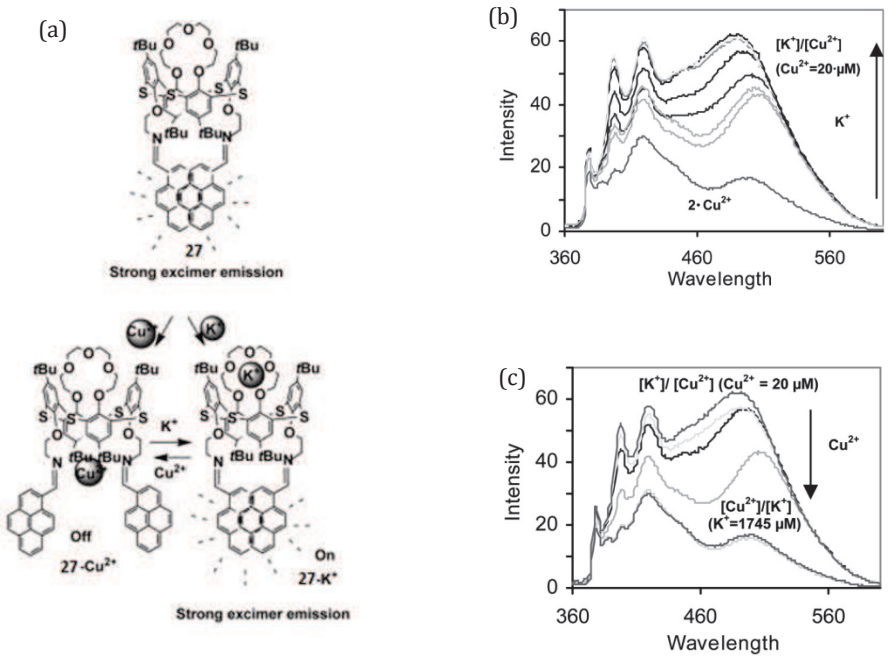


Figure 21 - *(a) effets photo-induits par la complexation de potassium et de cuivre. (b) exaltation de l'émission de l'excimère avec l'ajout de potassium. (c) inhibition de l'émission de l'excimère avec l'ajout de cuivre.*

D. Transfert d'énergie

Un transfert d'énergie entre un fluorophore excité (donneur) et un second fluorophore à l'état fondamental (accepteur) est possible lorsqu'il existe un couplage entre le donneur et l'accepteur. Il faut pour cela un recouvrement entre le spectre d'émission du fluorophore donneur avec le spectre d'absorption du fluorophore accepteur. Ce transfert peut se faire de manière radiative - le photon émis par le donneur est réabsorbé par l'accepteur - ou de manière non radiative.

$$D^* + A \rightarrow D + A^*$$

Formule 7 - *Transfert d'énergie entre deux fluorophores*

Le mécanisme le plus couramment rencontré est le mécanisme de Förster. Celui-ci a lieu lorsqu'une interaction coulombienne existe entre le donneur et l'accepteur (Figure 22). Le transfert d'énergie se produit lorsque le fluorophore donneur retourne à l'état fondamental, et que parallèlement, le fluorophore accepteur est porté à l'état excité. Ce mécanisme ne nécessite pas de proximité spatiale entre les deux fluorophores et peut se produire entre deux fluorophores espacés de 10 à 100 Å.

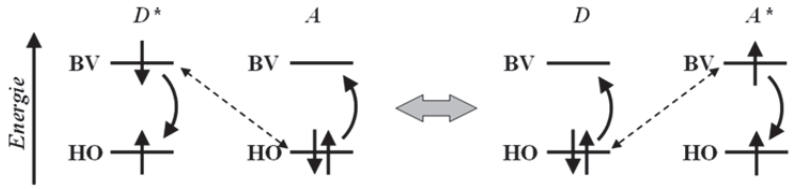


Figure 22 - *Mécanisme de transfert d'énergie de type Förtser*

Les fluoroionophores à transfert d'énergie sont basés sur la modification du transfert d'énergie à la suite de la complexation d'un cation. La modification du transfert d'énergie est soit liée à une modification de la distance séparant les deux fluorophores, soit liée à une modification du recouvrement spectral entre le fluorophore donneur et le fluorophore accepteur (Figure 23), comme le montre l'expression de la constante de vitesse du transfert d'énergie k_t (Formule 8) qui dépend de r la distance entre le donneur et l'accepteur et de R_0 le rayon de Förster. Le rayon de Förster correspond à la distance pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%, et dépend du recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur (Formule 9). La complexation du cation peut ainsi favoriser ou empêcher le transfert d'énergie.

$$k_t = \frac{1}{\tau_0^D}\left[\frac{R_0}{r}\right]^6$$

Formule 8 - *Expression de la constante de vitesse du transfert d'énergie k_t*

où :

- k_t : Constante de vitesse du transfert d'énergie (s^{-1})
- τ_0^D: Durée de vie du donneur en l'absence d'accepteur (s)
- R_0 : Rayon de Förster (m)
- r : Distance entre le donneur et l'accepteur

$$R_0 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2\Phi_D^0}{128\pi^5 N_A n^4}\int_0^\infty I_D(\lambda)\varepsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda$$

Formule 9 - *Expression du rayon de Förster R_0*

où :

- κ^2 : Facteur d'orientation
- Φ_0^D: Rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence d'accepteur
- N_A : Nombre d'Avogadro (mol^{-1})
- n : Indice de réfraction du milieu
- $I_D(\lambda)$: Intensité de fluorescence normalisée du donneur
- ε_A : Coefficient d'absorption molaire de l'accepteur ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

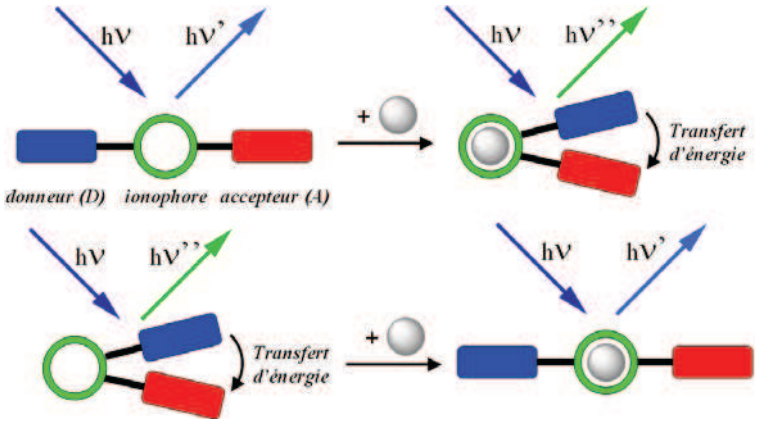


Figure 23 - *Modulation du transfert d'énergie entre fluorophores par ajout de cation*

La molécule **28** (Figure 24) est un exemple de fluoroionophore à transfert d'énergie ou la complexation du cation modifie le recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur[61]. Elle se compose d'un calix[4]arène couronne-6 portant un naphtalène qui permet la complexation du césium, et de deux coumarines attachées au calixarène via des liaisons amides. Les fluorophores ont été choisis de telle sorte que le spectre d'émission du naphtalène et le spectre d'absorption des coumarines se recouvrent partiellement permettant un transfert d'énergie de type Förster.

En l'absence de césium, l'émission du naphtalène est en partie inhibée par un transfert d'électron photo-induit entre les oxygènes de la couronne et le naphatalène. Le transfert d'énergie entre le naphtalène et les coumarines est possible, mais est peu important à cause de la faible fluorescence du naphtalène. La complexation du césium par les oxygènes de l'éther couronne permet d'inhiber le transfert d'électron photo-induit. L'inhibition de ce transfert d'électron entraîne une exaltation de la fluorescence du naphtalène, ce qui permet d'augmenter fortement le recouvrement avec le spectre d'absorption de la coumarine. Le meilleur recouvrement entre les deux spectres permet un transfert d'énergie plus efficace et donc une exaltation de la fluorescence des coumarines.

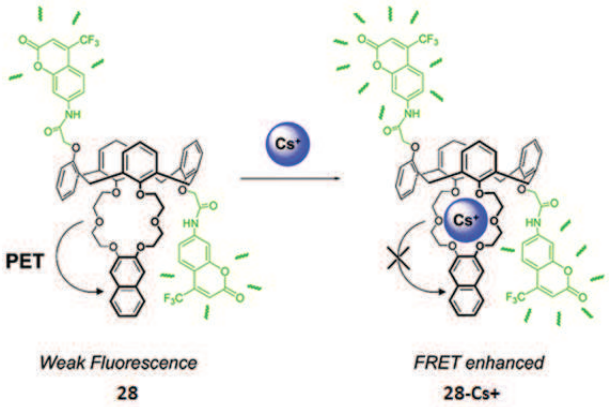


Figure 24 - *Augmentation du transfert d'énergie suite à la complexation du césium*

IV. Conclusions sur les sondes moléculaires fluorescentes de cations

Avec une grande diversité d'entités complexantes et de fluorophores existants, et différents phénomènes photo-induits par la complexation des cations, la famille des sondes moléculaires fluorerscentes de cations est vaste. Deux critères sont importants lors de la conception des sondes, la sélectivité de la complexation et les effets photophysiques induits par la complexation. Pour ce travail qui a porté sur la synthèse et l'étude de sondes fluorescentes pour la détection de traces de césium en milieu aqueux, et la mesure de variations de potassium en milieu biologique, la solubilité dans l'eau des sondes est dans notre cas un troisième critère essentiel à prendre en compte. Des calix[4]arènes couronne portant des groupements solubilisants ont pour cela été utilisés. Différents fluorophores ont été utilisés pour l'obtention des sondes envisagées.

Chapitre 2. Détection du Césium : Mesures d'humidité en temps réel dans des canalisations à l'aide d'un traceur chimique

I. Introduction

La détection du césium entre dans le cadre d'une collaboration avec EDF dont l'objectif a été de mettre au point un système permettant la mesure du taux d'humidité en régime diphasique dans des canalisations du circuit secondaire des centrales électriques. Le césium est utilisé dans ce cas comme traceur chimique et permet l'accès à d'autres paramètres.

A. Projet EDF

1) Fonctionnement des centrales thermiques

Les centrales nucléaires et thermiques sont composées de trois circuits indépendants couplés entre eux permettant la production d'électricité. Un circuit primaire de génération de chaleur, un circuit secondaire de génération de vapeur et un circuit tertiaire permettant le refroidissement et la condensation de la vapeur du circuit secondaire (Figure 25). La seule différence entre les centrales nucléaires et thermiques est la source de combustible utilisée pour la génération de chaleur, nucléaire dans le cas d'une centrale nucléaire, fossile dans le cas d'une centrale thermique.

La chaleur produite dans le circuit primaire permet le chauffage puis la vaporisation de l'eau qui y circule. Cette vapeur produite est utilisée comme source de chaleur dans un échangeur thermique pour permettre la vaporisation de l'eau du circuit secondaire. La vapeur issue de l'eau du circuit secondaire entraîne la rotation des turbines. Couplées à des alternateurs, celles-ci permettent de transformer l'énergie mécanique en énergie électrique. Une fois passée dans les turbines, la vapeur est refroidie et condensée dans des condenseurs alimentés en eau froide par l'eau du circuit tertiaire. L'eau liquide récupérée en sortie des condenseurs est ensuite renvoyée vers le générateur de vapeur pour un nouveau cycle de vaporisation-condensation.

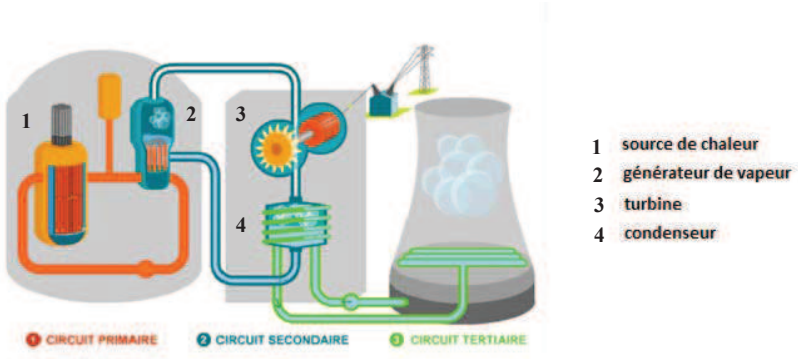


Figure 25 - *Fonctionnement d'une centrale nucléaire*

Le fonctionnement d'une centrale n'est pas idéal. Suivant les conditions de travail, une quantité plus ou moins importante de vapeur peut se condenser avant son passage dans les turbines. Celle-ci est au contact des parois plus froides des canalisations et forme une pellicule d'eau liquide plus ou moins importante sur la surface interne des canalisations (Figure 27). La présence d'eau liquide entre le générateur de vapeur et la turbine entraîne une diminution du rendement de la turbine, mais aussi une détérioration prématurée de celle-ci. La détermination du taux d'eau liquide dans le circuit secondaire et sa minimisation sont donc très importantes pour optimiser le fonctionnement d'une centrale.

2) Mesure du taux d'eau liquide au sein de canalisations

La mesure du taux d'eau liquide au sein des canalisations du circuit secondaire de vapeur permet d'avoir accès à de nombreux paramètres, comme le taux d'humidité au sein de la canalisation, le taux de corrosion de celle-ci ou encore le rendement de la turbine. Ces paramètres sont essentiels au bon fonctionnement d'une centrale.

A l'origine, le taux d'eau liquide était déterminé en utilisant un traceur radioactif : le sodium 24 (^{24}Na) dont la demi-vie est de 14,96 h. Le traceur était injecté en amont du générateur de vapeur. Les prélèvements étaient effectués en aval de celui-ci par piquage sur la canalisation. La concentration en traceur de l'échantillon prélevé était ensuite déterminée par la mesure de sa radioactivité. A partir de la connaissance de la concentration en traceur injecté, de la concentration mesurée au point de piquage et du débit de vapeur circulant, il est possible de déterminer l'épaisseur du film d'eau et donc la quantité d'eau liquide présente au point de piquage (Figure 26 et Annexe 1).

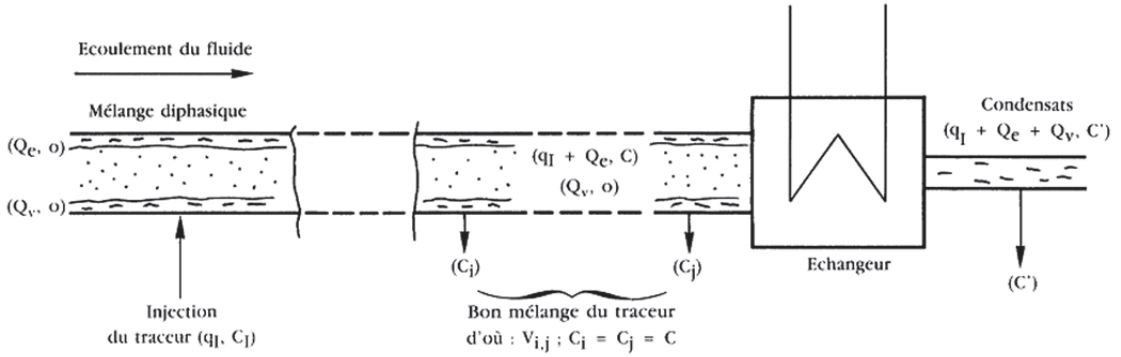


Figure 26 - *Schéma d'une canalisation du circuit de vapeur*

En effet, pour une quantité identique de traceur injecté, plus la quantité d'eau liquide sur les parois de la canalisation est faible, et plus celle-ci sera concentrée en traceur, car le traceur est uniquement présent en phase liquide (Figure 27).

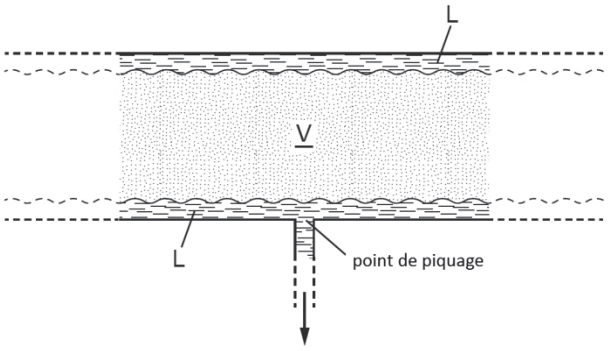


Figure 27 - *Détail d'une canalisation au point de piquage*

Pour que ce raisonnement soit valable, il faut être sûr que lors d'un prélèvement, uniquement l'eau liquide présente sur la paroi soit prélevée et non un mélange d'eau et de vapeur suite à la dépression créée par le soutirage. Pour cela, l'influence du débit de soutirage sur l'intensité de la radioactivité mesurée est dans un premier temps étudiée. Une quantité fixe de traceur est injectée et les prélèvements sont faits à différents débits de soutirage. L'intensité de la

radioactivité mesurée est, dans un premier temps, constante, vu que la quantité de traceur injecté est constante, puis, pour un certain débit, il y a une rupture brusque de la pente. Cette rupture correspond au débit de soutirage à partir duquel le film d'eau sur la paroi est brisé et où de la vapeur est condensée et prélevée en même temps que l'eau présente sur la paroi. Le traceur étant uniquement présent en phase liquide, la condensation de vapeur entraîne une dilution de celui-ci et c'est cette dilution qui est responsable de la diminution de l'intensité de la radioactivité mesurée (Figure 28). Cela permet de connaitre le débit de soutirage maximal utilisable pour que le raisonnement présenté plus haut soit valable.

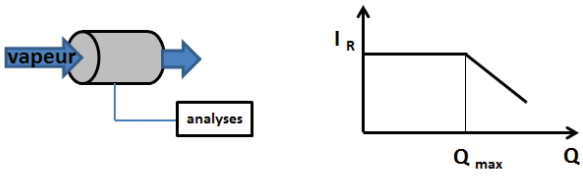


Figure 28 - *Influence du débit sur la quantité de traceur mesuré*

La concentration en traceur au point de piquage était déterminée à partir de l'intensité de la radioactivité mesurée et de la droite d'étalonnage faite au préalable (Figure 29).



Figure 29 - *Détermination de la concentration en ^{24}Na à partir d'une droite d'étalonnage.*

L'utilisation d'éléments radioactifs dans le circuit de vapeur des centrales nucléaires ou thermiques, a par la suite, été abandonnée pour des raisons de sécurité. Le sodium 24 a alors été remplacé par un traceur chimique : le césium 133 (^{133}Cs) non radioactif. Le chlorure de césium CsCl a été choisi. Un dossier d'innocuité complet existait pour cet élément. Le césium, comme le sodium, à l'avantage d'être uniquement présent en phase liquide, contrairement au dioxyde de carbone CO_2 ou au dioxygène O_2 qui sont présents à la fois en phases gazeuse et liquide. La mesure du taux de CO_2 ou d'O_2 ne permet donc pas de déterminer le taux de vapeur suivant la méthode présentée.

La concentration en césium des échantillons est actuellement mesurée par ICP-MS en laboratoire. Cette méthode coûteuse ne permet pas de connaître en temps réel la concentration de césium et donc le taux d'humidité de la canalisation. Des essais à l'aide de méthodes chromatographiques ont été effectués, mais elles n'ont pas permis de descendre sous les 0,1 ppm de césium.

Dans le cadre de ma thèse et en collaboration avec EDF, j'ai travaillé sur un système de détection permettant la mesure rapide et en continu du césium par fluorescence. En effet, notre équipe est spécialisée dans la synthèse et l'étude de sondes moléculaires fluorescentes pour la détection de cations, dont le césium, mais aussi dans l'utilisation de ces sondes au sein de circuits micro-fluidiques pour permettre l'analyse en continu de traces de cations.

3) Projet : mesure de traces de césium par fluorescence

L'objectif de ce projet a été la synthèse et l'étude de sondes permettant la détection sélective de traces de césium par fluorescence, puis, l'insertion de ces sondes dans un dispositif de mesure comprenant un circuit micro-fluidique pour permettre la mesure de traces de césium par fluorescence et en continu (Figure 30). Le cahier des charges imposé par EDF était de mesurer des concentrations de césium comprises entre 5 et 10^{-3} ppm à partir d'un tuyau de piquage dans lequel le débit pouvait varier entre 1 et 10 l/h. Le protocole resterait identique, l'intensité de la fluorescence en fonction du débit ou de la concentration en césium serait étudiée en lieu et place de l'intensité de la radioactivité.

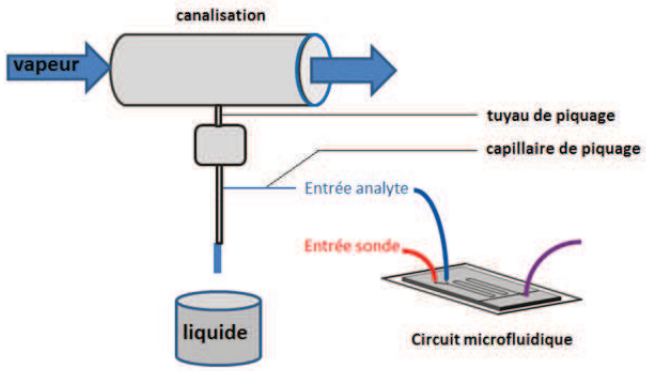


Figure 30 - *Schéma du projet envisagé*

B. Propriétés et méthodes de détection du césium

Les propriétés physico-chimiques du césium vont maintenant être présentées ainsi que les principales méthodes existantes permettant sa détection.

1) Propriétés du césium

Le césium Cs est un métal alcalin d'aspect argenté, de numéro atomique 55 et de configuration électronique [Ar] $6s^1$. Son point de fusion est de 28°C. Il peut ainsi à température ambiante exister à l'état solide ou à l'état de liquide en surfusion. Ses propriétés chimiques sont semblables à celles du potassium. Il est très réactif, pyrophorique et réagit aussi violemment au contact de l'eau. Dans la nature, il se trouve uniquement à l'état d'oxydation +1, et est présent à l'état de traces aussi bien dans la croûte terrestre sous forme d'oxyde, que dans les océans sous forme dissoute. Il en existe 31 isotopes dont la masse varie de 114 à 145. Parmi eux, seul l'isotope 133 est stable, l'isotope radioactif le plus important étant le césium 137 (^{137}Cs) issu uniquement de réactions de fission nucléaire. L'isotope 137, de période de décroissance radioactive de 30 ans, est un émetteur β^- qui se désintègre en baryum ^{137m}Ba, puis rapidement en baryum non radioactif par émission de rayonnement gamma (γ). Une désintégration β^- sans émission de rayonnement γ est également possible[62] (Figure 31). Il peut être utilisé comme source de rayonnement radioactif en médecine pour traiter des cancers. Le césium non radioactif de par ses propriétés photoémissives est utilisé dans la fabrication de certaines cathodes. Certains sels de césium (Cs_2CO_3, CsF) sont utilisés en chimie lors de réactions, et des solutions aqueuses de formiates de césium de densité importantes (2,3 $g.cm^{-3}$) servent en

extraction pétrolière lors de forages. Le césium 133 est aussi utilisé pour la réalisation d'horloges atomiques, un nombre fixe de périodes de sa radiation entre deux niveaux de l'état fondamental servant à la définition de la seconde[63].

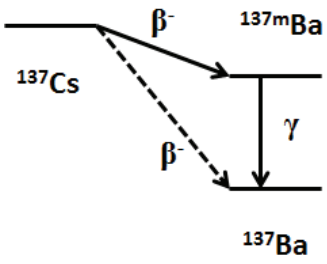


Figure 31 - *Schéma de désintégration radioactive du 137Cs*

Etant proche du potassium, le césium est ainsi capable de remplacer celui-ci dans l'organisme. Néanmoins sa toxicité est faible. La valeur de la dose létale moyenne (LD_{50}) du chlorure de césium chez la souris est de 2,3 g/kg, proche des valeurs du chlorure de potassium ou sodium. Il est principalement éliminé par voie urinaire et sa période biologique varie de 50 à 150 jours[64]. Au contraire, la radiotoxicité de ses isotopes, le ^{137}Cs en particulier, est plus problématique. En tant qu'émetteur β, son caractère potentiellement cancérigène ne peut être négligé. Outre une exposition directe à une source de césium radioactif, certains végétaux comme les champignons poussant sur des sols contaminés accumulent le césium radioactif. Leur consommation de manière régulière génère une exposition continue entraînant des risques pour la santé. La capacité des champignons à extraire du sol et à concentrer les métaux lourds (Pb, Hg, Cs) en leur sein offre des solutions intéressantes pour la dépollution et la décontamination de sols. Au niveau moléculaire, ces propriétés complexantes sont dues à la présence de polyphénols capables de complexer ces métaux. Dans le cas du césium, des dérivés de l'acide pulvinique comme la norbadione A sont responsables de sa séquestration[65,66]. Les normes en vigueur s'appliquant au ^{137}Cs sur les produits alimentaires sont résumées dans le Tableau 2[67]. Les mesures de ^{137}Cs dans l'environnement peuvent être effectuées sur des prélèvements d'air, d'eau, de sol, ou de produits alimentaires, l'analyse se faisant par spectrométrie gamma (γ).

Denrées alimentaires	Aliments pour le nourrisson	Produits laitiers	Autres denrées alimentaires	Liquides destinés à la consommation
Activité (Bq/kg)	< 400	< 1000	< 1250	< 1000

Tableau 2 - *Normes en vigueur concernant l'activité du 137Cs pour la commercialisation de denrées alimentaires au sein de l'Union Européenne*

2) Chromatographie d'échanges d'ions

La chromatographie d'échanges d'ions est un type de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des ions ou des molécules chargées d'un mélange[68,69]. L'échantillon liquide à analyser est passé sur une phase stationnaire chargée. Pour séparer des cations, une résine chargée négativement (anionique) sera utilisée, alors que pour les anions la séparation sera réalisée par une résine chargée positivement (cationique). Les cations sont ainsi séparés en fonction de leurs charges, tailles et polarisabilités (Figure 32). Généralement, ils sont ensuite analysés à l'aide d'un détecteur de conductivité. Mais une telle colonne peut très bien être placée

en amont d'un spectromètre d'absorption ou d'émission atomique ou d'un spectromètre de masse et jouer uniquement un rôle de séparation. C'est une technique chromatographique couramment utilisée en chimie analytique, notamment pour le contrôle de la qualité de l'eau. Cependant, ces dispositifs sont lourds et peu transportables sur le terrain, donc plus adaptés pour des analyses de prélèvements.

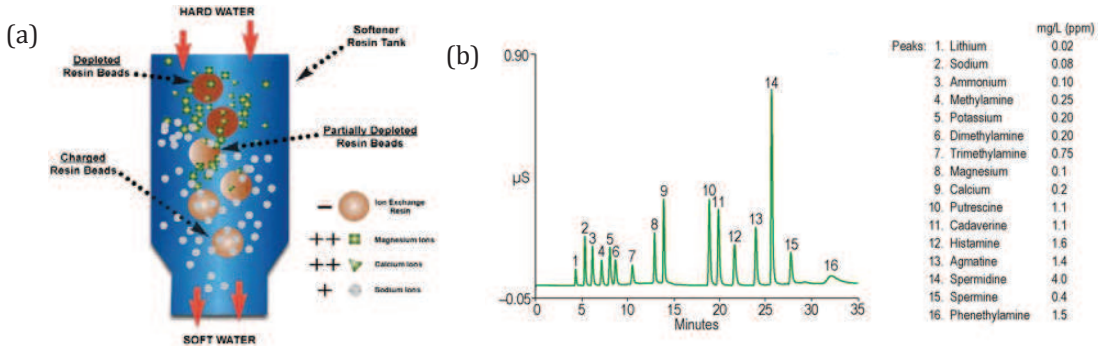


Figure 32 - *(a) Principe de la chromatographie à échanges d'ions, (b) chromatogramme*

3) Spectrométrie d'absorption atomique

La spectrométrie d'absorption atomique se base sur l'absorption de lumière par des atomes à l'état fondamental[70,71,72]. Chaque élément dispose de raies d'absorption caractéristiques permettant de le différencier. L'échantillon liquide à doser est vaporisé puis atomisé par une source de chaleur. Le nuage de vapeur formé est traversé par un faisceau lumineux dont une partie est absorbée (Figure 33). Les raies absorbées permettent de déterminer les métaux présents (Figure 34). L'intensité de lumière absorbée est proportionnelle à la concentration initiale en métal, permettant une analyse quantitative.

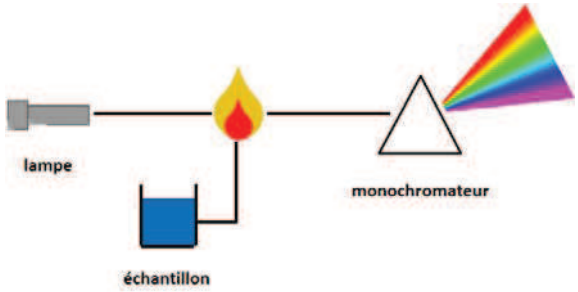


Figure 33 --*Principe de la spectrométrie d'absorption atomique*

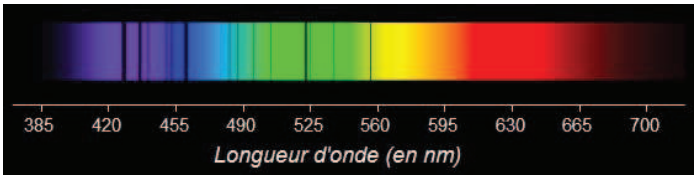


Figure 34 - Raies d'absorption du césium

Cette technique largement répandue, simple d'utilisation et peu chère permet le dosage d'une soixantaine d'éléments avec des limites de détection de l'ordre du µg.L^{-1}. Néanmoins, les concentrations doivent être à l'état de traces pour rester dans la zone de linéarité de la loi de

Beer-Lambert et elle ne permet pas d'analyse qualitative d'échantillons de composition inconnue. L'équipement est également lourd et difficilement transportable sur le terrain.

4) Spectrométrie d'émission atomique

La spectrométrie d'émission atomique s'intéresse aux rayonnements émis par des atomes à l'état excité lors de leur retour à l'état fondamental[73]. Tout comme pour l'absorption atomique, les raies d'émission atomique d'un élément lui sont propres et permettent ainsi de l'identifier (Figure 36). L'échantillon est vaporisé, puis atomisé en utilisant cette fois une torche à plasma pour exciter un plus grand nombre d'atomes (Figure 35). L'intensité des raies obtenues est aussi proportionnelle à la quantité de métal en solution, permettant aussi une analyse quantitative.

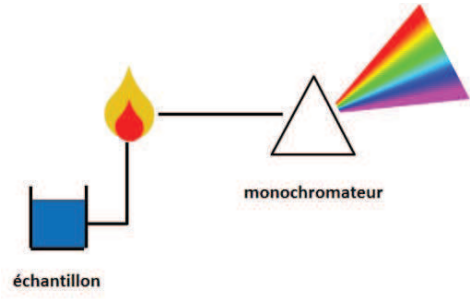


Figure 35 - *Principe de la spectrométrie d'émission atomique*

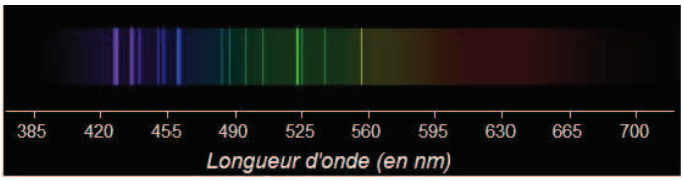


Figure 36 - Raies d'émission du césium

Tout comme la spectrométrie d'absorption atomique, c'est une technique robuste dont la sensibilité est aussi de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$. Elle permet une analyse plus fine de certains éléments, et l'analyse qualitative de mélange. L'équipement est de même difficilement transportable et un peu plus onéreux que l'absorption atomique.

5) Spectrométrie de masse (ICP-MS)

La spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS) permet de doser la quasi-totalité des éléments en solution[74]. Après vaporisation de l'échantillon, celui-ci est ionisé par une torche à plasma. Les ions formés sont ensuite séparés les uns des autres en fonction de leurs masses, charges et vitesses par application de champs électromagnétiques. C'est une technique de référence pour l'analyse de traces, permettant aussi la quantification des ratios isotopiques. Néanmoins, elle n'est pas transportable sur le terrain et nécessite un coût de fonctionnement élevé.

6) Spectrométrie gamma

Si l'on s'intéresse à un isotope radioactif du césium tel que le ^{137}Cs, la spectrométrie gamma (γ) peut être utilisée comme méthode de mesure[75,76]. Le rayonnement gamma est un rayonnement analogue à celui de la lumière, mais beaucoup plus énergétique. Ce rayonnement d'énergie déterminée issu de la désexcitation du noyau est caractéristique de celui-ci et donc de l'élément

en présence. Contrairement à un compteur Geiger mesurant uniquement les rayonnements ionisants émis par un échantillon, un spectromètre à rayonnement γ est capable d'analyser les différentes énergies émises, et donc les différents éléments radioactifs présents dans l'échantillon. Il mesure aussi l'intensité des différents rayonnements γ émis, permettant une analyse aussi bien qualitative que quantitative d'un échantillon radioactif. Un inconvénient de cette méthode est le temps d'acquisition de la mesure pour un échantillon, qui peut être de plusieurs jours. Mais c'est la seule méthode permettant d'identifier et de déterminer l'activité de radioéléments.

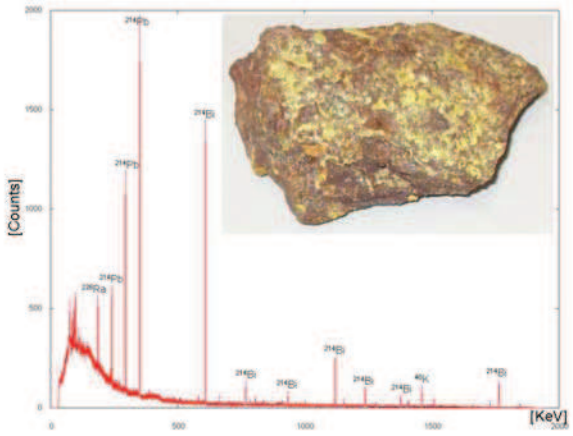


Figure 37 - *Spectre Gamma d'un minerai d'Uranium : présence des radionucléides ^{226}Ra, ^{214}Pb, ^{214}Bi de la chaîne de désintégration de l'Uranium*

7) Spectrophotométrie de fluorescence

La détection de cations par spectrophotométrie de fluorescence a connu un fort développement ces dernières années. Elle repose sur l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes de cations[77,78,79,80,81]. La conception de ces sondes fait appel à la chimie supramoléculaire et à la photophysique, pour obtenir des sondes spécifiques d'un cation entraînant une réponse mesurable par fluorescence. La fluorescence émise est ensuite mesurée par un système optique puis transformée en signal électrique et analysée. Ces sondes moléculaires peuvent être insérées dans un système de mesure pour obtenir un senseur portatif à bas coût et spécifique d'un cation pour des analyses sur le terrain. Mais contrairement aux techniques décrites précédemment, elles peuvent aussi être utilisées pour effectuer de l'imagerie de fluorescence de tissus vivants, permettant la mesure de concentrations ioniques au sein de cellules ainsi que l'observation de phénomènes à l'échelle cellulaire avec une bonne résolution spatiale.

8) Résumé des performances des différentes méthodes de détection du césium

Méthodes	Avantages	Inconvénients	Portabilité	Limites de détections
Chromatographie à échanges d'ions	Détection simultanée de plusieurs ions Mesures simples Fiable	-	non	-
Spectrométrie d'absorption atomique	Très sensible Fiable	Coûteuse	non	≈ 1µg/L
Spectrométrie d'émission atomique	Très sensible Détection simultanée de plusieurs ions Fiable	Coûteuse	non	≈ 1 µg/L
Spectrométrie de masse (ICP-MS)	Très sensible Détection simultanée de plusieurs ions Fiable	Coûteuse	non	< 1 ng/L
Spectrométrie gamma γ	Détection simultanée de plusieurs espèces Fiable	Temps d'analyse long Non-transportable	non	-
Spectrophotométrie de fluorescence	Très sensible Peu coûteuse	Interférences Photostabilité	oui	< 1µg/L

Tableau 3 - *Récapitulatif des méthodes de détection de cations*

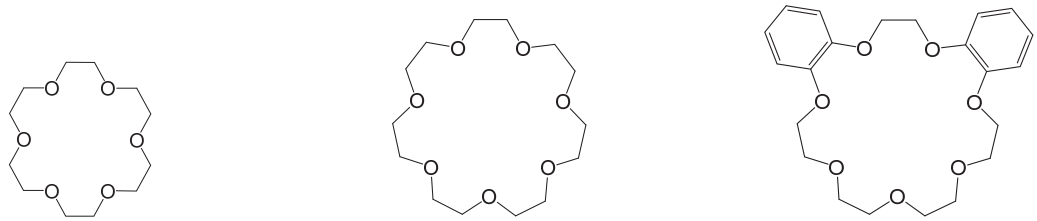
Parmi les différentes méthodes présentées, la détection du césium par spectrophotométrie de fluorescence présente de nombreux avantages. Cette méthode est très sensible, et permet la détection rapide de traces, elle est aussi peu coûteuse et peut être utilisée au sein de dispositifs transportables sur le terrain. Pour ces différentes raisons, l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes de césium a été envisagée pour la détection de césium.

C. Présentation des systèmes complexants et des sondes moléculaires fluorescentes du césium existantes

Le césium est un cation alcalin. Bien que plus mou que le sodium et le potassium, il est bien complexé par des structures macrocycliques de type éther couronne contenant plusieurs atomes d'oxygène. La toxicité du césium non radioactif est faible mais, la radiotoxicité de ses isotopes radioactifs est plus préoccupante. Des sondes moléculaires fluorescentes spécifiques du césium permettraient donc - comme nous l'envisageons - la réalisation de capteurs à faible coût et transportables**.** Les différents types de sondes existants vont maintenant être présentés.

1) Sondes fluorescentes à base d'éthers couronnes

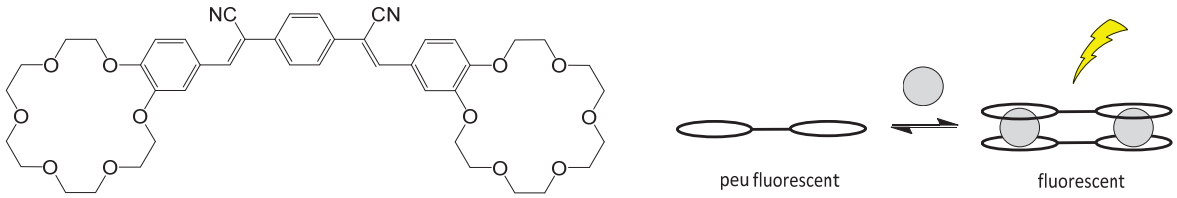
Les éthers couronnes **29** et **30** disposant respectivement de 6 et 7 atomes d'oxygène permettent grâce à leurs taille une complexation sélective du césium. Néanmoins, ces éthers couronnes de grande taille sont assez flexibles et peuvent adapter leur conformation pour complexer des cations de plus petites tailles. Le remplacement de ponts méthylènes par des groupements aryles (molécules **31**) permet de diminuer leur flexibilité et d'augmenter leur sélectivité vis-à-vis du césium.



29 **30** **31**

Figure 38 - *Ethers couronnes complexant le césium*

En milieu organique, les éthers couronnes peuvent établir des interactions de type sandwich, où deux ligands coordinnent un métal. La molécule **32** est un des rares exemples de sondes moléculaires fluorescentes basées sur ce phénomène permettant la détection de césium[82]. En l'absence de césium, l'espèce seule est peu fluorescente. L'ajout de césium entraîne un déplacement vers le rouge et une large exaltation de la fluorescence. Ceci est attribué à la formation d'un complexe sandwich, où chacune des deux couronnes est en interaction avec un atome de césium (Figure 39). La sélectivité de la détection provient de la formation de ce complexe sandwich. Ainsi, le potassium peut lui aussi être complexé par la couronne, mais il n'entraîne pas la formation de complexe sandwich et donc de variations des propriétés photophysiques. La complexation du potassium n'est donc pas visible, mais sa compétition avec le césium bien réelle. Ce composé dispose donc d'une bonne sélectivité du point de vue des effets photophysiques associés à la complexation, mais sa sélectivité chimique par rapport au potassium est insuffisante.

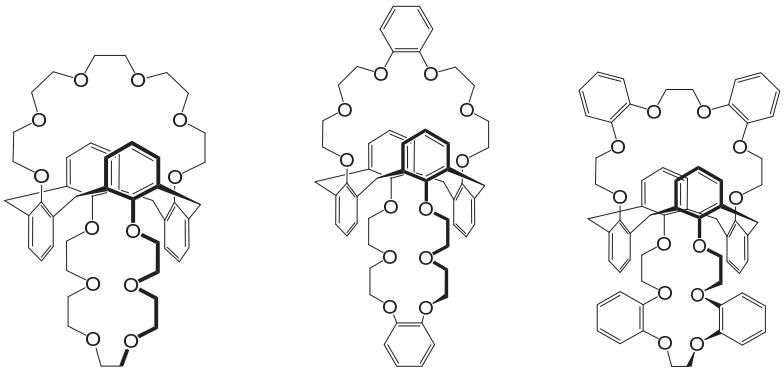


32 *complexe sandwich*

Figure 39 - *Sonde fluorescente moléculaire spécifique du césium et mode d'action*

2) Sondes fluorescentes à base de calixarènes couronnes

Le greffage d'éthers couronnes sur un calix[4]arène permet d'obtenir des molécules avec une meilleure sélectivité vis-à-vis des cations alcalins[83]. A ce jour, les calixarènes les plus efficaces pour la complexation du césium sont des calix[4]arénes-bis-couronnes-6 (nomenclature introduite par Arnaud-Neu et al.[84,85,86]) en conformation 1,3 alternées (molécule **33** Figure 40). La taille de l'éther couronne contenant 6 atomes d'oxygènes est idéale pour la complexation du césium. De plus, son immobilisation sur le calixarène le rend moins flexible et permet une meilleure sélectivité pour le césium[87,88,89]. Comme dans le cas d'éthers couronnes simples, le remplacement de ponts méthylènes par des groupements aryles permet d'augmenter la sélectivité des molécules **34** et **35** (Figure 40) pour le césium[90,91,92,93], la molécule **34** semblant être le cas le plus intéressant. Ces groupements aromatiques permettent aussi une fonctionnalisation supplémentaire possible sur l'éther couronne. Enfin, comme l'ont montré Shinkai et al. [94], la conformation 1,3 alternée permet aussi d'accroitre la sélectivité Cs^+/Na^+ de la molécule. En effet, la conformation 1,3 alternée permet l'établissement d'interactions π entre le césium et les cycles benzéniques du calixarène. La complexation du sodium est quant à elle favorisée par une conformation cône où le sodium est coordinné par les oxygènes présents sur la partie inférieur du calix[4]aréne.



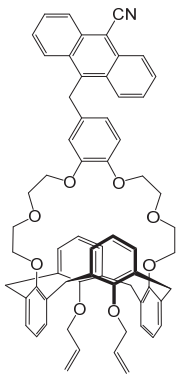
33 **34** **35**

Figure 40 - *Calix[4]arène bis-couronnes-6 sélectif du césium*

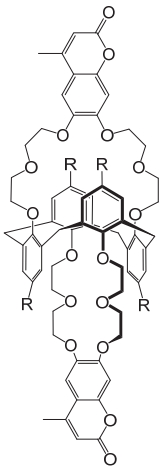
Ces molécules destinées dans un premier temps à l'extraction sélective du césium, peuvent être fonctionnalisées par des fluorophores pour obtenir des sondes moléculaires fluorescentes spécifiques du césium. Dabestani et al.[95,96] ont été les premiers à synthétiser des fluoroionophores à base de calix[4]arène couronne-6 et de type PET comme la molécule **36** (Figure 41). Cette molécule dispose d'un site de complexation du césium auquel est attaché de manière covalente mais non conjugué un motif cyanoanthracène. En l'absence de césium, un

transfert d'électrons photo-induits (PET) entre les oxygènes du groupement catéchol et le cyanoanthracène empêche la fluorescence. La complexation du césium et son interaction avec les oxygènes de la couronne modifient le potentiel d'oxydation de ceux-ci, empêchant le transfert d'électrons photo-induits, entraînant une exaltation de fluorescence. La constante de formation du complexe ML dans un mélange CH_2Cl_2/MeOH (1/1) est log K_{11} = 7,08.

Le **Calix-COU-2**[97,98] (Figure 41) synthétisé au laboratoire est un fluoroionophore à transfert de charge photo-induit (PCT). Il comprend la même entité complexante, mais les motifs cyanoanthracène ont été remplacés par deux coumarines. L'ajout de césium entraîne un léger déplacement hypsochrome des spectres d'absorption, et une diminution de la fluorescence. Le Calix-COU-2 dispose d'une très bonne sélectivité Cs^+/Na^+ et Cs^+/K^+ en milieu organique. Les constantes de formation des complexe ML et M_2L sont respectivement log K_{11} = 4,03 ± 0,02 et log K_{21} = 3,79 ± 0,05 dans l'éthanol. Ce composé étant uniquement soluble en milieu organique, un analogue hydrosoluble de Calix-COU-2 a été synthétisé au laboratoire le **Calix-COU-Sulf**[99,100] (Figure 41). L'introduction de groupements sulfonates sur le calixarène[101] permet sa solubilisation en milieu aqueux. La molécule ainsi obtenue dispose d'une très bonne sélectivité Cs^+/Na^+ dans l'eau, la sélectivité Cs^+/K^+ étant plus faible. Les constantes de formation des complexes ML et M_2L dans l'eau sont respectivement log K_{11} = 6,68 ± 0,09 et log K_{21} = 3,81 ± 0,05. Les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf sont différentes de celle de Calix-COU-2. La complexation du césium entraîne un léger déplacement bathochrome des spectres d'absorption et une augmentation de la fluorescence. Cette différence de propriétés photophysiques est liée au groupements sulfonates. Les propriétés photophysiques du Calix-COU-2 et du Calix-COU-Sulf seront présentées plus en détails dans la suite de ce chapitre.



36



Calix-COU-2 R = H

Calix-COU-Sulf R = SO_3^-

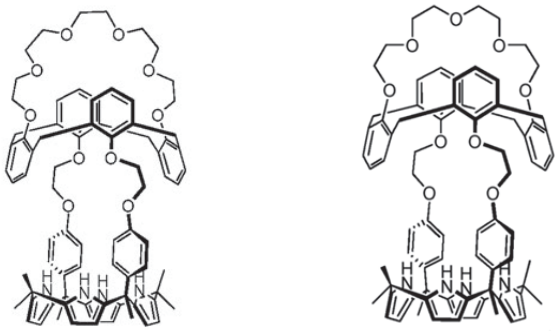
Figure 41 - *Fluoroionophore spécifique du césium*

3) Complexants de paires d'ions du césium

Le césium peut aussi être complexé avec un contre-ion sous forme de paires d'ions. Sessler et al.[102,103,104] ont ainsi développé des molécules permettant la complexation sélective de paires d'ions de césium. Ces molécules se composent d'un récepteur de cation attaché de manière covalente via deux ponts éthylène glycol à un récepteur d'anion. Le récepteur de cations est un

calix[4]arène couronne-6 ou 5 permettant la complexation sélective de césium ou de potassium. Le récepteur d'anions est un calix[4]pyrole permettant la complexation de fluorure ou de nitrate.

La molécule **37** (Figure 42) comportant un Calix[4]arène-couronne-6 dispose d'une bonne sélectivité pour le césium en milieu organique. Elle est ainsi capable de complexer sélectivement en milieu organique le fluorure de césium CsF en présence d'autres ions[105]. La constante d'association de la paire CsF K_a, est de $3{,}8.10^5$ M^{-1} dans un mélange méthanol/chloroforme (1/9).



37 **38**

Figure 42 - *Récepteur de paires d'ions du césium*

La molécule **38** contient elle un calix[4]arène-couronne-5 (Figure 42). L'affinité de cette molécule en milieu organique est ainsi meilleure pour le potassium que pour le césium, mais en l'absence de potassium, la complexation d'une paire d'ions du césium est possible. Ainsi la constante d'association de la paire CsF K_a pour cette molécule est de $4{,}1.10^4$ M^{-1} soit un ordre de grandeur de moins que la molécule **37**. La bonne affinité de cette molécule pour le potassium permet l'extraction sélective de fluorure de potassium KF de phases aqueuses[106]. De plus, la meilleure affinité pour le potassium de cette molécule permet aussi de remplacer le césium. Le césium peut ainsi dans un premier temps être complexé, puis relargué par addition de potassium (Figure 43). Ceci pourrait permettre une extraction et une isolation sélective du césium.

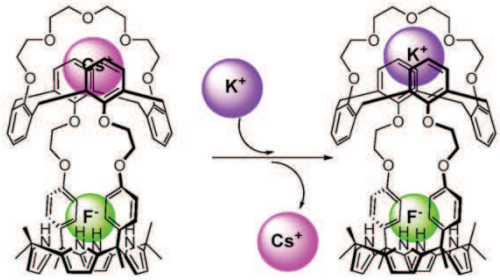


Figure 43 - *Remplacement du césium par le potassium*

4) Les Cryptophanes

En plus des calixarènes, un autre type de structures macrocycliques rigides permet la complexation sélective du césium, les cryptophanes (Figure 44). Les cryptophanes sont des cages moléculaires de forme sphérique, composé de deux unités cyclotrivératrylène (CTV) attachées de manière covalente. Le cavité centrale des cryptophanes est lipophile et permet

l'encapsulation de molécules neutres ou chargées avec la formation de complexes hôte/molécule[107].

Certains cryptophanes portant des fonctions hydroxyles sont solubles en milieu aqueux comme la molécule **MM-1**, mais uniquement sous formes déprotonnées à pH basique (pH >12). Ces cryptophanes ont montré une bonne affinité pour certains cations dont le césium[108,109]. Contrairement aux molécules neutres, la complexation de cations par les cryptophanes ne dépend pas uniquement de la taille de la cage. La présence des groupements hydroxyles et l'établissement d'interactions π entre le cation et les cycles aromatiques du cryptophane jouent aussi un rôle important. Pour ces molécules chirales, la complexation de cations comme le césium modifie leur conformation. Ces modifications sont visibles par dichroïsme circulaire (CD) et peuvent être étudiées (Figure 44). La complexation du césium est aussi visible par RMN du césium (^{133}Cs). Des études de titration calorimétrique isotherme ont montré d'importantes constantes d'association pouvant aller jusqu'à 6.10^9 M^{-1}, permettant la détection par dichroïsme circulaire de concentrations micromolaire de césium.

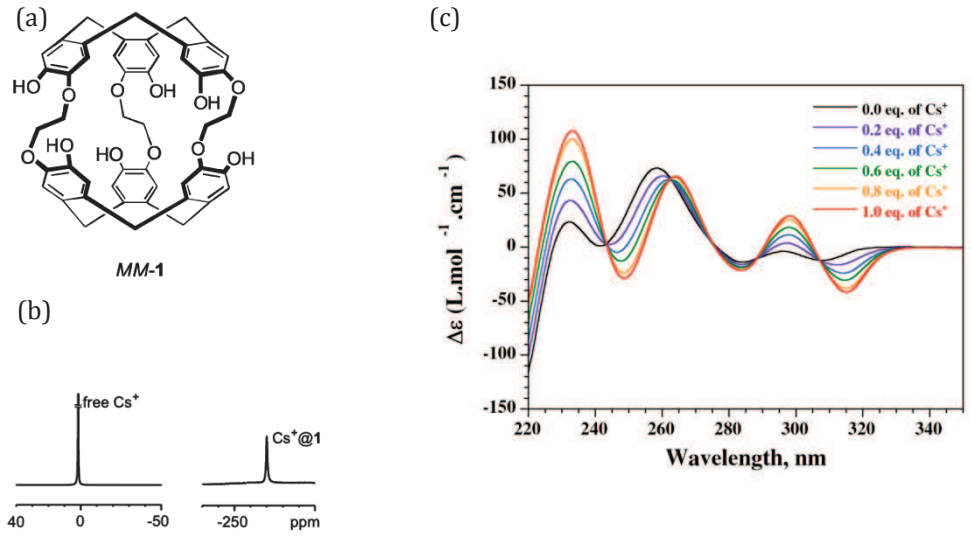


Figure 44 - *(a) cryptophane MM-1 sélectif du césium, (b) déplacement RMN du césium libre et complexé par MM-1, (c) spectres de dichroïsme circulaire de MM-1 (Solvent : $CHCl_3$/LiOH,H_2O 0,1M) ; [Cs+] : 7,4.10^{-5} - 8,4.10^{-5} M)* [110]

5) Conclusions sur les sondes moléculaires existantes du césium

Parmi les différentes sondes moléculaires présentées, les calixarènes couronnes et le Calix-COU-Sulf en particulier semblent les plus intéressants. Le Calix-COU-Sulf a l'avantage d'être soluble dans l'eau à pH neutre et de disposer d'une bonne sensibilité et d'une bonne sélectivité pour le césium. Au contraire, les sondes moléculaires basées uniquement sur des éthers couronnes sont quant à-elles trop peu sélectives pour être utilisées telles quelles. De même, les récepteurs de paires d'ions et les cryptophanes bien qu'ayant de bonnes affinités pour le césium ne sont pas adaptés à la problématique qui est la détection de traces de césium en milieu aqueux.

En effet, les récepteurs de paires d'ions présentés ont plusieurs inconvénients. Tout d'abord, ils ne sont pas solubles en milieu aqueux. Ensuite, ils ne disposent pas de fluorophores pour signaler la complexation du césium, bien que ceci soit facilement envisageable. Leur plus gros

inconvénient est qu'ils soient faits pour la complexation sélective de paires d'ions. En absence du contre-ion adéquat la complexation du césium n'est pas aussi efficace. Notre but étant la détection de traces de césium en milieu aqueux, l'absence du contre-ion nécessaire peut être préjudiciable aux mesures. Ces molécules sont donc plus adaptées à l'extraction sélective de césium.

De même, les cryptophanes ont deux inconvénients majeurs. Ils sont solubles en milieu aqueux mais uniquement pour des pH élevés (pH 12). Comme les récepteurs de paires d'ions, ils ne disposent pas de fluorophores pour signaler la complexation. Mais contrairement à eux, aucun fluoroionophore incorporant ce type de structure n'a à notre connaissance été rapporté, et leur fonctionnalisation par un fluorophore ne semble pas aisée. Ces molécules sont donc aussi plus adaptées à l'extraction sélective de césium. Leur greffage sur des particules magnétiques pourrait permettre l'extraction sélective, puis l'isolement de césium radioactif.

II. Synthèse et étude des propriétés photophysiques du Calix-Cou-Sulf

Le Calix-COU-Sulf est la molécule à partir de laquelle ce projet a débuté. Le rappel de sa synthèse et l'étude des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-2 son précurseur, vont dans un premier temps être rappelées, avant de présenter les travaux effectués.

A. Rappel de la synthèse du Calix-COU-2 et Calix-COU-Sulf

Le Calix-COU-Sulf et le Calix-COU-2 sont deux molécules précédemment synthétisées au laboratoire. Le Calix-COU-Sulf est ainsi obtenu par sulfonation du Calix-COU-2 en deux étapes et avec de bons rendements[111] (Figure 47). Le calix-COU-2 est quant à lui obtenu en trois étapes à partir de la 4-méthyl-6,7-dihydroxycoumarine[112] (Figure 46).

La synthèse du Calix-COU-2 débute par la O-alkylation des oxygènes 6 et 7 de la coumarine **42**. Celle-ci est effectuée par substitution nucléophile sur le diéthylène glycol monotosylé **40**, au reflux de l'acétonitrile en présence de K_2CO_3 avec un rendement de 55%. Pour cette substitution nucléophile, le diéthylène glycol monotosylé **40** a été préféré au 2-(1-chloro)éthoxyéthanol avec lequel le rendement n'est que de 37%

Le diéthylène glycol monotosylé **40** est obtenu par tosylation du diéthylène glycol **30** (Figure 45). La réaction est effectuée avec un excès de diéthylène glycol (4 éq) pour favoriser le produit monosubstitué. Néanmoins, le produit ditosylé **41** est aussi formé. Les produits mono et ditosylés sont séparés par précipitation du diéthylène glycol ditosylé **41** dans l'isopropanol. Cette purification ne nécessitant pas de colonne, nous permet d'obtenir facilement de grandes quantités de diéthylène glycol monotosylé **40**.

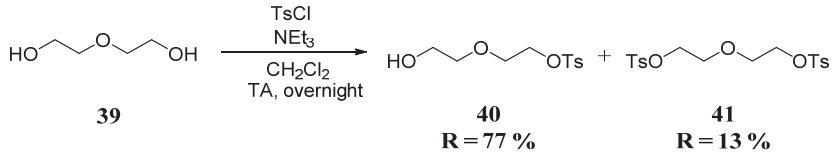


Figure 45 - *Synthèse du diéthylène glycol monotosylé 40*

Les fonctions hydroxyles de la coumarine diglycolées **43** sont ensuite transformées en bons groupements partants en vue du greffage de la coumarine sur le Calix[4]arène. Cette fois encore, le chlorure de tosyle est utilisé en tant que bon groupement partant. En présence de chlorure de tosyle et de triéthylamine dans le dichlorométhane, la molécule ditosylée **44** est obtenue après purification avec 74% de rendement. La molécule ditosylée **44** est ensuite greffée sur le Calix[4]arène en présence de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile. La réaction de greffage est facilitée par effet 'template' du potassium. Après purification par chromatographie, le Calix-COU-2 est obtenu avec 43% de rendement (Figure 46).

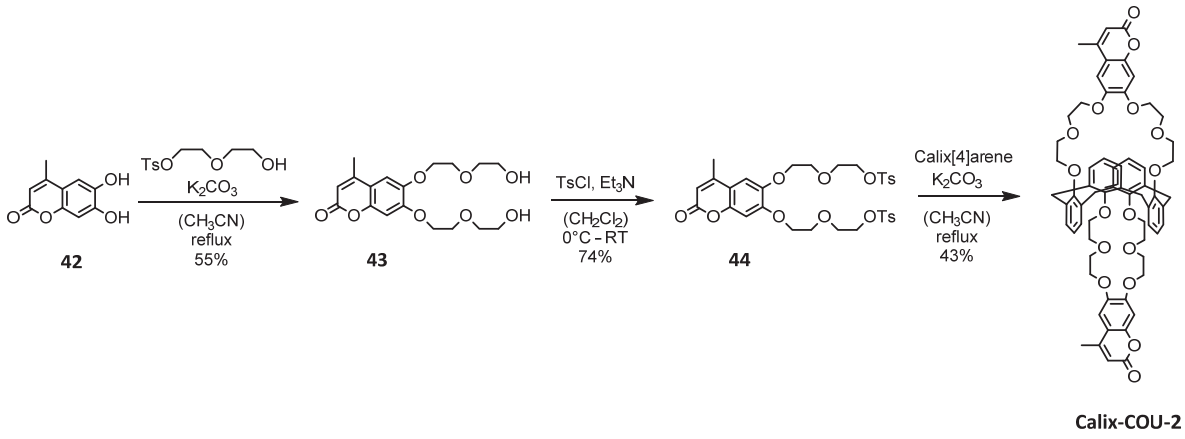


Figure 46 - *Synthèse du Calix-COU-2*

L'insertion des groupements sulfonates à l'aide d'acide chlorosulfonique s'effectue en deux étapes (Figure 47). L'ajout d'acide chlorosulfonique à une solution de Calix-COU-2 dans le dichlorométhane permet d'obtenir le calixarène chlorosulfoné Calix-COU-SO_2Cl avec 87% de rendement. Les fonctions chlorosulfonates sont ensuite hydrolysées en sulfonates en milieu aqueux en présence de pyridine. Après neutralisation à l'aide de $NaHCO_3$, le calix-COU-Sulf est récupéré par précipitation dans l'acétone avec 92% de rendement.

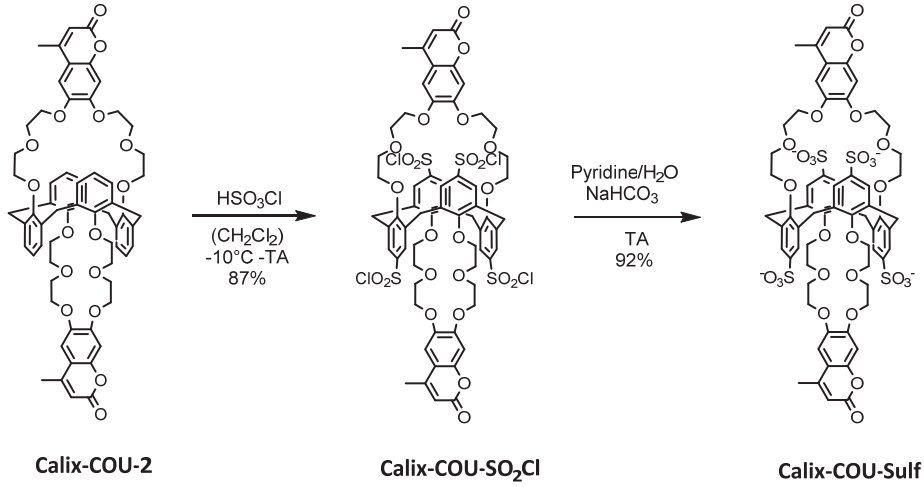


Figure 47 - *Synthèse du Calix-COU-Sulf*

B. Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-2

Ces résultats se rapportent à des travaux réalisés antérieurement au laboratoire[113,114].

Propriétés spectroscopique dans l'éthanol

Le coefficient d'absorption molaire du Calix-COU-2 dans l'éthanol est de 22200 $M^{-1}.cm^{-1}$ au maximum de l'absorption qui se situe à 335 nm. Le spectre d'émission de la molécule est une large bande à transfert de charge dont le maximum se situe à 408 nm. Le rendement quantique φ de la molécule dans l'éthanol est de 0,29. Les propriétés de complexation du césium et du potassium dans l'éthanol ont ensuite été étudiées par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire.

Etudes de complexations par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

La complexation du césium ou du potassium par le Calix-COU-2 n'entraîne qu'une légère augmentation des spectres d'absorbance du Calix-COU-2, dont le maximum dans l'éthanol se situe à 339 nm (Figure 48).

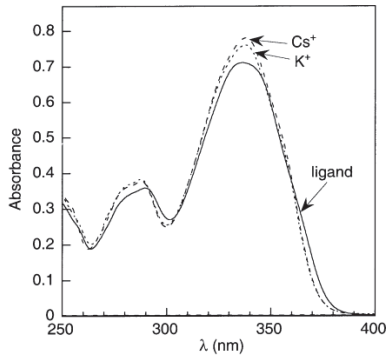


Figure 48 - *Influence de la complexation du césium et du potassium sur le spectre d'absorption du Calix-COU-2. Solvant = EtOH, [Calix-COU-2] = 3,24.10^{-5} M ; [Cs$^+$] = [K$^+$] = 1mM*

En revanche, l'ajout de césium (Figure 49) ou de potassium (Figure 50) entraîne une forte diminution de la fluorescence du Calix-COU-2 ainsi que des déplacements hypsochromes de quelques nanomètres des spectres d'émissions. La diminution de la fluorescence peut être décomposée en deux régimes correspondant à la complexation d'un premier puis d'un second cation. La complexation du premier cation entraîne une forte diminution de la fluorescence pour un faible ajout de cation. La complexation du second cation entraîne une diminution moins brutale de la fluorescence, mais plus importante au final.

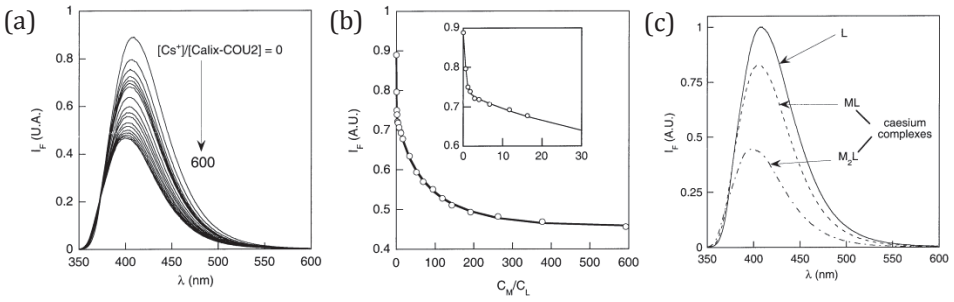


Figure 49 - *Evolution des spectres d'émission (a) et de l'intensité de fluorescence à 410 nm (b) du Calix-COU-2 avec l'ajout d'acétate de césium. (c) Spectres du ligand seul L et des complexe ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit. ([L] =19 µM) Solvent = EtOH; λ_{exc} = 310 nm*

Pour le césium, la complexation d'un premier cation entraîne un déplacement hypsochrome de 2 nm des spectres d'émission. Le rendement quantique passe de 0,29 à 0,24 (Tableau 4). La complexation d'un second cation entraîne un déplacement supplémentaire de 7 nm, le rendement quantique passant de 0,24 à 0,12.

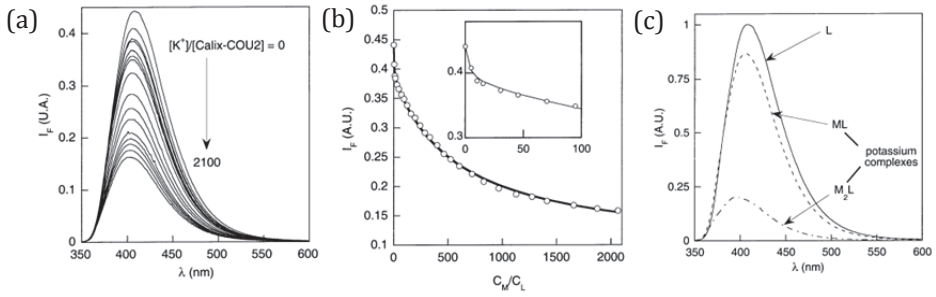


Figure 50 - *Evolution des spectres d'émission (a) et de l'intensité de fluorescence à 410 nm (b) du Calix-COU-2 avec l'ajout de thiocyanante de potassium. (c) Spectres du ligand seul L et des complexe ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit. ([L] =19 μM) Solvent = EtOH; λ_{exc} = 310 nm*

Pour le potassium, la complexation d'un premier cation entraîne un déplacement hypsochrome de 3 nm des spectres d'émission. Le rendement quantique passe de 0,29 à 0,26 (Tableau 4). La complexation d'un second cation entraîne un déplacement supplémentaire de 8 nm, le rendement quantique passant de 0,26 à 0,05.

	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ϕ
Calix-COU-2	408	0,29
Calix-COU-2 + K^+	405	0,26
Calix-COU-2 + $2K^+$	397	0,05
Calix-COU-2 + Cs^+	406	0,24
Calix-COU-2 + $2Cs^+$	399	0,12

Tableau 4 - *Variation des caractéristiques photophysiques du Calix-COU-2 en fonction du complexe formé*[115]

Les effets du césium et du potassium sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-2 ne sont pas équivalents. Pour un complexe de stochiométrie 1 :1, le césium induit une modification plus importante des propriétés photophysiques que le potassium, alors que pour un complexe de stochiométrie 2 :1, le potassium induit plus d'effets que le césium.

Effets photo-induits

Pour comprendre les effets photophysiques observés et leur importance, il faut s'intéresser à la structure de la coumarine. Celle-ci se compose d'une partie donneuse, les oxygènes en position 6 et 7 conjuguée à une partie acceptrice, la lactone. C'est un fluorophore à transfert de charge photo-induit. L'absorption d'un photon entraîne un transfert de charge intramoléculaire entre la partie donneuse et acceptrice de la coumarine. Dès lors, l'interaction d'un cation avec la partie donneuse ou acceptrice de la coumarine modifie le transfert de charge intramoléculaire et donc les propriétés photophysiques de celle-ci. Dans notre cas, la complexation d'un cation au niveau des oxygènes entraîne une diminution de leur caractère donneur. Le transfert de charge intramoléculaire est donc aussi diminué. Cela se traduit par un déplacement hypsochrome des spectres d'émission et une diminution de l'intensité de la fluorescence (Figure 51).

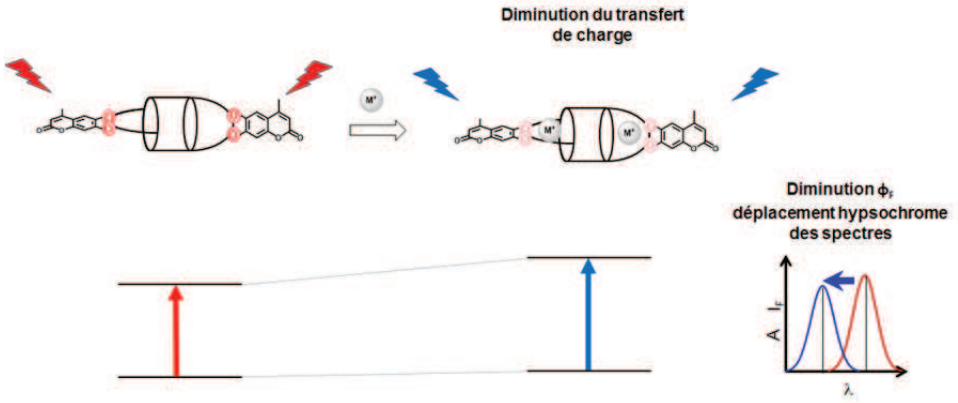


Figure 51 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire lors de la complexation de cations*

Les effets induits sont aussi plus importants, plus la distance séparant le cation et les oxygènes est faible, et ou plus la densité de charge du cation est grande. Ainsi, pour un complexe 1 :1 le césium induit plus d'effet, car sa taille correspond plus à la taille de la cage. Celui-ci est donc mieux coordinné que le potassium induisant plus d'effet. Pour un complexe 2 :1, un deuxième élément est à prendre en compte : la répulsion électrostatique entre deux cations complexés. Cette répulsion diminue la distance séparant les cations des oxygènes. Pour une distance entre le cation et les oxygènes équivalente, le potassium dont la densité électronique est plus importante que le césium induit dans ce cas plus d'effet.

Sélectivité de la complexation

Les constantes de complexation obtenues en effectuant l'ajustement numérique des dosages fluorimétriques nous montrent aussi que même si les effets photophysiques observés sont plus importants pour le potassium, les constantes de complexation du césium sont cependant plus grandes. En effet, la quantité de potassium à ajouter pour former le complexe 2 :1 est plus importante que celle du césium. La complexation du second cation n'est d'ailleurs pas facilitée par la présence du premier, la constante de complexation du premier cation étant bien supérieure à celle du second $K_{11} >> K_{21}$. Ce comportement anticoopératif est dû à la répulsion électrostatique existant entre les deux cations. Les constantes de complexation des différents cations montrent aussi une très bonne sélectivité Cs^+/Na^+ avec un rapport des constantes de formation du complexe 1 :1 de 16000. La sélectivité K^+/Na^+ est plus faible, le rapport des constantes n'étant que de 220.

	Calix-COU-2 (ϕ = 0,29)			
	log K_{11}	log K_{21}	ϕ_{ML}	ϕ_{M2L}
Na^+	2,48 ± 0,06	-	0,26	-
K^+	4,81 ± 0,07	2,46 ± 0,06	0,26	0,05
Cs^+	6,68 ± 0,09	3,81 ± 0,1	0,24	0,12

Tableau 5 - *Comparaison des constantes de complexation et des rendements quantiques des différents complexes formés*[116]

Les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf, l'analogue hydrosoluble du Calix-COU-2, vont maintenant être rappelées.

C. Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf et études dans le cadre du projet EDF

Les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf vont dans un premier temps être rappelées[117], avant de présenter les études en cuve effectuées sur le Calix-COU-Sulf dans le cadre du projet EDF.

1) Rappel des propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf

Les propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Sulf ont été étudiées dans un milieu aqueux tamponné à pH = 7 par la présence de 50 mM de tampon MES.

Propriétés photophysiques dans le tampon MES

Le Calix-COU-Sulf est parfaitement soluble en milieu aqueux pour des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-5} mol/L, gamme utilisée de concentrations en spectroscopie de fluorescence. Son coefficient d'absorption molaire dans le tampon MES est de 20200 $M^{-1}.cm^{-1}$ au maximum d'absorption du spectre qui se situe à 334 nm. Le spectre d'émission est une large bande à transfert de charge dont le maximum se situe à 423 nm (Figure 52). La molécule est aussi fortement fluorescente en milieu aqueux avec un rendement quantique de 0,40. Le déclin de fluorescence enregistré au maximum de l'émission est monoexponentiel avec une durée de vie mesurée de 3,51 ± 0,04 ns. Les propriétés de complexation du césium par le Calix-COU-Sulf ont ensuite été étudiées dans le même milieu d'étude.

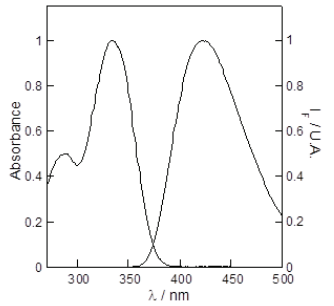


Figure 52 - *Spectre d'absorption et d'émission normés du Calix-COU-Sulf. Solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 5,2 µM ; λ_{exc} = 330 nm*

Etudes de complexations par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

L'ajout de césium entraîne un déplacement bathochrome de 10 nm des spectres et une légère augmentation du coefficient d'absorption molaire, ceci entraînant l'apparition d'un point isobestique à 337 nm (Figure 53 (a)).

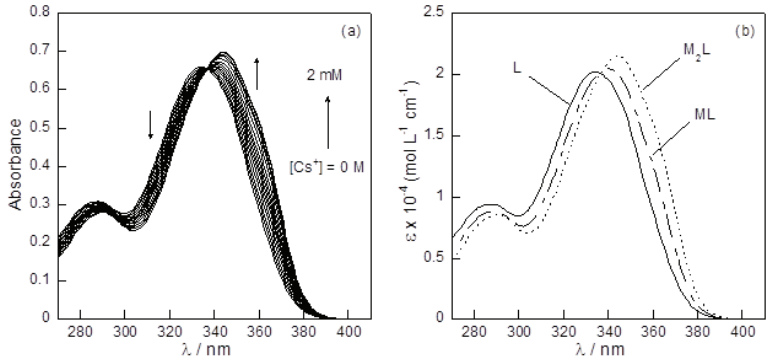


Figure 53 - *(a) Evolution des spectres d'absorptions du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium Solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 33 µM ; λ_{exc} = 330 nm. (b) spectres d'absorption du ligand L et des complexes ML et M_2L reconstruits avec le logiciel specfit.*

Comme pour le Calix-COU-2, la complexation de deux cations est possible. Les valeurs des constantes de complexation déterminées à l'aide du logiciel specfit sont: log K_{11} = 4,10 ± 0,04 pour le premier cation, et log K_{21} = 3,82 ± 0,05 pour le second. Ces valeurs obtenues dans l'eau sont inférieures aux valeurs obtenues pour le Calix-COU-2 dans l'éthanol dû à l'effet fortement dissociant de l'eau. Nous pouvons néanmoins voir que contrairement au Calix-COU-2 ces valeurs sont très proches, le rapport K_{21} sur K_{11} vaut ainsi 0,5. Dans le cas d'un ligand possédant deux sites de complexation identiques, ce rapport vaut théoriquement 0,25[118]. En tenant compte des erreurs expérimentales, nous pouvons donc considérer que la complexation du second cation n'est pas influencée par la présence du premier contrairement au Calix-COU-2. Il n'y a donc pas d'effet anticoopératif dans ce cas. Ceci peut être expliqué par la présence des quatre groupements sulfonates chargés négativement qui masquent la charge positive de chaque cation. De plus, nous pouvons constater que le spectre du complexe ML est quasiment la demi-somme des spectres du ligand seul et du complexe M_2L (Figure 53 (b)), ce qui montre que les effets photophysiques en absorption sont identiques pour la complexation du premier et du second cation.

La complexation de césium par le Calix-COU-Sulf entraîne une exaltation de la fluorescence de 24% et un déplacement hypsochrome de 4 nm des spectres d'émission (Figure 54 (a)).

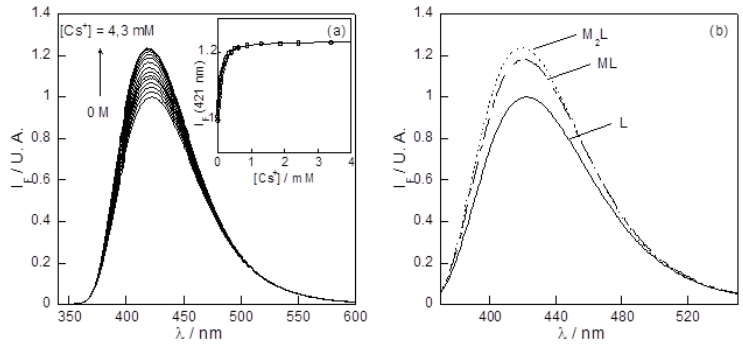


Figure 54 - *(a) Evolution des spectres d'émissions corrigés du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium, solvant = tampon MES 50mM ; [L] = 5,2 µM ; λ_{exc} = 330 nm. (b) spectres d'émission du ligand L et des complexes ML et M_2L reconstruits par le logiciel specfit.*

Les valeurs des constantes de complexations déterminées à partir des spectres d'émission sont identiques. Avec log K_{11} = 4,03 ± 0,02 pour le premier cation et log K_{21} = 3,79 ± 0,05 pour le

second. De même, le rapport K_{21} sur K_{11} vaut 0,57. Par contre, les effets photophysiques associés à la complexation du second cation sont moins importants que ceux associés à la complexation du premier cation (Figure 54 (b)).

Effets photo-induits

Les spectres d'absorption sont déplacés vers les plus hautes longueurs d'ondes, signe d'un plus grand transfert de charge intramoléculaire. Alors que l'interaction du césium avec les oxygènes donneurs de la coumarine devrait entraîner un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption comme pour le Calix-COU-2. De même, une exaltation de la fluorescence est observée avec l'ajout de césium, alors que celle-ci était presque totalement inhibée dans le cas du Calix-COU-2.

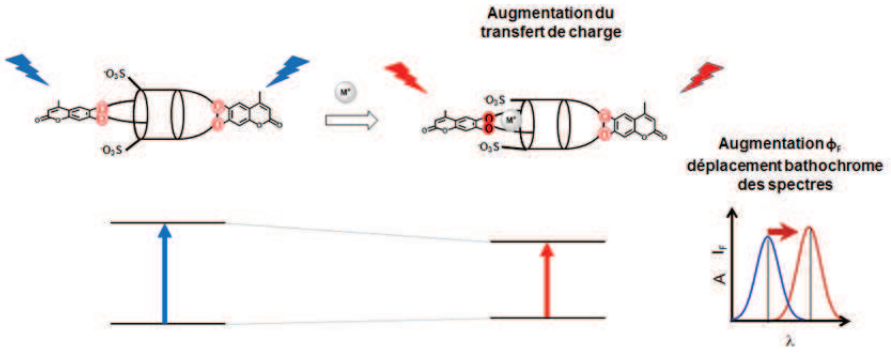


Figure 55 - *Effet de la complexation du césium sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf*

L'unique différence entre les deux molécules est la présence des groupements sulfonates. La différence de comportement observée entre les deux molécules est due à la participation des groupements sulfonates à la complexation du césium. Lors de la complexation, ceux-ci se rapprochent des oxygènes 6 et 7 de la coumarine, augmentant leur caractère donneur. Le transfert de charge intramoléculaire au sein de la coumarine est donc augmenté, ce qui explique le déplacement bathochrome des spectres d'absorption et l'exaltation de la fluorescence observée. Ceci a été conforté par une étude RMN ^1H et une étude de modélisation moléculaire. Par contre, le déplacement hypsochrome observé des spectres d'émission est plus complexe et doit être lié à l'existence d'interactions différentes à l'état excité entre le césium et le Calix-COU-Sulf.

Sélectivité de la complexation

Des études de compétitivité ont été réalisées pour déterminer la sélectivité de la sonde pour le césium (Figure 56). La présence de Li^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} et Sr^{2+} n'a entrainé aucune interférence pour une concentration de 2mM. De même, aucun effet photophysique significatif n'a été observé pour une concentration en sodium inférieur à 25 mM.

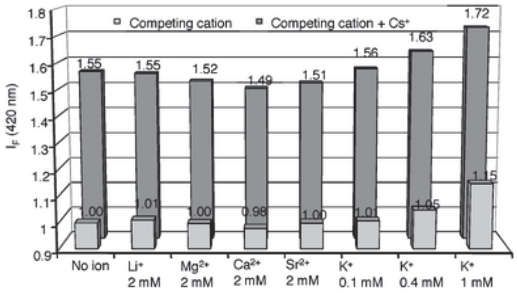


Figure 56 - *Intensité de fluorescence à 420 nm du Calix-COU-Sulf dans un tampon MES 50mM en présence de césium (55 µM) et de différents cations interférents.*

Comme pour le Calix-COU-2 le potassium est le principal ion interférent. Les effets photophysiques qu'il induit sont similaires à ceux du césium : déplacement bathochrome des spectres d'absorption et exaltation de la fluorescence (Figure 57). Seule la formation d'un complexe 1 :1 a été observée, avec une constante de complexation log K_{11} = 1,7 ± 0,05.

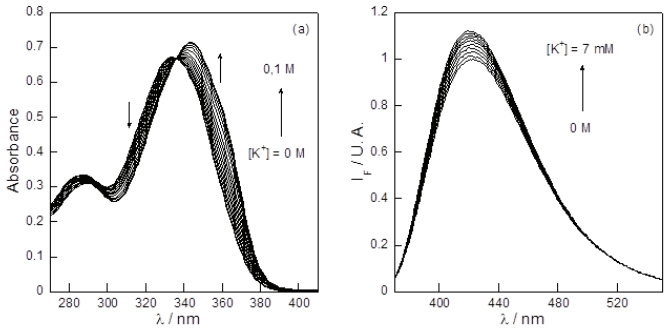


Figure 57 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission corrigé (b) du Calix-COU-Sulf dans un tampon MES 50 mM λ_{exc} = 337 nm.*

2) Etudes en cuve du Calix-COU-Sulf dans le milieu d'étude EDF

Les propriétés photophysiques du Calix-COU-Sulf avaient été étudiées dans un milieu tamponné dans le but d'utiliser cette sonde en milieu biologique. Dans le cadre du projet EDF, l'eau qui circule dans les canalisations du circuit de vapeur est maintenue légèrement basique par la présence de différentes bases (triéthylamine, morpholine…) pour éviter la corrosion des canalisations. Des études ont été effectuées dans des conditions proches de ces conditions de travail. Elles ont montré que les solutions utilisées dans le circuit de vapeur secondaire n'avaient pas d'influence sur les propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Sulf. Pour plus de simplicité, la suite des études en cuves et en microfluidiques a été effectuée dans de l'eau à pH neutre.

Après avoir étudié l'influence du milieu de travail, nous nous sommes intéressés à la gamme imposée de concentrations en césium. Pour ce projet, la détection de concentrations de césium comprises entre 5 et 10^{-3} ppm est exigée, soit des concentrations comprises entre 1.10^{-8} et 4.10^{-5} mol/L. Des études de complexation ont donc été effectuées avec le Calix-COU-Sulf pour déterminer la gamme de concentrations que celui-ci pouvait balayer.

La limite haute de la sonde a dans un premier temps été étudiée. Un dosage effectué entre 0 et 50 mM de césium a montré que l'intensité de fluorescence augmentait de façon linéaire sur l'ensemble de la gamme (Figure 58)

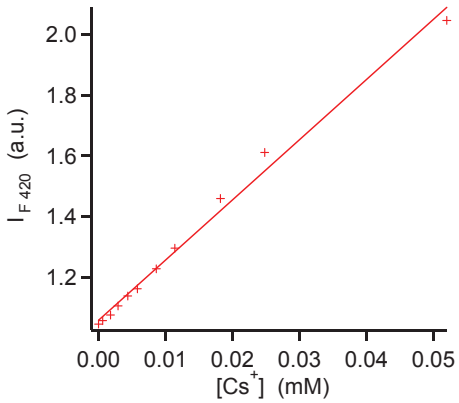


Figure 58 - *Augmentation linéaire de la fluorescence à 420 nm entre 0 et 50 mM de césium. [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm.*

La limite basse de détection en cuve de la sonde a ensuite été déterminée (Figure 59). En excitant à 365 nm, une limite de 0,6 µM de césium a été déterminée.

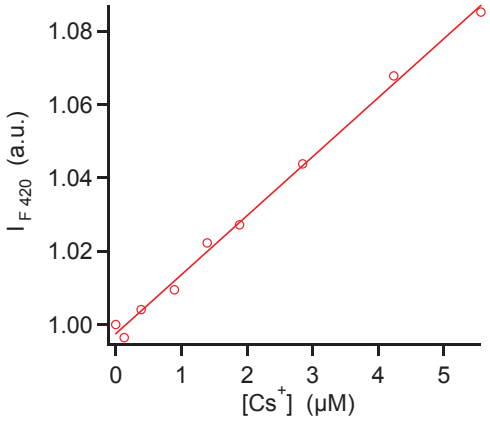


Figure 59 - *Détermination de la limite de détection en cuve du Calix-COU-Sulf. [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm.*

Comme nous nous y attendions le Calix-COU-Sulf ne permet pas de balayer l'ensemble de la gamme imposée de concentrations (Figure 60). De nouvelles molécules avec une meilleure affinité pour le césium sont donc nécessaires pour pouvoir balayer l'ensemble de la gamme de concentrations.

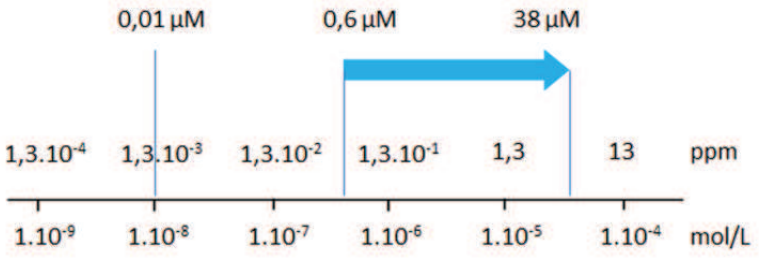


Figure 60 - *Gamme de concentrations mesurables par le Calix-COU-Sulf*

D. Conclusions sur l'utilisation du Calix-COU-Sulf

Le Calix-COU-Sulf est une molécule intéressante pour plusieurs raisons. Sa synthèse en 5 étapes est simple et permet d'obtenir le produit avec de bons rendements. La molécule est aussi fortement fluorescente et permet la détection de traces de césium. De plus, ses propriétés photophysiques et complexantes sont compatibles avec les conditions de travail utilisées dans les canalisations de vapeur d'EDF.

Malheureusement, cette molécule ne permet pas de balayer l'ensemble de la gamme imposée de concentrations. De nouvelles sondes avec une meilleure affinité pour le césium sont donc nécessaires pour compléter la gamme de concentrations que le Calix-COU-Sulf balaye et ainsi répondre à la problématique. Pour cela, nous avons cherché à remplacer les groupements sulfonates par d'autres groupements ayant une meilleure affinité pour le césium. Outre abaisser la limite de détection, ces groupements doivent aussi permettre d'assurer la solubilisation de la molécule en milieu aqueux.

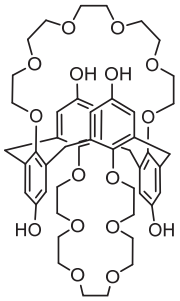
III. Synthèse et études photophysiques de nouvelles sondes

Cette partie présente les nouvelles sondes envisagées et synthétisées, ainsi que l'étude de leurs propriétés photophysiques et complexantes.

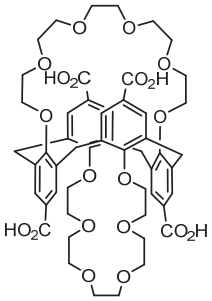
A. Nouvelles sondes envisagées

1) Etat de l'art sur les entités complexantes à base de calix[4]arène couronne hydrosoluble sélectif du césium

Lemaire et al.[119], ont travaillé sur la solubilisation des calixarènes en milieu aqueux, et ils ont effectué la synthèse de calix[4]arène-bis-couronnes-6 portant des fonctions alcools et acides carboxyliques (Figure 61). Des études de complexation du césium effectuées à partir de ces molécules en milieu basique, ont montré une bonne sélectivité pour le césium. La constante de complexation du premier cation log K_{11} est de 5,63 pour le Calix-Alcool et de 4,78 pour le Calix-Acide. Par comparaison, la constante de complexation du premier cation log K_{11} du Calix-COU-Sulf n'est que de 4,05.



Calix-Alcool: log K = 5,63



Calix-Acide: log K = 4,78

Figure 61 - *Calix[4]arène-bis-couronne-6 portant des fonctions alcool et acide carboxylique*

Les fonctions alcools et acides peuvent être introduites soit à partir de calixarènes bromés[120] (Figure 62) ou formylés[121] (Figure 63).

La bromation de calixarènes est effectuée en présence de Br_2 dans le dichlorométhane, elle permet d'obtenir des calixarènes tétrabromés avec de bons rendements. Les bromes peuvent ensuite être remplacés par des fonctions alcools, aldéhydes ou acides via des substitutions brome-lithium, suivi par l'addition d'électrophiles. Le calixarène tétrahydroxylé **47** est ainsi obtenu par ajout de triméthylborate $B(OMe)_3$ à un intermédiaire lithié, entraînant la formation d'un dérivé boré. Celui-ci est ensuite hydrolysé en alcool par un mélange $NaOH\text{-}H_2O_2$. Le calixarène **49** portant quatre fonctions acides peut lui être obtenu de deux façons. L'ajout de carboglace à un intermédiaire lithié permet, après neutralisation d'obtenir le composé **49** en une étape. L'ajout de DMF à un intermédiaire lithié entraîne la formation du calixarène tétraformylé **48**. Les fonctions aldéhydes peuvent ensuite être oxydées en acide, le composé **49** est alors obtenu en deux étapes.

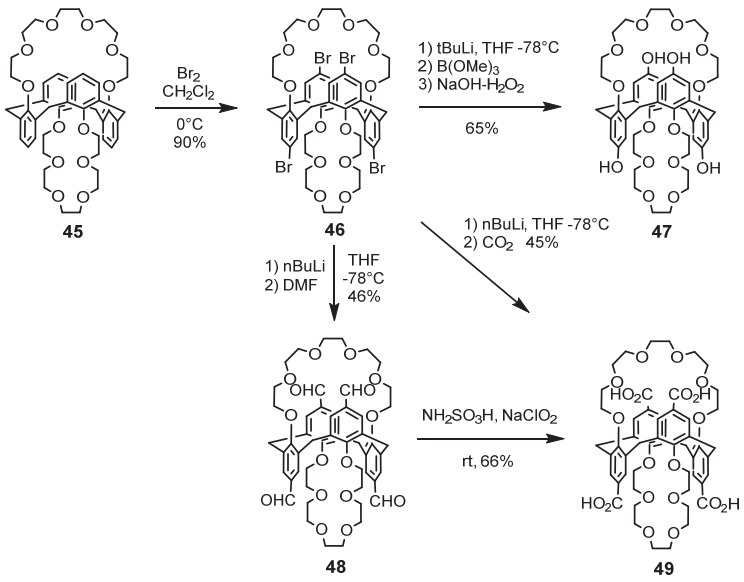


Figure 62 - *Insertion de groupements alcools, aldéhydes et acides à partir de calix[4]arène-bis-couronnes-6 bromé*

Les calixarènes peuvent aussi être directement formylés en présence de dichloro(méthoxy)méthane et de $TiCl_4$. Le calix[4]arène-bis-couronne-6 **45** a ainsi pu être diformylé. Celui-ci peut par la suite être oxydé en acide pour obtenir le composé **52** ou transformé en alcool par une oxydation de Bayer-Williger suivi de l'hydrolyse du formate formé.

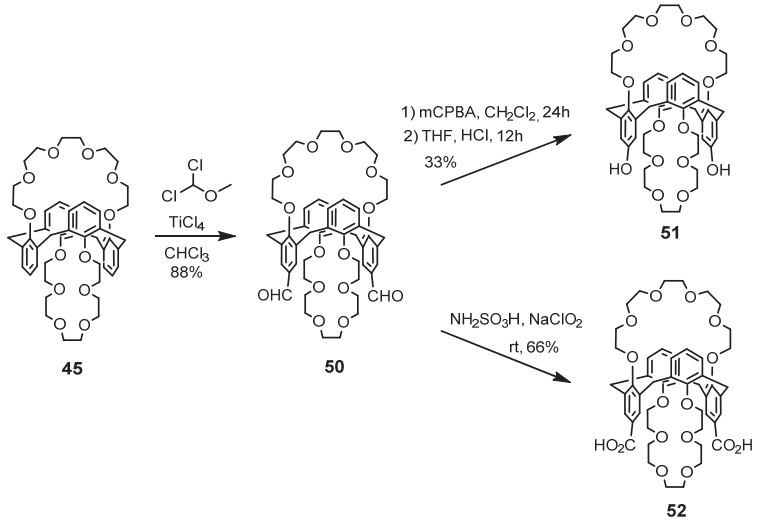


Figure 63 - *Insertion de groupements alcools et acides à partir de calix[4]arène-bis-couronnes-6 formylé*

Lemaire et al. n'ont pu obtenir que le calixarène diformylé, mais par la suite Regen et al.[122] ont montré que l'utilisation d'un large excès de $TiCl_4$ (100 éq) et de dichloro(méthoxy)méthane (200 éq) permettait d'obtenir un calix[4]arène tétraformylé (Figure 64).

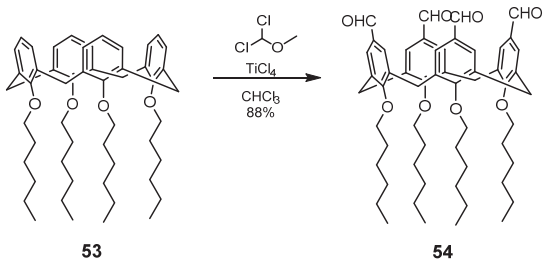


Figure 64 *Tétraformylation d'un calix[4]arène*

2) Cibles envisagées

A partir de ces résultats, nous avons décidé de remplacer les groupements sulfonates par des groupements phénolates et carboxylates pour obtenir deux nouveaux analogues, Calix-COU-Alcool et Calix-COU-Acide (Figure 65).

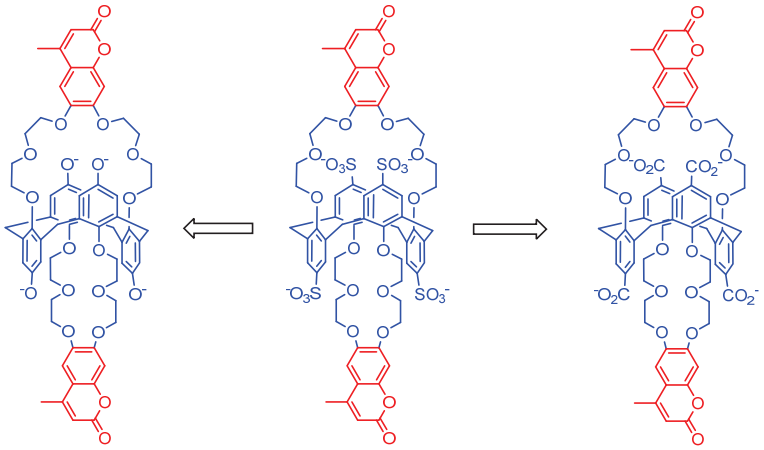


Figure 65 - *Analogues de Calix-COU-Sulf envisagé : Calix-COU-Alcool et Calix-COU-Acide*

B. Synthèses effectuées

L'introduction des fonctions alcools qui est notre objectif principal semble être plus aisée à partir de calixarènes bromés que formylés. Nous avons donc dans un premier temps tenté l'insertion des fonctions alcools et acides à partir de calixarènes bromés puis formylés.

1) Voie 1 : Bromation

a) Bromation de Calix-COU-2

Dans une première approche, nous avons envisagé d'introduire les groupements phénols en fin de synthèse à partir du Calix-COU-2 (Figure 66). Celui-ci serait tétrabromé pour obtenir le composé **55** avant d'être transformé en Calix-COU-Alcool suivant les conditions décrites ci-dessus.

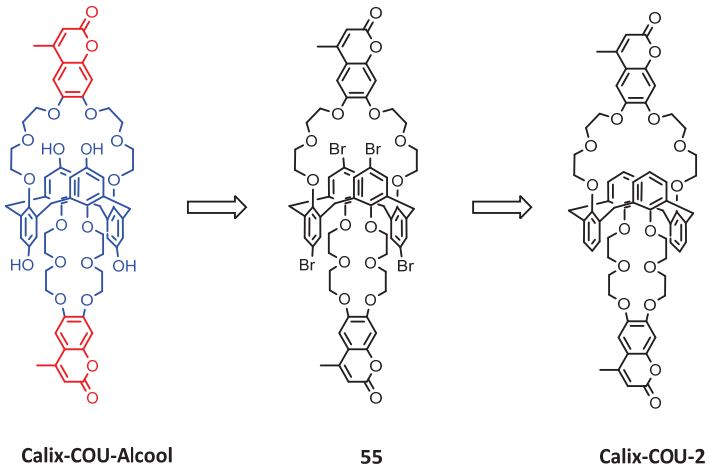


Figure 66 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix-COU-2*

Des essais de bromation du Calix-COU-2 en présence de Br_2 dans le dichlorométhane n'ont pas permis d'obtenir le produit tétrabromé **55** attendu (Figure 67). Le produit hexabromés **56** où les coumarines sont bromées en position 3, est obtenu dans le meilleur des cas. Un mélange de produits bromés non séparable a été observé pour d'autres essais. Nous avons également tenté de transformer le composé hexabromé **56** en composé hexahydroxylé **57** sans succès.

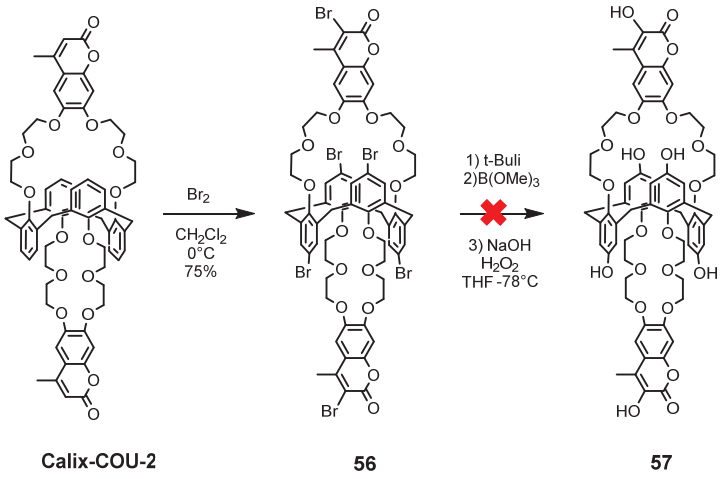


Figure 67 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix-COU-2*

b) Bromation du Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6

Pour éviter la bromation de la coumarine, nous avons envisagé de construire celle-ci en fin de synthèse à partir de la molécule hexahydroxylée **58** via une synthèse de Pechman (Figure 68). Le composé hexahydroxylé serait issu du remplacement brome alcools à partir de la molécule hexabromée **59**. La molécule hexabromée **59** serait obtenue par bromation du calix[4]arène-bis-benzocourone-6 **60**, issu du greffage de la molécule **61** sur un calix[4]arène.

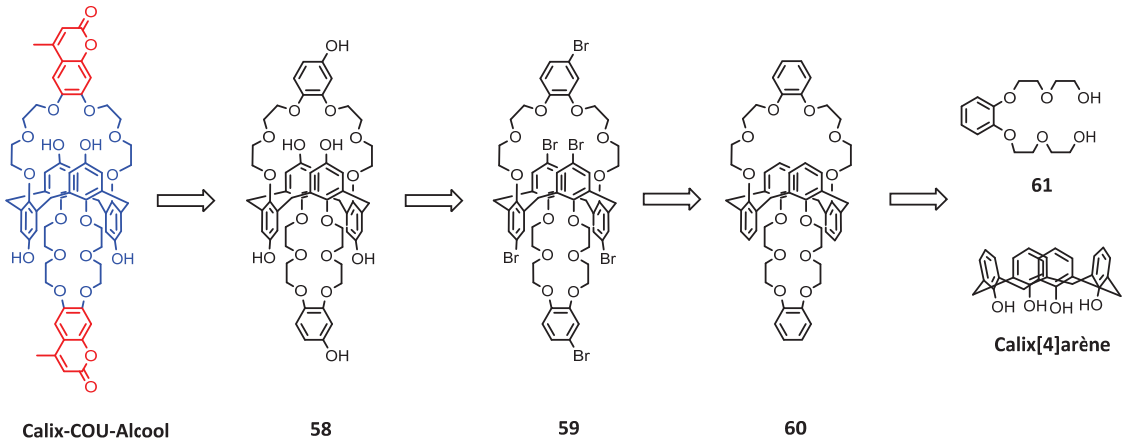


Figure 68 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6*

La molécule **61** issue de la réaction du 2-(2-chloro)ethoxyethanol sur le 1,2-dihydroxybenzène[123] en présence de K_2CO_3 dans le DMF a été obtenue avec 97% de rendement (Figure 69). Les fonctions hydroxyles des groupements diéthylène glycol ont ensuite été remplacées par des groupements tosyles pour permettre le greffage de la molécule sur le calix[4]arène. En présence de chlorure de tosyle et de triéthylamine dans le dichlorométhane, la molécule **63** a été obtenue avec 70% de rendement. Cette molécule a ensuite été greffée sur le calix[4]arène en présence de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile pour obtenir le calix[4]-bis-benzocouronne-6 **60** attendu avec 62% de rendement.

Nous avons ensuite tenté de bromer sélectivement la molécule **60** pour obtenir le produit hexabromé **59**. Mais cette fois, malgré différents essais, nous n'avons pas obtenu le produit hexabromé attendu, mais octabromé **64** avec un excès de Br_2. Un mélange de produits de bromation est obtenu avec moins d'équivalent de Br_2. Des essais pour remplacer les bromes par des fonctions hydroxyles n'ont pas non plus conduit au produit hydroxylé.

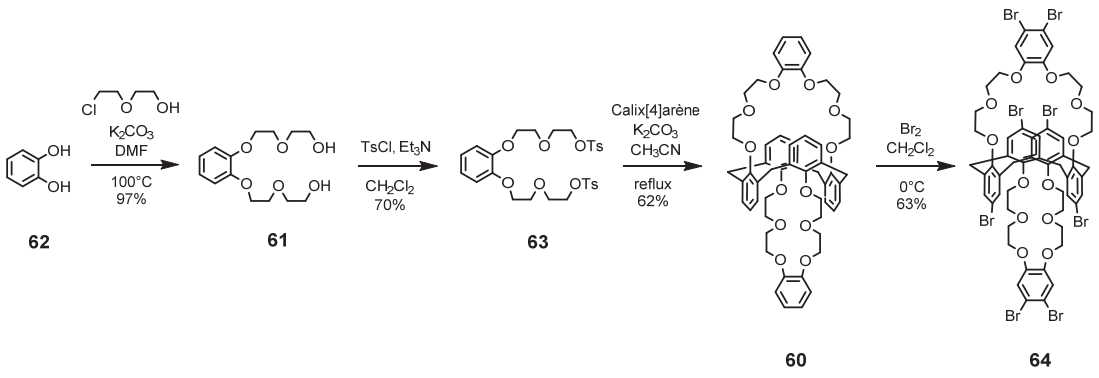


Figure 69 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6*

c) Bromation du calix[4]arène tétraglycolé

Dans une autre approche pour obtenir le Calix-COU-2 tétrabromé, nous avons choisi d'insérer les bromes encore plus en amont dans la synthèse et de modifier la synthèse du Calix-COU-2 (Figure 70). Celui-ci ne serait plus obtenu par greffage de deux coumarines diglycolées, mais par l'insertion de quatre chaînes diéthylène glycol puis de la coumarine. Ceci permettra d'effectuer

l'étape de bromation avant l'insertion de la coumarine, permettant d'obtenir le Calix-COU-2 tétrabromé. Le remplacement des bromes par les fonctions alcools permettrait par la suite d'obtenir le composé souhaité.

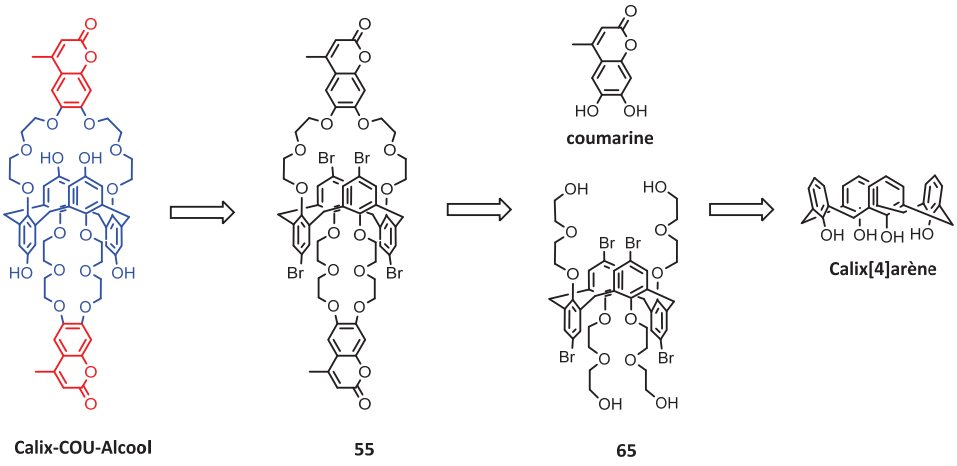


Figure 70 - *Rétrosynthèse envisagée du Calix-COU-Alcool par bromation du Calix[4]arène tétraglycolé*

L'ajout de 6 équivalents de diéthylène glycol monotosylé à une suspension de calix[4]arène et de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile a permis d'obtenir le composé tetraglycolé **66** avec 42% de rendement (Figure 71). Le composé **66** a ensuite été bromé en présence de Br_2 dans le dichlorométhane pour obtenir le calix[4]arène-tetrabromé-tetraglycolé **65** avec 54% de rendement. Pour permettre le greffage de la coumarine, les fonctions alcools ont ensuite été transformées en fonctions tosyles. La tosylation des quatre fonctions alcools n'étant pas favorisée, celle-ci a été effectuée dans des conditions différentes, dans un mélange THF-eau (9/1) en présence de soude. Une faible quantité du produit tétrabromé tétratosylé **67** a été obtenue avec 18% de rendement, le composé tritosylé étant le second produit majoritaire. L'ajout d'un excès de chlorure de tosyle, ainsi que des essais avec différentes bases, n'ont pas permis de faire mieux. Des essais de tosylation du composé tritosylé pour obtenir le composé tétratosylé n'ont pas non plus été concluants. La présence de quatre fonctions tosyle sur le calixarène semble être trop encombrante. Le chauffage au reflux du composé **67** en présence de dihydroxycoumarine et de Cs_2CO_3 n'a pas permis d'obtenir le Calix-COU-2 tétrabromé **55**. La réaction de greffage est beaucoup moins facile qu'avec la coumarine diglycolée, qui est quant à elle facilitée par l'effet template du potassium.

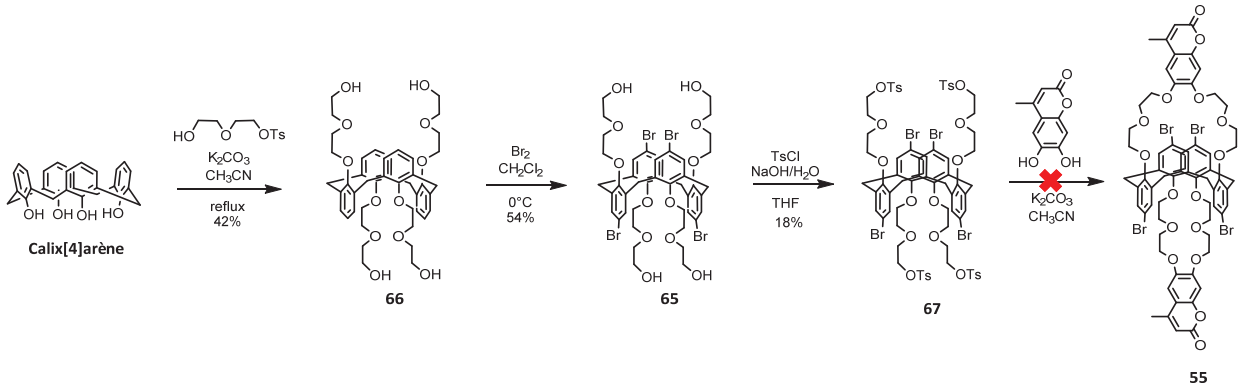


Figure 71 - *Essai de synthèse du Calix-COU-Alcool par bromation du calix[4]arène-tetraglycolé*

Suite aux difficultés rencontrées pour obtenir une molécule tétrabromée et l'impossibilité de transformer ceux-ci en alcools, nous nous sommes intéressés à l'insertion des fonctions alcools et acides à partir de calixarène formylé (Figure 63). L'insertion de fonctions acides à partir de calixarènes bromés à l'aide de carboglace n'a pas été tentée.

2) Voie 2 : Formylation

a) Formylation du Calix-COU-2

L'ajout d'une solution de Calix-COU-2 à une solution de $TiCl_4$ (100 éq) et de dichloro(methoxy)methane (200 éq) entraîne la formation d'un mélange de produits di- et tétraformylés (Figure 72). La séparation des produits di- et tétraformylés formés est assez difficile et doit être effectuée par CCM préparative. Néanmoins, le produit tétraformylé **68** a été isolé avec 56% de rendement.

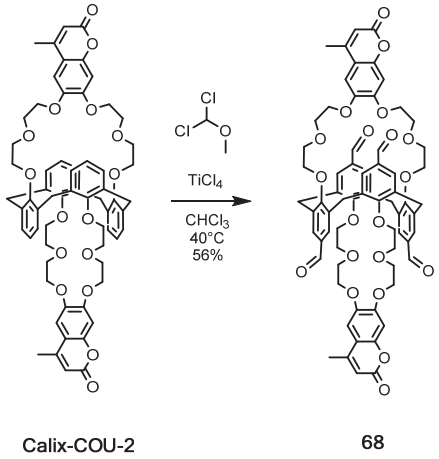


Figure 72 - Formylation du Calix-COU-2

b) Synthèse de Calix-COU-Alcool

A partir du produit tétraformylé, différentes conditions de l'oxydation de Bayer-Williger ont été tentées pour obtenir un produit tétrahydroxylé. Le mCPBA a dans un premier temps été utilisé comme réactif d'oxydation.

Différents essais ont été effectués avec le mCPBA, celui-ci étant ajouté goutte à goutte à des solutions de calixarènes formylés dans le dichlorométhane (Figure 73). Les réactions difficiles à suivre par CCM ont généralement été agitées 24 heures à température ambiante puis quenchées à l'aide d'une solution de $Na_2S_2O_3$. Les produits bruts issus de l'extraction des phases aqueuses sont ensuite analysés par RMN. Les analyses RMN des différents produits bruts récupérés présentent malheureusement toujours des traces de mCPBA qui empêchent l'identification de nouveaux produits potentiels. L'hydrolyse des différents produits bruts isolés qu'elle soit effectuée en conditions acides[124] ou basiques[125] n'a pas permis d'obtenir le produit attendu. Nous avons alors tenté de nouveaux essais à l'aide de H_2O_2.

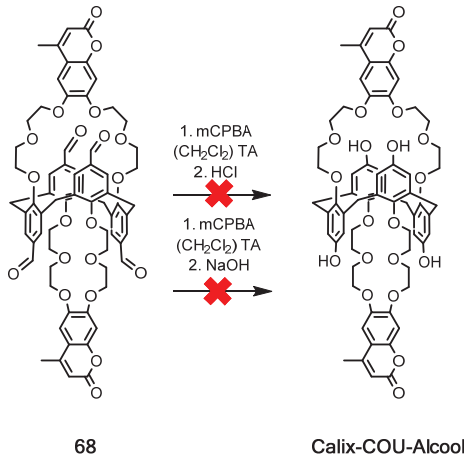


Figure 73 - *Essai d'oxydation de Bayer-Williger à l'aide de mCPBA*

L'utilisation de solution de H_2O_2 a 30% à la place du mCPBA suivi d'hydrolyse acide[126] ou basique[127] n'a pas non plus permis d'isoler le produit attendu, le produit initial étant généralement récupéré en fin de réaction (Figure 74).

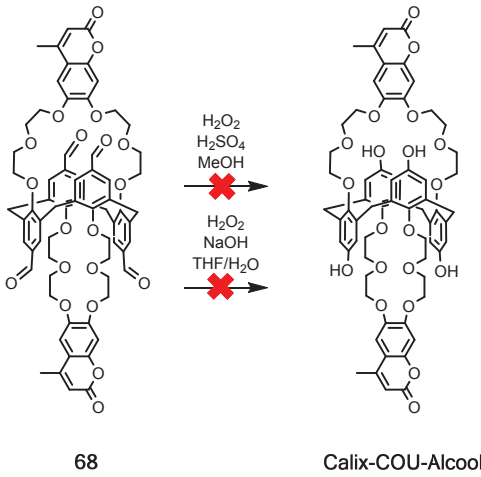


Figure 74 - *Essais d'oxydation de Bayer-Williger à l'aide de H_2O_2*

Le Calix-COU-Alcool n'est qu'une des deux molécules envisagées. Nous nous sommes, donc suite à cela, concentrés sur l'oxydation des fonctions aldéhydes en acides pour obtenir le Calix-COU-Acide.

c) Synthèse de Calix-COU-Acide

L'oxydation du composé **21** en présence d'acide sulfamique et de chlorite de sodium dans un mélange chloroforme acétone a permis d'obtenir le composé tétracarboxylé. Le Calix-COU-Acide a ainsi été obtenu avec 75% de rendement[128] (Figure 75).

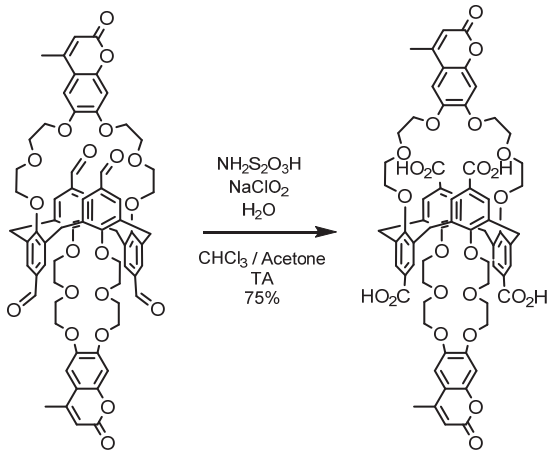


Figure 75 - *Synthèse du Calix-COU-Acide*

3) Conclusions

Des deux molécules envisagées, seul le Calix-COU-Acide a pu être obtenu, malgré différents essais et conditions pour obtenir le Calix-COU-Alcool. Plutôt que d'effectuer de nouveaux essais de synthèse du Calix-COU-Alcool, nous avons préféré étudier les propriétés photophysiques du Calix-COU-Acide, afin de déterminer si le remplacement des fonctions sulfonates par des fonctions acides permettait d'améliorer la sensibilité de la sonde.

C. Etudes photophysiques de Calix-COU-Acide

Les études photophysiques sur le Calix-COU-Acide ont été effectuées dans l'eau, contrairement à celles menées avec le Calix-COU-Sulf qui avaient été effectuées dans un tampon MES. Ce tampon avait été choisi en vue de l'utilisation potentielle de la sonde en milieu biologique. Dans notre cas, le Calix-COU-Acide a été synthétisé pour une application en milieu aqueux et dans un composant microfluidique. Sa caractérisation dans un milieu tamponné n'est donc pas nécessaire.

1) Etudes photophysiques

Nous avons, dans un premier temps, étudié les propriétés photophysiques du Calix-COU-Acide, et de la coumarine fonctionnalisée par deux groupements éthylène glycol appelée coumarine modèle. Pour être sûr que les fonctions acides carboxyliques soient bien toutes déprotonnées, le Calix-COU-Acide a été étudié dans une solution à pH 11. L'étude de la coumarine modèle a été effectuée dans une solution à pH 11 contenant 1% d'acétonitrile pour permettre une bonne solubilisation de la molécule. Ces résultats ont, dans un second temps, été comparés aux résultats obtenus pour Calix-COU-Sulf dans le tampon MES.

Le coefficient d'absorption molaire du Calix-COU-Acide est de 21 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ au maximum de l'absorption. Cette valeur est identique à celle de Calix-COU-Sulf et deux fois plus importante que celle de la coumarine modèle, ce qui indique qu'il n'y a pas d'interactions entre les deux

fluorophores à l'état fondamental. Le maximum d'absorption du Calix-COU-Acide se situe à 342 nm, soit 5 nm de plus que la coumarine modèle (Figure 76 (a)).

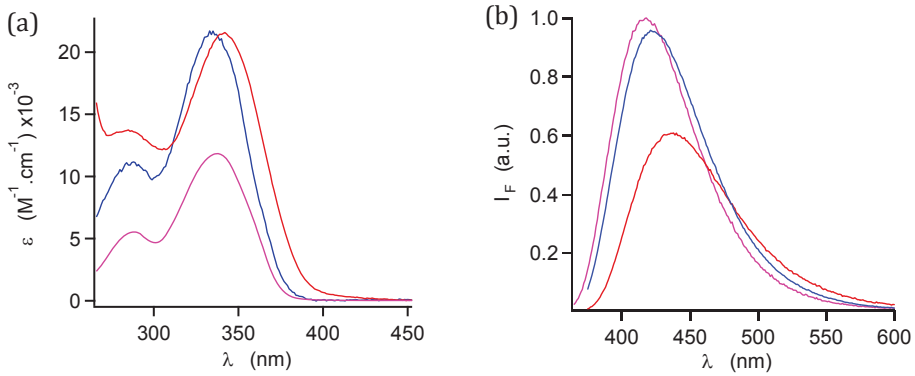


Figure 76 - *Comparaison des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de la coumarine modèle (rose), du Calix-COU-Acide (rouge) et du Calix-COU-Sulf (bleu)*

Le spectre d'émission du Calix-COU-Acide est déplacé de plus de 19 nm vers les plus hautes longueurs d'ondes par rapport à la coumarine modèle (Figure 76 (b)). Son rendement quantique de 0,27 est par contre plus faible que celui de la coumarine modèle ou du Calix-COU-Sulf. De plus, le déclin de fluorescence enregistré au maximum de l'émission n'est pas monoexponentiel. La durée de vie mesurée est une combinaison de ces deux valeurs 3,37 ns (0,85) + 0,92 ns (0,15) (Tableau 6).

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	Φ_F	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	τ (ns)
Coumarine modèle	337	418	0,39 (417)	11800	3,23
Calix-COU-Acide	342	437	0,27 (437)	21000	3,37 (0,85), 0,92
Calix-COU-Sulf	334	421	0,39 (420)	21000	3,51

Tableau 6 - *Comparaison des propriétés spectroscopiques de la coumarine modèle, du Calix-COU-Sul et du Calix-COU-Acide*

Une étude de pH a été effectuée pour voir l'influence du pH de travail sur la solubilité et les propriétés photophysiques du Calix-COU-Acide.

2) Influence du pH de travail

La molécule est très peu soluble à pH neutre. L'augmentation du pH permet sa solubilisation. La déprotonation des fonctions acides sont donc responsable de la solubilisation de la molécule.

L'influence du pH de travail sur les spectres d'absorption de la molécule a ensuite été étudiée. Pour un pH variant entre 7,5 et 10,5 une diminution de la bande à 340 nm est observée (Figure 77 (a)). Cette diminution devient beaucoup plus importante pour des pH supérieurs. Les bandes à 340 et 286 nm diminuent jusqu'à disparaitre pour laisser place à une nouvelle bande à 308 nm. Un comportement identique a été observé pour la coumarine modèle (Figure 77 (b)). L'effet sur les spectres d'émission a ensuite été étudié.

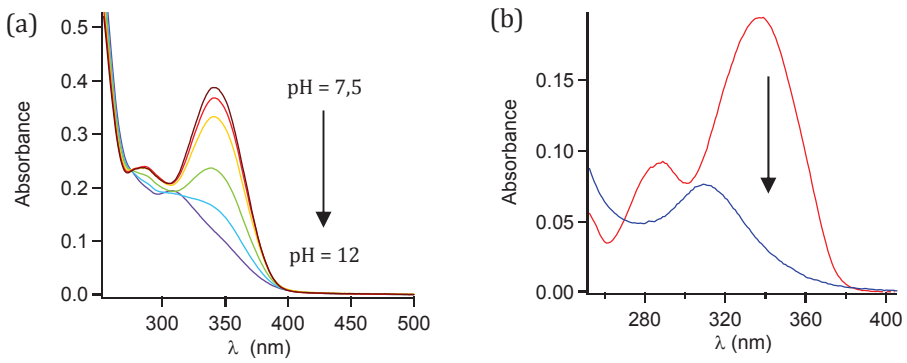
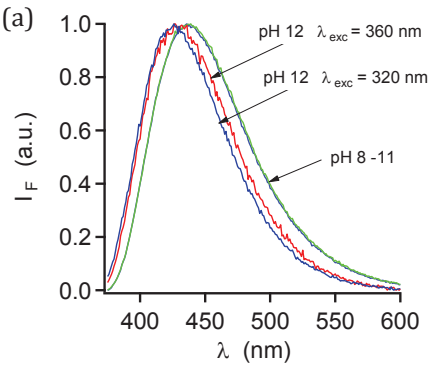


Figure 77 *--(a) Influence du pH sur les spectres d'absorption du Calix-COU-Acide (a) (pH = 7,5/9,5/10,5/ 11,2/11,5/12) et de la coumarine modèle (b) (rouge pH 9, bleu pH 12,8)*

La forme des spectres d'émission ne change pas pour un pH compris entre 8 et 11 (Figure 78 (a)) et ne sont pas non plus dépendants de la longueur d'onde d'excitation. Une faible diminution du rendement quantique est quand même observé entre pH 9 et 11, celui-ci passant de 0,31 à 0,27 (Figure 78 (b)). Par contre, pour des pH supérieurs, une forte diminution de rendement quantique est observée, ainsi qu'un déplacement hypsochrome du spectre d'émission. De plus, le spectre d'émission devient dépendant de la longueur d'ondes d'excitation. Ce qui indique la présence de plus d'une espèce en solution.



(b)

pH	Φ_F
8	0.31
9	0.31
10	0.29
11	0.27
12	0.094

Figure 78 - *Influence du pH sur les spectres d'émission (a) et le rendement quantique (b) du Calix-COU-Acide*

Des mesures de fluorescence résolues en temps ont montré un comportement similaire (Figure 79). Pour un pH compris entre 8 et 11, la durée de vie de fluorescence ne varie pas, et est la somme de deux exponentielles. Pour un pH supérieur, la durée de vie de fluorescence diminue et ne peut plus être modélisée par la somme de deux exponentielles, mais par la somme de trois exponentielles.

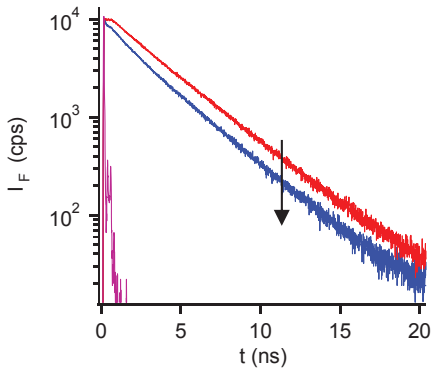


Figure 79 - *Comparaison des déclins de fluorescence à pH 11 (rouge) et à pH 12 (bleu)*

	α	τ	α	τ	α	τ	τ_{moy} (ns)
pH = 11	5,20	3,33	1,05	0,75	-	-	2.90
pH = 12	3,54	3,33	2,05	1,53	2,13	0,11	1.96

Tableau 7 - *Valeurs des déclins de fluorescence du Calix-COU-Acide à pH 11 et 12*

Les variations spectrales observées doivent être dues à l'hydrolyse de la lactone en conditions basiques, entraînant l'ouverture de celle-ci (Figure 80). Ce phénomène est décrit par Killiç[129] comme réversible et se produisant à pH 11 et au-dessus. Les variations spectrales observées pour des pH supérieurs à 11 doivent être liées à l'apparition du produit phénolique issu de l'hydrolyse de la lactone.

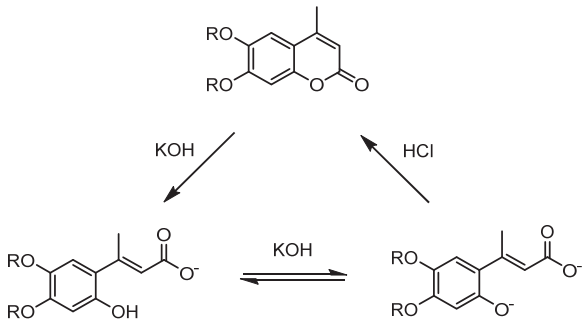


Figure 80 - *Mécanisme d'hydrolyse de la lactone proposé par Killiç*[130]

Lemaire et al.[131] , qui ont effectué la synthèse du Calix-Alcool et du Calix-Acide (Figure 61), ont par la suite étudié leurs propriétés de complexation en milieu aqueux. Pour être sûr de déprotonner l'ensemble des fonctions alcools et acides ils ont travaillé dans des solutions de soude à 0,1 M, soit à pH 13. Leurs molécules ne portant pas de fonctions susceptibles d'être hydrolysées, un travail à un tel pH était possible.

Dans notre cas, l'hydrolyse de la coumarine se produisant pour un pH supérieur à 11, il nous est impossible de travailler à un tel pH. Néanmoins, travailler en conditions basiques permet la solubilité de la molécule, et la présence des fonctions carboxylates chargées négativement devrait permettre une meilleure complexation du césium. Pour nos études de complexation, nous avons donc choisi de travailler à pH 11, un pH suffisamment basique pour espérer déprotonner les quatre fonctions acides. Mais aussi un pH où la variation des propriétés photophysiques n'est pas encore trop importante.

3) Etudes de complexation

La complexation du césium a été étudiée en milieu aqueux à pH 11, par ajout d'une solution concentrée de carbonate de césium (Cs_2CO_3) tout en maintenant la concentration en ligand constante.

Etudes de complexations par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

Les effets observés suite à l'ajout de césium sont semblables à ceux du Calix-COU-Sulf : un déplacement bathochrome de 5 nm des spectres d'absorption, et une légère augmentation du coefficient d'absorption molaire. Le déplacement bathochrome observé est néanmoins moins important que celui du Calix-COU-Sulf (Figure 81 (a)).

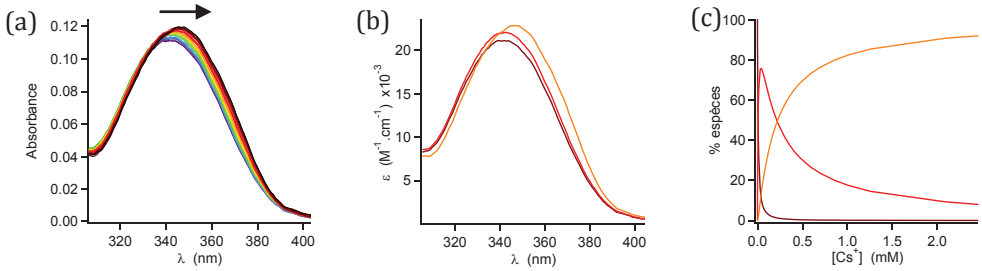


Figure 81 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Acide avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O pH 11 ; [L] = 5,2 µM, λ_{exc} = 365 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de césium.*

L'ajustement numérique effectué à l'aide du logiciel specfit nous permet de déterminer les constantes de formation des complexes ML et M_2L qui sont respectivement Log K_{11} = 5,28 ± 0,18, Log K_{21} = 3,67 ± 0,20. La constante de formation du complexe ML pour le Calix-COU-Acide est plus importante que celle du Calix-COU-Sulf (Tableau 8). De plus, la constante de formation du premier complexe est plus importante que celle du second, ce qui montre que contrairement au Calix-COU-Sulf, les deux sites de complexations du Calix-COU-Acide ne sont pas identiques.

	Log K_{11}	Log K_{21}	K_{21} / K_{11}
Calix-COU-Sulf	4,10 ± 0,04	3,82 ± 0,05	0,52
Calix-COU-Acide	5,28 ± 0,18	3,67 ± 0,20	0,025

Tableau 8 - *Comparaison des constantes de formation des complexes ML et M_2L du Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Acide*

Comme pour les résultats obtenus en absorption, les effets induits par le césium sont semblables à ceux observés avec le Calix-COU-Sulf. L'ajout de césium entraîne une exaltation de la fluorescence et un déplacement hypsochrome de 5 nm des spectres d'émission (Figure 82). Par contre, l'exaltation de la fluorescence est moins importante, et n'est que d'un facteur 1,5 contre 2,7 pour le Calix-COU-Sulf.

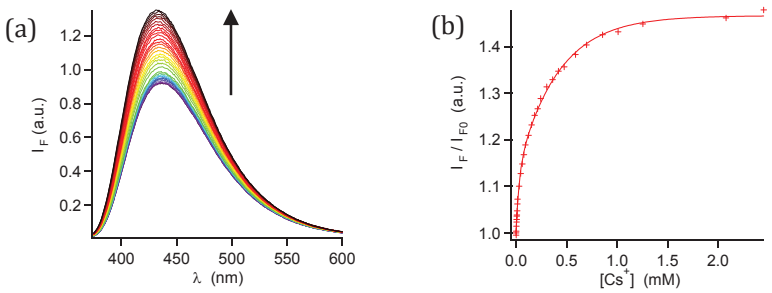


Figure 82 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Acide (a) et de l'intensité de fluorescence à 432 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O pH 11 ; [L] = 5,2 µM, λ_{exc} = 365 nm.*

Comparaison de la limite de détection en cuve du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-Acide

Une limite de détection en cuve de 1,6 µM de césium a été déterminée pour le Calix-COU-Acide dans l'eau à pH 11 et en excitant à 365 nm (Figure 83). Cette valeur est supérieure à celle du Calix-COU-Sulf qui est de 0,6 µM de césium.

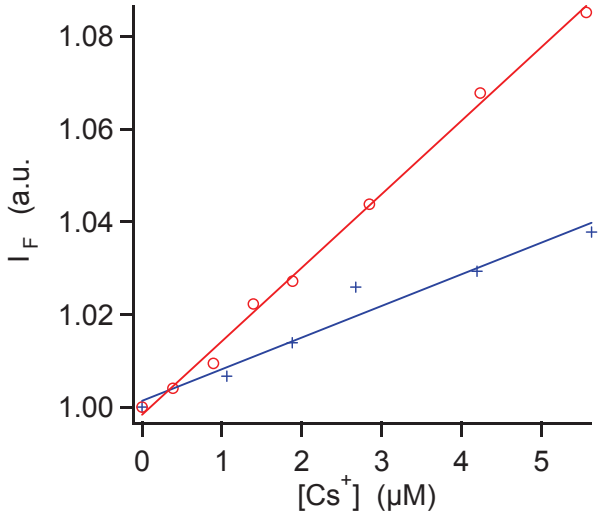


Figure 83 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge) et du Calix-COU-Acide (bleu). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm.*

Bien que la constante de formation du complexe ML du Calix-COU-Acide soit plus grande que celle du Calix-COU-Sulf, le Calix-COU-Acide ne permet pas de mesurer de plus faibles concentrations de césium que le Calix-COU-Sulf. En effet, dans le cas du Calix-COU-Acide, la complexation du césium entraîne une plus faible exaltation de la fluorescence. Son rendement quantique de fluorescence étant aussi plus faible, l'augmentation de la fluorescence liée à l'ajout de césium est donc moins importante (Tableau 9). Ce qui explique pourquoi malgré une meilleure constante de complexation la molécule ne permet pas de mesurer de plus faibles concentrations de césium.

	Calix-COU-Sulf	Calix-COU-Acide
Log K_{11}	4,10 ± 0,04	5,28 ± 0,18
Log K_{21}	3,82± 0,05	3,67± 0,20
K_{21}/K_{11}	0,5	0,025
ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	21 000	21 000
Φ	0,39	0,27
ΔIF (λ_{exc} = 365	2,5	1,7
LOD (µM)	0,6	1,6

Tableau 9 - *Comparaison des propriétés complexantes et des propriétés photophysiques des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Acide*

4) Conclusions sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Acide

Les constantes de complexation du Calix-COU-Acide déterminées à l'aide du logiciel specfit sont meilleures que celles du Calix-COU-Sulf. Mais les plus faibles effets photophysiques induits par le césium ne permettent pas de mesurer d'aussi basses concentrations que le Calix-COU-Sulf. Si les effets photophysiques induits par le césium sur le Calix-COU-Acide sont moins importants, c'est que l'augmentation du transfert de charge intramoléculaire suite à la complexation est plus faible et donc que la densité de charge négative supplémentaire perçue lors de la complexation par les oxygènes donneurs de la coumarine est plus faible. Deux hypothèses peuvent expliquer cela.

La première hypothèse se base sur l'acidité des fonctions acides carboxyliques présentes sur le calixarène. Si seules trois des quatre fonctions acides sont déprotonnées lors de la complexation, le rapprochement de ces fonctions entraîne une augmentation de la densité de charge peut être moins importante, responsable des effets plus faibles observés. Mais à pH 11 le nombre de fonctions acides non déprotonnées ne doit pas être très important. Par comparaison à pH 11 un téta acide comme l'EDTA se trouve à plus de 80% sous sa forme entièrement déprotonnée.

La deuxième hypothèse se base sur la différence de géométrie entre les groupements sulfonates et carboxylates. L'étude de la modélisation moléculaire du Calix-COU-Sulf nous a montré qu'un atome d'oxygène d'une des deux fonctions sulfonates participe à la complexation d'un atome de césium. De plus, lors de la complexation, un atome d'oxygène par groupement sulfonate se rapproche d'un atome d'oxygène de la coumarine. Les groupements sulfonates dont la géométrie est tétraédrique, établissent peut être des interactions plus fortes avec les oxygènes de la coumarine que les groupements carboxylates plans. Des calculs de modélisation moléculaire devraient permettre de déterminer si cette hypothèse est plausible. Il faudra dans ce cas dissocier l'efficacité de la complexation des effets photophysiques induits. Les deux effets possibles peuvent aussi s'additionner pour expliquer la différence de comportement observée

En conclusion, la plus faible limite de détection atteinte par le Calix-COU-Acide en cuve et le fait de devoir travailler en milieu basique nous ont poussés à ne pas utiliser le Calix-COU-Acide en micro-fluidique et à abandonner la synthèse du Calix-COU-Alcool. Les propriétés complexantes du césium de deux analogues du Calix-COU-Sulf, le Calix-COU-Alcyne-Sulf et le Calix-COU-CN-Sulf ont été étudiées en cuve afin de déterminer si de plus basses limites de détections pouvaient être atteintes.

D. Etudes photophysiques de Calix-COU-Alcyne-Sulf et Calix-COU-CN-Sulf

Le Calix-COU-Alcyne-Sulf et le Calix-COU-CN-Sulf sont deux analogues du Calix-COU-Sulf dont la coumarine a été modifiée pour permettre son excitation à de plus hautes longueurs d'ondes. Ces sondes ont été synthétisées pour permettre la détection de potassium en milieu biologique (Chapitre 3). Leurs propriétés de complexation du césium ont néanmoins aussi été étudiées en cuve et en microfluidique. pour déterminer si une limite de détection du césium plus faible pouvait être atteinte, grâce à la plus grande brillance de ces molécules ou à des effets photo-induits plus importants. Seuls les résultats expérimentaux traitant de la complexation du césium seront présentés ici. L'étude plus détaillée de ces sondes sera présentée au chapitre 3.

1) Etudes de complexation du Calix-COU-Alcyne-Sulf dans l'eau

Etudes de complexation par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

Comme pour le Calix-COU-Sulf, l'addition de césium entraîne un déplacement bathochrome des spectres d'absorption de 8 nm entraînant l'apparition d'un point isobestique à 374 nm. Le coefficient d'absorption molaire augmente aussi mais très légèrement par rapport au Calix-COU-Sulf (Figure 84).

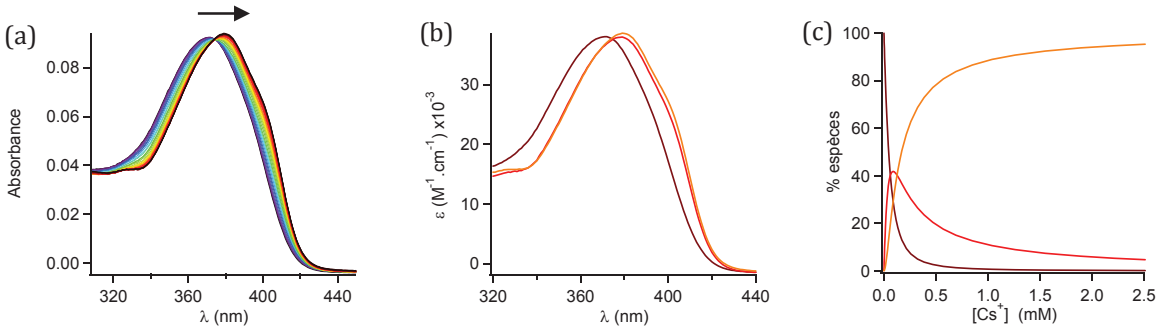


Figure 84 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de césium.*

Les constantes de formation des complexes ML et M_2L ont été déterminées à l'aide du logiciel specfit. Les valeurs de ces constantes sont respectivement Log K_{11} = 4.22 ± 0,02, Log K_{21} = 3.91 ± 0,07. (Tableau 10). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celle du Calix-COU-Sulf, de même le rapport K_{21}/K_{11} vaut 0,49 montrant que les deux sites de complexation sont équivalents.

	Log K_{11}	Log K_{21}	K_{21} / K_{11}
Calix-COU-Sulf	4,10 ± 0,04	3,82 ± 0,05	0,52
Calix-COU-Alcyne-Sulf	4,22 ± 0,02	3,91 ± 0,07	0,49

Tableau 10 - *Comparaison des constantes de formation des complexes ML et M_2L du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-Alcyne-Sulf*

L'ajout de césium entraîne comme pour le Calix-COU-Sulf une exaltation de la fluorescence sans déplacement hypsochrome des spectres. L'augmentation de la fluorescence est linéaire entre 0 et 50 µM de césium et d'un facteur 2 en tout. Ce qui est moins important que le Calix-COU-Sulf mais plus important que le Calix-COU-Acide (Figure 85).

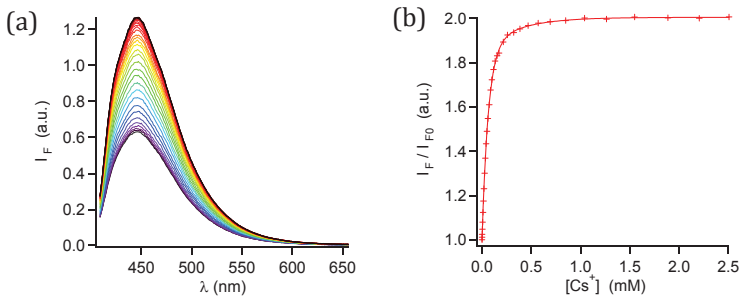


Figure 85 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O ; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.*

Détermination de la limite de détection du Calix-COU-Alcyne-Sulf en cuve

La limite de détection du césium en cuve du Calix-COU-Alcyne-Sulf est de 0,6µM soit comme celle du Calix-COU-Sulf (Figure 86).

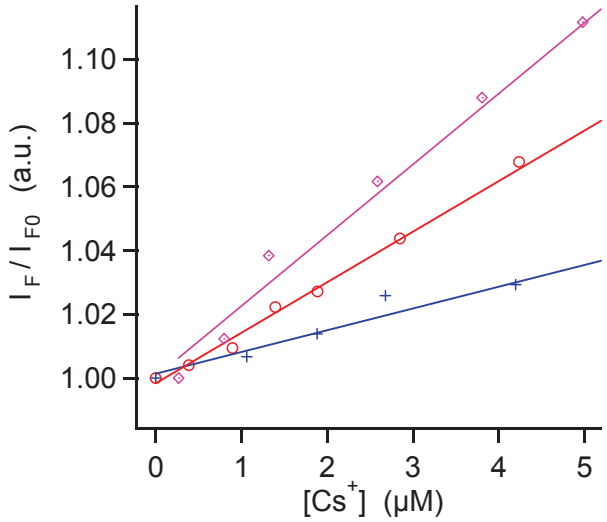


Figure 86 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu) et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm.*

Le fait que les deux molécules aient la même limite de détection du césium est une coïncidence : bien que les constantes de complexation du césium par Calix-COU-Sulf et par Calix-COU-Alcyne-Sulf soient identiques, de même que leurs rendements quantiques, le coefficient d'absorption molaire du Calix-COU-Alcyne-Sulf est plus important que celui du Calix-COU-Sulf. Alors, l'exaltation de la fluorescence à la suite de l'ajout de césium ΔIF est plus importante pour le Calix-COU-Sulf (Tableau 11). La compensation de ces deux paramètres fait que la limite de détection de ces deux molécules est identique.

	Calix-COU-Sulf	Calix-COU-Acide	Calix-COU-Alcyne-Sulf
Log K_{11}	4,10 ± 0,04	5,28 ± 0,18	4,22 ± 0,02
Log K_{21}	3,82± 0,05	3,67± 0,20	3,91± 0,07
K_{21}/K_{11}	0,5	0,025	0,49
ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	21 000	21 000	37500
Φ	0,39	0,27	0,43
ΔIF (λ_{exc})	2,5 (365 nm)	1,7 (365 nm)	2 (405 nm)
LOD (µM)	0,6	1,6	0,6

Tableau 11 - *Comparaison des propriétés complexantes et des propriétés photophysiques des Calix-COU-Sulf, Calix-COU-Acide et Calix-COU-Alcyne-Sulf.*

2) Etudes de complexation du Calix-COU-CN-Sulf dans l'eau

L'addition de césium entraîne un déplacement bathochrome de 6 nm des spectres d'absorption et l'apparition d'un point isobestique à 371 nm. Le coefficient d'absorption molaire qui est 26 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ augmente aussi avec l'ajout de césium.

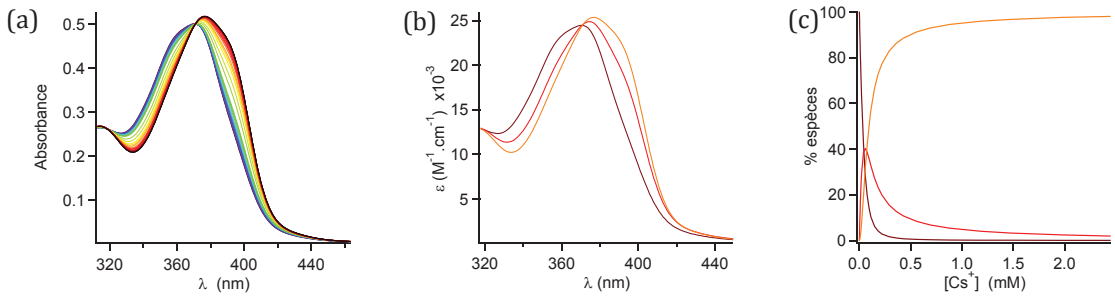


Figure 87 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O; [L] = 19 µM, λ_{exc} = 405 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L (noir) et des complexes ML (rouge) et M_2L (jaune) reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de césium.*

L'ajout de césium entraîne aussi une exaltation de la fluorescence ainsi qu'un déplacement hypsochrome de 4 nm des spectres d'émission (Figure 88). Entre 0 et 40 µM de césium la fluorescence augmente de façon linéaire. Celle-ci est multipliée par un facteur 2,2 sur l'ensemble de la gamme, soit un peu plus que le Calix-COU-Alcyne-Sulf.

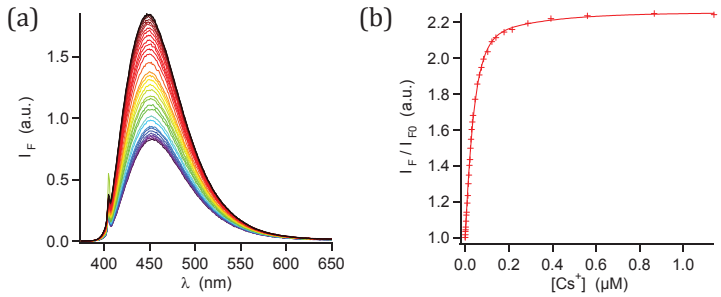


Figure 88 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-CN-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 452 nm (b) avec l'ajout de césium. Solvant = H_2O ; [L] = 4,4 µM, λ_{exc} = 405nm, $\lambda_{em\ max}$ = 454 nm.*

Les constantes de formation des complexes ML et M_2L déterminées à l'aide du logiciel specfit sont respectivement Log K_{11} = 4.55 ± 0,05 et Log K_{21} = 4.31 ± 0,08. (Tableau 12). Ces valeurs sont un peu plus grandes que celle du Calix-COU-Sulf. L'augmentation du transfert de charge intramoléculaire pourrait expliquer ce phénomène. Le rapport K_{21}/K_{11} vaut lui 0,58 montrant que les deux sites de complexation sont aussi équivalents.

	Log K_{11}	Log K_{21}	K_{21} / K_{11}
Calix-COU-Sulf	4,10 ± 0,04	3,82 ± 0,05	0,52
Calix-COU-CN-Sulf	4,55 ± 0,05	4,31 ± 0,08	0,58

Tableau 12 - *Comparaison des constantes de complexation du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-CN-Sulf*

Détermination de la limite de détection du Calix-COU-CN-Sulf en cuve

La limite de détection du césium en cuve du Calix-COU-CN-Sulf est de 0,5 µM. Cette valeur est un peu plus faible que celle du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (Tableau 11).

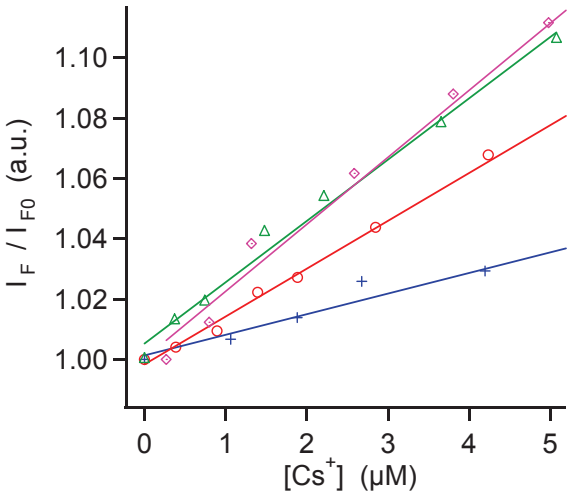


Figure 89 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu)et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose), Calix-COU-CN-Sulf (vert). Calix-COU-Sulf, [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide, [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf, [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm. Calix-COU-CN-Sulf, [L] = 4,4 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 452 nm.*

Cette limite de détection plus faible résulte de l'augmentation de plusieurs facteurs par rapport au Calix-COU-Sulf ou au Calix-COU-Alcyne-Sulf, comme les constantes de complexation du césium, le coefficient d'absorption molaire, ou l'exaltation de la fluorescence. Néanmoins la différence de limite de détection n'est pas très importante.

	Calix-COU-Sulf	Calix-COU-Acide	Calix-COU-Alcyne-Sulf	Calix-COU-CN-Sulf
Log K_{11}	4,10 ± 0,04	5,28 ± 0,18	4,22 ± 0,02	4,55 ± 0,05
Log K_{21}	3,82± 0,05	3,67± 0,20	3,91± 0,07	4,32 ± 0,08
K_{21}/K_{11}	0,5	0,025	0,49	0,58
ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	21 000	21 000	37 500	26 000
Φ	0,39	0,27	0,43	-
ΔIF (λ_{exc})	2,5 (365 nm)	1,7 (365 nm)	2 (405 nm)	2,2 (405 nm)
LOD (µM)	0,6	1,6	0,6	0,5

Tableau 13 - *Comparaison de la limite de détection du césium du Calix-COU-Sulf (rouge), du Calix-COU-Acide (bleu)et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rose). Calix-COU-Sulf [L] = 4,8 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 420 nm. Calix-COU-Acide [L] = 5,2 µM, solvant = H_2O pH 11, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} = 432 nm. Calix-COU-Alcyne-Sulf [L] = 4,7 µM, solvant = H_2O, λ_{exc} = 405 nm, λ_{em} = 445 nm.*

E. Conclusions sur la synthèse et l'étude des sondes réalisées

Les différentes sondes étudiées n'ont pas permis de diminuer significativement la limite de détection du césium mesurable en cuve. Le Calix-COU-Acide, malgré de meilleures constantes de complexation, ne permet pas de mesurer de plus faibles concentrations de césium. Les Calix-COU-Alcyne et Calix-COU-CN-Sulf ont quant à eux une limite de détection de l'ordre de celle du Calix-COU-Sulf.

En conservant cette structure, le moyen de diminuer la limite de détection de la molécule serait d'améliorer certains paramètres photophysiques de la coumarine comme son rendement quantique de fluorescence, son coefficient d'absorption molaire, ou l'exaltation de la fluorescence suite à la complexation de césium, dans le but de diminuer le rapport signal sur bruit et de mesurer de plus basses concentrations. Mais ces paramètres ne sont pas facilement rationalisables, et l'impact sur la limite de détection devrait être limité.

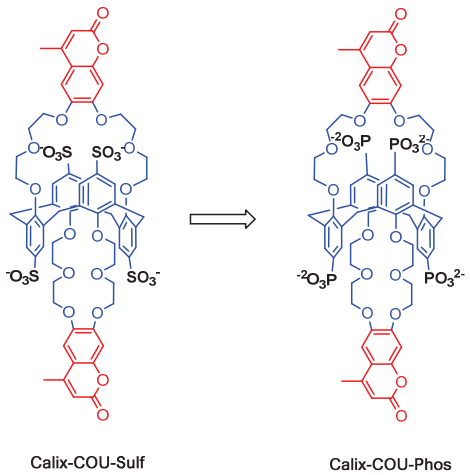


Figure 90 - *Remplacement envisageables des groupements sulfonates par des groupements phosphonates.*

Le remplacement des groupements sulfonates par des groupements phosphonates pourrait permettre d'augmenter le transfert de charge intramoléculaire lié à la complexation du césium et donc l'exaltation de la fluorescence (Figure 90). En effet, les groupements phosphonates disposent de deux charges négatives, alors que les groupements sulfonates n'en possédent qu'une. Lors de la complexation, le rapprochement des groupements phosphonates pourrait entraîner un transfert de charge intramoléculaire plus important qu'avec les groupements sulfonates, et donc une exaltation de la fluorescence plus importante. Les groupements phosphonates comme les groupements sulfonates ont une géométrie tétraédrique, et sont déprotonnés à pH neutre. Leur interaction avec les oxygènes donneurs de la coumarine devrait donc être similaire. Des études de modélisation moléculaire permettraient de valider cela.

IV. Utilisation des sondes dans un dispositif de microfluidique

Le Calix-COU-Sulf et le Calix-COU-Alcyne-Sulf ont été utilisés dans un dispositif micro-fluidique afin de pouvoir mesurer des concentrations de césium en continu. Le système de mesure initial va tout d'abord être présenté, puis le nouveau système de mesure mis en place pour ce projet ainsi que les résultats obtenus.

A. Présentation du système de mesure pour la détection d'espèces polluantes par fluorescence

Le système de mesure développé au laboratoire se base sur un circuit micro-fluidique en verre/PDMS (Figure 92), qui est la technologie utilisée au laboratoire. Les solutions d'analyte et de sonde sont introduites dans le circuit à l'aide d'un pousse-seringue par deux entrées différentes, le pousse-seringue permettant le contrôle du débit d'introduction. Une fois injectées, les deux solutions sont mélangées dans le canal micro-fluidique par un système de mélangeur passif à chevrons. Le mélangeur est constitué d'une succession de sections de chevrons asymétriques (Figure 91). En passant au-dessus de chevrons identiques, les lignes de flux forment deux rouleaux séparés dont la largeur dépend de la largeur des chevrons. En passant d'une section de chevrons à une autre, les lignes de flux se mélangent pour former deux nouveaux rouleaux, et ainsi de suite, ce qui permet un mélange efficace sur une faible longueur.

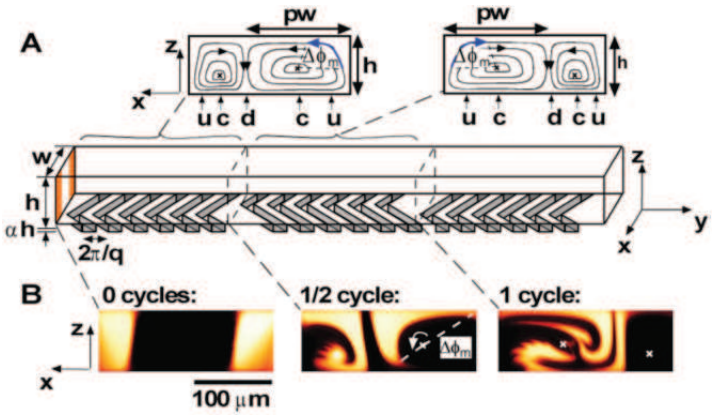


Figure 91 - *(A) Schéma des lignes de flux au sein des sections de chevrons (B) Imagerie confocale des lignes de flux à l'entrée du circuit après ½ cycle et un cycle de chevrons*[132]

Après cette zone de mélange, le circuit se termine par une portion de canal lisse où circule le mélange. Dans cette zone, deux canaux perpendiculaires en vis-à-vis permettent d'insérer deux fibres optiques au plus près du canal de mesure. L'extrémité des fibres optiques est ainsi séparé du canal de mesure par une membrane de 70 µm en PDMS. Ces fibres d'un diamètre de cœur de 100 µm permettent de conduire la lumière issue de diodes électroluminescentes (LED) pour exciter le mélange circulant dans le canal micro-fluidique.

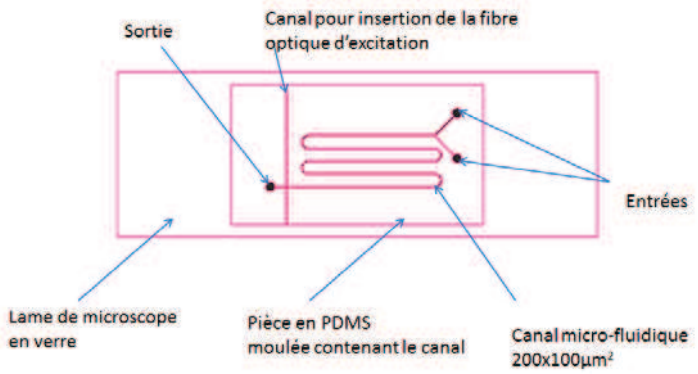


Figure 92 - *Schéma du circuit micro-fluidique verre/PDMS*

La fluorescence émise est ensuite collectée à 90° (coté verre du circuit verre/PDMS) par une lentille qui focalise la lumière à l'entrée d'une fibre optique de 1000 µm diamètre de cœur, acheminant le signal vers un détecteur (Figure 93). En amont du détecteur, un filtre passe haut permet de s'affranchir des signaux lumineux parasites en particulier de la lumière d'excitation. Le détecteur est un tube photomultiplicateur (PMT) (Réf : Hamamatsu H10722-210) qui transforme le signal lumineux en un signal électrique. Ce détecteur possède sa propre alimentation haute tension et un amplificateur convertisseur courant/tension. Le signal électrique ainsi obtenu est une tension dont l'amplitude est l'image de l'amplitude de la fluorescence émise. La tension obtenue est ensuite envoyée vers une chaîne d'acquisition. Pour obtenir un meilleur rapport signal/bruit, un système de détection synchrone est utilisé.

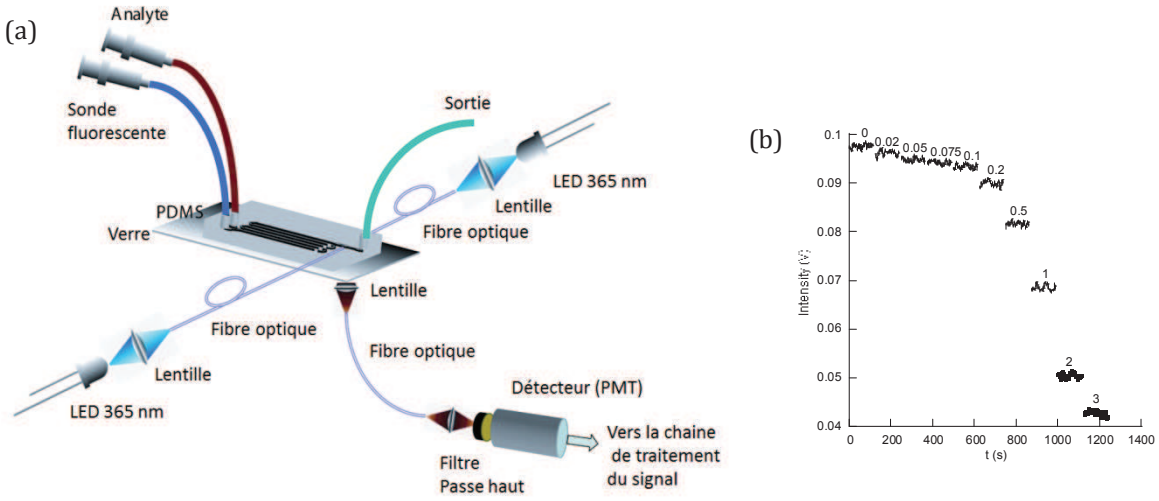


Figure 93 - *(a) Schéma du dispositif de microfluidique initial, (b) dosage de traces de plomb à l'aide du Calix-Dans-4*[133]

Ce système de mesures polyvalent permet l'utilisation de différents types de sondes pour la détection d'espèces variées (cations, anions, molécules neutres). L'utilisation d'une sonde moléculaire fluorescente spécifique du plomb Calix-Dans-4 dans ce dispositif a permis la détection de traces de plomb dans des solutions aqueuses (Figure 93 (b))[134,135].

Bien que fonctionnant de façon satisfaisante, ce système n'est pas adapté à la mesure en continu de concentrations de césium. En effet, la sonde et l'analyte sont injectés à l'aide d'un pousse-

seringue. Ce système de mesure est donc séquentiel et ne permet pas de mesures en continu. Ce système a donc été modifié pour répondre à la problématique imposée.

B. Nouveau système de mesure permettant la mesure en continu de concentrations de césium par fluorescence

1) Description du nouveau système de mesure

L'alimentation en eau du circuit micro-fluidique a été le principal problème à résoudre pour modifier le système. En effet, en sortie du générateur de vapeur (GV), la vapeur produite circule dans des canalisations de diamètre important (φ > 1m) à haute pression et haute température (P = 60 bar, T = 220°C). C'est sur ces canalisations qu'un premier piquage permet de récupérer l'eau à analyser présente sur les parois. Ce piquage délivre une eau à un débit compris entre 1 et 10 L/h et à 20°C. Ce débit est trop important pour alimenter directement le circuit micro-fluidique dont le débit d'alimentation doit être de 0,5 mL/h. L'utilisation de prélèvements issus de cette eau ne permettrait pas une analyse en continu. Un deuxième piquage a donc été envisagé sur ce tuyau de piquage à l'aide d'un capillaire pour alimenter le circuit micro-fluidique dans les conditions de fonctionnement optimales (Figure 94).

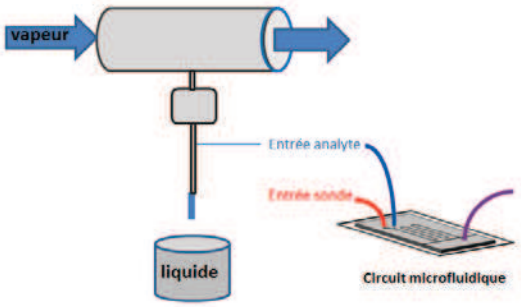


Figure 94 - *Schéma de l'alimentation du circuit microfluidique*

Il existe deux façons d'alimenter un circuit micro-fluidique, soit en régulant le débit, soit en régulant la pression. La régulation du débit peut se faire à l'aide d'un pousse-seringue comme pour le dispositif de départ. La régulation en pression implique l'utilisation d'une pompe ou d'un réservoir sous pression.

Pour le nouveau dispositif, une alimentation en pression a été envisagée. Un réservoir d'eau sous pression alimente en continu le circuit micro-fluidique et un régulateur de débit présent sur chaque voie permet de délivrer les débits souhaités aux entrées du circuit (Figure 95). L'injection des solutions de sondes et de césium se fait à l'aide de vannes équipées de boucles d'injection. Ces vannes disposent de deux positions, 'load' et 'inject' qui permettent de commuter le flux d'un circuit vers un autre. En position 'load', l'eau du réservoir sous pression va dans le circuit micro-fluidique sans passer par la boucle d'injection. Il est alors possible de remplir celle-ci. Pour démarrer une mesure, la vanne est basculée en position 'inject'. En position 'inject', l'eau issue du réservoir sous pression passe dans la boucle d'injection, chassant la solution qu'elle contient vers le circuit micro-fluidique. Une vanne est ainsi dédiée à l'injection des solutions de sonde et une autre à l'injection des solutions de césium. Ce système se révèle fort intéressant, car contrairement au système précèdent, le circuit en PDMS ne se trouve que pour de courtes périodes en présence de sonde et de césium. Le reste du temps, celui-ci est 'lavé' par l'eau circulant à travers les régulateurs de débit, ce qui évite tout risque d'adsorption au niveau du

circuit et diminue fortement la quantité de solution à utiliser. Le volume de solution injecté peut être réglé en ajustant la longueur de la boucle. Toutefois, les états 'load' et 'inject' peuvent être commutés à tout moment pour réduire le temps de mesure sans attendre le vidage de la boucle.

En plus de ces deux vannes à 6 ports Upchurch V451, une troisième vanne à 4 ports Upchurch V101D a été ajoutée en amont de la vanne permettant l'injection du césium. Cette vanne permet de passer facilement de la configuration étalonnage à la configuration mesure. Il est ainsi possible dans un premier temps d'injecter à la seringue des solutions de césium pour la réalisation de droites d'étalonnage, puis dans un second temps de commuter la vanne pour alimenter le circuit en eau issue du piquage. Pour nous aider à dimensionner le système et en particulier la voie 'césium', nous avons fait quelques calculs élémentaires de fluidique (ces calculs sont développés en Annexe 2). Il fallait vérifier que nous étions en flux laminaire dans le tuyau de piquage et ce, quel que soit le débit dans ce tuyau. Nous avons ainsi pu nous servir de l'équation de Bernoulli et déterminer la pression nécessaire à l'entrée du capillaire, ce qui nous a amenés à dimensionner la garde hydraulique permettant d'alimenter le circuit.

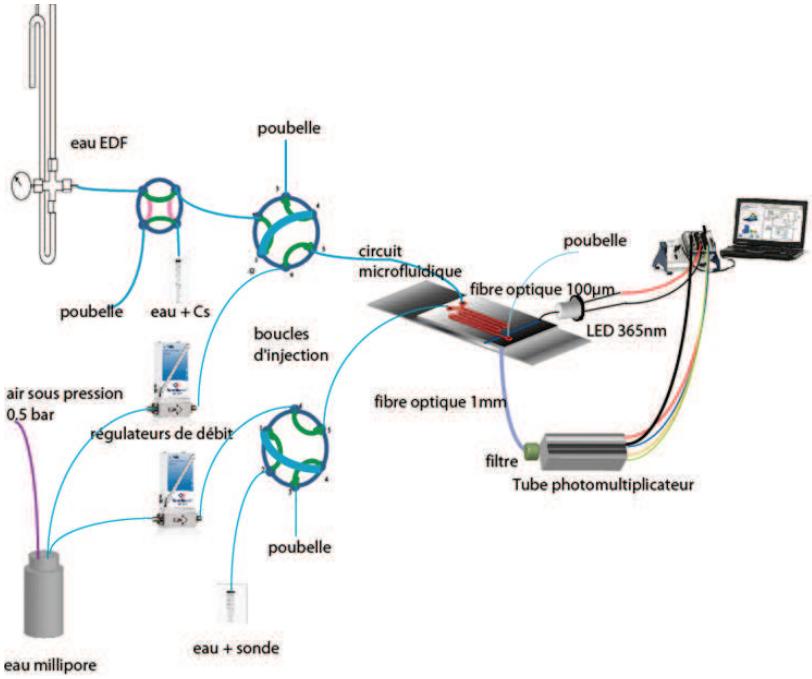


Figure 95 - *Schéma du nouveau système de mesure*

Les systèmes optiques permettant l'excitation et la mesure de la fluorescence ont aussi été améliorés. Afin d'optimiser le couplage de la lumière entre la LED et la fibre optique, une « embase active » a été construite au laboratoire. Les embases actives sont des composants opto-mécaniques qui assurent la connexion entre la diode et la fibre optique et permettent un bon couplage de la lumière avec la fibre. Des embases actives contenant des LED à 365 nm sont disponibles commercialement, mais dans notre cas, un filtre est nécessaire pour affiner le spectre de la LED à 365 nm. C'est pour cette raison qu'une embase active sur mesure a été réalisée. Cette embase active contient une LED à 365 nm (ref LED : UVLED365-10E), un filtre optique à 370 nm d'une largeur de 10 nm (réf : Semrock FF01-370/10-25) et une lentille bille en silice fondue pour focaliser le faisceau lumineux sur la fibre optique. La fibre optique est d'un côté connectée à l'embase active via une connexion optique SMA, de l'autre insérée dans le

circuit en PDMS au plus près du canal micro-fluidique. Il faut souligner que cette 'embase active' est un composant de terrain et donc bien adaptée au problème environnemental posé.

Comme pour le montage initial, la fluorescence est collectée à 90° et focalisée par une lentille dans une fibre optique de gros diamètre (1000µm) et envoyée vers le détecteur. Pour collecter un maximum de fluorescence lié à la sonde et éviter des signaux lumineux parasites, un filtre spatial a tout d'abord été placé entre le circuit et la lentille. Ensuite, pour augmenter le rapport signal sur bruit, une seconde embase active a été construite. Cette embase active contient le détecteur, un tube photomultiplicateur, un filtre passe-haut et une lentille bille en verre BK7 pour focaliser la lumière collectée sur le tube photomultiplicateur.

Les différents éléments du montage décrit ont été assemblés et fixés sur un « breadboard » pour permettre le transport du dispositif. Des parois opaques ont aussi été placées pour protéger l'intérieur du dispositif (Figure 96).

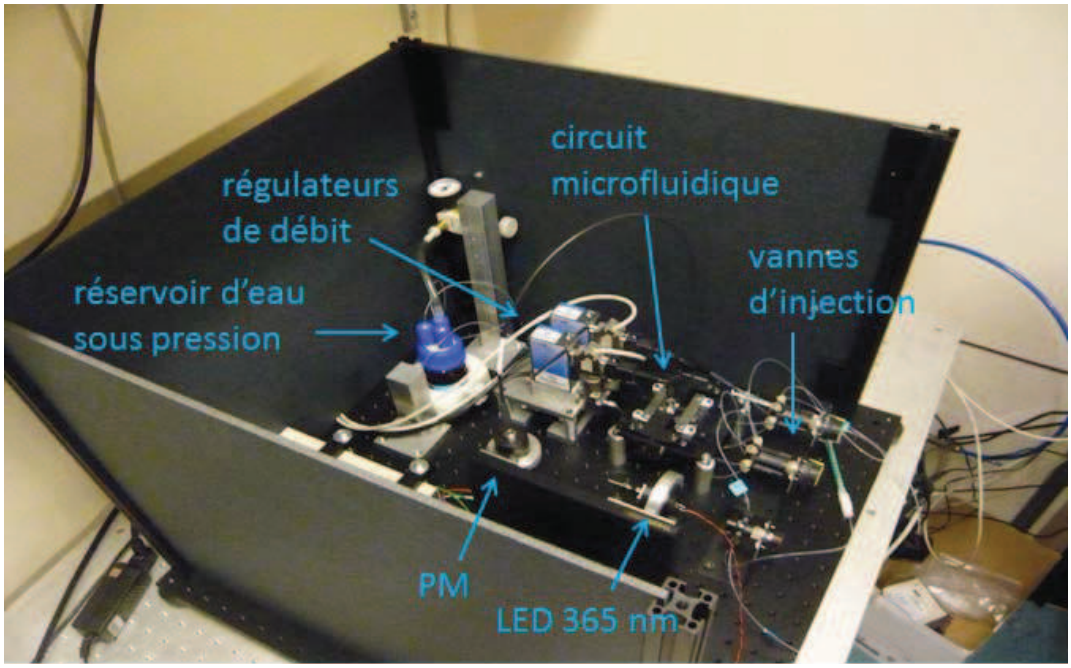


Figure 96 --*Photographie de l'intérieur du montage final*

L'alimentation nécessaire au fonctionnement de la LED, du détecteur et de la chaîne de traitement du signal a aussi été intégrée à l'intérieur du système. Le banc optique de départ a ainsi été transformé en un prototype transportable sur le terrain.

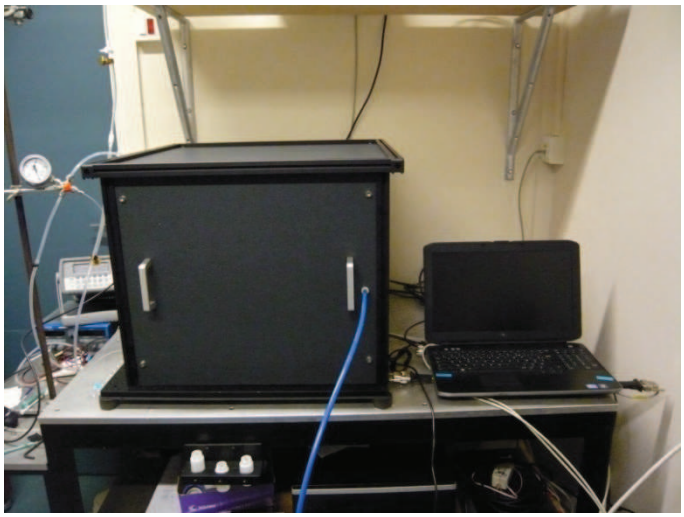


Figure 97 - *Montage final fermé, avec l'ordinateur pilotant son fonctionnement*

Une fois complet, ce montage se compose du système de mesure fermé, où les injections des solutions de sonde et de césium se font de l'extérieur, et d'un ordinateur permettant le contrôle du système. (Figure 97).

Les signaux obtenus suite à l'injection et au mélange de la sonde et du césium, ont la forme d'un palier dissymétrique dont le niveau dépend de l'intensité de la fluorescence mesurée (Figure 98). Le signal augmente rapidement pour atteindre le niveau du palier maintenu un temps suffisant grâce à la longueur des boucles d'injection. Le signal diminue ensuite plus lentement pour rejoindre la valeur initiale du bruit dû à la circulation de l'eau pure.

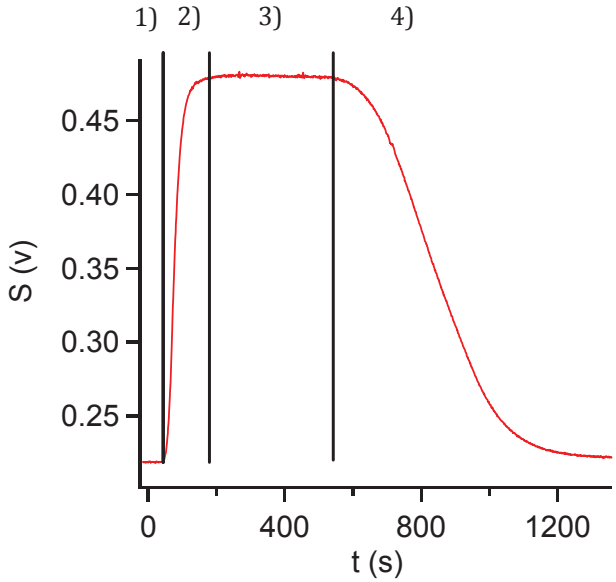


Figure 98 - *Profil des signaux obtenus lors de l'injection de solution de sondes. 1) temps de latence, 2) temps de montée, 3) pallier, 4) descente*

Ainsi, il est possible de décomposer le signal en quatre parties :

- la partie 1 correspond au temps de latence entre l'injection et le début de la détection de la sonde fluorescente. Ce délai est dû à la distance à parcourir entre la sortie de la boucle et la zone de détection (B, B'-D

Figure 99 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection avec les boucles d'injection*

)

- la partie 2 correspond au temps nécessaire pour atteindre le palier.

- la partie 3 correspond au palier lui-même, représentatif du mélange des 2 solutions injectées.

- la partie 4 correspond au temps de retour au signal initial.

La forme et la durée de chaque étape dépendent en premier lieu de la géométrie du système de mesure (longueurs et diamètres des capillaires et du circuit) et du débit de travail. Les profils des différentes parties, notamment 2 et 4 dépendent aussi fortement des phénomènes de dispersion axiale et radiale le long de l'écoulement. Le système de mesures a donc été étudié en détail afin de justifier le profil des signaux obtenus.

2) Profil des paliers

Le système de mesures décrit précédemment est schématisé sur la

Figure 99 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection avec les boucles d'injection*

en situation d'injection. Les boucles d'injection ont préalablement été remplies de solutions de sonde et de césium. En passant en position 'inject', les solutions présentes dans les boucles sont alors poussées par l'eau provenant des régulateurs dans les capillaires reliant les boucles au circuit (B-C), puis à travers le circuit micro-fluidique (C-D). Le chemin parcouru par ces solutions se compose de différentes sections :

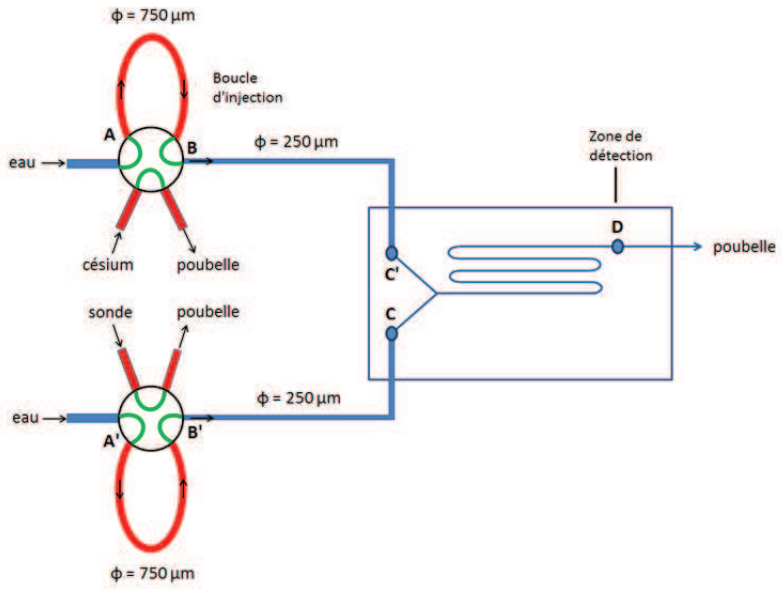


Figure 99 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection avec les boucles d'injection*

- la boucle d'injection, constituée d'un capillaire de 250 mm de longueur et de 750 µm de diamètre intérieure ($d_1 = 2w_1$) (A-B).

- le capillaire reliant la boucle d'injection et le circuit microfluidique, de 180 mm de longueur et de 250 µm de diamètre intérieur ($d_2 = 2w_2$) (B-C).

- le circuit microfluidique de section rectangulaire, large de 200 µm, haut de 75 µm, et long de 130 mm, en négligeant le volume des chevrons (C-D).

Dans une première approche, en négligeant la diffusion et en considérant que les solutions sont poussées à un débit de 0,65 mL/h par l'eau issue des régulateurs de débit, un profil de type piston devrait être obtenu (Figure 100 bleu), où le temps de latence correspondant au temps entre l'injection des solutions et le début du créneau devrait être de 45s. La durée du palier serait quant à elle de 610s, temps nécessaire pour que l'eau issue des régulateurs passe dans les boucles d'injection et arrive dans la zone de détection. Expérimentalement, le profil du palier n'est pas aussi marqué. La montée et surtout la descente du palier sont beaucoup plus lentes. Le palier est aussi plus court. Au lieu de faire 610s, celui-ci est réduit à 450s. Ceci est dû à la diffusion des solutions lors de leur écoulement. L'étude des écoulements dans les différentes sections menant à la zone de détection justifie la forme du profil.

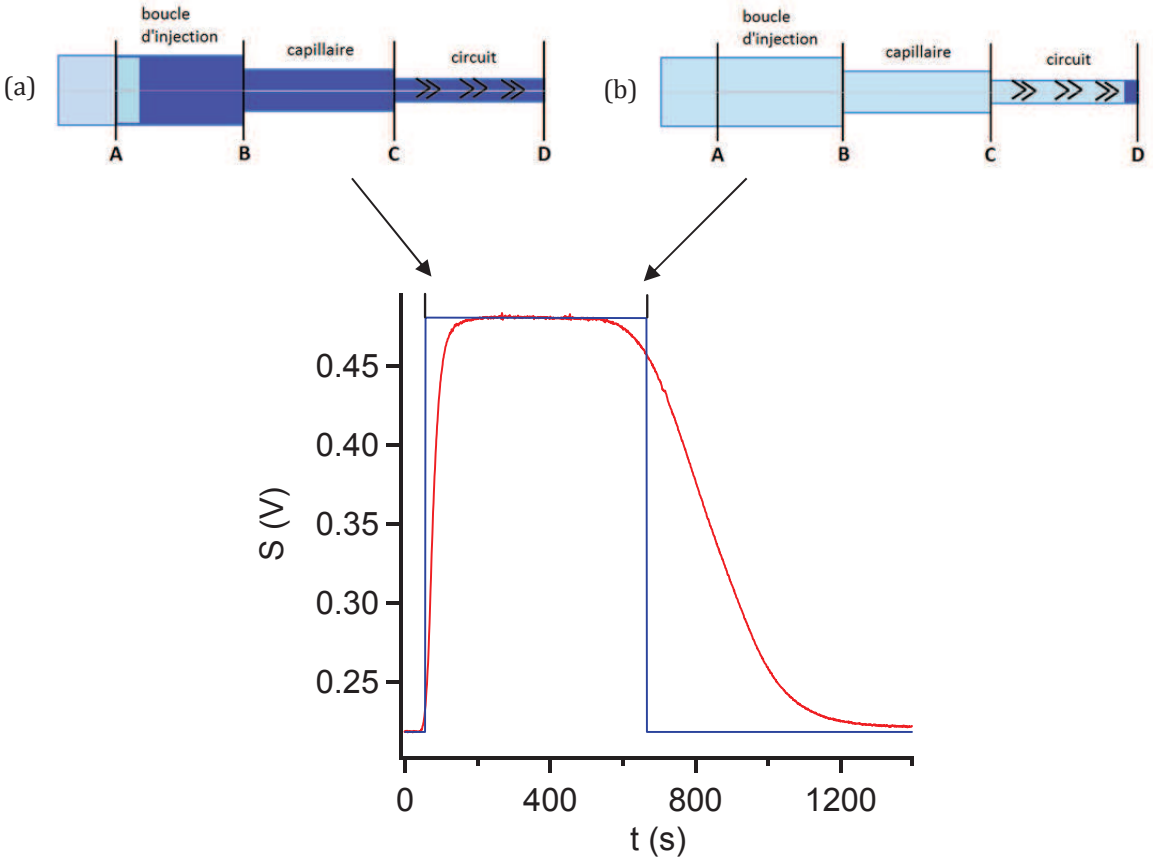


Figure 100 - *Superposition du profil pour un écoulement piston pur (bleu) et du profil expérimental (rouge). Illustration du profil d'écoulement piston : (a) arrivée de la sonde dans la zone de détection, début du palier ; (b) arrivée de l'eau dans la zone de détection fun du palier*

Au sein des capillaires de section cylindrique où l'écoulement est laminaire, celui-ci suit la loi de Poiseuille. La symétrie axiale conduit à un profil parabolique du champ de vitesses où la vitesse est maximale au centre (U_0) et théoriquement nulle sur les parois (Annexe 3). Lors de l'injection

ponctuelle d'un traceur, cette distribution des vitesses génère un étirement dans l'axe de l'écoulement entraînant un élargissement du temps de résidence du traceur, la largeur ΔW du profil étant proportionnel à U_0 et au temps de séjour moyen, t (Figure 101 (b)). En raison de la diffusion radiale du traceur, induite par le gradient de concentration ainsi créé, le profil parabolique est transformé en un écoulement de type 'piston'. Le couplage de l'élongation axiale due au profil de Poiseuille et de la diffusion radiale est appelé dispersion de Taylor. La dispersion radiale du traceur est achevée après le temps caractéristique τ_D égal à w^2/D, où D est le coefficient de diffusion du traceur (Figure 101 (c)). En parallèle et tout au long du processus, chaque fine tranche contenant du traceur subit à son tour un étirement et une diffusion radiale. Après N étapes, le 'bouchon' est transformé en une large bande décrite par un profil gaussien (Figure 101 (d)).

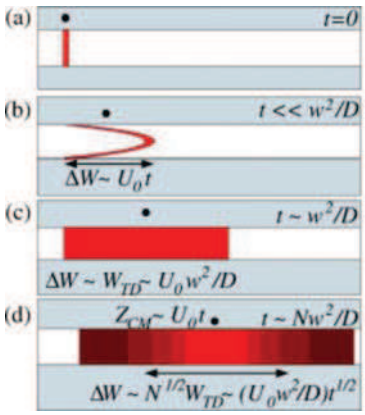


Figure 101 - *(a) Injection d'une tranche de traceur. (b) Profil parabolique du traceur due à son élongation (c) Profil en 'bouchon' du traceur après dispersion radiale (d) Profil gaussien du taceur après N cycles*

Dans les canaux micro-fluidiques de section rectangulaire en absence de chevrons, la dispersion de Taylor entraînerait aussi un élargissement similaire du temps de résidence[136]. Le calcul du nombre de Péclet, qui est un nombre sans dimension caractérisant la diffusion au sein d'un fluide, permet de déterminer si la dispersion de Taylor est négligeable. Pour un nombre de Péclet inférieur à 10^2, la dispersion de Taylor n'est pas négligeable, entraînant un élargissement du temps de résidence. Celui-ci est néanmoins moins important dans un canal de taille identique avec chevrons[137] (Figure 102). De plus, le fait que les chevrons soient dissymétriques diminue encore la dispersion de Taylor. Pour un nombre de Péclet supérieur à 10^2, l'élargissement du temps de résidence est négligeable notamment en présence de chevrons. Les chevrons permettent une circulation radiale des lignes de fluides, ce qui assure un bon mélange, mais ils permettent aussi de limiter la dispersion de Taylor.

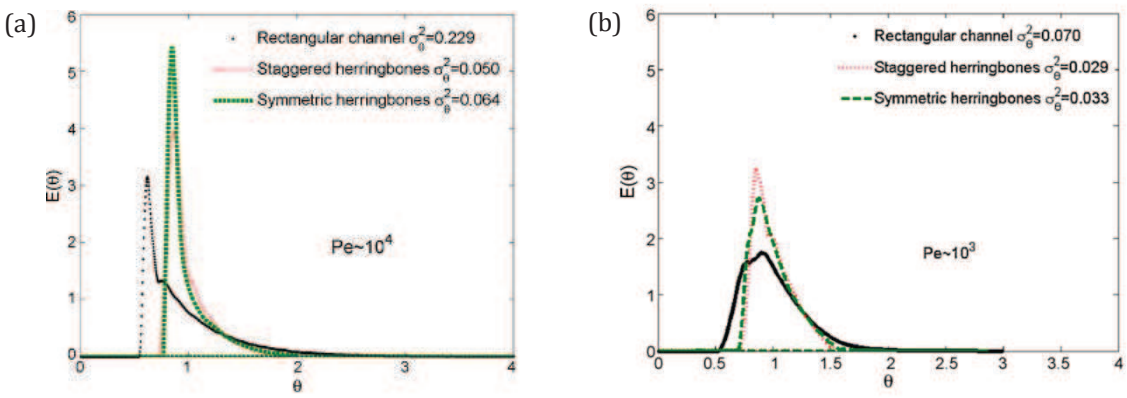


Figure 102 - *Distribution du temps de résidence au sein d'un canal microfluidique de section rectangulaire pour un nombre de Péclet Pe de 10^4 (a) et de 10^3 (b). Canal lisse (noir), canal muni de mélangeurs à chevrons symétrique (vert), canal muni de mélangeurs à chevron dissymétrique (rouge)*

Dans le cas du système mis en œuvre et avec les débits choisis, le nombre de Péclet Pe est élevé (>10^6) (Annexe 3) et permet de supposer que l'écoulement dans le circuit micro-fluidique s'apparente à un écoulement piston. Le profil du signal enregistré dans la zone de détection dépend donc uniquement de la diffusion au sein des boucles d'injection et des capillaires de liaison. La Figure 103 décompose les différentes étapes du profil des paliers obtenu.

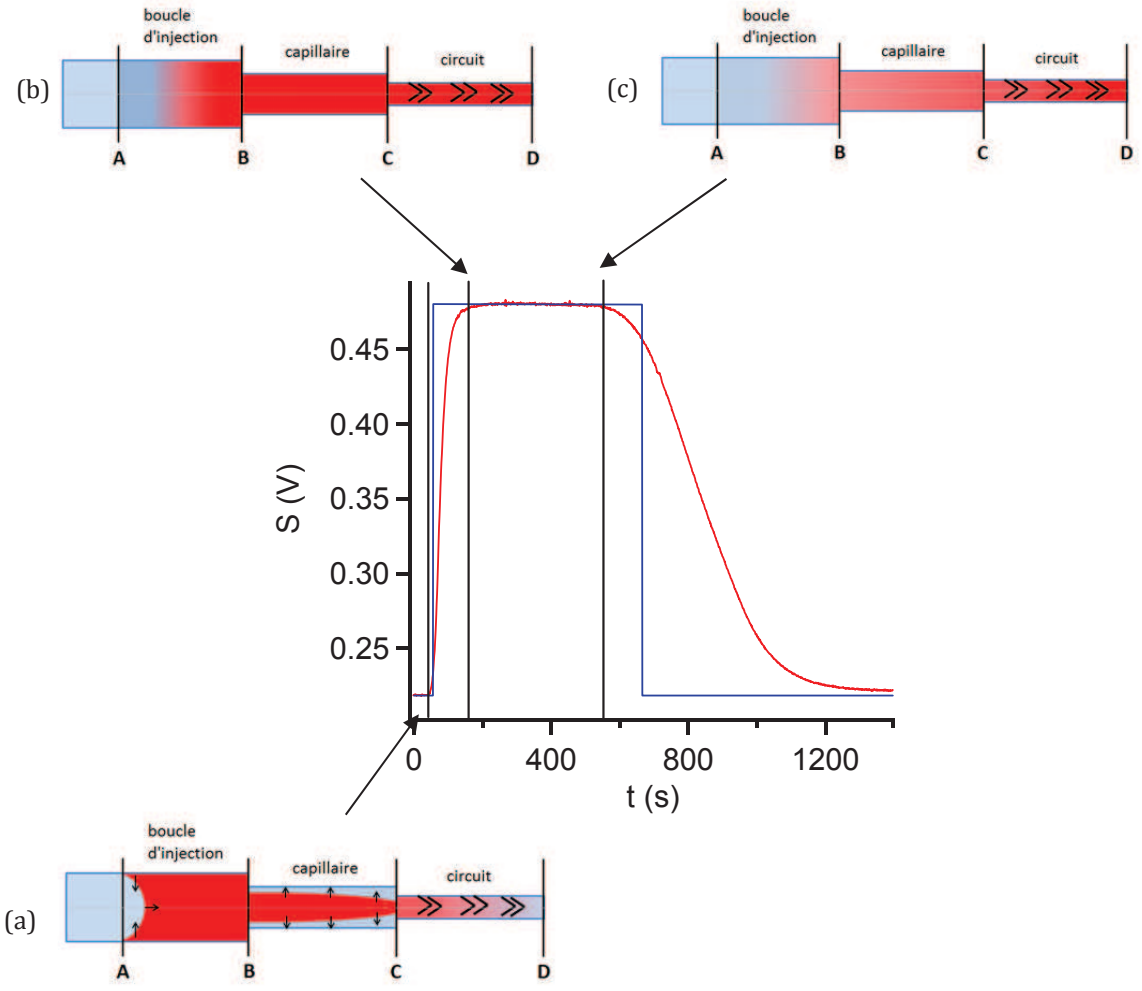


Figure 103 - *Superposition du profil pour un écoulement piston pur (bleu) et du profil expérimental (rouge). Illustration du profil expérimental : (a) arrivée de la sonde dans la zonde de détection; (b) début du palier ; (c) fin du palier.*

Conformément à la dispersion de Taylor en écoulement de Poiseuille cylindrique, l'amont et l'aval des tranches de solution de sonde et de césium adopte en premier lieu un profil parabolique en amorçant une dispersion radiale. En tête comme en queue d'injection, la dispersion de Taylor entraîne l'étalement du temps de résidence des solutions injectées de part et d'autre du temps de passage moyen. L'arrivée du front d'injection au point de détection entraîne l'augmentation du signal mesuré, et correspond à la fin de la première phase de latence. Expérimentalement elle a lieu après environs 40s (Figure 103 (a)), soit plus rapidement que pour un écoulement de type piston pur, où le front d'injection mettrait 55s à arriver. L'étalement du front retarde aussi le début du palier lui-même. Ainsi, le palier n'est atteint qu'au bout de 160s (Figure 103 (b)). Comme pour l'augmentation du signal, sa diminution n'est pas instantanée mais elle s'effectue en plus de 800s, la fin de la boucle ayant subi une élongation plus importante (Figure 103 (c)). Le signal retrouve pour finir son niveau initial lorsque toute la solution de sonde est passée dans le circuit plus de 2000s après leur injection. Le profil obtenu est reproductible d'une injection à l'autre comme le montre la Figure 104. Si besoin, il peut aussi être écourté en repassant en mode 'load' dès la fin du palier pour injecter de nouvelles solutions (Figure 105). La queue de la boucle est ainsi supprimée.

3) Conclusions sur le nouveau système de mesure

Contrairement au système initial, ce nouveau système de mesures permet la mesure en continu de traces de césium. L'utilisation de vannes munies de boucles d'injection permet de facilement passer du mode étalonnage au mode mesure. Le circuit étant constament rincé par de l'eau, le risque de contamination est aussi moindre. De plus, ce dispositif a aussi été 'durci' (embase active, fixation des différents éléments, intégration du système de traitement du signal) pour être transportable et permettre des mesures sur le terrain.

Dans le cadre de ce projet, ce système de mesure a été utilisé avec une sonde moléculaire fluorescente du césium pour permettre la mesure de concentrations de césium. Mais ce système peut être utilisé avec d'autres types de sondes pour détecter d'autres analytes.

C. Mesures de concentration de césium en microfluidique

Des solutions de Calix-COU-Sulf et de Calix-COU-Alcyne-Sulf ont été utilisées dans le dispositif de micro-fluidique. Leur limite de détection du césium en circuit micro-fluidique a ainsi été déterminée. Mais dans un premier temps, l'optimisation des paramètres de mesure a été étudiée.

1) Optimisation des paramètres du système

Sur le dispositif, différents paramètres peuvent être réglés, comme l'intensité de la diode électroluminescente (LED), le gain du tube photomultiplicateur (PM) et le débit des régulateurs de débit. Augmenter l'intensité de la LED permet d'augmenter l'intensité du faisceau d'excitation et donc l'intensité de la fluorescence émise. Moduler le gain du PM permet de modifier l'intensité

du signal récupéré. En travaillant avec de faibles concentrations en sonde, l'augmentation d'un de ces deux paramètres permet d'augmenter le signal récupéré, mais aussi le bruit. Mais comme nous avons vu lors de l'étude en cuve des molécules, l'influence de la concentration de la sonde sur la pente de la droite $I_F = f([Cs^+])$ est très faible. Travailler avec une faible concentration de sonde n'est donc pas nécessaire. Pour s'affranchir d'un bruit trop important, nous avons donc travaillé avec des concentrations comprises entre 2 et 4 µM dans le cas du Calix-COU-Sulf et du Calix-COU-Alcyne-Sulf.

Nous avons ensuite étudié l'influence du débit sur la qualité du signal obtenu. Augmenter le débit permet de diminuer le temps de mesure. Mais si celui-ci est trop important, les signaux deviennent fortement bruités. En effet, plus le débit est important et plus le temps de séjour dans le canal micro-fluidique est faible, et donc plus le temps de mélange des solutions de sondes et de césium est court. De plus, si le débit est trop important, les lignes de flux ne sont plus mélangées de manière efficace par les chevrons. Ces deux phénomènes se répercutent sur la qualité du signal.

Après des essais à différents débits, nous avons choisi de travailler à 0,65 mL/h, les signaux obtenus pour des débits plus importants étant trop irréguliers. Pour vérifier que le mélange est bien homogène à ce débit, l'injection d'une solution de sonde a été effectuée sur une voie, puis sur les deux. Les signaux correspondant à l'injection de la solution sur les deux voies étaient deux fois plus importants que ceux pour l'injection sur une seule voie, ce qui prouve qu'à ce débit le mélange est bien homogène (Figure 104).

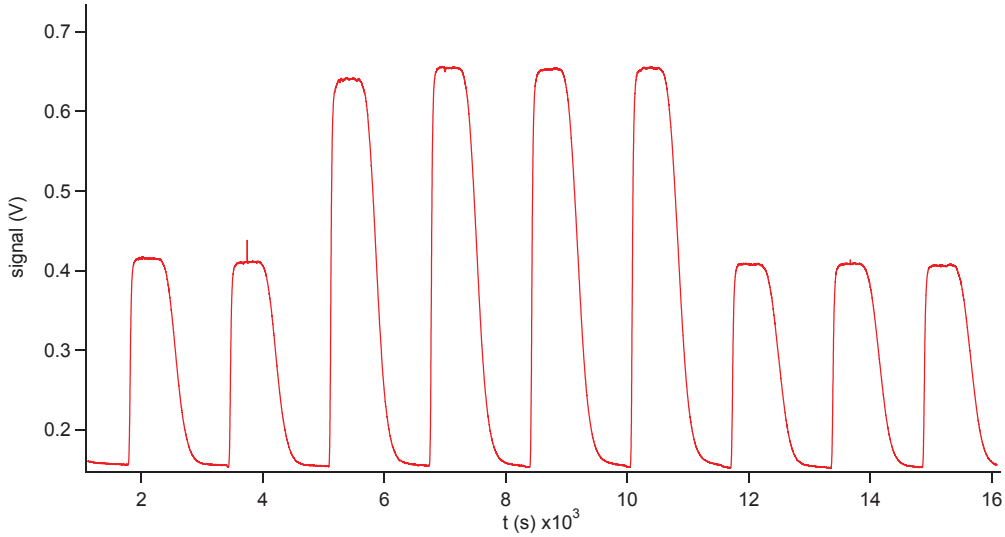


Figure 104 - *Signaux obtenus lors de l'injection d'une solution de sonde sur une et deux voies du circuit micro-fluidique pour un débit de 0,65 mL/h. Palier 1, 2 et 7 à 9 injection de la solution de sonde sur une seule voie. Palier 3 à 6 injections des solutions de sondes sur les deux voies du circuit. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 1,84 µM.*

Nous avons aussi effectué des expériences pour vérifier que ni la sonde ni le césium ne s'adsorbaient dans les capillaires ou sur le circuit. Des concentrations croissantes de césium puis décroissantes ont été injectées (Figure 105), afin de vérifier que la hauteur des paliers ne dépendait pas du palier précèdent. Si la sonde ou le césium s'adsorbe, la hauteur des paliers dans le sens de la montée ne devrait pas être identique à celui de la descente.

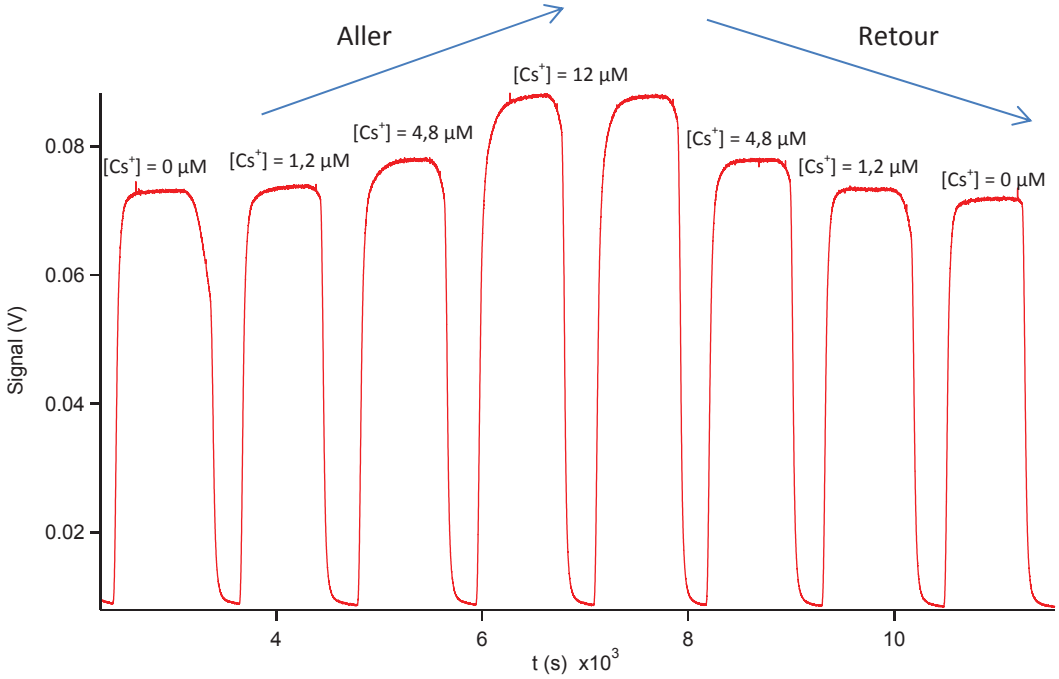


Figure 105 - *Signaux obtenus lors de l'injection de concentrations croissantes puis décroissantes de césium. [Calix-COU-Sul] = 4 µM*

La Figure 105 nous montre que la hauteur des paliers ne semble pas dépendre du palier le précédant. Le calcul de la moyenne et de l'écart type des différents paliers (Tableau 14, Figure 106) confirme cela. La valeur des paliers de césium est indépendante de l'injection de ceux-ci.

$[Cs_+]$ (µM)	S_{aller} (V)	S_{retour} (V)
0	$0{,}07286 \pm 2.10^{-4}$	$0{,}07159 \pm 4.10^{-4}$
1,2	$0{,}07336 \pm 4.10^{-4}$	$0{,}0732 \pm 2.10^{-4}$
4,8	$0{,}07735 \pm 7.10^{-4}$	$0{,}07762 \pm 3.10^{-4}$
12	$0{,}08705 \pm 9.10^{-4}$	$0{,}08727 \pm 6.10^{-4}$

Tableau 14 - *Moyennes et écart-types des paliers de la figure 85*

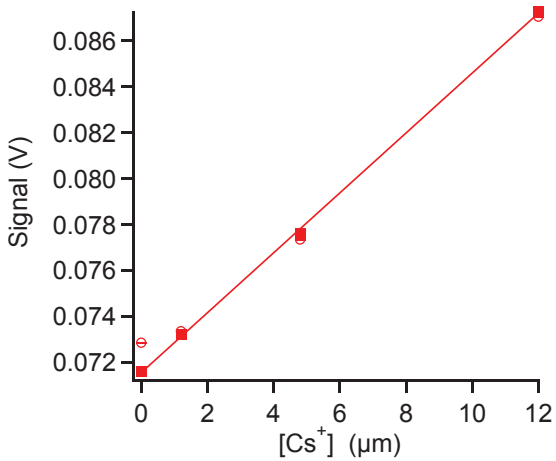


Figure 106 - *Evolution du signal mesuré en fonction de la concentration en césium. Rouge : concentrations croissantes, blanc : concentrations décroissantes, Calix-COU-Sul] = 4 µM*

Un autre paramètre important est le seuil de la ligne de base correspondant au bruit du système. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 104, le retour à la ligne de base entre deux injections ne se fait pas toujours au même niveau. De plus, celle-ci diminue légèrement au fil du temps. Ceci pose la question du choix de la valeur de la ligne de base à prendre pour soustraire la valeur du bruit de celle du palier. Deux solutions sont possibles : effectuer les injections à des laps de temps identiques ou prendre les paliers correspondant à une concentration nulle en césium comme « zéro ». L'injection à des temps réguliers oblige de contrôler l'injection de façon précise.

Nous avons donc préféré prendre les paliers sans césium comme « zéro ». Chaque palier avec césium est ainsi soustrait de la valeur moyenne des paliers sans césium. De plus, pour plus de précision et éviter une dérive, plusieurs paliers à la suite sont effectués pour une même concentration de césium. Ces paliers sont en plus encadrés par des paliers sans césium. La moyenne des paliers d'une concentration de césium est ensuite soustraite de la moyenne des paliers sans césium les entourant. Ainsi, plus simplement, sur la Figure 107 la moyenne des paliers 3 à 5 correspondant à une concentration de 5 µM de césium est soustraite de la moyenne des paliers 1, 2 et 6, 7 correspondant à une concentration nulle en césium.

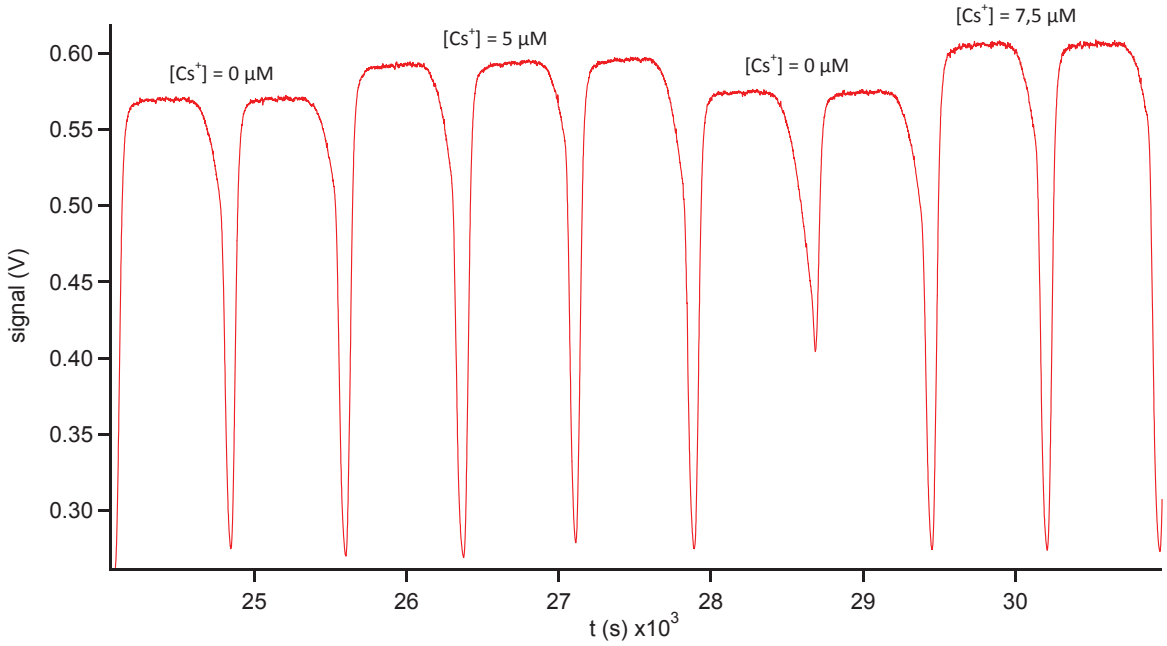


Figure 107 - *Exemple de paliers de césium encadrés par des paliers sans césium. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 1,84 µM.*

Les calculs de moyenne et d'écart type effectués sur différents paliers de même concentration, nous ont de plus montré que la moyenne sur un palier (moyenne temporelle), était équivalente à la moyenne de plusieurs paliers d'une même concentration en césium (moyenne statistique). Les mesures obtenues ainsi sont de plus indépendantes des paramètres liés au circuit. En effet, le niveau de bruit d'un circuit à l'autre varie, la soustraction par la valeur des paliers sans césium permet de s'affranchir de ces paramètres. Les courbes de calibrations et les limites de détection obtenues avec les différentes sondes vont maintenant être présentées.

2) Comparaison des limites de détection du Calix-COU-Alcyne-Sulf en cuve et en circuit microfluidique

La limite de détection du Calix-COU-Alcyne-Sulf en cuve est de 0,6 µM de césium avec 0,44% d'erreur relative. En circuit micro-fluidique celle-ci est de 0,2 µM avec 0,11% d'erreur relative. En effet, l'écart type le plus important sur une mesure est de 0,0008 V, en effectuant le rapport de trois fois la valeur de cet écart type par la pente de la droite, il est possible de déterminer la limite de détection de la sonde qui est de 0,2 µM avec 0,11 % d'erreur. La limite de détection atteinte avec le Calix-COU-Alcyne-Sulf en circuit micro-fluidique est donc plus faible qu'en cuve (Figure 109). Ceci est dû au fait que le rapport signal sur bruit est meilleur en circuit micro-fluidique ce qui permet de descendre plus bas en limite de détection.

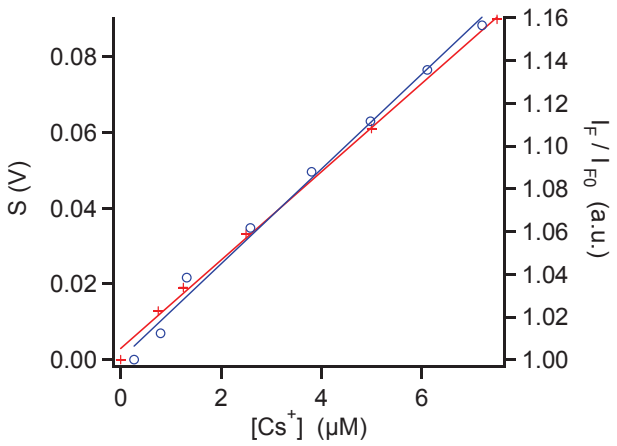


Figure 108 - *Comparaison de la limite de détection en cuve (bleu) et en circuit microfluidique (rouge) du Calix-COU-Alcyne-Sulf. [Calix-COU-Alcyne-Sulf]cuve = 4,7 µM, [Calix-COU-Alcyne-Sulf]circuit = 1,84 µM, solvant = H_2O.*

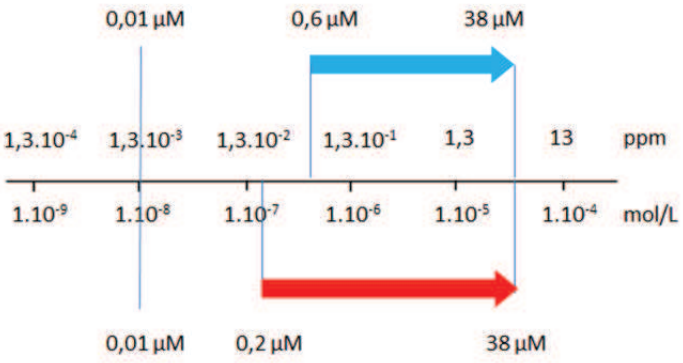


Figure 109 - *Gammes de concentrations de césium mesurables par le Calix-COU-Alcyne-Sulf, en cuve (bleu) et avec le dispositif de micro-fluidique (rouge)*

D. Conclusions et perspectives sur la mesure de césium en circuit microfluidique

Outre l'utilisation d'une nouvelle sonde qui relève de la synthèse organique, l'amélioration du système de mesures actuel pourrait permettre d'augmenter le rapport signal sur bruit et ainsi de diminuer la limite de détection mesurable. Plusieurs modifications sont pour cela envisageables.

Tout d'abord, la disposition des fibres optiques utilisées pour exciter et récupérer la fluorescence pourrait être modifiée. Pour permettre une meilleure excitation de la sonde, la fibre servant à l'excitation pourrait être placée dans l'axe du canal et non plus perpendiculaire à celui-ci, ce qui devrait diminuer la diffusion de la lumière au sein du PDMS, et exciter de manière plus efficace les molécules. La place laissée libre par la fibre d'excitation pourrait être utilisée pour récupérer la fluorescence. Une ou deux fibres optiques pourraient ainsi être placées perpendiculairement de part et d'autre du canal micro-fluidique. La fluorescence serait ainsi récupérée directement au sein du circuit micro-fluidique, ce qui permettrait de s'affranchir d'un système de micromanipulation et rendrait le système plus robuste.

La source d'excitation pourrait aussi être modifiée. A 365 nm - la longueur d'onde d'excitation du Calix-COU-Sulf - seules des LEDs existent, alors qu'à 405 nm - la longueur d'onde d'excitation du Calix-COU-Alcyne-Sulf - des diodes lasers sont disponibles en plus des LEDs. L'intensité de la lumière émise par les diodes lasers peut être beaucoup plus importante que celle des LEDs, ce qui permettrait d'obtenir des signaux plus importants et donc de d'augmenter le rapport signal sur bruit. Avec des signaux plus importants, il serait également possible de remplacer le tube photomultiplicateur par une simple photodiode dont le coût est moindre.

V. Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, de nouvelles sondes pour la détection du césium ont été obtenues. Ces sondes n'ont pour l'instant pas permis de diminuer de manière significative la limite de détection du césium en milieu aqueux. Néanmoins, elles ont permis une meilleure compréhension de certains problèmes. Des modifications de la structure de la sonde, comme le remplacement des groupements sulfonates par des groupements phosphonates pourraient permettre d'obtenir des sondes avec des limites de détection plus basses.

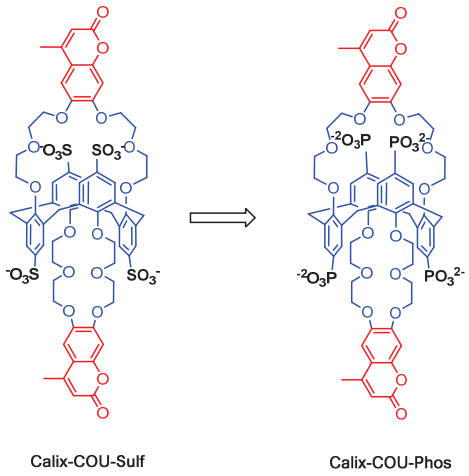


Figure 110 - *Remplacement envisageables des groupements sulfonates par des groupements phophonates.*

En plus des sondes synthétisées, un système de mesures permettant la mesure en continu de césium ou d'autres analytes, a été mis au point. Ce système transportable permet la mesure de concentrations plus faibles de césium grâce à un rapport signal sur bruit plus fort que lors de mesures en cuve. Des améliorations de ce système sont envisageables, d'une part pour augmenter le rapport signal sur bruit et gagner en détection, et d'autre part pour le rendre encore plus robuste.

Chapitre 3. Sondes fluorescentes pour la mesure du potassium extracellulaire

I. Introduction

Ce travail a été effectué en collaboration avec le Dr. Gilles Huberfeld qui s'intéresse à la dynamique de fluctuation spatiale et temporelle de la concentration extracellulaire en potassium dans les activités neuronales et notamment dans la genèse des activités épileptiques, sous-tendues par une décharge neuronale excessive dans son intensité, et dans la mise en jeu hypersynchrone d'une population de neurones. L'objectif de ce projet a été de mettre au point une sonde moléculaire fluorescente permettant la mesure du potassium extracellulaire compatible avec une utilisation biologique dans le but de visualiser les flux de potassium par imagerie de fluorescence lors d'activités neuronales.

A. Rôle du potassium au niveau cellulaire

Le rôle du potassium dans le contrôle du potentiel membranaire et dans le fonctionnement des neurones va être présenté. Nous aborderons ensuite, l'implication du potassium dans les crises épileptiques, ainsi que l'objectif du projet.

1) Rôle du potassium dans le potentiel membranaire

L'existence d'un potentiel membranaire est essentielle au fonctionnement cellulaire. Le potentiel membranaire est dû à une différence de concentrations et de perméabilités des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. A l'état de base, une pompe ATPase dépendante a permis une charge intracellulaire en potassium et une extraction efficace du sodium, le tout étant équilibré par une hyperpolarisation intracellulaire. La concentration en sodium est ainsi plus importante à l'extérieur de la cellule (≈150 mM) qu'à l'intérieur (≈15 mM). Au contraire, la concentration en potassium est plus importante à l'intérieur de la cellule (≈150 mM) qu'à l'extérieur (≈5 mM). En ce qui concerne les charges négatives, les ions chlorures sont les principales charges négatives du milieu extracellulaire. Dans le milieu intracellulaire, les charges négatives sont majoritairement dues à la présence de protéines (A^-) dont la charge globale est négative, et qui ne peuvent pas passer la membrane plasmique (Figure 111).

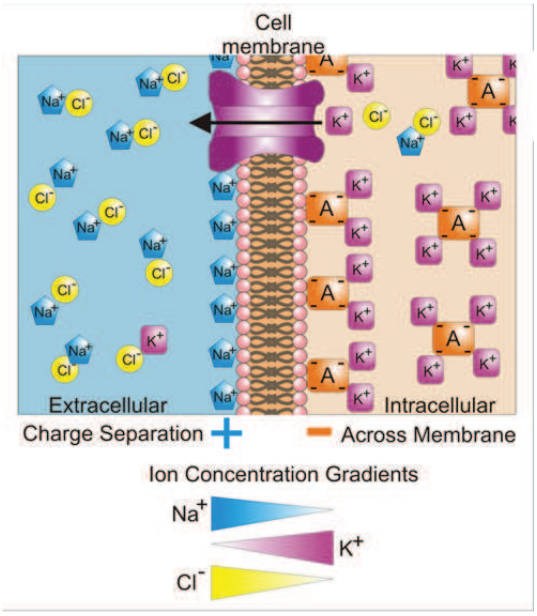


Figure 111 - *Répartition des espèces chargées de part et d'autre de la membrane plasmique*

A l'état de base, un certain nombre de canaux membranaires perméables au potassium sont ouverts- les canaux dits de fuite - alors que de nombreux autres canaux perméables au potassium sont fermés. Leur ouverture dépend de divers facteurs affectant le fonctionnement neuronal. Les concentrations et flux intracellulaires et extracellulaires en potassium sont maintenus grâce à un gradient électrochimique. La sortie de potassium est favorisée par un gradient chimique, mais équilibrée partiellement par un gradient électrique défavorable. Le potentiel membranaire permettant d'équilibrer les gradients électrique et chimique, (nommé potentiel d'inversion) est d'environ -90 mV. Ainsi, au potentiel membranaire de repos, proche de -65mV, le potassium tend à être extrudé du neurone sous l'effet du gradient chimique prédominant. Une perte de charge positive intracellulaire entraîne alors une hyperpolarisation cellulaire inhibitrice, car elle éloigne le potentiel membranaire du seuil d'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants permettant l'excitation cellulaire, c'est à dire l'émission de potentiel d'action. De même, l'ouverture de canaux potassium supplémentaires entraînera une hyperpolarisation cellulaire, ce qui constitue un mode de régulation de l'activité neuronale. Le potassium est par ailleurs un élément clé de régulation du potentiel d'action.

De multiples systèmes neuronaux contribuent à la régulation du potassium intracellulaire. Il existe notamment un lien clé avec la régulation neuronale du chlorure. Une faible concentration intracellulaire en chlorure (4-7 mM en intracellulaire vs 120 mM en extracellulaire) est notamment maintenue par l'extrusion de chlorure par un cotransporteur potassium-chlorure nommé KCC2, dépendant du gradient électrochimique favorable du potassium. Cette régulation du chlorure neuronal est fondamentale, car elle sous-tend l'inhibition neuronale dépendant du neurotransporteur GABA. Les récepteurs canaux au GABA de type A sont perméables au chlorure. Lorsqu'ils sont activés au niveau synaptique par le GABA, une entrée de chlorure portée par son gradient électrochimique (au potentiel de repos de la cellule) permet d'hyperpolariser le neurone, donc de l'inhiber.

Le potassium ne s'accumule pas dans l'espace extracellulaire. Il y diffuse avant d'être recapté par les astrocytes environnants. Ces cellules gliales sont hyperpolarisées (-80mV) et captent le potassium intracellulaire par un mécanisme passif dépendant de gradients tant électrique que chimique favorables, via des canaux spécifiques nommés Kir4.1. Le potassium diffuse ensuite dans l'astrocyte, puis dans le réseau d'astrocytes connectés par des jonctions gap avant d'être relargué à distance lorsque le gradient électrochimique devient favorable à son extrusion.

Ce tamponnage du potassium extracellulaire est fondamental, car une augmentation de sa concentration a des conséquences neuronales importantes. Une augmentation du potassium extracellulaire tend à réduire le gradient chimique donc son efflux. En conséquence, le neurone se dépolarise et devient plus excitable. De plus, lorsque le gradient chimique du potassium se réduit, l'efficacité d'extrusion du chlorure par KCC2 est réduite. L'augmentation du chlorure intracellulaire réduit alors la capacité du neurone à s'inhiber sous l'effet du système de neurotransmission GABAergique.

Les éléments de régulation du potassium intracellulaire et extracellulaire sont donc :

- son extrusion par les neurones selon les canaux membranaires ouverts, le gradient chimique, la polarité membranaire, l'existence et l'abondance de potentiel d'action

- sa diffusion dans l'espace extracellulaire dépendant du volume extracellulaire et des charges électriques qui s'y trouvent

- son tamponnage par les astrocytes.

2) Rôle du potassium dans le fonctionnement neuronal

Les neurones permettent la transmission d'informations à l'aide d'impulsions électriques. Ils se composent de trois parties distinctes, le soma ou corps cellulaire, les dendrites et l'axone (Figure 112). Le corps cellulaire contient le noyau et le cytoplasme de la cellule présentant tous les éléments nécessaires au fonctionnement cellulaire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries). Les dendrites sont le prolongement du corps cellulaire. Elles sont nombreuses et ramifiées et permettent la réception de l'influx nerveux. Elles sont dites « afférentes » car elles conduisent l'influx nerveux induit à leurs extrémités vers le corps cellulaire. L'axone unique permet la conduction du signal électrique du corps cellulaire vers les zones synaptiques. Il est dit « efférent ». La terminaison de l'axone est très ramifiée, on parle d'arborescence terminale. A chaque terminaison se trouve un renflement appelé bouton synaptique, qui fait face sans continuité physique à une dendrite formant ainsi une synapse. Le bouton synaptique appelé élément présynaptique n'est pas en contact direct avec la dendrite appelée élément post synaptique. Ils sont séparés par une fente synaptique de quelques dizaines de nanomètres (Figure 114).

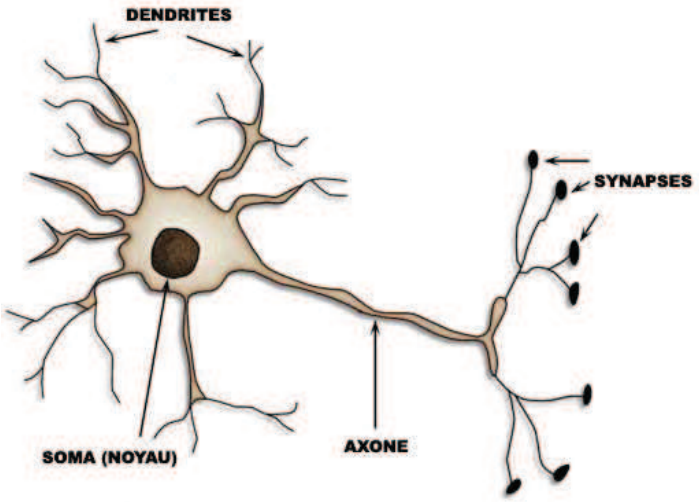


Figure 112 - *Représentation d'un neurone*

Les neurones reçoivent, transmettent et propagent des influx nerveux. L'influx nerveux est une activité électrique transmise le long de l'axone sous forme d'une séquence de potentiel d'action. Le potentiel d'action est une dépolarisation transitoire locale mais propagée, et brève du potentiel membranaire. Il est généré dans le segment initial de l'axone et est propagé le long de l'axone jusqu'aux terminaisons synaptiques. Le potentiel d'action est caractérisé par une entrée importante d'ions sodium (via des canaux sodium voltage-dépendants activés par dépolarisation) entraînant la dépolarisation de la membrane, suivie d'une sortie retardée d'ions potassium pour rétablir le potentiel membranaire de repos (Figure 113). La pompe Na^+/K^+ ATPase permet ensuite de rétablir les concentrations ioniques initiales. L'amplitude des potentiels d'action d'un neurone est toujours la même. L'intensité de l'influx nerveux dépend de la fréquence des vagues de potentiel d'action.

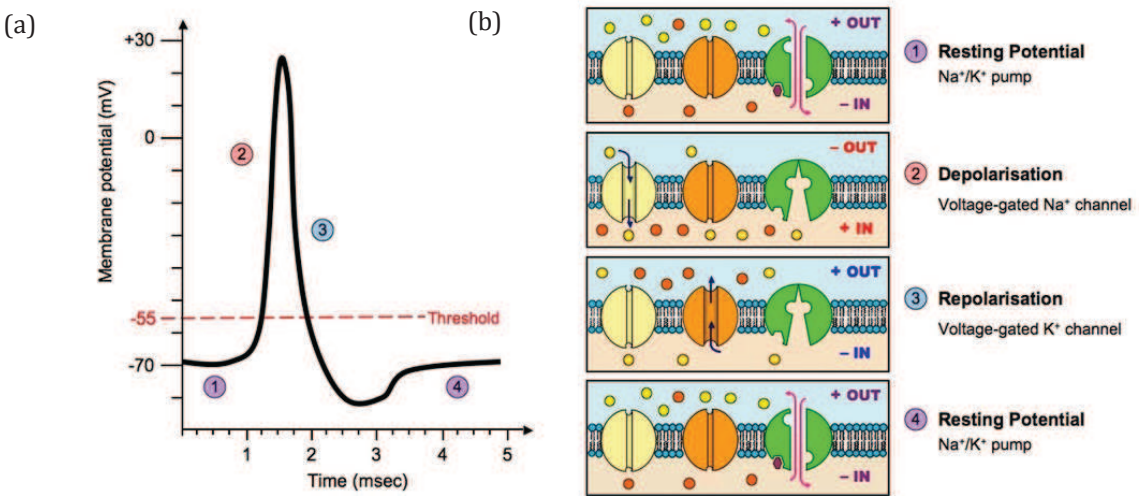


Figure 113 - *Schématisation d'un potentiel d'action (a) et du rôle des différents canaux ioniques (b), jaune : canaux sodium, orange : canaux potassium, vert : pompe Na^+/K^+ ATPase*

Lorsque le potentiel d'action arrive au bouton synaptique, il entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant, induisant une entrée de calcium dans la cellule. (Figure 114). L'intrusion du calcium permet la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, qui par diffusion vont se fixer sur des récepteurs spécifiques présents sur l'élément post-synaptique. La fixation des neurotransmetteurs entraîne l'ouverture de canaux ioniques spécifiques générant des mouvements ioniques transmembranaires. Ces mouvements ioniques transmembranaires modifient la polarisation de la membrane plasmique de l'élément post synaptique. Ils sont transmis le long de l'arborisation dendritique et convergent vers le corps cellulaire, puis vers le segment initial de l'axone. Ils sont donc intégrés tout au long de ce trajet. Leur résultante au segment initial de l'axone, si elle est suffisamment dépolarisante pourra générer un potentiel d'action.

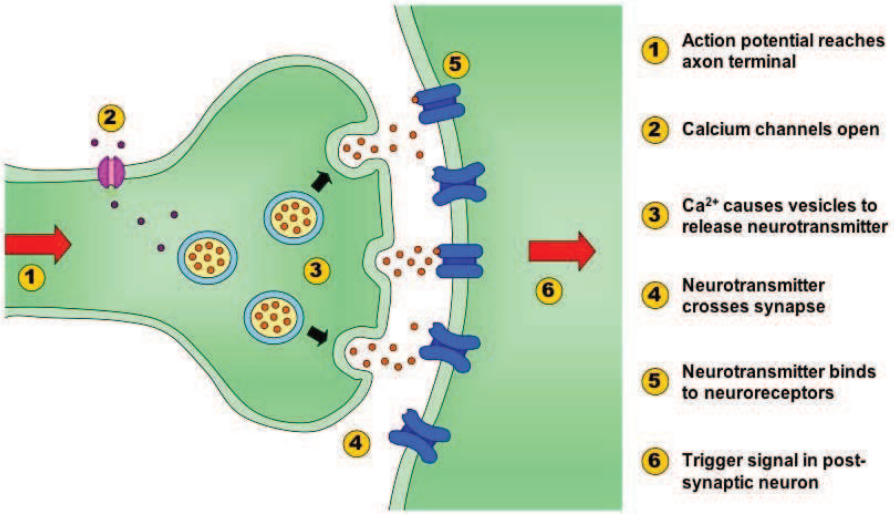


Figure 114 - *Fonctionnement d'une synapse chimique*

L'absence de neurotransmetteurs entraîne l'arrêt de la stimulation nerveuse. Plusieurs mécanismes permettent d'arrêter la libération de neurotransmetteurs. L'un d'entre eux, mineur cependant, repose sur l'ouverture des canaux potassiques. Cette ouverture entraîne un afflux de potassium, ce qui permet de ramener le potentiel membranaire de la membrane à sa valeur

d'origine et d'inhiber les canaux calciques dépendant du potentiel. La diminution du calcium intracellulaire suite à la fermeture des canaux calciques inhibe la libération de neurotransmetteurs.

La propagation et la transmission d'influx nerveux sont liées à des mouvements ioniques transmembranaires, dont des mouvements de potassium. La mauvaise régulation de ces courants ioniques peut être à l'origine de troubles du fonctionnement neuronal, notamment de crises d'épilepsie[138].

3) Potassium et crises épileptiques

Les activités épileptiques sont définies comme des décharges excessives, transitoires et soudaines mais surtout hyper synchrones d'une population neuronale du cortex cérébral. Les origines des crises sont diverses. Elles peuvent survenir à la suite d'un traumatisme, d'une malformation, d'une lésion évolutive ou cicatricielle, ou résulter d'une mutation génétique affectant un type de canal ionique ou un système de neurotransmission. Les crises peuvent entraîner une altération de la conscience, des troubles moteurs, sensoriels, cognitifs ou psychiques[139]. Les crises sont classées en fonction de leurs symptômes, et de l'étendue de neurones qu'elles impliquent. Au niveau cellulaire, les crises sont caractérisées par une excitation, une décharge de potentiels d'action et de synchronisations excessives d'une population de neurones. De nombreux mécanismes cellulaires peuvent y concourir : excitabilité neuronale excessive, excès de neurotransmission excitatrice, insuffisance de neurotransmission inhibitrice, excès de transmission et de synchronisation de l'excitation neuronale. Nombre de ces mécanismes sont sous-tendus par des flux ioniques. Parmi ceux-ci, les flux potassiques semblent d'une importance capitale, bien que jusque-là peu étudiés faute d'outil performant. Un déséquilibre du gradient chimique du potassium rendra le neurone plus excitable à l'état de base et peut concourir à accroitre la fréquence des potentiels d'action, donc la transmission de l'excitation. Ce déséquilibre peut dépendre des régulateurs membranaires du potassium, eux-même liés à la régulation d'autres ions comme le sodium ou le chlorure. Une libération excessive de potassium, éventuellement sous-tendue par une activité neuronale intense lors de la crise ou de sa phase d'initiation peut contribuer à exciter, accroître l'excitabilité des neurones voisins et tend à synchroniser leur activation. Par ailleurs, la régulation du chlorure étant liée à celle du potassium, elle va être affectée et donc influencer directement les capacités d'inhibition neuronale par le GABA. A l'extrême, lorsque la concentration intracellulaire en chlorure croit, la signalisation GABAergique peut même devenir excitatrice, ce qui semble pouvoir hautement contribuer à la genèse des activités épileptiques[140,141,142].

Des fluctuations de concentrations extracellulaires en potassium sont mises en jeu durant les décharges épileptiques[143], une augmentation étant mesurée grâce aux sondes 'ion sensitive dye'. Cependant ces sondes ne mesurent la concentration extracellulaire en potassium qu'à leur pointe et leur résolution temporelle n'est pas bonne, de l'ordre des dizaines de millisecondes au mieux. Il est ainsi délicat d'en inférer une simple participation des flux potassiques ou un rôle causal, générateur de décharges épileptiques. La mesure de la concentration extracellulaire en potassium, avec une dynamique proche de celle des neurones (de l'ordre de la milliseconde) et en de multiples emplacements dans une aire de plusieurs centaines de microns à millimètres, en corrélation avec l'enregistrement de neurones individuels, des processus synaptiques inhibiteurs contribuerait ainsi à l'évaluation du rôle causal et des déterminants d'une augmentation de concentration du potassium extracellulaire.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'activités épileptiques, et en particulier le rôle du potassium extracellulaire, le Dr Gilles Huberfeld effectue des expériences d'électrophysiologie sur des tissus humains épileptiques issus d'ablations de zones du cerveau atteintes par cette pathologie. L'activité neuronale est mesurée à l'aide d'électrodes sous forme de signaux électriques associés aux flux d'ions transmembranaires. Ces expériences permettent donc très indirectement la mesure des flux d'ions transmembranaires, via les phénomènes électriques générés, mais elles ne permettent pas la mesure spécifique des flux de potassium. L'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes du potassium permettrait une visualisation directe des flux de potassium par imagerie de fluorescence et pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes épileptiques. C'est pourquoi nous avons cherché à développer des sondes moléculaires fluorescentes du potassium.

4) Projet : mesure du potassium extracellulaire par imagerie de fluorescence

Le but de ce projet est de mesurer les variations du potassium extracellulaire par imagerie de fluorescence au sein de tranches de tissus cérébraux. Ceci a été envisagé en utilisant une sonde moléculaire fluorescente du potassium. Cette sonde présente dans le milieu extracellulaire, permettrait, en corrélation avec les activités neuronales mesurées électriquement à l'aide d'électrodes, de mesurer optiquement des variations locales de potassium en de multiples endroits par imagerie de fluorescence. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre le rôle du potassium extracellulaire, et si celui-ci est une cause ou une conséquence des crises d'épilepsies. Notre travail a consisté en la synthèse et l'étude de sondes fluorescentes du potassium permettant la mesure des fluctuations du potassium extracellulaire en conditions physiologiques.

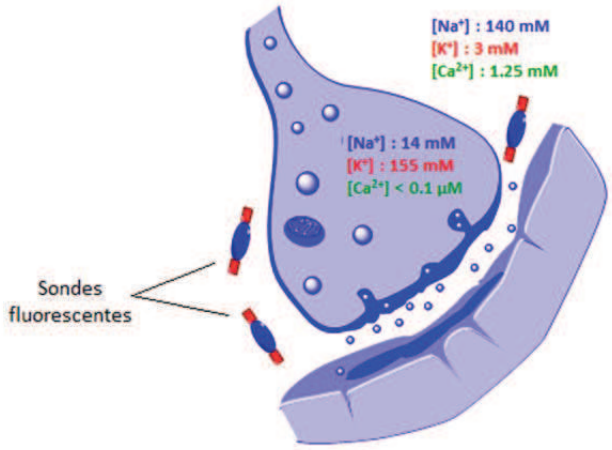


Figure 115 - *Représentation d'une synapse et des sondes fluorescentes envisagées, avec les concentrations intracellulaire et extracellulaires en sodium, potassium et calcium.*

Le développement de sondes fluorescentes pour des applications en milieu biologique implique de multiples contraintes. Les sondes envisagées doivent tout d'abord être parfaitement solubles en milieu aqueux. Elles doivent disposer d'une bonne sélectivité pour le potassium en présence d'une grande quantité de sodium (Figure 115), mais également d'une bonne sensibilité pour le potassium entre 1 et 15 mM, pour permettre la détection de variations millimolaire de potassium. Les propriétés photophysiques du fluorophore doivent aussi permettre des

expériences d'imagerie sur des tissus vivants. La molécule doit donc être excitable dans le visible par un ou deux photons et disposer d'une bonne brillance. En plus de ces contraintes, les cinétiques de formation et de dissociation du complexe sonde/potassium doivent être rapides, afin de pouvoir visualiser de brèves variations de la concentration, comme celles liées aux potentiels d'actions dont l'ordre de grandeur est de la milliseconde.

Les sondes de potentiel membranaire sont des sondes sensibles à la variation du potentiel électrique de la membrane. Ces sondes permettent de visualiser par imagerie de fluorescence l'activité électrique des neurones complétant ainsi les expériences d'électrophysiologie. Des sondes fluorescentes du potassium pour mesurer les variations du potassium extracellulaire permettraient de même de compléter des mesures d'électrophysiologie. Le fonctionnement des sondes de potentiel membranaire va être brièvement présenté avant d'aborder les différentes sondes du potassium existantes.

B. Sondes de potentiel membranaires

La mesure de la variation du potentiel membranaire, à l'aide de fluorophores sensibles au potentiel électrique de la membrane permet une visualisation spatiale et temporelle de l'activité neuronale[144,145]. Ces sondes reposent sur des changements photophysiques lors de la variation ou de l'inversion du potentiel membranaire. Elles se basent soit sur un transfert de charge photo-induit (PCT), soit sur un transfert d'énergie photo-induit (FRET) ou encore un transfert d'électron photo-induit (PET) (Figure 116).

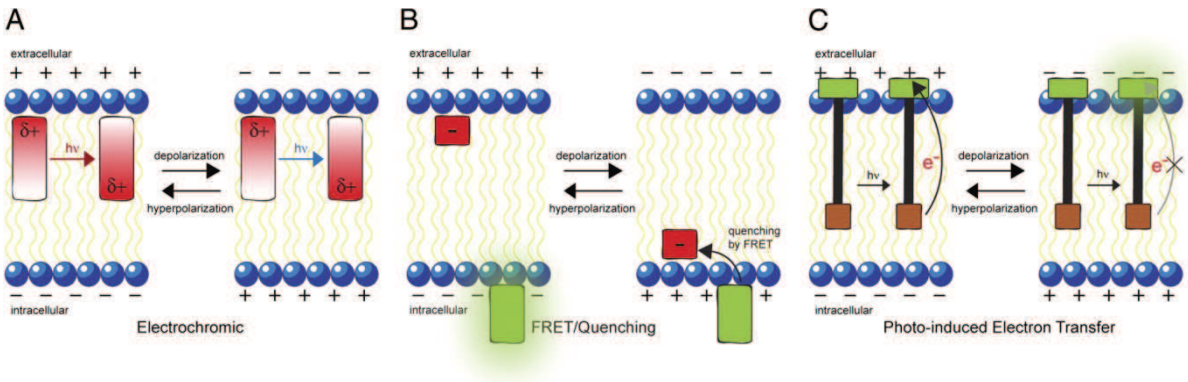


Figure 116 - *Principe de fonctionnement des différentes sondes de potentiel. (a) Sonde de potentiel électrochrome. (b) Sonde de potentiel basée sur un transfert d'énergie photo-induit. (c)Sonde de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit.*[146]

1) Sondes de potentiel électrochrome

Les sondes de potentiel électrochrome sont des fluorophores de type PCT contenant un groupement donneur et un groupement accepteur. Ces molécules se composent d'une partie lipophile et d'une partie hydrophile[147] (Figure 117). La partie lipophile permet à la molécule de pénétrer la membrane plasmique, la partie hydrophile empêche la molécule de traverser entièrement la membrane, ce qui permet d'ancrer la molécule dans la membrane plasmique. Ces molécules à transfert de charge intramoléculaire sont fortement sensibles aux modifications environnementales, comme la variation du potentiel membranaire. Le changement du potentiel membranaire modifie les états électroniques du fluorophore, ce qui se traduit par un

déplacement bathochrome ou hypsochrome des spectres d'absorption et d'émission[148] (Figure 116 A). Ce changement est directement lié à la variation du champ électrique, c'est donc un processus ultrarapide (ps-fs). Par contre, les déplacements spectraux observés sont peu importants et de faible intensité.

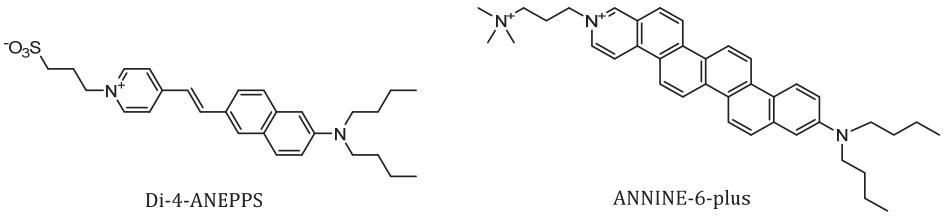


Figure 117 - *Sondes de potentiel électrochrome*

2) Sondes de potentiel basées sur un transfert d'électron photo-induit (FRET)

Ces sondes se basent sur l'efficacité du transfert d'énergie (FRET) entre un fluorophore donneur **69** présent sur la surface externe de la membrane plasmique, et un fluorophore accepteur présent au sein de la membrane plasmique[149,150] (Figure 118). Le fluorophore accepteur de type oxonol est hydrophobe et chargé négativement, ce qui lui permet d'être présent au sein de la membrane et de se déplacer en fonction du potentiel membranaire. Au potentiel de repos, la face interne de la membrane est chargée négativement et la face externe positivement. L'oxonol chargé négativement se trouve sur la face externe de la membrane au voisinage du fluorophore donneur **69**. Un transfert d'énergie efficace entre le fluorophore donneur et accepteur a donc lieu (Figure 118 (a)). Lors de la dépolarisation, la polarité de la membrane est inversée. L'oxonol migre alors vers la partie interne de la membrane diminuant fortement l'efficacité du transfert d'énergie. La fluorescence de l'oxonol accepteur est alors quenchée et celle du fluorophore donneur **69** exaltée (Figure 118 (b)). La vitesse de la réponse dépend de la vitesse de translocation de l'espèce qui est de l'ordre de la milliseconde. Ce type de sonde induit d'importantes modifications photophysiques, mais son temps de réponse de l'ordre de la milliseconde ne permet pas de mesurer une succession d'évènements rapides.

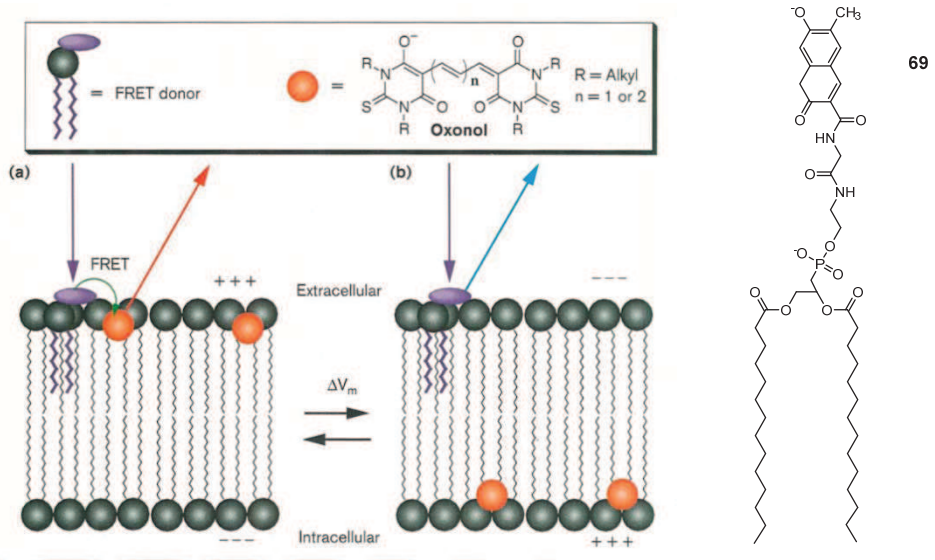
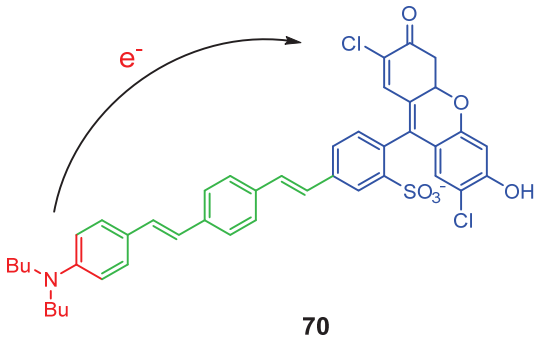


Figure 118 - *Illustration du transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur : (a) au potentiel de repos, (b) lors d'une phase de dépolarisation[151]*

3) Sondes de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit (PET)

Les sondes de potentiel basées sur un transfert d'électron photo-induit (PET)[152,153], combinent les meilleures caractéristiques des deux précédents types de sondes : un temps de réponse rapide et d'importantes modifications spectroscopiques. Le fluorophore est attaché via un espaceur à un groupement dibutylamino riche en électrons ancré dans la membrane plasmique. Au potentiel de repos, le potentiel électrique de la membrane permet un transfert d'électron photo-induit entre le groupement donneur et le fluorophore (Figure 116 C). La dépolarisation inverse le champ électrique membranaire, ce qui empêche le transfert d'électrons photo-induits entraînant une exaltation de la fluorescence du fluorophore (Figure 116 C).



70

Figure 119 - *Exemple d'une sonde de potentiel basée sur un transfert d'électron photo-induit entre le groupement donneur (rouge) et le fluorohore(bleu)* [154]

C. Etat de l'art des sondes moléculaires fluorescentes du potassium

Les différentes sondes fluorescentes du potassium existant à ce jour vont maintenant être présentées, ainsi que leurs modes de fonctionnement, avant de discuter des avantages et des inconvénients que ces différentes sondes peuvent offrir.

1) Sondes commerciales à base d'éthers couronnes

Tsien *et al.* ont développé les premières sondes moléculaires fluorescentes pour la mesure du Na^+ SBFI (Sodium-binding BenzoFuran Isophtalate) et du K^+ PBFI (Potassium-binding BenzoFuran Isophtalate). Ces sondes se composent d'un éther couronne lié à un dérivé de benzofurane[155,156] (Figure 120).

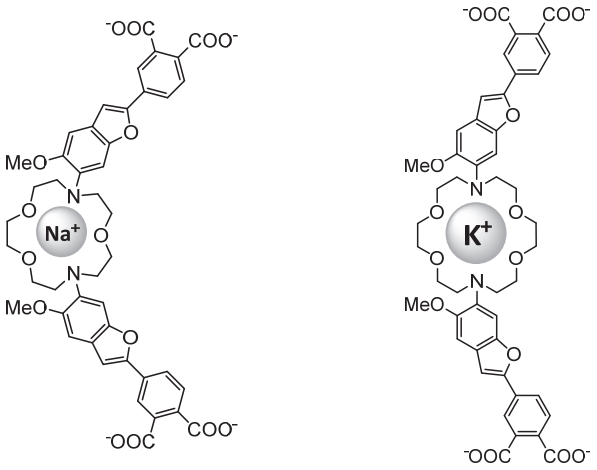


Figure 120 - *Sonde moléculaire fluorescente permettant la mesure de sodium et de potassium*

Ces fluoroionophores de type PET entraînent une large exaltation de la fluorescence suite à la complexation d'un cation, et sont peu sensibles au pH. Basées sur des éthers couronnes, ces sondes permettent une bonne complexation des cations alcalins, mais la sélectivité entre cations alcalins est faible, en particulier la sélectivité K^+/Na^+ du PBFI. Dès lors, la mesure du sodium intracellulaire ou du potassium extracellulaire ne peut pas être effectuée avec ces sondes à cause du large excès de cations interférents par rapport au cation ciblé.

Un autre inconvénient du PBFI et SBFI sont leur excitation dans l'UV, mais ce problème a été résolu avec une nouvelle génération de sondes où le fluorophore de type benzofurane a été remplacé par un fluorophore de type fluoréscéine permettant une excitation à 488 nm (Figure 121), ce qui rend la mesure du sodium extracellulaire, et du potassium intracellulaire plus aisée.

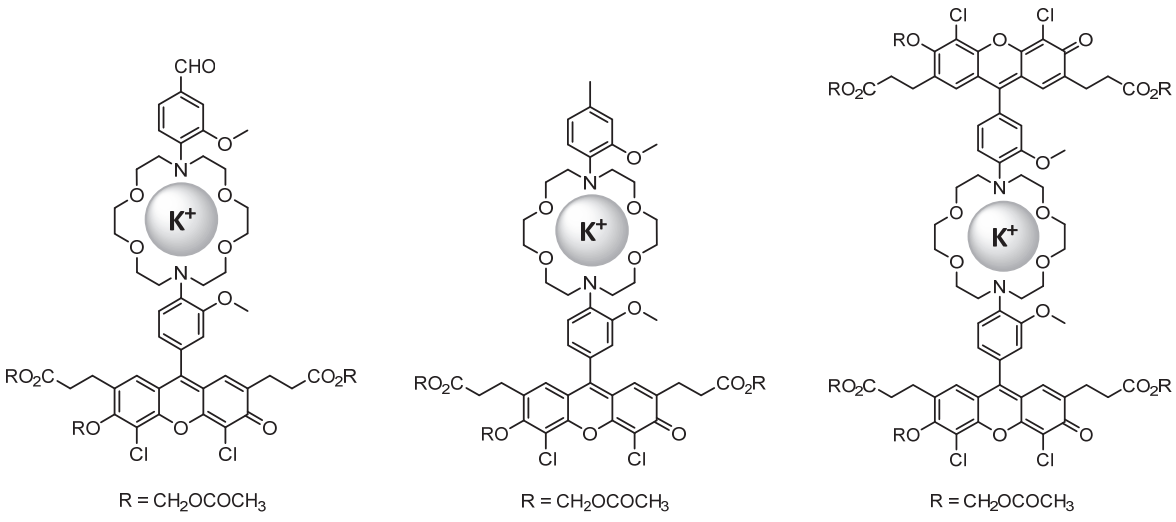


Figure 121 - *Structures des sondes du type Asante-Potassium-Green*[157]

	λ_{exc} ($\lambda_{abs\ max}$) (nm)	λ_{em} (nm)	K_d (mM)	Sélectivité K^+/ Na^+	M (g/mol)
PBFI	340/390	500	5	1,5	1175
APG-1	488 (517)	540	54	-	1100
APG-2	488 (517)	540	18	1-1,2	1100
APG-3	488 (517)	540	20	-	1300

Tableau 15 - *Résumé des caractéristiques des sondes commerciales existantes*

La sélecivité K^+/Na^+ de ces sondes n'est pas pour autant meilleure (Tableau 15), ne résolvant pas le problème de la mesure du potassium extracellulaire.

2) Sondes à base de triazacryptand

Comme cela a été présenté en introduction, le remplacement d'un éther couronne par un cryptand permet d'augmenter la sélectivité pour le cation, grâce à une plus grande rigidité et une meilleure organisation spatiale. Le premier fluoroionophore incorporant un triazacryptand a été synthétisé par Masilamani et *al*[158]. **71** Figure 122. C'est un fluoroionophore de type PET, la complexation du potassium au niveau du cryptand empêche un transfert d'électron photo-induit entre les azotes de la couronne et la coumarine entraînant une exaltation de fluorescence. Cette molécule permet la détection sélective de potassium comprise entre 0 et 10 mM dans des conditions proches du milieu extracellulaire. Cette molécule avec deux azotes aliphatiques a par contre l'inconvénient d'être facilement protonable dans les conditions physiologiques

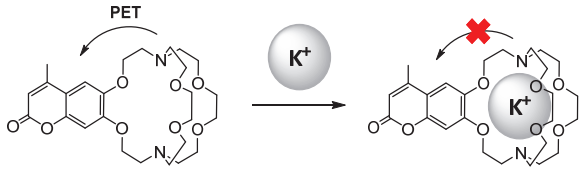


Figure 122 - *Inhibition du transfert d'électron photo-induit entre les azotes et la coumarine à la suite de la complexation du potassium*[159].

Pour éviter cette protonation de Silva[160] molécule **72** et Sammes[161] molécules **73** (Figure 123) ont modifié le squelette du cryptant en remplaçant les azotes aliphatiques par des azotes aromatiques. Ceci a permis de s'affranchir de l'influence du pH, mais la restriction rotationnelle imposée aux azotes entraîne de plus faibles effets photophysiques[162].

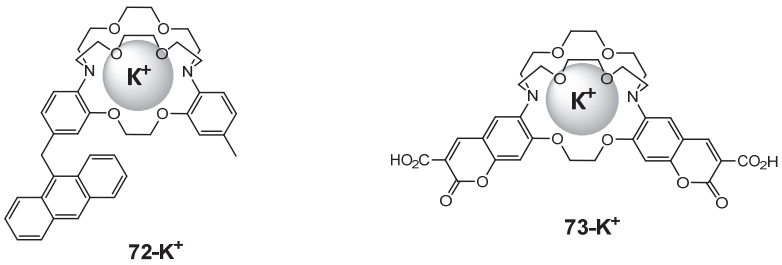


Figure 123 - *Cryptands où les azotes sont aromatiques pour diminuer l'influence du pH*

Suite à cela, He *et al*[163] ont modifié ce cryptand **74** (Figure 124) en insérant une alcoxy-aniline portant un bras éthylène glycol méthylé. Cette entité complexante est liée via un pont éthylène à

une 4-aminonaphthalimide, ce qui permet un transfert d'électron photo-induit entre l'azote de l'alkoxy-aniline et la 4-aminonaphthalimide. L'ajout de potassium inhibe ce transfert entraînant une forte exaltation de la fluorescence. Cette configuration permet à la fois d'être peu sensible au pH, et de permettre une rotation plus libre du cryptant autour de la fonction azote entraînant des effets photophysiques plus importants[164]. L'entité complexante dispose aussi d'une bonne sélectivité K^+/Na^+. Le sodium plus petit ne remplit pas complètement la cage, n'inhibant pas correctement le transfert d'électron. Cette sonde permet donc la mesure de potassium parmi un excès de sodium. Elle a de plus été greffée sur une matrice polymère pour permettre la mesure de la concentration en potassium d'échantillons de sang et de sérum.

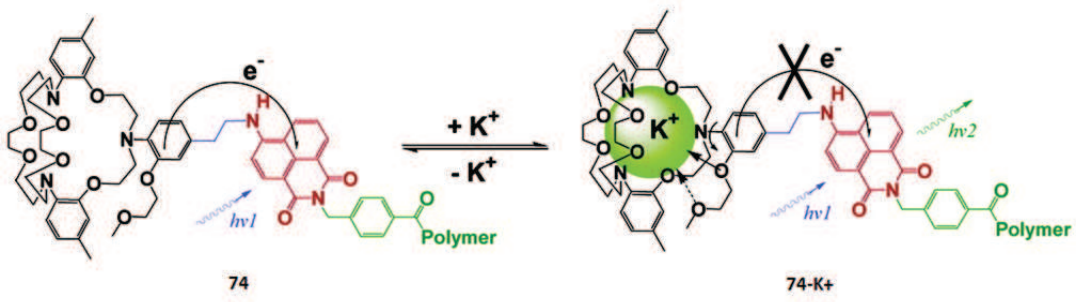


Figure 124 - *Inhibition du transfert d'électron photo-induit en présence de potassium[165].*

Le groupe de Verkman a poursuivi dans cette direction en remplaçant la naphtalimide par une tetramethylrhodamine[166,167]. Le TAC-RED (Figure 125) a ainsi été utilisé pour des mesures de potassium extracellulaire sur des tissus neuronaux de souris. Malheureusement, la molécule seule est en partie internalisée par les cellules. Pour éviter cela, la Rhodamine a été remplacée par un BODIPY[168,169] **75** portant en β des fonctions acides carboxyliques. Ces fonctions leur ont permis de conjuguer la sonde à des chaînes de dextroses, assurant son maintien dans le milieu extracellulaire. L'équipe de Verkman a aussi effectué un important travail de synthèse, tout d'abord en obtenant un ionophore plus sélectif du potassium **76** [170] en remplaçant au sein du ligand les groupements aminophénoxy par des groupements bis-imidazole. Mais surtout, en optimisant la synthèse crytand[171] de départ en divisant le nombre d'étapes de synthèse par deux, permettant un accès plus facile à ce type de ligands.

TAC-Red R = CH3 **75** **76**
77 R = H

Figure 125 - *Sondes moléculaires fluorescentes du potassium à base de cryptands*

3) Sondes à base de complexe de lanthanides

Une autre piste intéressante est l'association de complexes de lanthanides luminescents à une entité de reconnaissance du potassium. L'intérêt des complexes de lanthanides est leur longue durée de vie de luminescence, ce qui est intéressant pour des applications en biologie[172]. Suite à

l'excitation, le retard d'émission de la sonde permet de s'affranchir de la fluorescence des tissus et de récolter ensuite uniquement la luminescence de la sonde. Les complexes de lanthanides peuvent être excités directement ou couplés à une antenne excitatrice qui une fois excité transférera son énergie d'excitation au complexe de lanthanide qui se désexcitera de manière radiative. Les sondes décrites se basent soit sur l'inhibition d'un transfert d'électron entre l'entité complexante et l'antenne excitatrice[173], soit sur un changement conformationnel de la molécule modifiant le transfert d'énergie entre l'antenne et son complexe[174].

Les sondes (Figure 126) synthétisées par Gunnlaugsson **78**[175] et Wong **79**[176] se basent sur l'inhibition d'un transfert d'électron photo-induit entre l'entité complexante et l'antenne excitatrice en présence de potassium (Figure 127).

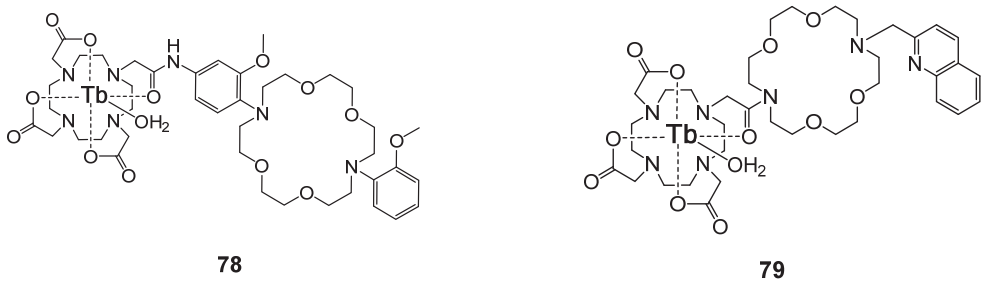


Figure 126 - *Sondes moléculaires fluorescentes basées sur l'inhibition d'un transfert d'électron entre l'entité complexante et l'antenne du complexe de lanthanide*

En l'absence de potassium, un transfert d'électron photo-induit entre l'azote de l'éther couronne et l'antenne excitatrice empêche un transfert d'énergie efficace entre l'antenne et son complexe. La complexation de potassium permet l'inhibition du transfert d'électron photo-induit, ce qui augmente l'efficacité du transfert d'énergie entraînant une exaltation de la luminescence du complexe de lanthanide (Figure 127).

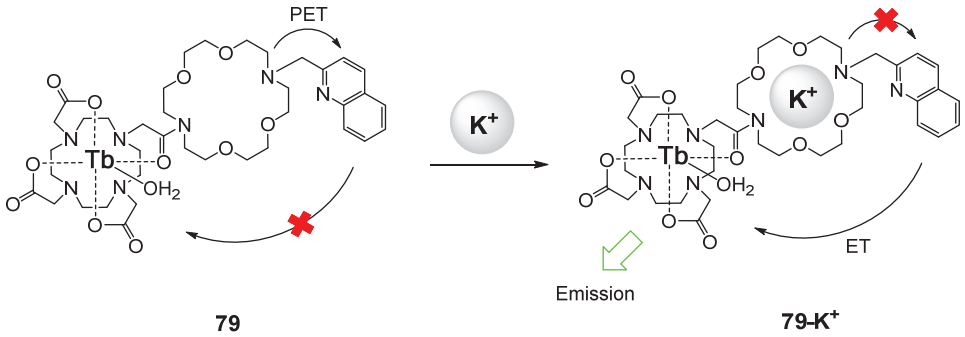
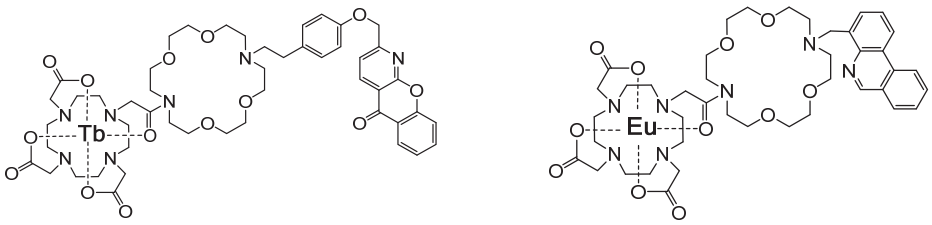


Figure 127 - *Exaltation de la luminescence du complexe de lanthanide suite à l'inhibition du transfert d'électron photo-induit*[177]

Les sondes (Figure 128), en plus de l'inhibition d'un transfert d'électron photo-induit, s'appuient sur le changement de conformation de la molécule à la suite de la complexation de potassium[178,179]. De la distance entre l'antenne et le complexe de lanthanide dépend l'efficacité du transfert d'énergie. En l'absence de potassium, le fluorophore utilisé comme antenne excitatrice est trop éloigné du complexe de lanthanide pour réaliser un transfert d'énergie efficace, entraînant une faible luminescence du complexe de lanthanide (Figure 129). La complexation du potassium par l'éther couronne entraîne un changement de conformation de la molécule, l'antenne excitatrice participant à la coordination du potassium via des interactions π.

Avec cette nouvelle conformation, l'antenne est nettement plus proche de son complexe, augmentant l'efficacité du transfert d'énergie et donc la luminescence de celui-ci. Le sodium de plus petite taille, peut lui aussi être en partie complexé par le cycle, mais sans effectuer d'interaction π, ce qui n'entraîne pas d'augmentation significative de la luminescence. Dans le cas de la molécule **81**, c'est l'azote de la phénantridine qui participe à la complexation du potassium.



80 **81**

Figure 128 - *Sondes moléculaires fluorescentes basées sur le changement de conformation de la molécule suite à la complexation de potassium.*

Ces sondes avec ce mécanisme de détection intéressant, ont une meilleure sélectivité K^+/Na^+ que des éthers couronnes classiques. La molécule **80** présente une large exaltation de la fluorescence suite à la complexation de potassium, mais n'est pas soluble dans l'eau. La molécule **81** soluble dans l'eau dispose quant à elle d'une exaltation de fluorescence beaucoup plus faible.

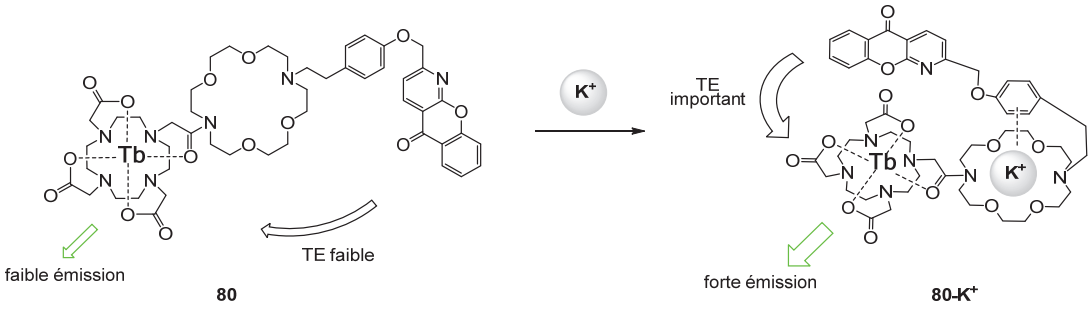
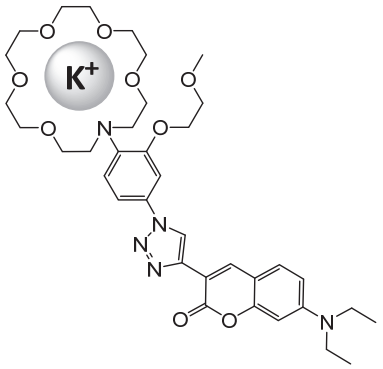


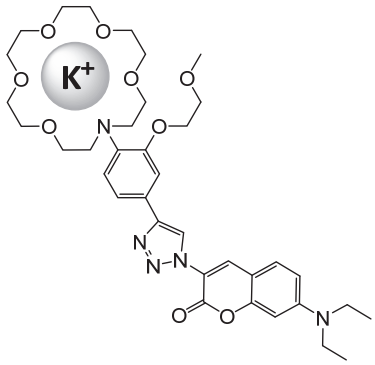
Figure 129 - *Exaltation de la luminescence du complexe de lanthanide suite au rapprochement de l'antenne de son complexe*[180]

4) Sondes à bases d'éthers couronnes modifiés

Dernièrement, des sondes moléculaires fluorescentes basées sur un éther de couronne disposant d'un bras « 2-methoxyethoxy » (Figure 130) ont permis d'augmenter par 10 la sélectivité de la sonde pour le potassium[181]. Ce type de bras introduit par Gokel et al.[182], comme pour les cryptands, permet une meilleure coordination du potassium et donc une plus grande stabilisation du complexe formé. Cette simple modification permet la détection sélective de concentration de potassium comprise entre 2 et 100 mM. Un motif triazole a été utilisé pour attacher le fluorophore à l'ionophore, permettant l'introduction simple de différents fluorophores. Ainsi, des sondes avec une sélectivité pour le potassium améliorée sont ainsi accessibles en peu d'étapes. La molécule **83** dont les propriétés photophysiques sont les plus intéressantes, a été incorporée au sein d'une matrice polymère pour la réalisation d'un capteur permettant l'analyse de solutions de potassium[183].



82



83

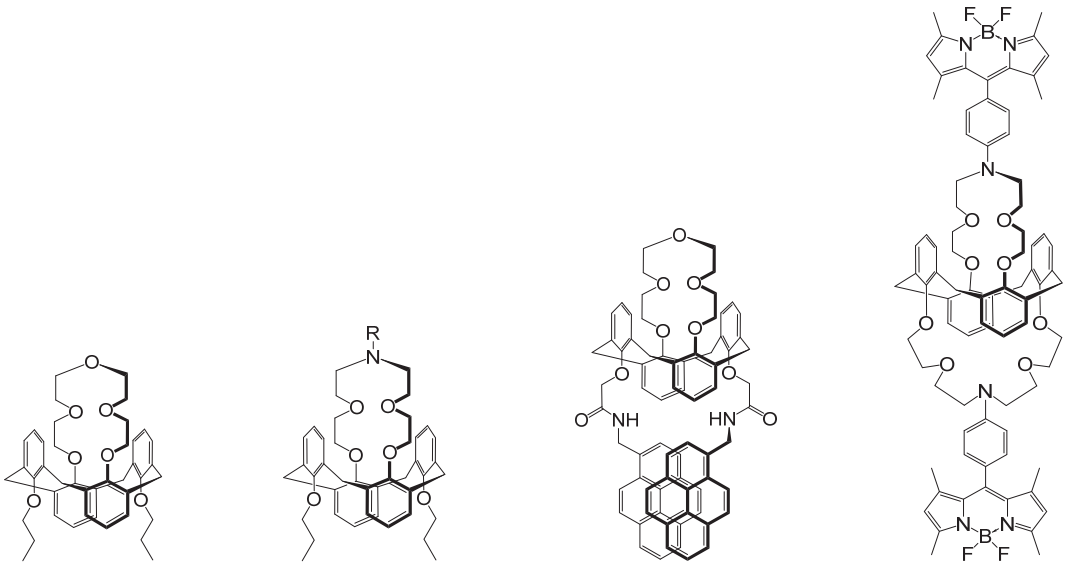
Figure 130 - *Sondes moléculaires fluorescentes à base d'éther de couronne fonctionnalisé*

Bien que disposant d'une meilleure sélectivité pour le potassium, l'augmentation de fluorescence lié à la complexation du potassium entre 0 et 20 mM de K^+ est faible. De plus ces molécules comme le PBFI et les sondes à base de cryptands disposent d'une bonne pénétration cellulaire, ce qui est un inconvénient pour la mesure de potassium extracellulaire. Ces sondes sont donc plus adaptées à la réalisation de capteurs.

5) Sondes à base de Calix[4]arène-couronne

Une autre famille de molécule dispose de bonnes propriétés de complexation vis à vis des cations alcalins : les calix[4]arène-couronnes. Ces molécules sont constituées d'un socle calix[4]arène fonctionnalisé sur leur partie inférieure par un éther couronne cyclique de taille variable, et permettent une détection sélective des cations alcalins[184]. Le socle calix[4]arène apporte une rigidité à l'éther couronne et l'empêche de pouvoir s'adapter à la taille de cations plus petits garantissant une sélectivité de complexation. Dans le cas du potassium, le calix[4]arène- couronne-5 molécule **84** dont l'éther couronne comprend 5 atomes d'oxygène a montré une bonne sélectivité par rapport au sodium dans les solvants organiques. Cette sélectivité s'explique d'une part par la taille de l'éther couronne utilisé, mais aussi par la conformation 1,3-alternée prise par le calixarène. En effet Shinkai et al[185] ont montré que la conformation cône permet une complexation sélective du sodium, avec sa coordination par les atomes d'oxygène. Alors que la conformation 1,3-alternée permet la complexation de cations alcalins plus gros et plus polarisable tel que K^+ et Cs^+ par l'établissement d'interactions π avec les cycles aromatiques environnants. Différentes sondes moléculaires fluorescentes utilisent ce type de structures, comme la molécule **86**[186]. Cette molécule dispose de deux sites de complexation différents : l'éther couronne permet la complexation du potassium, et les fonctions amides, la complexation du plomb. En l'absence de plomb, on observe la présence d'excimères du pyrène. L'ajout de plomb entraîne leurs disparitions par complexation de celui-ci. L'ajout de potassium permet d'éjecter le plomb et de retourner à la situation initiale et inversement. L'éther couronne peut aussi être modifié. La molécule **85** où l'oxygène central de l'éther couronne a été remplacé par un azote a montré la même sélectivité en milieu organique vis-à-vis du potassium[187]. Cet azote permet la fonctionnalisation de l'éther couronne, avec l'ajout par exemple d'un fluorophore pour obtenir une sonde moléculaire fluorescente spécifique du potassium. C'est par exemple ce qui a été fait pour la molécule **87** synthétisée au laboratoire, où un calix[4]-bis-aza-couronne-5 a été substitué par deux bodipys[188]. Cette molécule dispose d'une excellente

sélectivité K^+/Na^+ et d'une très forte exaltation de fluorescence en solvant organique suite à l'ajout de potassium.


F
B
F
N
N
N
O
O
O

II. Sondes fluorescentes à base de Calix[4]arène-bis-aza-couronne-5

Le Calix-Aza-Bodipy est un calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 portant deux bodipys à chaque extrémité (Figure 133). Cette molécule précédemment synthétisée au laboratoire[189], a été le point de départ de ce travail. En effet, cette molécule dispose dans les solvants organiques d'une bonne sensibilité pour le potassium dans la gamme visée de concentrations, et d'une bonne sélectivité potassium/sodium. Sa synthèse et ses propriétés photophysiques et complexantes seront donc rappelées avant d'aborder le travail effectué.

A. Rappel de la synthèse et des propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy

1) Synthèse du Calix-Aza-Bodipy

L'intermédiaire clé de la synthèse est le calix-aza-aldéhyde (Figure 132) sur lequel sont introduits les bodipys en fin de synthèse. La synthèse du calix-aza-aldéhyde débute par la formylation de l'aniline diglycolée **88**, suivant les conditions de la réaction de Duff[190]. La molécule formylée **89** a ainsi été obtenue avec 39% de rendement. Les fonctions alcools de cette molécule ont ensuite été transformées en bons groupes partants pour permettre le greffage de la molécule sur le calix[4]arène. En utilisant le chlorure de tosyle en présence de triéthylamine, la molécule ditosylée **90** a été obtenue avec 71% de rendement. Deux équivalents de cette molécule ont ensuite été greffés sur un calix[4]arène en présence de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile. Après quatre jours au reflux et purification, le calix-aza-aldéhyde en conformation 1,3 alternée a été isolé avec 37% de rendement. La réaction de greffage a été facilitée par la présence du K_2CO_3. En effet, le potassium est coordiné par l'azote et les chaînes éthylène glycol, ce qui permet une préorganisation de la molécule **90** facilitant son greffage sur le calix.

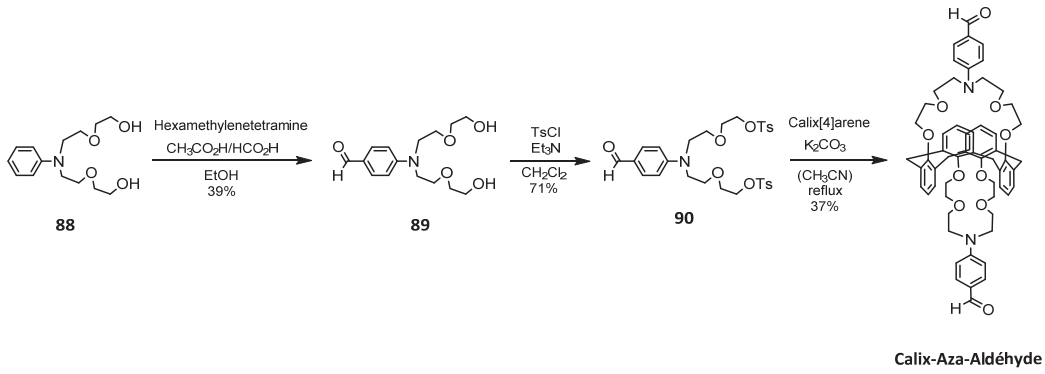


Figure 132 - *Synthèse du Calix-Aza-Aldéhyde*

La calix-aza-bodipy a été obtenu à partir du calix-aza-aldéhyde et de diméthylpyrole suivant les conditions habituelles de synthèse des bodipys (Figure 133). Après purification sur colonne, le produit a été précipité dans un mélange dichlorométhane-méthanol et isolé sous forme d'une fine poudre rouge avec 23% de rendement.

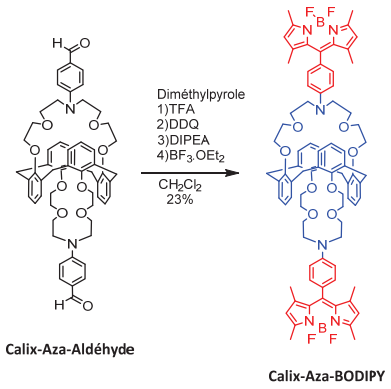


Figure 133 - *Synthèse du Calix-Aza-Bodipy*

Les propriétés photophysiques et complexantes du calix-aza-bodipy ont ensuite été étudiées dans différents solvants organiques.

2) Propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy

Le spectre d'absorption de la molécule se compose d'une bande étroite centrée vers 500 nm avec un léger épaulement, ce qui est caractéristique des bodipy. Sa forme n'est pas influencée par la polarité du solvant, mais le maximum est lui légèrement déplacé vers les plus basses longueurs d'ondes en passant de l'hexane à l'acétonitrile (Figure 134). Le coefficient d'absorption molaire de la molécule dans l'acétonitrile est de 140 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ et correspond à une transition $S_0 - S_1$. La valeur du coefficient d'absorption molaire est à peu près au double de la valeur du coefficient d'absorption molaire d'un bodipy seul[191], ce qui montre qu'à l'état excité les deux fluorophores n'interagissent pas ensemble.

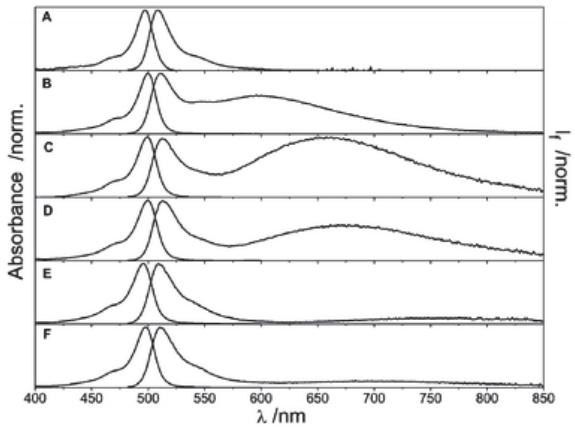


Figure 134 - *Spectres d'absorption et d'émission du Calix-Aza-Bodipy dans différents solvants. (A) hexane, (B) 1,4-dioxane, (C)THF, (D) CH_2Cl_2, (E) CH_3CN, (F) EtOH*

Au contraire, le spectre d'émission de la molécule dépend fortement de la nature du solvant (Figure 134). Dans un solvant non polaire comme l'hexane, une bande fine et intense, et image dans un miroir du spectre d'absorption est émise. Elle est issue de l'état localement excité (LE). Lorsque la polarité du solvant augmente, la fluorescence diminue fortement et une seconde bande apparait autour de 630 nm. Cette bande est issue d'un état de transfert de charge (CT) qui se forme à l'état excité. Avec l'augmentation de la polarité du solvant, cette bande est déplacée vers les plus hautes longueurs d'ondes et son intensité diminue jusqu'à disparaitre, la fluorescence n'étant pas pour autant restaurée.

Solvant	λ_{abs}	λ_{em} (LE)	λ_{em} (CT)	ϕ_{CT}/ϕ_{LE}	ϕ_F
Hexane	498	509	—	0	0.28
Dioxane	499	512	596	3,98	0,052
CHCl3	502	514	609	2,28	0,043
THF	499	512	658	5,34	0,019
CH2Cl2	500	513	672	3,03	0,014
MeCN	496	509	-	0	0,003
EtOH	498	512	-	0	0,006
MeOH	498	509	-	0	0,008

Tableau 16 - *Propriétés photophysiques du Calix-Aza-Bodipy dans différents solvants*

Dans un solvant suffisamment polaire, la présence du groupement amino donneur conjugué au bodipy accepteur entraîne, à l'état excité, l'apparition d'un rapide transfert de charge intramoléculaire (CT). Ce transfert de charge est ensuite suivi d'une désexcitation non radiative. Ce processus plus rapide qu'une désexcitation radiative explique pourquoi la fluorescence de la molécule est quenchée dans des solvants polaires.

3) Effets de la protonation et de la complexation

En conditions acides, la protonation de l'azote entraîne une très forte exaltation de la fluorescence sans déplacement des spectres. Alors qu'en absorbance un déplacement bathochrome de 3 nm des spectres est observé. Dans l'éthanol, le rendement quantique passe ainsi de 0,03 à 0,67. La même exaltation de fluorescence est observée avec la complexation de cations. (Figure 136 (b)).

En l'absence de cation ou lorsque l'amine n'est pas protonée, le transfert de charge intramoléculaire (CT) entre l'azote et le bodipy gouverne la désexcitation de la molécule. La protonation ou la complexation de cation diminue la densité électronique de l'amine, ce qui entraîne une diminution de la vitesse du transfert de charge intramoléculaire. La désexcitation radiative (LE) redevient alors compétitive avec le transfert de charge (CT), ce qui explique l'exaltation de la fluorescence observée (Figure 135).

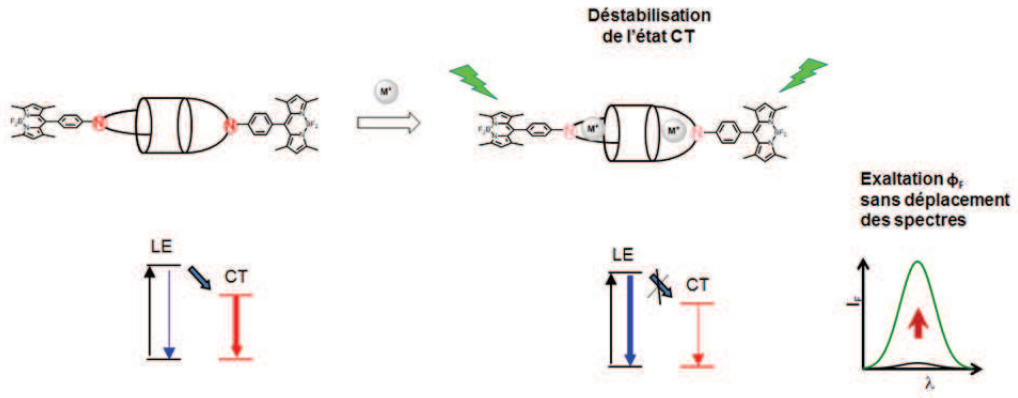


Figure 135 - *La complexation du potassium entraîne une déstabilisation de l'état CT, augmentant la probabilité de désexcitation à partir de l'état LE.*

Parmi les différents cations testés, le potassium a induit les effets photophysiques les plus importants. L'augmentation de la fluorescence est même linéaire entre 0 et 20mM de potassium

qui est la gamme visée de concentration. Des essais de compétition ont aussi montré une très bonne sélectivité K^+/Na^+ avec un $K_{11}(K^+)/ K_{11}(Na^+) > 1300$ dans l'acétonitrile. La complexation du second cation n'est par contre pas facilitée $K_{21} << K_{11}$ avec Log K_{11}. = 4,32 ± 0,04 et Log K_{11}. = 1,73 ± 0,04. Comme pour le Calix-COU-2, la faible distance entre les deux sites de complexation et la répulsion électrostatique existante entre les deux cations impliquent que la complexation du second cation ne soit pas favorisée.

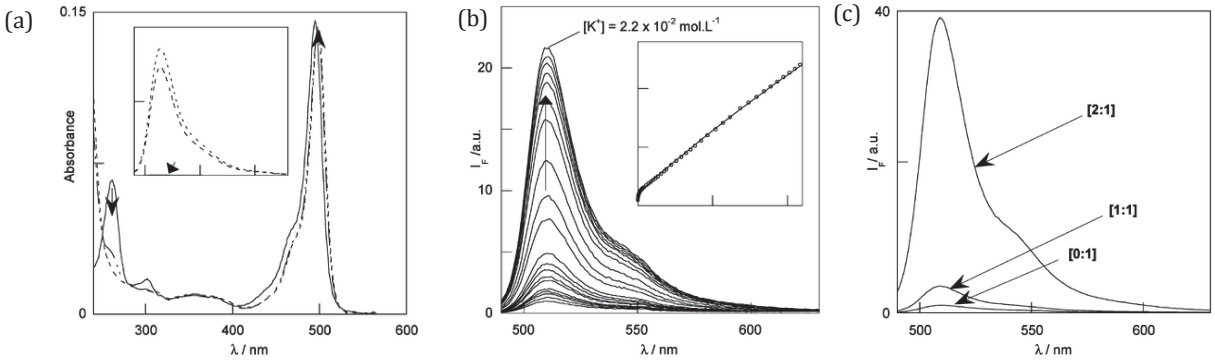


Figure 136 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) du Calix-Aza-Bodipy avec l'ajout de potassium. [L] = 0,7 µM, λ_{exc} = 475 nm, Solvant = EtOH. (c) Spectre d'émission du ligand L seul, et des complexes ML et M_2L reconstruits à l'aide du logiciel specfit*

Bien que cette molécule ne soit pas soluble dans l'eau, des essais de complexation dans un mélange eau/éthanol (1/3) en présence de sodium se sont montrés très encourageants (Figure 137), la fluorescence étant multipliée par un facteur deux entre 0 et 4 mM de potasssium.

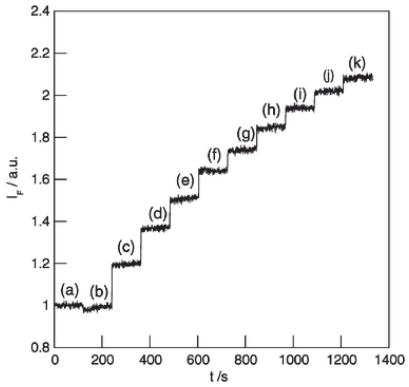


Figure 137 - *Evolution de l'Intensité de la fluorescence du Calix-Aza-Bodipy avec l'ajout de potassium dans un mélange eau-méthanol (1/3). [L] = 0,-µM, λ_{exc} = 475 nm, λ_{em} = 515 nm. Concentration Na^+/K^+ ajoutées (mM): (a) 0/0; (b) 44/0; (c) 44/0.52; (d) 44/1.05; (e) 44/1.57; (f) 44/2.1; (g) 44/2.62; (h) 44/3.15; (i) 44/3.67; (j) 44/4.2; (k) 44/4.72.*

4) Conclusions sur le Calix-Aza-Bodipy

Les études des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-Aza-Bodipy montrent que celui-ci dispose d'une bonne sélectivité Na^+/K^+ et d'une très bonne sensibilité pour le potassium dans la gamme fixée de concentration. Son maximum d'absorption qui se situe à 475 nm ce qui permettrait de travailler avec un laser Argon ionisé (λ_{exc} = 477 nm). Le seul problème est que celui-ci n'est pas soluble en milieu aqueux comme bon nombre de calixarènes. Mais comme il a été décrit en introduction, différents groupements permettent la solubilisation des calixarènes en milieu aqueux (PEG, phosphonates, carboxylates, amoniums…). Nous avons dans notre cas choisi d'insérer des groupements sulfonates via une réaction de chloro-sulfonation, comme cela

a déjà été effectué au laboratoire[192] pour tenter d'obtenir un analogue hydrosoluble du Calix-Aza-Bodipy (Figure 138). La rétrosynthèse envisagée ainsi que les deux voies de synthèse explorées et les résultats spectroscopiques vont maintenant être présentés.

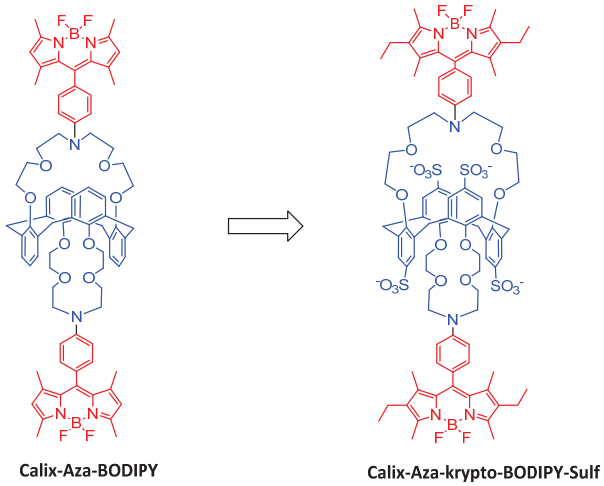


Figure 138 - *Modification du calix-Aza-Bodipy envisagée.*

B. Calix-Aza-Bodipy-Sulf

1) Rétrosynthèse envisagée

Pour la synthèse de notre molécule cible, le Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf, une approche plus convergente a été envisagée (Figure 139). En effet, la synthèse précédemment décrite est purement linéaire. L'entité complexante est dans un premier temps synthétisée, puis les bodipys sont construits à partir des fonctions aldéhydes. Cette étape avec un rendement faible en fin de synthèse est un problème pour l'obtention de quantités importantes de produit.

Nous avons donc envisagé une synthèse plus convergente, où le fluorophore et l'ionophore seraient synthétisés séparément, puis attachés l'un à l'autre de manière efficace en fin de synthèse, juste avant l'étape de sulfonation (Figure 139). Les réactions pallado-catalysées sont un moyen simple et efficace pour créer ce type de liaison. L'ionophore un calix-bis-aza-couronne-5 **91** et le bodipy **92** seraient ainsi construits séparément, puis liés en fin de synthèse via une réaction pallado-catalysé, dans notre cas une réaction d'Hartwig-Buchwald[193,194].

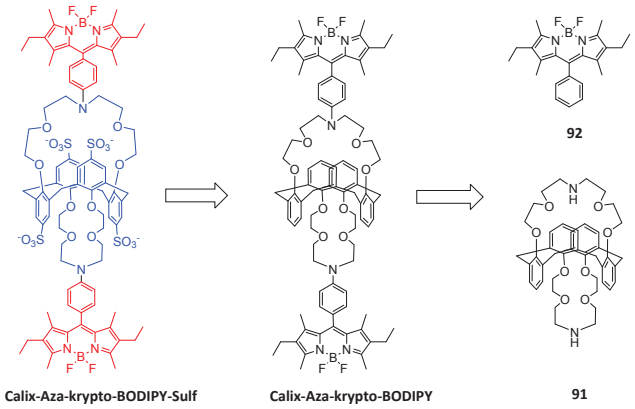


Figure 139 - *Rétrosytnhèse envisagée du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf*

Nous avons aussi choisi de remplacer le bodipy précédemment utilisé non substitué en β, par un krypto-bodipy substitué en β. En effet, l'acide chlorosulfonique[195] permet l'insertion de groupements sulfonates sur les bodipy en position β (Figure 140). Le krypto-bodipy a aussi l'avantage d'avoir ses spectres d'absorption et d'émission déplacés d'une vingtaine de nanomètres vers les plus hautes longueurs d'ondes.

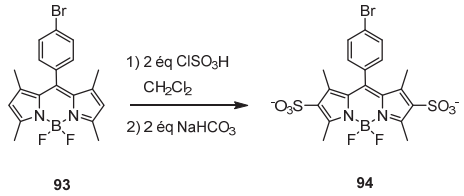


Figure 140 - *Insertion de groupements sulfonates en β en présence d'acide chlorosulfonique*[196]

La synthèse du Calix[4]-bis-aza-couronne-5 **91** a été décrite par Kim et al.[197] (Figure 141). Celle-ci n'a pas été effectué par greffage de deux molécules diglycolées comme précédemment (Figure 132), mais par l'ajout de quatre chaînes diéthylène glycol dans un premier temps, puis la formation des éthers couronnes par cyclisation dans un second temps. La cyclisation a été effectuée par une double substitution nucléophile entre un équivalent de *p*-toluenesulfonamide et deux chaînes ethylènes glycol chlorées. Une fois la sulfonamide formée, le groupement tosyle présent sur l'amine a été retiré, pour obtenir le composé nu **91**. Cette déprotection a été effectuée en présence d'amalgame de sodium Na(Hg) de Na_2HPO_4 dans un mélange dioxane/MeOH (5/1) au reflux du méthanol.

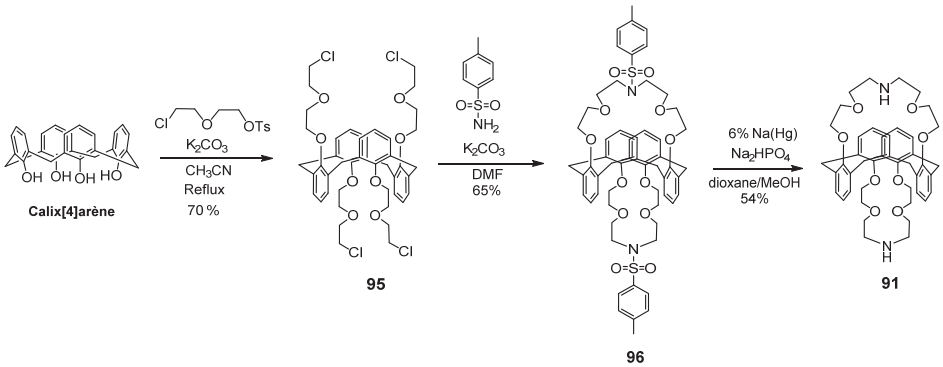


Figure 141 - *Synthèse décrite du Calix[4]-bis-aza-couronne-5* ***91*** [198]

La déprotection décrite par Kim et al. nécessite l'utilisation d'amalgame de sodium Na(Hg) au reflux du méthanol (Figure 141). Pour éviter ces conditions, nous avons préféré remplacer la *p*-toluenesulfonamide par la 2-Nitrobenzensulfonamide (Ns-NH_2)[199]. Le groupement 2-Nitrobenzensulfonyl (Ns-) se greffe de la même façon, mais étant plus pauvre en électrons, il peut être déprotégé de façon plus douce en présence de thiophénol et de K_2CO_3. La nitrobenzenesulfonamide étant moins nucléophile que la *p*-toluenesulfonamide, nous avons aussi préféré remplacer les fonctions chlorures par des groupements tosyles, meilleurs groupes partants (Figure 142).

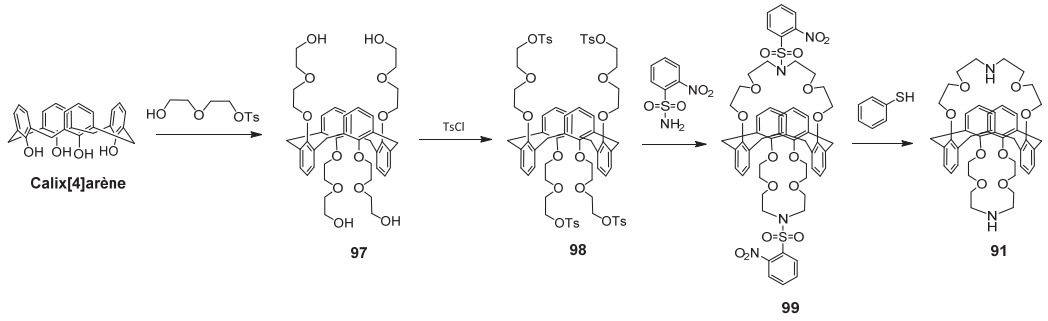


Figure 142 - *Synthèse envisagée du Calix[4]-bis-aza-couronne-5* ***91***

Deux voies de synthèse pour obtenir le calix-Aza-Bodipy-Sulf ont été explorées : la voie 1 en essayant à partir du Calix[4]-bis-aza-couronne-5, et la voie 2 où nous sommes repartis du calix-aldéhyde.

2) Première voie de synthèse

Avant d'effectuer la synthèse du calix[4]-bis-aza-couronne-5, nous avons d'abord vérifié que le groupement nosyle (Ns) pouvait bien être déprotégé selon les conditions décrites. Une séquence modèle de substitution-déprotection a pour cela été effectuée (Figure 143).

La 2-nitrobenzensulfonamide **100** a dans un premier temps, été substituée par deux molécules de diéthylène glycol monotosylé. En présence de K_2CO_3 et dans le DMF, la molécule **101** a ainsi été obtenue avec 51% de rendement après purification. La déprotection directe de la molécule **101** aurait entrainé la formation d'une chaîne aminodiéthylène glycol particulièrement hydrosoluble, ce qui aurait rendu son isolation difficile. Pour obtenir un produit de déprotection peu soluble en milieu aqueux, les fonctions hydroxyles ont été transformées en éthers de silyle. La fonction 2-Nitrobenzensulfonyl sur la molécule **102** a ensuite été retirée en présence de thiophénol, et de K_2CO_3 au reflux du DMF donnant la molécule **103** avec 79% de rendement.

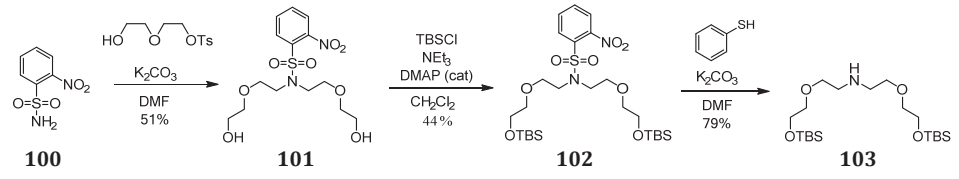


Figure 143 - *Essai de déprotection du groupement nosyle*

Après avoir vérifié que le groupement nosyle pouvait bien être déprotégé à l'aide de thiophénol, nous avons débuté la synthèse du calix[4]-bis-aza-couronne-5 **91**. Le calix[4]arène tétraglycolé **97** a été obtenu à partir du calix[4]arène et d'éthylène glycol monotosylé en présence de K_2CO_3.

Après quatre jours au reflux de l'acétonitrile, le produit tétraglycolé en conformation 1,3-alternée a été isolé par précipitation avec 51% de rendement (Figure 144).

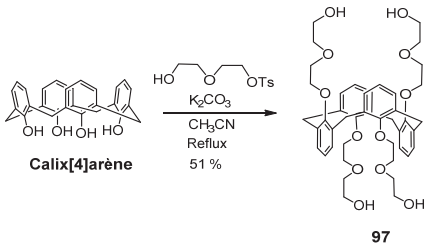


Figure 144 - *Synthèse du calix[4]arène tétraglycolé* **97**

Le produit tétraglycolé **97** a ensuite été tétratosylé **98**, pour permettre la fermeture des éthers couronne. En utilisant les mêmes conditions que pour la mono tosylation du diéthylène glycol[200] (chlorure de tosyle en présence de triéthyleamine dans le dichlorométhane), seul le produit tritosylé a pu être isolé. En effectuant la réaction dans le THF et en remplaçant la triéthylamine par de la soude[201], le composé tétratosylé **98** a été obtenu avec 67% de rendement après purification (Figure 145).

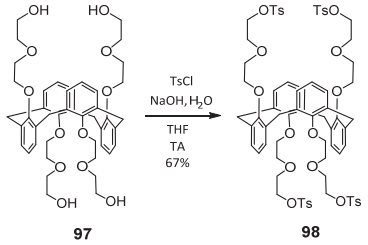


Figure 145 - *Synthèse du calix[4]arène tétraglycolé tétratosylé* **98**

Les éthers couronnes ont ensuite été formés à partir du produit tétratosylé **98** et de nitrobenzenesulfonamide en présence de K_2CO_3 dans le DMF. Après 48h à 100°C, le composé dinosylé **99** est obtenu avec 54% de rendement après purification (Figure 146).

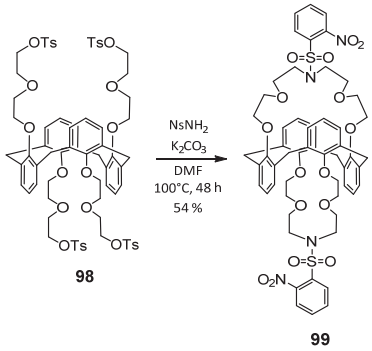


Figure 146 - *Synthèse du composé dinosylé* ***99***

Des essais de déprotection des groupements nosyles ont ensuite été effectués en présence de thiophénol et de K_2CO_3 dans le DMF (Figure 147). Le produit de déprotection trop polaire pour être purifié par chromatographie sur gel de silice a été isolé par précipitation dans l'éther. Des analyses RMN ^1H du produit obtenu ont révélé que celui-ci n'était pas pur, mais que les signaux

correspondant aux groupements nosyles avaient disparu. Une nouvelle déprotection a été effectuée avec un excès de thiophénol (8 éq) et de K_2CO_3 (16 éq) dans le DMF à 50°C[202]. Le produit a cette fois été précipité, puis passé sur une colonne phase inverse. Après plusieurs essais, nous avons réussi à isoler une petite quantité du produit voulu ne contenant plus que très peu d'impuretés.

La déprotection du produit ne semble pas être le problème. Sa purification est par contre plus compliquée. Trop polaire pour être purifié par chromatographie sur gel de silice, sa précipitation dans l'éther ne permet pas de le séparer de ses impuretés. L'utilisation de colonne phase inverse a permis d'isoler une fraction pure de produit, mais en très faible quantité.

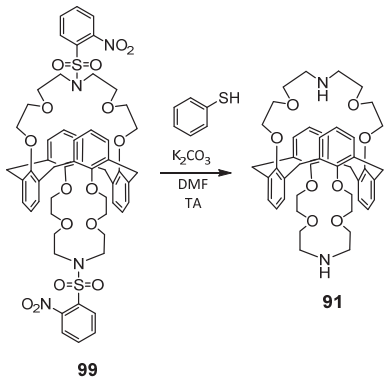


Figure 147 - *Déprotection du groupement nosyle*

Simultanément, des essais couplages d'Hartwig-Buchwald entre la molécule modèles **103** et un bodipy bromés **104** ont été effectués (Figure 148). En se basant sur des conditions utilisées pour le couplage d'un éther couronne et d'un cyanoanthracène[203] et malgré plusieurs essais avec jusqu'à 18%mol de catalyseur, aucun produit de couplage n'a pu être isolé.

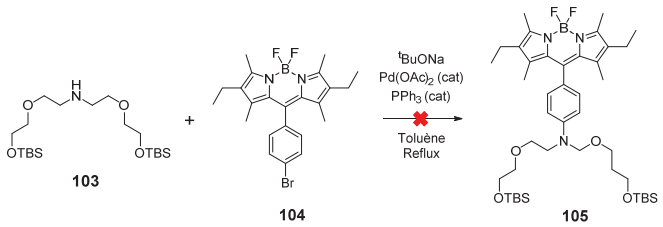


Figure 148 - *Essai de couplage entre un composé modèle et un bodipy bromé*

D'autres conditions réactionnelles auraient pu être essayées[204,205] en changeant par exemple le catalyseur. Mais au vu des difficultés de purification du calix[4]-bis-aza-couronne-5 **91**, nous avons préféré repartir sur une synthèse linéaire à partir du Calix-Aza-Aldéhyde. La 2-nitrobenzènesulfonamide aurait aussi pu être remplacée par un autre groupement. Dans le cadre de ce projet Yi-Bin Ruan, un ancien étudiant, a utilisé le dansyl amide à la place de la 2-nitrobenzènesulfonamide. Le dansyl étant une espèce fluorescente, la molécule obtenue a été directement sulfonée pour obtenir l'équivalent hydrosoluble le Calix-Aza-Dans-Sulf (Figure 149).

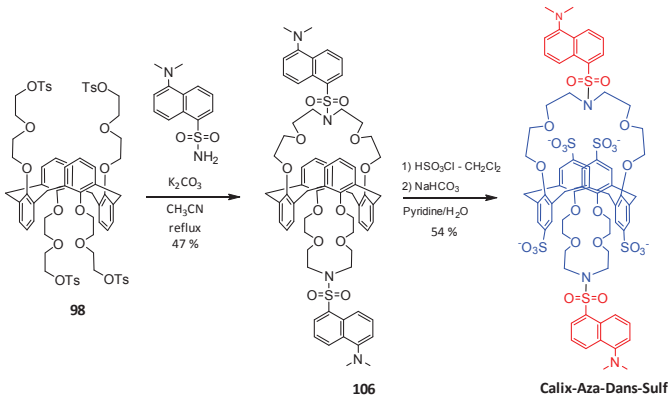


Figure 149 - *Synthèse du Calix-Aza-Dans-Sulf*

Les groupements donneur et accepteur sont sur cette molécule inversés. Une diméthylaniline riche en électrons est conjuguée à une sulfonamide électrodéficiente. Le transfert de charge intramoléculaire est dans ce cas inversé, l'azote de l'éther couronne se retrouvant appauvri en électrons. Les propriétés de complexation du potassium dans l'eau de cette molécule ne sont donc pas très intéressantes. Néanmoins, cette molécule a montré une très bonne affinité pour l'aluminium[206]. Les groupements sulfonates présents sur celle-ci entraînent l'adsorption de la molécule à la surface de particules colloïdales de $Al(OH)_3$. Cette adsorption est signalée par une exaltation de fluorescence liée à la diminution de la polarité entourant le dansyl (Figure 150).

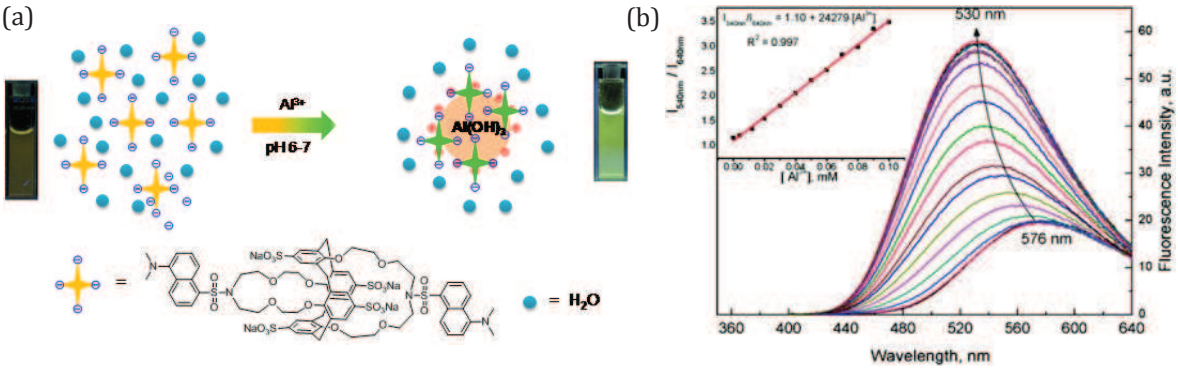


Figure 150 (a) - *Principe de la détection du $Al(OH)_3$ par le Calix-Aza-Dans-Sulf (b) Evolution de la fluorescence suite à l'ajout d'aluminium*

L'obtention de façon simple de calix[4]-bis-aza-couronne-5 et de conditions de couplage efficaces pouvant être longs et fastidieux, nous avons préféré repartir du calix-aldéhyde pour effectuer la synthèse du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf.

3) Synthèse et étude du Calix-Aza-krypto-Bodipy

a) Synthèse du Calix-Aza-Krypto-Bodipy

Le Calix-Aza-krypto-Bodipy a donc finalement été obtenu par condensation du calix-aza-aldéhyde et du 3-éthyl-2,4-diméthylpyrole suivant les conditions habituelles de synthèse des bodipys (Figure 151). Le produit brut a été ensuite purifié sur colonne, puis précipité dans un mélange dichlorométhane-méthanol, et isolé sous forme d'une fine poudre rouge avec 17% de rendement.

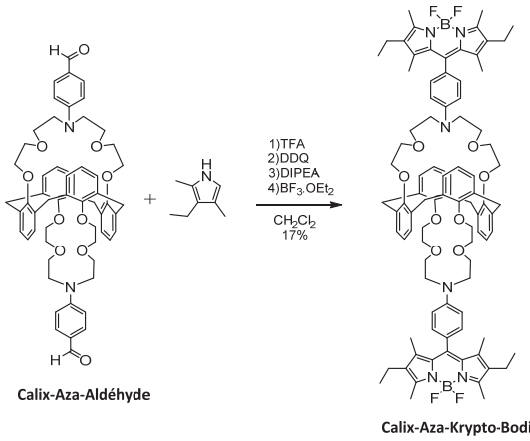


Figure 151 - *Synthèse du Calix-Aza-Krypto-Bodipy-à partir du Calix-Aza-Aldéhyde*

b) Propriétés photophysiques du Calix-Aza-Krypto-Bodipy

Le remplacement du bodipy par un krypto-bodipy a entrainé le déplacement des spectres d'absorption et d'émission de 23 et 27 nm vers les plus hautes longueurs (Figure 152) d'ondes. A part cela, les propriétés photophysiques et complexantes du Calix-Aza-Krypto-Bodipy sont semblables à celles du Calix-Aza-Bodipy. La fluorescence de la sonde en milieu polaire est quenchée avec l'apparition de l'état CT. La protonation ou la complexation de cations diminuent le transfert de charge intramoléculaire entraînant l'exaltation de fluorescence. La sélectivité de la molécule pour le potassium a aussi été conservée.

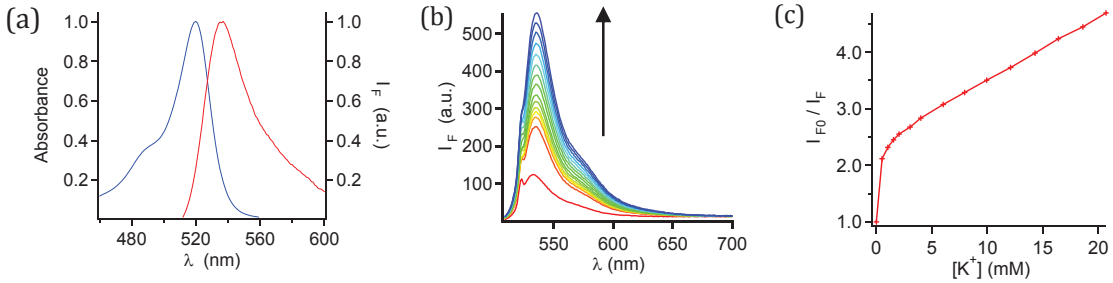


Figure 152 - *(a) Spectre d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-Aza-Bodipy. Evolution des spectres d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 535 nm (c) avec l'ajout de potassium.Solvant = CH_3CN, [L] = 1,6 µM, λ_{exc} = 522 nm.*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
Calix-Aza-Bodipy	496	509	140 000	0,003
Calix-Aza-krypto-Bodipy	519	536	102 000	0,002

Tableau 17 - *Comparaison des propriétés spectrales du calix-Aza-Bodipy et du Calix-Aza-krypto-Bodipy*

4) Synthèse et étude du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf

a) Synthèse

La synthèse du calix-aza-krypto-bodipy-sulf a été effectuée suivant le protocole de synthèse du Calix-Cou-Sulf[207] (Figure 153). Vingt équivalents d'acide chlorosulfonique ont été ajoutés à une solution de Calix-Aza-Krypto-Bodipy dans le dichlorométhane à - 15°C. Après trois heures à

température ambiante, la réaction a été quenchée par ajout d'eau. L'extraction de la phase aqueuse à l'acétate d'éthyle a permis de récupérer le produit brut. Les spectres RMN H^1 dans le chloroforme du produit brut ont montré la disparition des hydrogènes en para de l'oxygène, prouvant que la réaction de substitution a bien eu lieu. Le produit d'un violet sombre est néanmoins peu fluorescent par rapport au bodipy initial.

L'hydrolyse des groupements SO_2Cl en SO_3^- a ensuite été effectuée à partir du produit brut dans un mélange eau/pyridine. En fin de réaction, le produit est isolé par précipitation et passé sur colonne phase inverse. Bien que coloré, le produit est peu fluorescent dans l'eau. Les spectres RMN H^1 dans le MeOD, bien que de mauvaise qualité, permettent néanmoins de distinguer la présence des principaux groupements. Par analyse la masse du produit attendu est visible, mais de faible intensité. Les pics principaux correspondent à la masse du produit avec perte de BF_2 ou de B_2F_4. La réaction de chlorosulfonation semble affecter le bodipy, entraînant vraisemblablement la perte du groupement BF_2. Une étude du produit dans l'eau a quand même été effectuée.

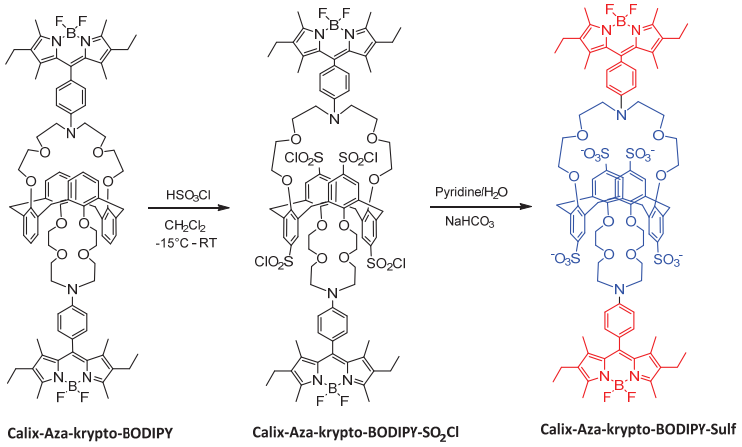


Figure 153 - *Synthèse du Calix-Aza-Bodipy-Sulf à partir du Calix-Aza-Krypto-Bodipy*

b) Propriétés spectroscopiques

Les propriétés spectroscopiques du composé isolé ont été étudiées dans l'eau. Bien que la molécule soit peu fluorescente un coefficient d'absorption molaire de 50 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ a été obtenu. Le rendement quantique de la molécule n'a par contre pas pu être déterminé. La comparaison des spectres du Calix-Aza-krypto-Bodipy et du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf (Figure 154) montre que le spectre d'absorption du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf est beaucoup plus large que celui du Calix-Aza-krypto-Bodipy. Ceci est vraisemblablement dû à la présence d'espèces dégradées.

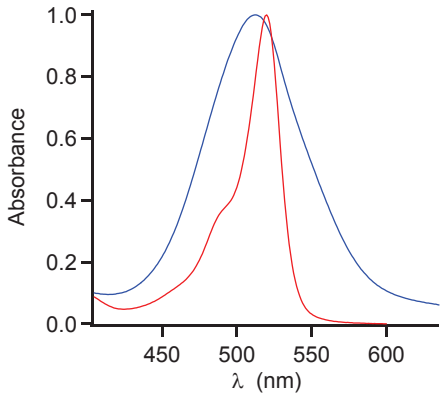


Figure 154 - *Spectre d'absorption du Calix-Aza-krypto-Bodipy (rouge) et du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf (bleu).*

Des dosages en milieu aqueux ont aussi été effectués (Figure 155). Ceux-ci semblent montrer que la fluorescence atteint un plateau dès 10 mM de potassium, soit beaucoup plus rapidement que le composé non sulfoné dans l'acétonitrile. La fluorescence semble augmenter seulement entre 0 et 5 mM de potassium, alors que pour la molécule non sulfonée dans l'acétonitrile, la fluorescence augmente linéairement entre 0 et 20 mM de potassium. L'affinité pour le potassium de la molécule hydrosoluble semble différente et ne semble plus permettre la mesure de concentration de potassium comprise entre 1 et 15 mM.

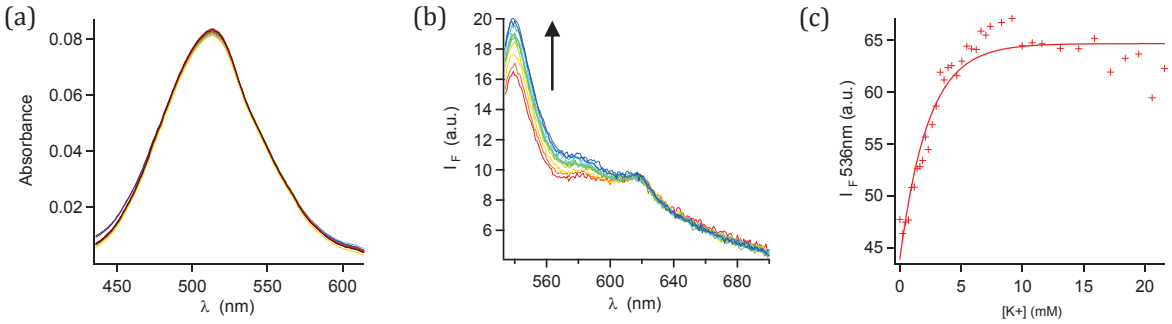


Figure 155 - *Evolution des spectres d'absorption (a), d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 536 nm (c) du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf avec l'ajout de potassium. Solvant = tampon MES pH 7, [L] = 7,7 µM, λ_{exc} = 510 nm*

c) Phénomène photo-induit

Comme nous pouvons le remarquer l'exaltation de la fluorescence est beaucoup plus faible que pour le Calix-Aza-krypto-Bodipy. Cet effet pourrait être dû, d'une part à une dégradation du bodipy, mais également à la participation des groupements sulfonates à la complexation du potassium (Figure 157). En effet, comme ce qui a été observé pour le Calix-COU-Sulf, la participation des groupements sulfonates à la complexation pourrait renforcer le transfert de charge et donc empêcher une exaltation de la fluorescence à la suite de la complexation du potassium.

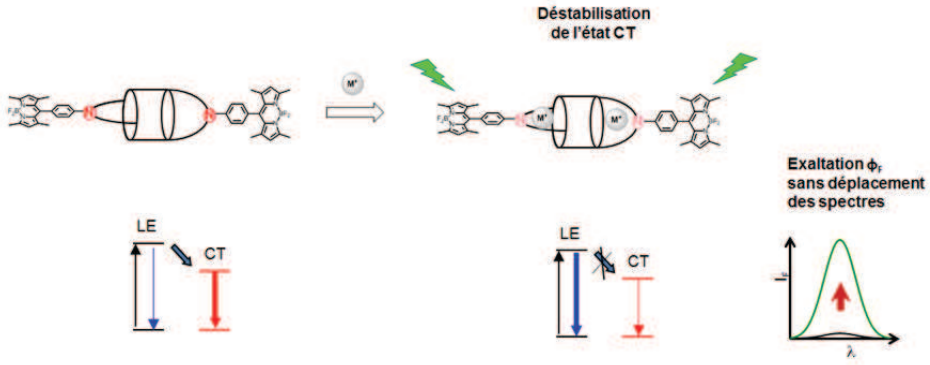


Figure 156 - *La complexation du potassium entraîne une déstabilisation de l'état CT, augmentant la probabilité de désexcitation à partir de l'état LE.*

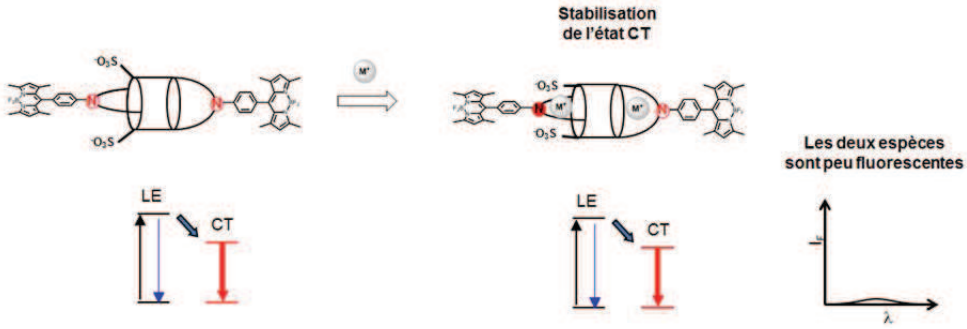


Figure 157 - *La complexation du potassium entraîne une stabilisation supplémentaire de l'état CT, empêchant une exaltation de fluorescence à la suite de la complexation du potassium.*

5) Conclusions et perspectives

Bien que le Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf n'ait pas pu être correctement caractérisé, la sélectivité K^+/Na^+ nous a semblé moins bonne pour le Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf que pour le Calix-Aza-Bodipy. L'ajout de groupements sulfonates a pu entraîner une réduction de la taille de la cage complexante comme cela a été observé entre le Cailx-COU-2 et le Calix-COU-Sulf. La diminution de la taille de cette cage peut expliquer la diminution de la sélectivité K^+/Na^+. Des études sont actuellement en cours pour obtenir une sonde hydrosoluble basée sur un calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 et valider cette hypothèse. Pour tenter de complexer sélectivement le potassium, nous nous sommes intéressés à une entité complexante un peu plus grande, le calix[4]arène-bis-couronne-6 contenant non plus cinq mais six hétéroatomes complexants (Figure 158). Le Calix-COU-Sulf, une molécule précédemment synthétisée au laboratoire[208], est construite sur un calix[4]arène-bis-couronne-6. Des études préliminaires de complexation du potassium ont donc été effectuées sur cette molécule, dans le but de déterminer si les calix[4]arène-bis-couronne-6 permettent une complexation sélective du potassium.

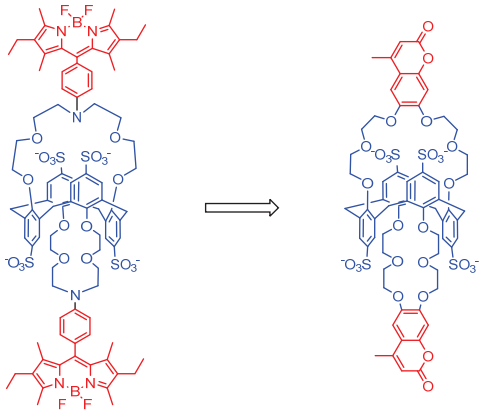


Figure 158 - *Remplacement envisagé du Calix-Aza-krypto-Bodipy-Sulf par le Calix-COU-Sulf*

III. Sondes fluorescentes à base de Calix[4]arène-bis-couronne-6

A. Etudes de complexation du potassium par Calix-COU-Sulf

Le Calix-COU-Sulf (cf Chapitre 2) est une sonde moléculaire fluorescente hydrosoluble du césium. Elle dispose de très bonnes constantes de complexation de celui-ci et d'une bonne sélectivité vis à vis du potassium et du sodium. Mais c'est aussi dans une moindre mesure un bon complexant du potassium ayant aussi une bonne sélectivité potassium/sodium. Le césium n'étant naturellement pas présent dans le corps humain, celui-ci ne devrait pas être un obstacle à l'utilisation de cette sonde en milieu biologique. Le but ici n'est pas la détection d'une concentration minimale d'un cation, mais la mesure des variations de concentration d'un cation dans une gamme donnée de concentrations. Nous avons donc effectué des études de complexation préliminaires pour déterminer si cette sonde peut permettre la mesure des variations de potassium entre 1 et 15 mM en présence d'un excès de sodium.

1) Etudes de complexation de Calix-COU-Sulf dans l'eau

Un premier dosage a été effectué dans l'eau pure. L'ajout de potassium a entrainé un déplacement bathochrome de 10 nm des spectres d'absorption, ainsi qu'une faible augmentation du coefficient d'absorption molaire, entraînant l'apparition d'un point isobestique à 340 nm (Figure 159 (a) et (b)). Contrairement au césium, l'ajustement numérique effectué à l'aide du logiciel specfit est optimal lorsque le modèle fait intervenir deux espèces absorbant la lumière, le ligand seul L et le complexe ML de stoechiométrie 1 :1. La valeur de la constante de formation du complexe ML est log K_{11} = 1.58 ± 0,05.

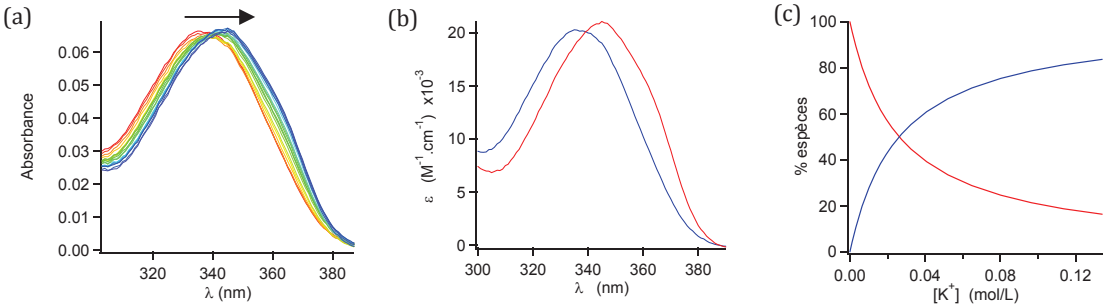


Figure 159 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O, [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de potassium.*

L'addition de potassium entraîne aussi une exaltation de fluorescence mais sans déplacement hypsochrome des spectres d'émission contrairement à ce qui est observé lors de l'ajout de césium. La fluorescence est multipliée par un facteur 2,7 avec l'ajout de potassium entre 0 et 100 mM de potassuim. Entre 0 et 20 mM de potassium visée de concentration, l'augmentation de la fluorescence est quasi linéaire. Celle-ci est multipliée par un facteur deux, soit une augmentation de 4,5 % par mM de potassium (Figure 160).

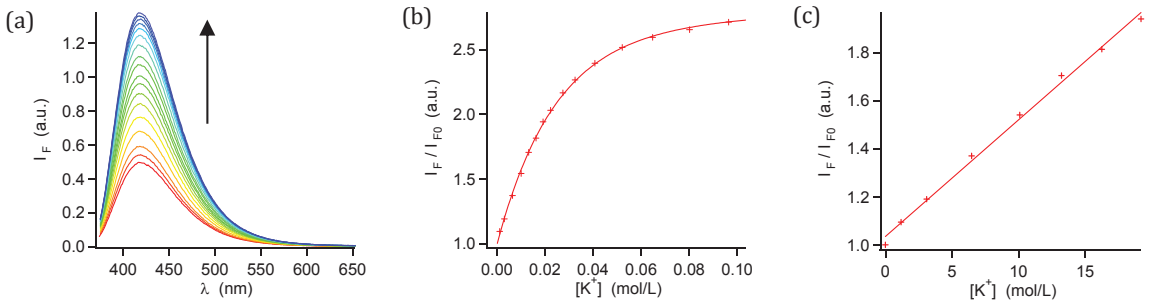


Figure 160 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 420 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm, λ_{em} max = 420 nm.*

Ce premier dosage nous montre que le Calix-COU-Sulf se situe parfaitement dans la gamme souhaitée de mesure, avec une augmentation quasi linéaire de la fluorescence entre 0 et 20 mM de potassium.

2) Etudes de complexation de Calix-COU-Sulf dans des conditions proches des conditions physiologiques

Un second dosage a ensuite été effectué dans des conditions proches des conditions physiologiques en présence de cations potentiellement interférents ($Na^+/Ca^{2+}/Mg^{2+}$) et de glucose. Le dosage a ainsi été effectué dans une solution d'eau contenant 146 mM de NaCl, 2,5 mM de $CaCl_2$, 1,3 mM de $MgSO_4$ et 11 mM de glucose. L'addition de potassium a entrainé un déplacement batochrome de 8 nm des spectres d'absorption ainsi qu'une faible augmentation du coefficient d'absorption molaire, entraînant l'apparition d'un point isobestique à 338 nm cette fois (Figure 161). La valeur de la constante de formation du complexe ML déterminée à l'aide du logiciel specfit est log K_{11} = 2,20 ± 0,04, cette valeur est plus importante que celle déterminée dans l'eau.

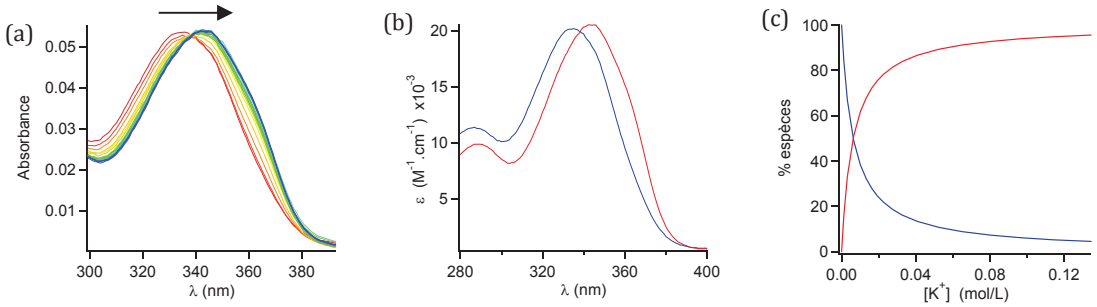


Figure 161 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 3.2 µM λ_{exc} = 365 nm. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Sulf avec l'ajout de potassium.*

L'augmentation de la fluorescence avec l'ajout de potassium n'est cette fois plus aussi linéaire entre 0 et 20 mM de potassium, mais elle est plus importante (Figure 162). La fluorescence est ainsi multipliée par un facteur 3 entre 0 et 100 mM de potassuim, et par un facteur 2,5 entre 0 et 20 mM de potassium, soit une augmentation de 8% par mM de potassium ajouté, ce qui est plus intéressant pour une bonne détection des variations de potassium. L'influence du milieu d'étude sur les effets photophysiques et la constante de formation du complexe ML ont été étudiés plus longuement dans la suite de ce chapitre.

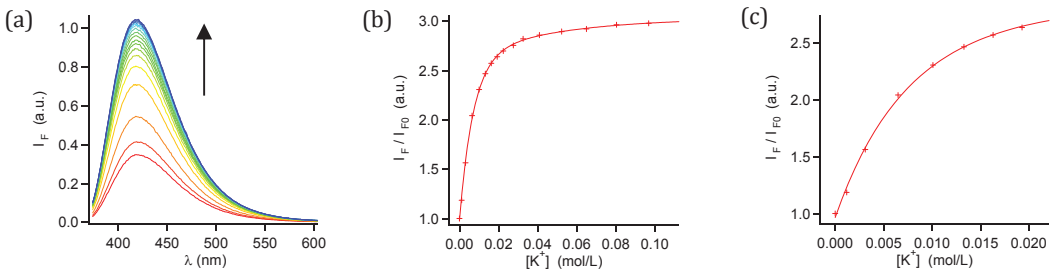


Figure 162 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 420 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 3,2 µM, λ_{exc} = 365 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 420 nm.*

3) Conclusions

Les résultats intéressants obtenus suite à ces essais de complexation nous ont poussés à changer d'entité complexante, pour remplacer le Calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 par un Calix[4]arène-bis-couronn-6 (Figure 163). Le Calix-COU-Sulf ne peut par contre pas être utilisé en tant que tel. En effet, son maximum d'absorption se situe autour de 340 nm dans la partie UV du spectre lumineux, ce qui n'est pas compatible avec des applications en milieu biologique où il est préférable de travailler au-dessus de 405 nm. Différentes stratégies ont donc été explorées pour remplacer la coumarine par un autre fluorophore excitable à de plus hautes longueurs d'ondes. La première piste a été d'ajouter le fluorophore sur un Calix[4]arène-bis-couronne-6 portant une fonction aldéhyde par une condensation de Knoevenagel.

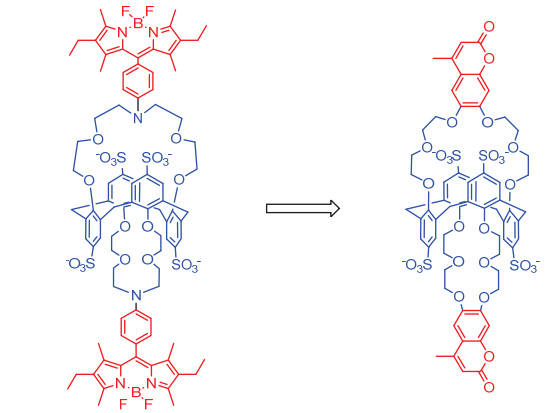


Figure 163 - *Remplacement du Calix[4]arène-bis-aza-couronne-5 par un Calix[4]arène-bis-couronne-6*

B. Insertion de nouveaux fluorophores par condensation de Knoevenagel

1) Rétrosynthèse envisagée

Comme pour le Calix-Aza-Bodipy, nous avons cherché à faire une synthèse la plus convergente possible, où l'ionophore et le fluorophore peuvent être synthétisés chacun de leur côté puis greffés l'un à l'autre avant ou après l'étape de sulfonation. Pour cela, nous nous sommes inspirés de la synthèse de sondes moléculaires fluorescentes du potassium basées sur des ionophores de type triazacryptands (TAC). L'entité complexante est dans un premier temps synthétisée, puis la fonction aldéhyde présente sur celle-ci permet ensuite l'ajout du fluorophore. (Figure 164). La

fonction aldéhyde peut être une base pour la synthèse de fluorophores de type Rhodamine[209,210] ou Bodipy[211,212], mais elle peut aussi permettre l'insertion de fluorophore via une réaction de condensation de Knoevenagel comme un Bodipy styrilique (Figure 168)[213] ou un fluorophore de type Dicyanomethylènedihydrofurane (DCDHF) (Figure 166)[214].

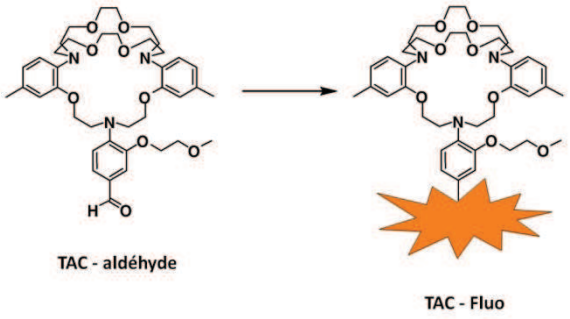


Figure 164 - *Insertion post-synthétique d'un fluorophore sur un triazacryptand aldéhyde*

Nous avons envisagé une rétrosynthèse où l'intermédiaire clé serait le Calix-aldéhyde (Figure 165), un Calix[4]arène-bis-couronne-6 portant une fonction aldéhyde sur chaque couronne pour permettre l'insertion des fluorophores. Celui-ci serait obtenu par greffage sur un calix[4]arène de deux équivalents de la molécule **109**, elle-même obtenu à partir du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde. Les fluorophores seraient ensuite ajoutés sur le Calix-aldéhyde, avant que la molécule ne soit rendue hydrosoluble grâce à l'étape de sulfonation. Cette retrosynthèse permet l'introduction facile de différents fluorophores en fin de synthèse. De plus, si le fluorophore choisi est sensible à l'étape de sulfonation, les étapes d'insertion des fluorophores et de sulfonation devraient être inversables.

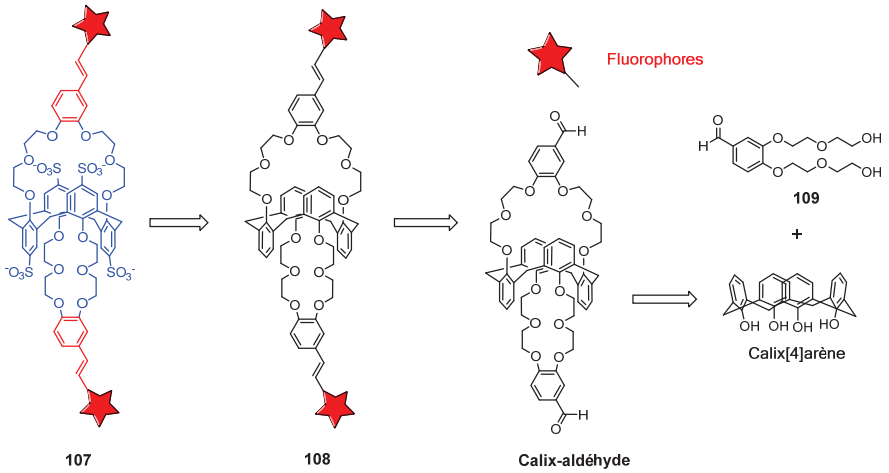


Figure 165 - *Rétrosynthèse de la sonde envisagée faisant intervenir une condensation de Knoevenagel*

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 165, nous avons choisi d'ajouter les fluorophores par une condensation de Knoevenagel plutôt que de les construire à partir de la fonction aldéhyde comme pour le calix-aza-bodipy. En effet nous souhaitons ici obtenir des sondes fluorescentes de type PCT où une partie donneuse d'électrons est conjuguée à une partie acceptrice d'électrons. En nous inspirant du Calix-COU-Sulf, où les oxygènes 6 et 7 de la coumarine jouent le rôle de groupements donneurs, la lactone jouant le rôle de groupement accepteur. Nous avons décidé d'insérer à l'opposé de ces mêmes oxygènes un fluorophore ou un groupement fortement

électrodéficient pour créer un transfert de charge efficace. La condensation de Knoevenagel nous a paru un moyen efficace pour effectuer cela.

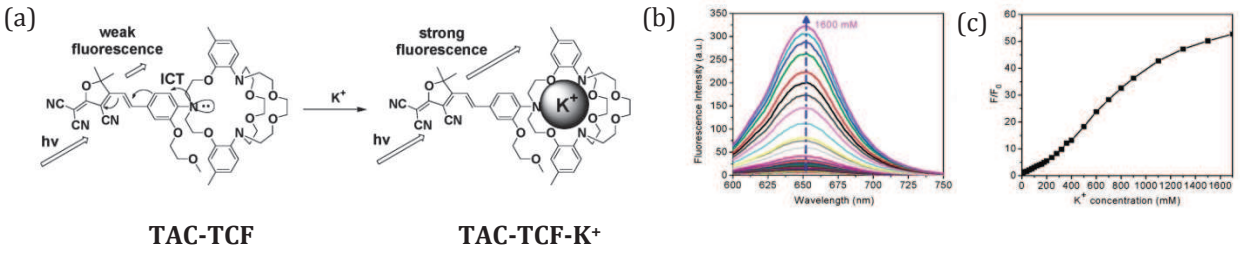
2) Choix des groupements à insérer

Plusieurs groupements électrodéficients ont donc été envisagés pour la réalisation de la sonde. Leur choix va maintenant être détaillé.

a) Les Dicyanomethylènedihydrofuranes (DCDHF)

Un de nos choix a été le 2-dicyanomethylene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran que nous appellerons TCF par la suite. Il appartient à la famille des Dicyanomethylènedihydrofurane (DCDHF), avec ses trois fonctions nitriles. Il est fortement électrodéficient, ce qui en fait un candidat intéressant. Sa conjugaison à des groupements donneurs dialkylanilino ou alkoxy permet l'obtention de fluorophores dipolaires fortement conjugués de type « push-pull » avec de bons coefficients d'absorption molaire[215]. De simples modifications synthétiques des groupements donneurs[216,217], accepteurs[218] ou du lien les conjuguant (benzène, thiophène, styrène)[219,220] permettent de facilement déplacer les spectres d'absorption de 440 jusqu'à 700 nm. L'ajout de groupements solubilisants permet aussi leur utilisation en milieu aqueux tout en conservant leurs caractéristiques photophysiques[221], ce qui est intéressant pour l'utilisation que nous recherchons. Son rendement quantique est néanmoins assez faible en solution inférieure à 10% et semble fortement dépendant de l'environnement[222]. En effet, inséré dans un film de PMMA, son rendement quantique est fortement augmenté. D'autres mesures faites dans des films PMMA ont aussi montré que ce type de molécule dispose d'un faible rendement quantique de photoblanchiment ($\phi_B < 10^{-6}$) semblable à celui des Rhodamines, et d'une bonne section efficace d'absorption à deux photons (150 GM)[223].

Utilisé à l'origine pour des applications en optique non linéaire[224,225] et pour la réalisation de polymères[226,227] il existe aussi de nombreux exemples de son utilisation en imagerie biologique, comme par exemple pour la détection de molécules uniques en imagerie de super résolution[228,229], pour la réalisation de chémodosimètre[230,231], et de sondes de pH[232]. Une sonde moléculaire fluorescente du potassium a d'ailleurs été construite à partir d'un triazacryptand et d'un TCF le TAC-TCF (Figure 166)[233] permettant la mesure du potassium intracellulaire. Le grand coefficient d'absorption molaire de ces molécules semble compenser leur faible rendement quantique pour obtenir une brillance suffisante pour permettre la mesure de variations du potassium. Pour ces raisons, le groupement TCF nous a fortement intéressés.



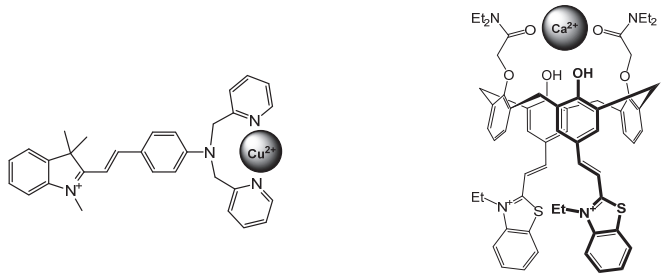
TAC-TCF **TAC-TCF-K⁺**

Figure 166 - *(a) Fonctionnement de la sonde moléculaire fluorescente du potassium. Evolution des spectres de fluorescence (b) et de la fluorescence à 561 nm (c) avec ajout croissant de potassium. Solvant = tampon HEPES pH = 7,2 λ_{exc} = 561 nm*

b) Les groupements de types indoliniums

Nous nous sommes d'autre part intéressés à un autre type de groupement fortement électroattracteur, les indoliniums connus pour être utilisés dans la synthèse de nombreuses cyanines[234]. Comme pour le TCF, la conjugaison d'indoliniums via un lien styryl à des groupements donneurs d'électrons permet d'obtenir des fluorophores de type « push-pull » appelé hémicyanine. De plus, les indoliniums ont l'avantage d'être chargés, ce qui peut aider à l'hydrosolubilité de la sonde finale.

Des fluorophores de type styryl indolinium ont déjà été utilisés pour la détection de cations. La molécule **110**[235] (Figure 167) associe par exemple un motif styryl indolinium avec un ligand dipicolamine et permet la détection sélective du cuivre II. La calix[4]arène **111**[236] (Figure 167) permet quant à lui la détection de calcium en milieu organique, l'indolinium y est remplacé par un benzothiazole, l'effet observé restant le même. La complexation du calcium entraîne une diminution du caractère donneur des oxygènes, impliquant une diminution du transfert de charge intramoléculaire ce qui influe sur les propriétés photophysiques du fluorophore.



110 **111**

Figure 167 - *Sondes moléculaires fluorescentes incorporant un motif de type hémicyanine*

c) Les Bodipy

Des bodipy conjugués à l'aide d'un groupement strylique ont déjà été utilisé pour la détection de cations. Ce sont de bons candidats, car ils disposent d'importants coefficients d'absorption molaire, de bons rendements quantiques et de bonnes photostabilités. De plus, le fait d'insérer le bodipy via un lien styrilique induit une plus grande conjugaison de celui-ci, ce qui entraîne un déplacement de ces spectres vers les plus hautes longueurs d'ondes[237].

La molécule B3TAC Figure 168, est issue de la condensation d'un bodipy et du TAC-aldéhyde. La complexation de potassium entraîne une exaltation de la fluorescence du bodipy (Figure 168 (b)) mais aussi un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption (Figure 168 (c)). En effet le potassium diminue la densité électronique de l'azote, ce qui réduit la délocalisation des électrons du bodipy, responsable du déplacement hypsochrome des spectres d'absorption. Ce système permet, en plus d'une détection fluorométrique, une détection colorimétrique (Figure 168 (d)). Cette molécule n'est par contre utilisable que dans un mélange acétonitrile/eau (40/60).

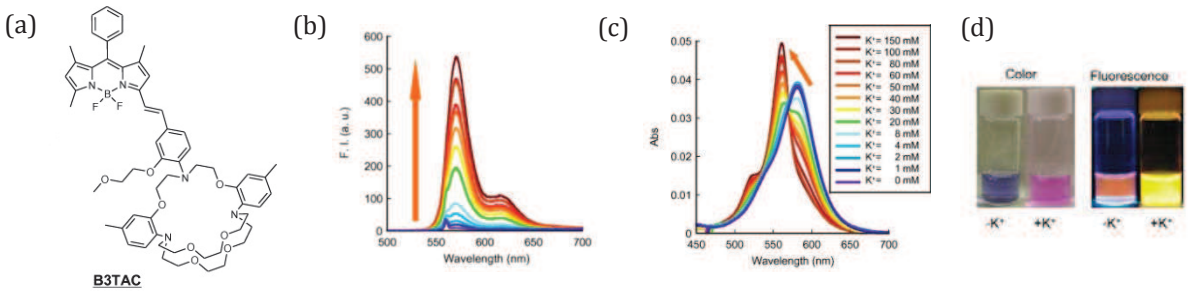


Figure 168 - *(a). Fluoroionophore du potassium associant un Triazacryptand et Bodipy. Evolution des spectres d'émission (b) et d'absorption (c) de la molécule avec l'ajout croissant de potassium. Solvant = tampon HEPES (pH = 7)/ CH_3CN (60/40), λ_{exc} = 560 nm. (d) Changement colorimétrique et fluorimétrique visible suite à l'ajout de potassium.*

d) Cibles envisagées

Nous avons pour résumer choisi d'insérer trois groupements sur le calix-aldéhyde : un groupement TCF, un groupement indolinium et un bodipy, dans le but d'obtenir les trois molécules Figure 169. Nous allons maintenant voir les différentes synthèses réalisées et les propriétés photophysiques des composés obtenus.

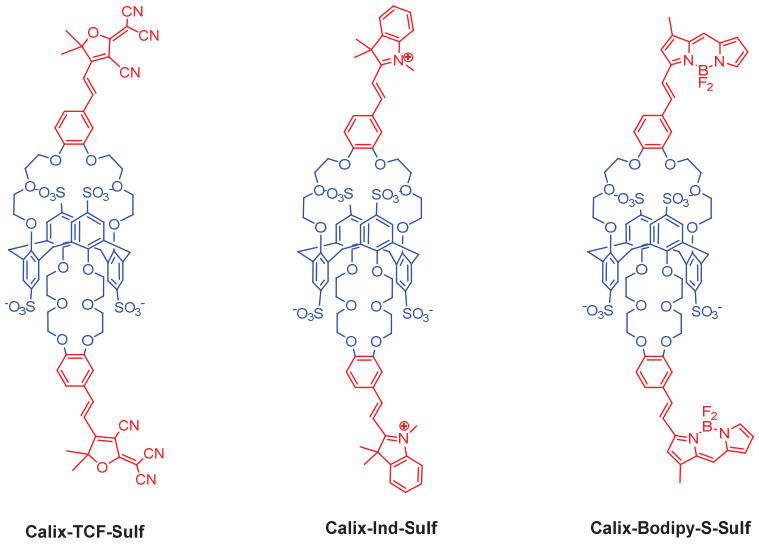


Figure 169 - *Molécules envisagées*

3) Synthèse du Calix-Aldéhyde

La synthèse du Calix-aldéhyde a été effectuée suivant le schéma réactionnel ci-dessous (Figure 170). Deux chaînes diéthylène glycol sont tout d'abord ajoutées sur la 3,4-dihydroxybenzaldéhyde **112** avec 87% de rendement. La molécule diglycolée obtenue **109** est tosylée en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane avec 68% de rendement. Deux molécules ditosylées **113** sont ensuite greffées sur le calix[4]arène en présence de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile. Après 5 jours à reflux, le calix-aldéhyde est obtenu avec 76% de rendement.

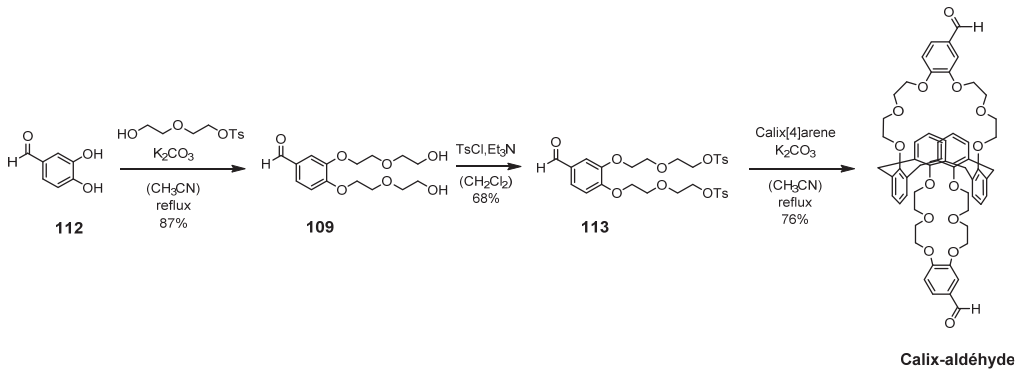


Figure 170 - *Synthèse du Calix-Aldéhyde*

4) Synthèse et études photophysiques du Calix-TCF-Sulf

a) Synthèse du Calix-TCF-Sulf

Le TCF est issu (Figure 171) de la condensation du malononitrile et de la 3-hydroxy-3-méthylbutan-2-one **114** en présence d'une quantité catalytique d'éthanolate de sodium dans le THF[238]. Après une nuit au reflux, le produit est obtenu par précipitation dans l'éthanol avec 68% de rendement.

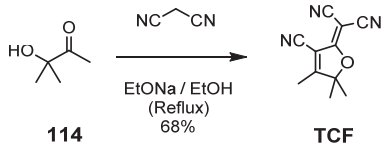


Figure 171 - *Synthèse du TCF*

Le Calix-TCF a été obtenu avec 47% de rendement à partir du Calix-aldéhyde, en présence de quatre équivalents de TCF, d'une quantité catalytique de pipéridine (0,3 éq) et après six heures au reflux de l'éthanol (Figure 172). L'utilisation de moins d'équivalent TCF entraîne la formation d'un mélange de produit mono et disubstitué non séparable par chromatographie sur gel de silice. Après traitement, le produit brut est purifié sur colonne puis précipité dans le cyclohexanne pour être isolé sous forme d'une fine poudre rouge.

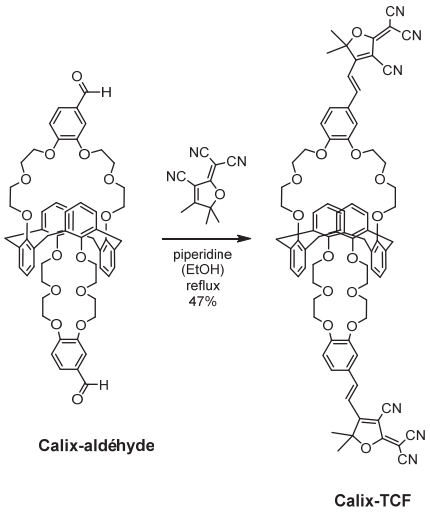


Figure 172 - *Synthèse du Calix-TCF*

Plusieurs essais de sulfonation ont ensuite été entrepris sur le calix-TCF dans le but d'obtenir son équivalent hydrosoluble, par addition d'acide chlorosulfonique suivie d'une hydrolyse en milieu basique (Figure 173). Des cristaux rouges semblables à ceux du calix-TCF ont été isolés par précipitation de la phase aqueuse, mais ni les analyses de masses, ni les analyses RMN effectuées dessus n'ont permis de déterminer la nature du produit obtenu. Avant d'effectuer de nouveaux essais, l'étude des propriétés spectroscopiques du Calix-TCF dans l'acétonitrile et du composé hydrosoluble dans l'eau a été effectuée.

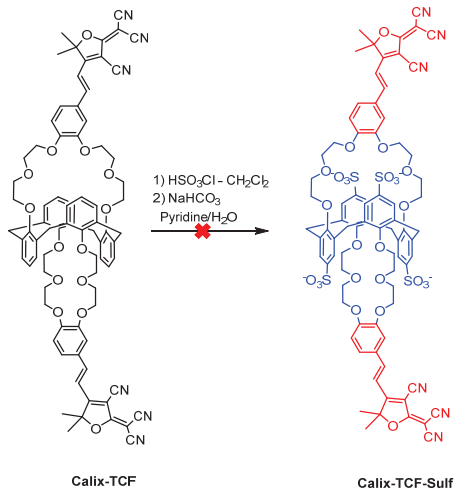


Figure 173 - *Essais de sulfonation du Calix-TCF*

b) Etudes photophysiques du Calix-TCF dans l'acétonitrile

Propriétés photophysiques dans l'acétonitrile

Le maximum d'absorption de la molécule se situe à 450 nm, le maximum d'émission se situant lui à 577 nm. L'importante conjugaison de ce fluorophore permet d'obtenir un déplacement de Stokes relativement important de 127 nm. Le coefficient d'absorption molaire est de 60 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ (Tableau 18). La molécule est par contre peu fluorescente avec un rendement quantique dans l'acétonitrile de 0,006, cette valeur est néanmoins du même ordre de grandeur que les autres fluorophores de ce type[239,240].

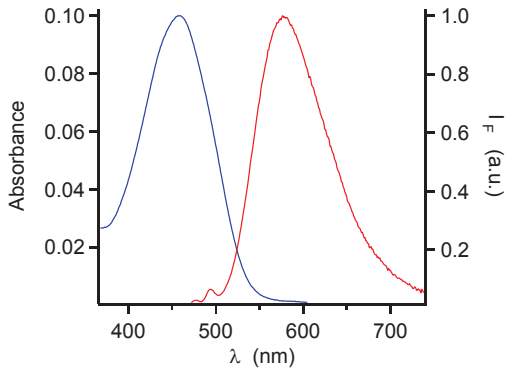


Figure 174 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-TCF dans l'acétonitrile*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ε ($M^{-1}.\ cm^{-1}$)	ϕ
Calix-TCF	450	577	60000	0,006
TAC-TCF	561	650	38400	0,001

Tableau 18 - *Comparaison des propriétés photophysiques du Calix-TCF dans l'acétonitrile et du TAC-TCF[241] dans l'eau*

Propriétés complexantes dans l'acétonitrile

L'ajout de potassium entraîne une augmentation de l'absorbance ainsi qu'un déplacement hypsochrome de 9 nm des spectres d'absorptions (Figure 175). Celle-ci semble augmenter fortement dans un premier temps, puis plus lentement dans un second temps, ce qui traduirait deux régimes de complexation différents comme dans le cas du Calix-COU-2 (chapitre 2).

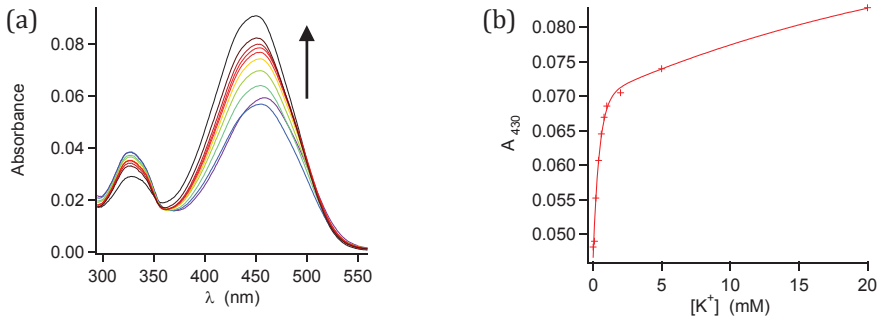


Figure 175 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et de l'absorbance à 430 nm du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-TCF] = 1,5 µM*

Au contraire, l'ajout de potassium entraîne une diminution de la fluorescence, sans entraîner de déplacement du maximum d'émission (Figure 176). La complexation du potassium au niveau des oxygènes entraîne une diminution du transfert de charge intramoléculaire qui est responsable de la baisse de la fluorescence observée. Comme pour l'absorbance, la baisse de la fluorescence semble se faire suivant deux régimes, la complexation de deux cations n'étant pas équivalente.

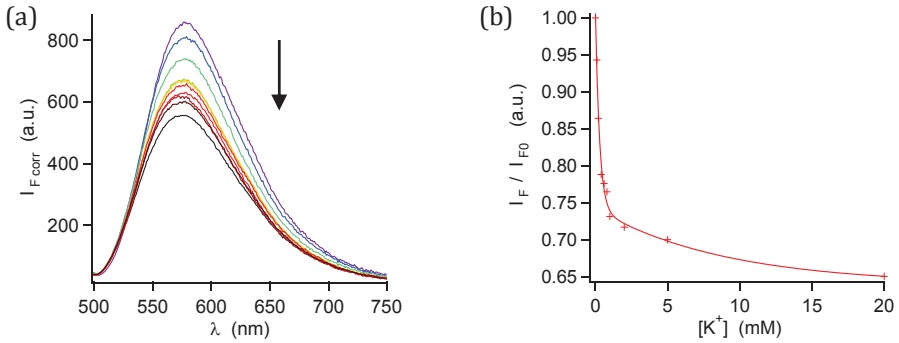


Figure 176 - *Evolution des spectres d'émission corrigés (a) et de l'intensité de la fluorescence à 575 nm (b) du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-TCF] = 1,5 µM; λ_{exc} = 430 nm; $\lambda_{em\ max}$ = 575 nm*

La sélectivité K^+/Na^+ a aussi été étudiée. Des ajouts de potassium ont été effectués en présence de 150 mM de sodium. Ceux-ci ont entrainé un déplacement hypsochrome de 7 nm des spectres d'absorptions, mais contrairement aux dosages effectués en absence de sodium, l'intensité de l'absorbance n'a pas varié. La présence d'un point isobestique à 457 nm est aussi à noter. Ces ajouts ont aussi entrainé une diminution de l'intensité de la fluorescence, comme précédemment.

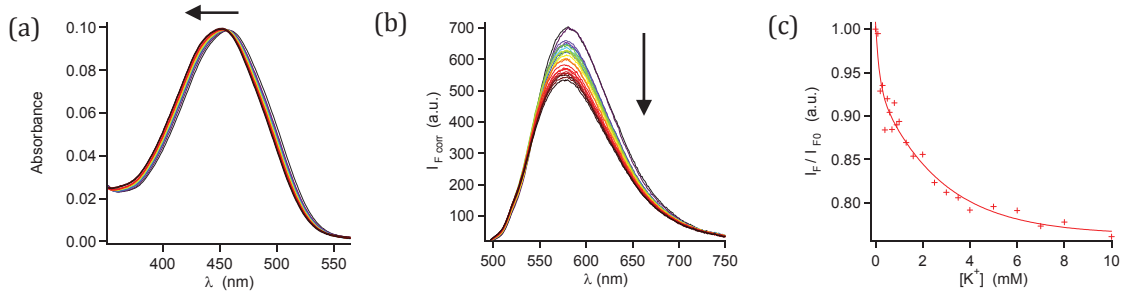


Figure 177 - *Evolution des spectres d'absorption (a), d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 580 nm (c) du Calix-TCF en présence d'une concentration croissante de K^+ et en présence de 150 mM de Na^+. Solvant = CH_3CN [Calix-TCF] = 1,5 µM λ_{exc} = 450 nm $\lambda_{em\ max}$ = 580 nm.*

c) Etudes photophysiques du composé hydrosoluble dans l'eau

Bien que la structure du Calix-TCF-Sulf n'ait pas pu être déterminée, les propriétés photophysiques de la poudre rouge isolée lors de l'étape de sulfonation ont néanmoins été étudiées dans l'eau (Figure 178). Les études montrent la présence d'un seul produit dont les déplacements spectraux sont proches de ceux du Calix-TCF. Le maximum d'absorption se situe à 442 nm, soit 8 nm plus bas que le Calix-TCF dans l'acétonitrile, le maximum d'émission molécule se situant lui à 580 nm, soit 3 nm plus haut que le Calix-TCF. L'influence du potassium sur les propriétés photophysiques a aussi été étudiée.

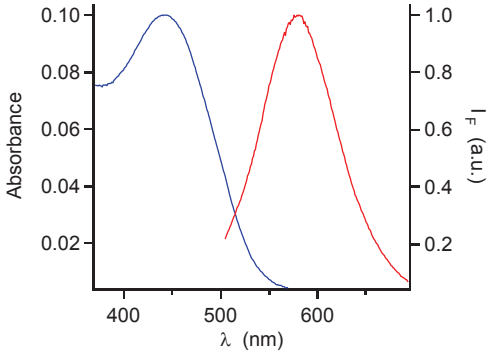


Figure 178 - *Spectres d'absorption (bleu) et de d'émission (rouge) du composé dans l'eau $\lambda_{abs\ max}$ = 442 nm $\lambda_{em\ max}$ = 580 nm*

L'influence du potassium sur les propriétés photophysiques du composé a été étudiée dans un tampon MES 5. 10^{-2} M contenant 50 mM de sodium (Figure 179). L'ajout de potassium a entrainé une diminution de l'absorbance et un déplacement bathochrome de 8 nm des spectres d'absorption, la présence d'un point isobestique à 492 nm étant aussi à noter. L'addition de potassium a aussi entrainé une augmentation de la fluorescence et un déplacement bathochrome de 6 nm du maximum d'émission. Ceci va à l'inverse de ce qui a été observé pour le Calix-TCF, mais est conforme au comportement du Calix-COU-Sulf où la complexation du potassium entraîne une augmentation du transfert de charge intramoléculaire et donc une augmentation de la fluorescence.

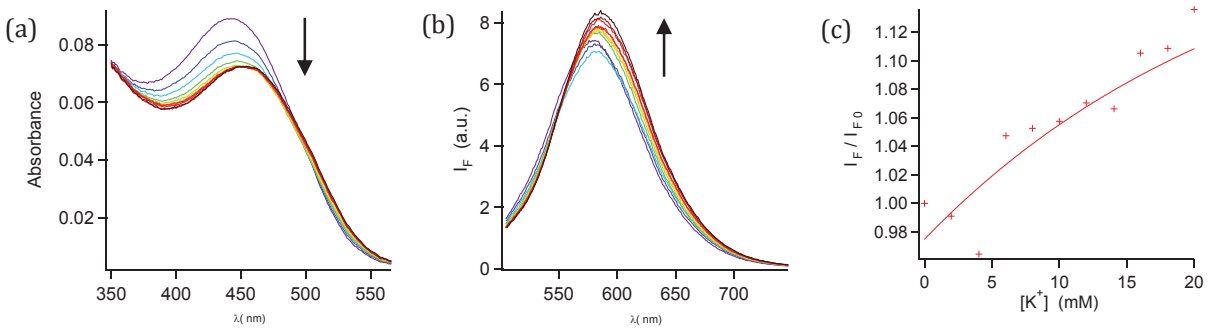


Figure 179 - *Evolution des spectres d'absorption (a) d'émission (b) et de l'intensité de la fluorescence à 580 nm (c) du Calix-TCF-Sulf en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant = tampon MES 5 .10^{-2} M λ_{exc} = 485 nm $\lambda_{em\ max}$ = 585 nm*

d) Conclusions

La variation des propriétés photophysiques du Calix-TCF avec l'ajout de potassium est conforme avec ce qui avait été observé pour le Calix-COU-2. En revanche, la variation des propriétés photophysiques du composé hydrosoluble suite à l'ajout de potassium va dans le sens inverse de ce qui est observé pour le Calix-TCF et donc de Calix-COU-2, mais dans le même sens que celle de Calix-COU-Sulf. Nous pouvons donc supposer que l'espèce isolée peut permettre la mesure de variations de potassium en milieu aqueux. Des caractérisations supplémentaires ainsi que des mesures supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir le confirmer. Néanmoins, cette molécule est très peu fluorescente. La variation de l'intensité de fluorescence suite à l'ajout de potassium est donc très faible, ce qui ne permet pas à priori d'envisager l'utilisation de cette molécule pour des mesures de potassium sur des tissus vivants.

5) Synthèse et études photophysiques du Calix-Ind-Sulf

a) Synthèse du Calix-Ind-Sulf

L'iodure de 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium a été obtenue par méthylation de la 2,3,3-Trimethylindoléine **115** dans le toluène à 80°C (Figure 180). Une fois le produit de départ entièrement consommé, le produit est récupéré par filtration avec 72% de rendement.

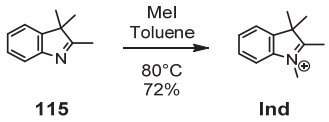


Figure 180 - *Synthèse du 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium Ind*

Quatre équivalents d'iodure de 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium en présence d'une quantité catalytique de pipéridine (0,3 éq) et après 6 heures au reflux de l'éthanol ont permis la formation du Calix-Ind. Le produit est purifié sur colonne puis précipité dans l'éther pour obtenir une fine poudre rouge avec 53% de rendement (Figure 181). Avant tout essai de sulfonation du composé obtenu, l'étude des propriétés photophysiques dans l'acétonitrile du Calix-Ind a été effectuée.

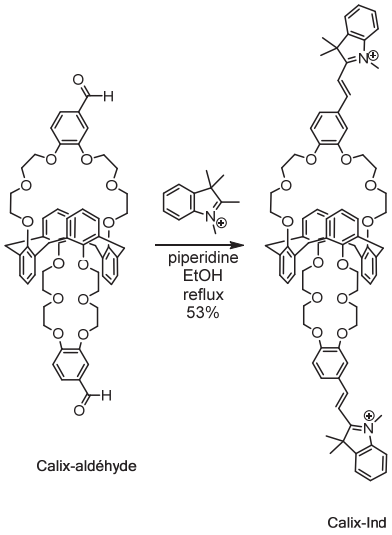


Figure 181 - *Synthèse du Calix-Ind*

b) Etudes photophysiques du Calix-Ind

L'étude des propriétés photophysiques du Calix-Ind a été effectuée dans l'acétonitrile (Figure 182). Le coefficient d'absorption molaire de la molécule est de 60 000 M^{-1}. cm^{-1} dans l'acétonitrile au maximum de l'absorption qui se situe à 445 nm. Le maximum du spectre d'émission se situe lui à 550 nm, tout comme le Calix-TCF la molécule est peu fluorescente

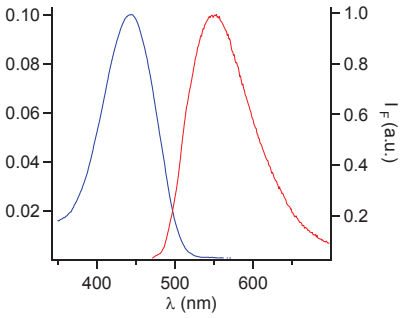


Figure 182 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) du Calix-Ind dans l'acétonitrile*

$\lambda_{abs\ max}$ = 445 nm
$\lambda_{em\ max}$ = 550 nm
ε = 60 000 M^{-1}. cm^{-1}
ϕ = -

Tableau 19 - *Caractéristiques photophysiques du Calix-Ind*

Le Calix-Ind, outre le fait d'être peu fluorescent, est aussi photosensible. L'acquisition successive de plusieurs spectres de fluorescence entraîne une dégradation du signal mesuré (Figure 183). Le rendement quantique de fluorescence n'a dès lors pas pu être mesuré avec précision. L'influence du potassium sur les spectres d'absorption de la molécule a néanmoins brievement été étudiée.

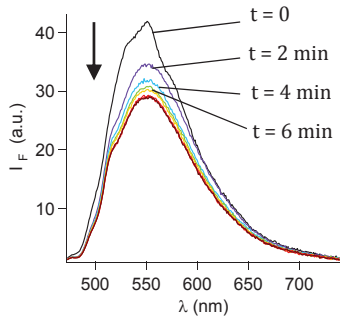


Figure 183 - *Diminution de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps*

Tout comme le Calix-TCF, l'ajout de potassium entraîne une augmentation de l'absorbance ainsi qu'un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption (Figure 184). La molécule étant photosensible, l'influence du potassium sur les spectres d'émissions n'a pas pu être effectuée. Le comportement doit être néanmoins similaire à ceux du Calix-TCF et du Calix-COU-2 où une diminution de la fluorescence est observée.

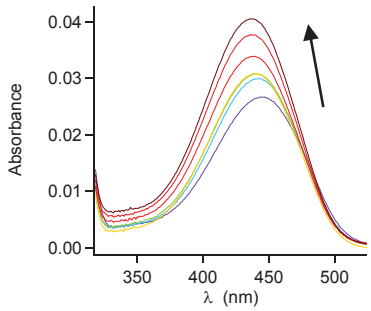


Figure 184 - *Evolution des spectres d'absorption du Calix-Ind en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = CH_3CN ; [Calix-Ind] = 0,5 µM*

c) Conclusion

Le Calix-Ind présente des propriétés d'absorption dans le visible avec un coefficient d'absorption molaire important. Ses propriétés photophysiques sont proches de celle du Calix-TCF, mais il est de plus photosensible, empêchant toute étude de fluorescence du composé. Nous n'avons dès lors pas cherché à effectuer d'analogues hydrosolubles du Calix-TCF.

6) Synthèse et études photophysiques du Calix-BODIPY-S-Sulf

a) Retrosynthèse envisagée

Pour éviter une dégradation du BODIPY liée à l'étape de chloro-sulfonation, nous avons envisagé une rétro-synthèse où celui-ci serait ajouté en fin de synthèse sur le calix-aldéhyde sulfoné (Figure 185). Le calix-aldéhyde-sulf serait obtenu par sulfonation du calix-aldéhyde. Les calixarènes sulfonés étant solubles dans l'éthanol, la condensation du bodipy sur le calix-aldéhyde sulfoné devrait être possible. De plus, pour éviter la possibilité d'une double condensation sur un bodipy portant deux méthyles en α, nous avons préféré prendre un bodipy dissymétrique **116** ne disposant que d'un seul méthyl en position α. Cette stratégie utilisée par

Vendrell et al.[242] pour la réalisation de bibliothèques de bodipys, a permis la découverte de nouvelles sondes de glucagon[243] ou de fructose[244].

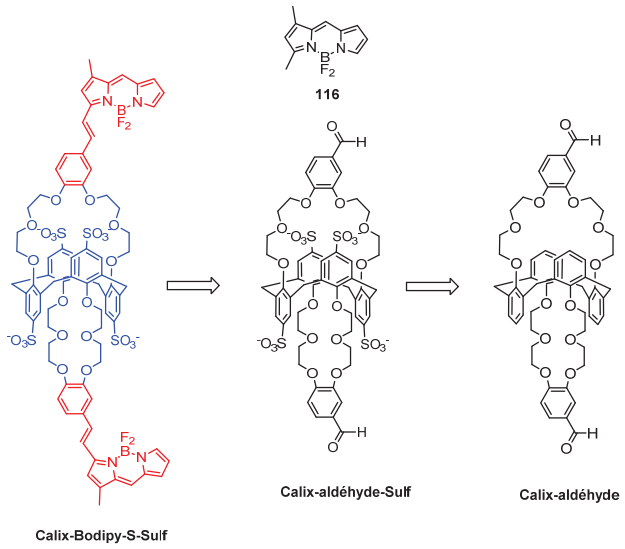


Figure 185 - *Retrosynthèse envisagée du Calix-Bodipy-S-Sulf*

b) Synthèse du Calix-Bodipy-S-Sulf

Contrairement à la synthèse des bodipy symétriques où deux pyroles identiques sont condensés en présence d'un aldéhyde ou d'un chlorure d'acide, les bodipy dissymétriques sont obtenus par condensation d'un pyrole portant une fonction aldéhyde et un pyrole non substitué en position 2[245]. Ainsi, le 1,3-diméthyle BODIPY **116** a été obtenu par condensation du pyrole 2-carboxyaldehyde **117** et du 2,4-dimethylpyrrole en présence **118** de $POCl_3$ dans le dichlorométhane[246]. Après purification sur colonne, le bodipy a été obtenu avec 36% de rendement (Figure 186).

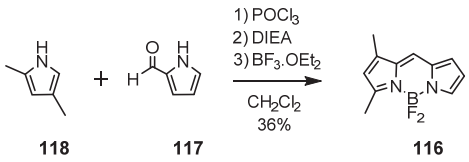


Figure 186 - Synthèse du 1,3-diméthyle BODIPY **49**

Pour obtenir le calix-aldéhyde-sulf, nous avons dans un premier temps essayé d'effectuer la chloro-sulfonation directement sur le calix-aldéhyde (Figure 187). Malgré différents essais, il s'est toujours formé au cours de la réaction un précipité pourpre qui après isolation s'est révélé être insoluble, rendant son identification ou utilisation impossible. Suite à cela, il a été décidé de protéger la fonction aldéhyde peut-être responsable du résultat obtenu, et de retenter des essais de chloro-sulfonation.

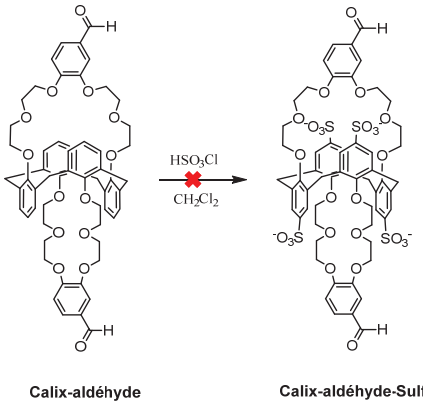


Figure 187 - *Essais de chloro-sulfonation sur Calix-aldéhyde*

Pour la protéger, la fonction aldéhyde a été transformée en thioacétal, en présence de 1,2-ethanedithiol et de $BF_3.OEt_2$ avec 86% de rendement[247] (Figure 188). De nouveaux essais de chloro-sulfonation ont ensuite été tentés, mais une fois encore, un précipité insoluble est apparu au cours de la réaction.

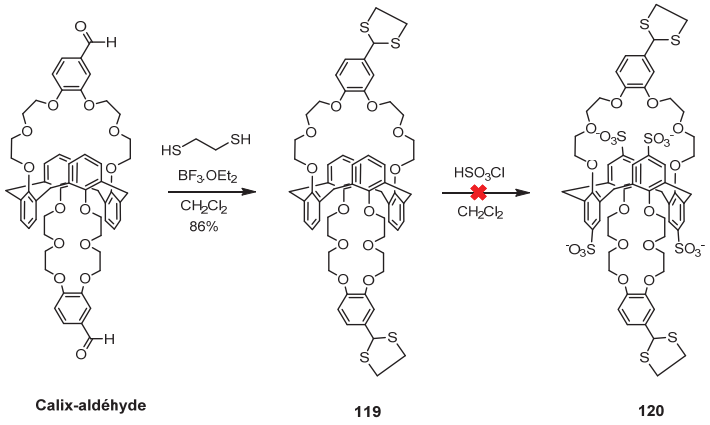


Figure 188 - *Protection et essai de chloro-sulfonation sur le Calix-aldéhyde protégé*

Malgré l'impossibilité de sulfoner le Calix-aldéhyde, dans le but d'effectuer la condensation de Knoevenagel après la sulfonation, le Calix-Bodipy-S a été synthétisé et ses propriétés photophysiques étudiées dans l'acétonitrile. Quatre équivalents du bodipy **116** en présence d'une quantité catalytique de pipéridine (0,3 éq) ont été ajoutés à une solution de Calix-aldéhyde dans le toluène. Après purification sur colonne, une très faible quantité de produit a été isolée mais suffisamment pour sa caractérisation.

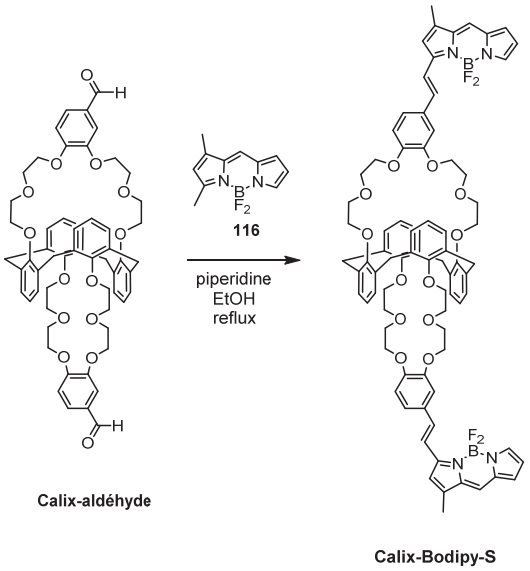


Figure 189 - *Synthèse du Calix-Bodipy-S*

c) Etudes du Calix-Bodipy-S dans l'acétonitrile

Les propriétés photophysiques du Calix-Bodipy-S ont été étudiées dans l'acétonitrile (Figure 190). Le maximum d'absorption se situe à 560 nm, et son coefficient d'absorption molaire est de 68 000 M^{-1}. cm^{-1}. Le maximum d'émission se situe à 585 nm et le rendement quantique de la molécule est de 0,48.

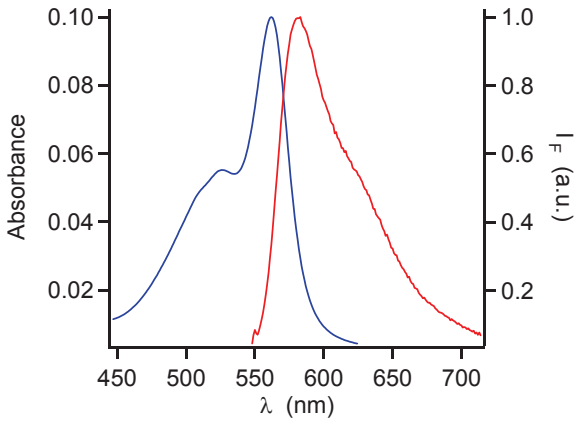
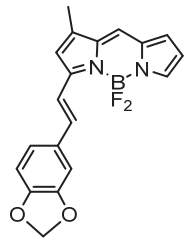


Figure 190 - *Spectres d'absorption et d'émission du Calix-Bodipy-S dans l'acétonitrile.*

Les spectres d'absorption et d'émission du Calix-Bodipy-S sont déplacés vers les plus hautes longueurs du fait de la conjugaison étendue du bodipy. Ces déplacements sont du même ordre de grandeur que des bodipy styriliques décrits dans la littérature comme le BD-139[248] (Figure 191, Tableau 20). L'influence du potassium sur les propriétés du Calix-Bodipy dans l'acétonitrile a ensuite été étudiée.



BD-139

Figure 191 *Structure du bodipy BD-139*[249]

	$\lambda_{abs\ max}$	$\lambda_{em\ max}$	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
BD-139	560	585	45 000	0,016
Calix-Bodipy-S	561	581	68 000	0,48

Tableau 20 - *Comparaison des propriétés spectrales du Calix-Bodipy-S et de BD-139*

L'ajout de potassium entraîne un déplacement bathochrome de 8 nm des spectres d'absorption et une augmentation de l'intensité de la fluorescence (Figure 192). La complexation du potassium, diminue le transfert de charge intramoléculaire existant entre les oxygènes donneurs et le bodipy accepteur, expliquant le déplacement bathochrome des spectres observés. De même, la diminution du transfert de charge intramoléculaire favorise une désexcitation radiative à partir de l'état LE, entraînant une augmentation de la fluorescence. Les effets photophysiques observés sont similaires à ceux de la sonde du potassium B3TAC (Figure 168) mais moins importants. L'azote qui est un meilleur groupement donneur que l'oxygène induit des effets photophysiques plus importants.

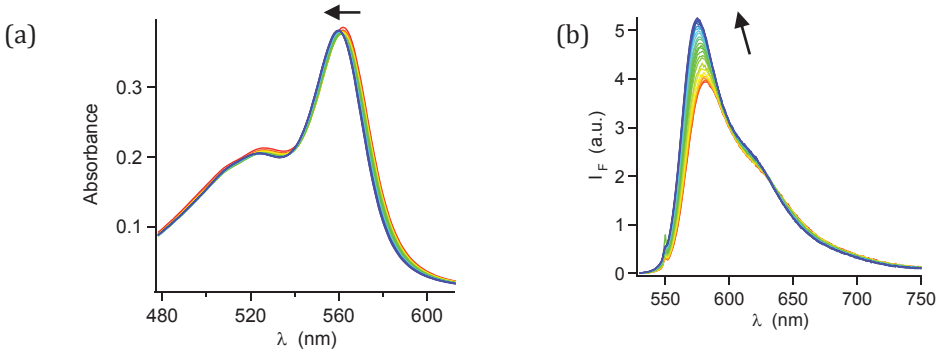


Figure 192 *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission du Calix-Bodipy-S avec l'ajout de potassium.*

d) Conclusions

Le Calix-Bodipy-S avec sa conjugaison étendue présente des déplacements spectraux et des propriétés photophysiques intéressantes. Le remplacement des oxygènes par un azote meilleur groupement donneur pourrait permettre d'obtenir des effets photophysiques plus importants à la suite de la complexation de potassium. Malheureusement, l'étape de chloro-sulfonation du Calix-Bodipy-S nécessaire à l'hydro solubilisation de la sonde aurait vraisemblablement entrainé sa dégradation. Des modifications de la structure de la sonde sont donc à envisager dans le but d'utiliser des bodipys striliques. Cette voie de synthèse a donc pour l'instant été abandonnée.

7) Conclusions sur l'insertion de fluorophores par condensation de Knoevenagel

La conjugaison d'espèces électroattractrices via une double liaison à notre ionophore ne nous a pas permis d'obtenir une molécule hydrosoluble permettant des mesures de potassium fiables. De même, l'impossibilité de sulfoner le Calix-Aldéhyde n'a pas non plus permis l'obtention du Calix-Bodipy-S-Sulf. Pour remédier au problème de stabilité du bodipy nous avons envisagé de remplacer les fluors par des fonctions acétyléniques (Figure 193). En effet, Ziessel et al. ont effectués des réactions de substitution B-F avec divers groupements (aromatiques, acétyléniques, aliphatiques) et les bodipy obtenus ont été jugé insensibles aux acides et bases fortes ainsi qu'aux solvants et réactifs polaires[250]. Ceci pourrait nous permettre d'ajouter le bodipy avant l'étape de sulfonation, pour obtenir une espèce stable à la sulfonation. Nous nous sommes intéressés aux groupements acétyléniques non seulement parce que les rendements de synthèses sont bons, mais aussi parce qu'ils peuvent être par la suite fonctionnalisés. Plutôt que d'insérer le bodipy via une réaction de Knoevenagel dont le rendement est faible, nous avons préféré construire le bodipy à partir du Calix-Aldéhyde, puis de remplacer les fluors avant d'ajouter les groupements sulfonates (Figure 193).

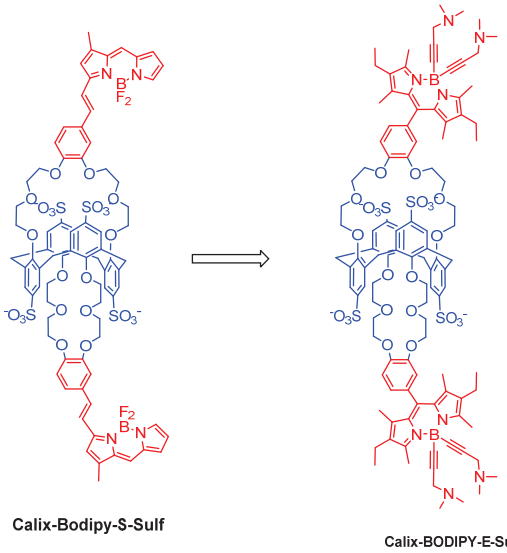


Figure 193 - *Remplacement du bodipy par un bodipy-E*

C. Remplacement du Bodipy par un Bodipy-E

1) Présentation des Bodipy-E

Les bodipy-E[251] pour éthynyl sont des bodipy issus de réactions de substitution B-F entre un composé acétylénique et un bodipy fluoré (Figure 194). Le remplacement des fluors par des triples liaisons les rendraient insensibles aux acides et bases fortes ainsi qu'aux solvants et réactifs polaires. Ceci est probablement dû à la stabilisation du bore tétraédrique par les groupements ethynyls donneurs.[252] Un tel bodipy nous permettrait d'envisager l'insertion du bodipy avant l'étape de sulfonation.

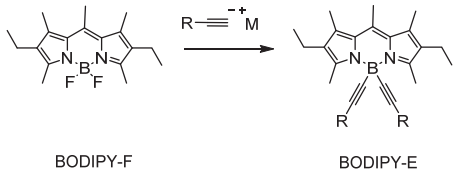


Figure 194 - *Bodipy-E issu de la substitution B-F d'un Bodipy-F*

Ce type d'insertion est utilisé pour la réalisation de cassettes donneur-accepteur, ou comme moyen d'augmenter la solubilité des bodipy en milieu aqueux. Les cassettes sont le fruit d'une stratégie mise en place pour s'affranchir du faible déplacement de Stokes des bodipy, qui est un inconvénient à leur utilisation en microscopie de fluorescence. Dans cette stratégie, des chromophores sont greffés sur le bore et font office d'antennes. Leur excitation est suivie d'un transfert d'énergie intramoléculaire en direction du bodipy. Celui-ci se désexcite par la suite en émettant un photon (Figure 195). On a ainsi la création artificielle d'un large déplacement de Stokes tout en conservant les caractéristiques spectroscopiques du bodipy.

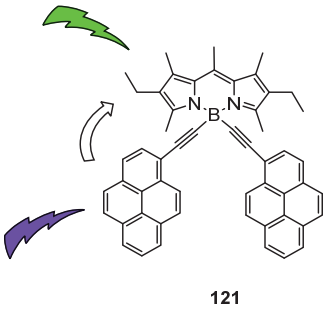


Figure 195 - *Exemple d'une cassette bodipy / pyrènes*

Ces triples liaisons peuvent aussi permettre l'insertion de groupements PEG[253], phosphonate[254] ou sulfobétaine[255,256] (Figure 196) pour augmenter la solubilité des bodipy dans l'eau tout en conservant les caractéristiques photophysiques du bodipy initial. Outre le fait d'avoir un bodipy résistant à la chloro-sulfonation, ceci nous permettrait d'augmenter l'hydrosolubilité de notre sonde. Parmi les différents groupements possibles, nous nous sommes intéressés aux sulfobétaines. Ces espèces zwiterioniques sont obtenues par insertion de la 3-diméthylaminopropyne puis quaternatisation de l'amine tertiaire en présence de propane sultone. Ce processus de solubilisation d'espèces faisant appel aux sulfobétaines est couramment utilisé en chimie médicinale[257].

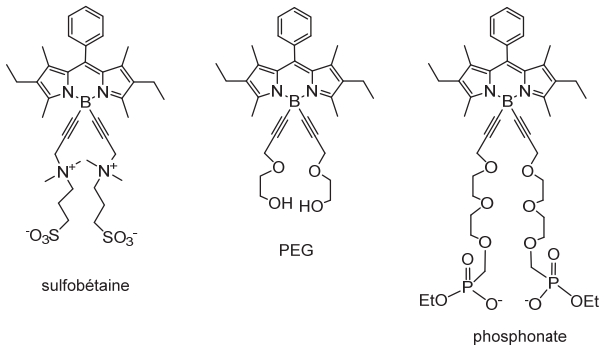


Figure 196 - *Groupement augmentant la solubilité des bodipy en milieu aqueux*

2) *Retrosynthèse envisagée*

Le Calix-bodipy serait obtenu à partir du Calix-aldéhyde. Les fluors seraient ensuite remplacés par des groupements 3-diméthylaminopropyne pour obtenir le Calix-bodipy-E avant de sulfoner la molécule pour obtenir le Calix-Bodipy-E-Sulf (Figure 197).

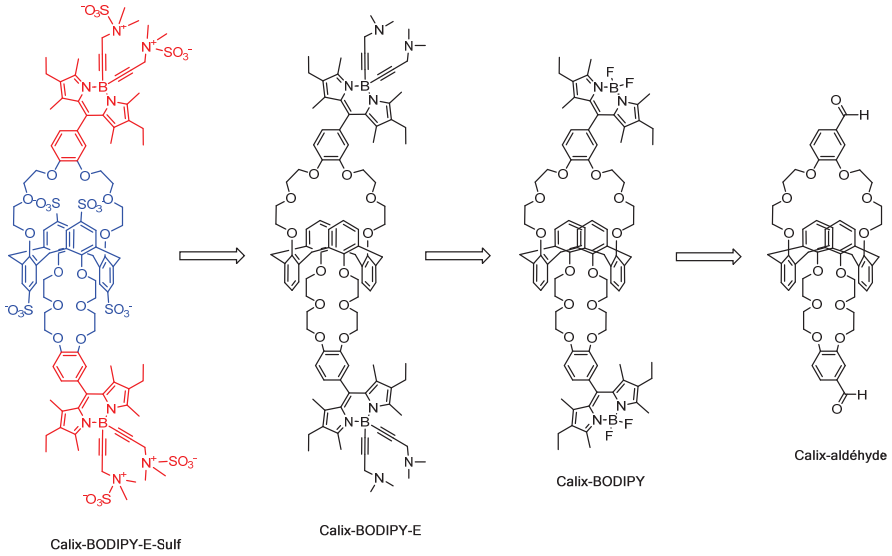


Figure 197 - *Rétrosynthèse du Calix-Bodipy-E-sulf envisagée*

3) *Synthèses effectuées*

Avant d'effectuer des essais sur le calix-aldéhyde, nous avons vérifié la stabilité des bodipy-E aux conditions de chlorosulfonation. Le bodipy-E **123** a été synthétisé à partir du bodipy **122** par substitution des fluors par la 3-diméthylaminopropyne avec 64% de rendement (Figure 198). L'utilisation d'EtMgBr à la place du BuLi ne permet pas d'isoler de produit de substitution. Pour tester la résistance du composé **123**, 16 équivalents d'acide chlorosulfonique ont été ajoutés à une solution du bodipy dans le dichlorométhane à température ambiante. Après deux heures, temps généralement nécessaire pour la réaction de chlorosulfonation, la réaction est quenchée par ajout d'eau. Des analyses CCM de la phase aqueuse fortement fluorescente ont montré la présence d'au moins deux produits fluorescents. Des essais de purification sur colonne n'ont malheureusement pas permis de les séparer, empêchant leur caractérisation.

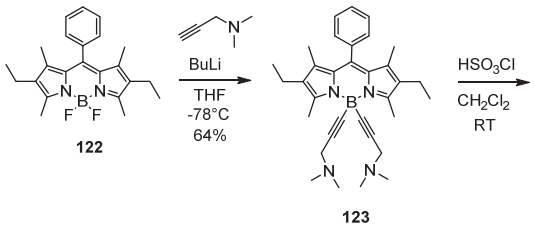


Figure 198 - *Synthèse d'un bodipy-E et essai de sulfonation*

Bien que nous n'ayons pas pu isoler un produit à la suite de cette réaction, le fait que des espèces fluorescentes aient résisté à l'étape de chlorosulfonation nous a encouragés à continuer. En effet, contrairement aux essais de chlorosulfonation effectués sur le calix-aza-bodipy, où la perte du

BF_2 a entrainé une extinction de fluorescence, des espèces fluorescentes ont ici été détectées après réaction.

Le calix-bodipy a été obtenu par condensation du calix-aldéhyde et du 3-Ethyl-2,4-dimethylpyrrole. Après purification sur colonne, le produit a été isolé avec 35% de rendement (Figure 199).

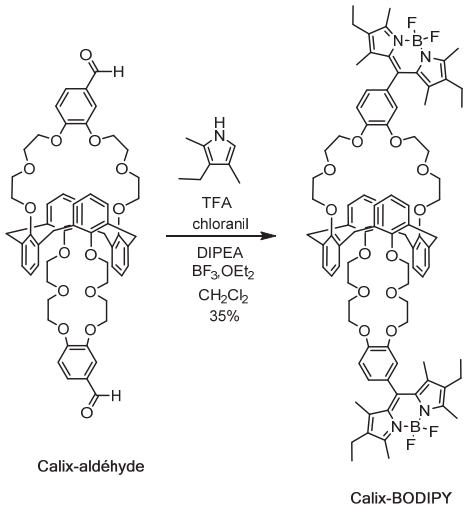


Figure 199 - *Synthèse du Calix-BODIPY et essai de synthèse du Calix-BODIPY-E*

Nous avons ensuite tenté de nombreux essais de substitution des fluors par la 3-diméthylaminopropyne sans parvenir à isoler de produits de substitutions (Figure 200). En travaillant dans des conditions identiques, ou avec un plus grand excès de lithien, avec du THF fraichement distillé, de la verrerie sèche, à basse température et avec plusieurs sources de BuLi, nous n'avons pas été en mesure d'obtenir le calix-Bodipy-E. Les propriétés photophysiques du Calix-Bodipy ont néanmoins pu être étudiées dans l'acétonitrile.

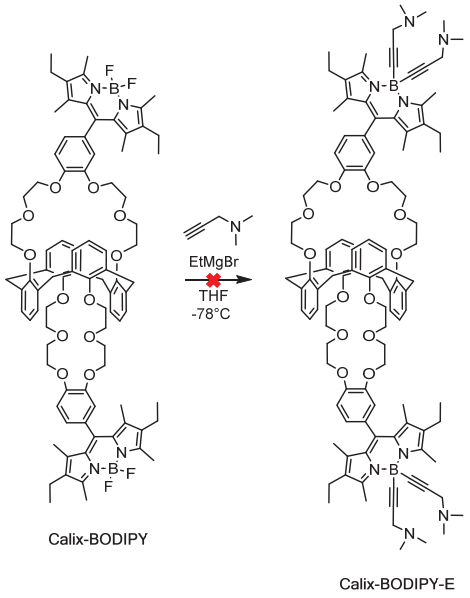


Figure 200 - *Essais de synthèse du Calix-Boudipy-E*

4) Propriétés spectrales du Calix-BODIPY

Les propriétés photophysiques du Calix-Bodipy ont été étudiées dans l'acétonitrile (Figure 201). Dans l'acétonitrile, le spectre d'absorption de la molécule est intense et fin, caractéristique des bodipy. Le maximum d'absorption se situe à 520 nm, et son coefficient d'absorption molaire est de 100200 M^{-1}. cm^{-1} correspondant à la transition $S_0 - S_1$.

Ces propriétés d'émission dans l'acétonitrile sont en revanche fortement différentes de celles du calix-aza-bodipy. La molécule est en effet fortement fluorescente dans l'acétonitrile avec un rendement quantique de 81% contrairement au calix-aza-bodipy. Le spectre d'émission est le symétrique dans un miroir du spectre d'absorption et son maximum d'émission se situe à 533 nm. L'influence du potassium sur les propriétés du Calix-Bodipy dans l'acétonitrile a ensuite été étudiée.

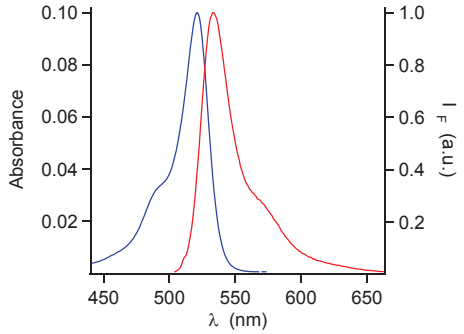


Figure 201 - *Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (b) de Calix-Bodipy dans l'acétonitrile*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ε (M^{-1}. cm^{-1})	ϕ
Calix-Bodipy	520	533	100200	0,81
Calix-Aza-Bodipy	496	509	140000	0,003

Tableau 21 - *Comparaison des caractéristiques photophysiques du Calix-Bodipy et du Calix-Aza-Bodipy*

L'ajout de potassium entraîne un déplacement bathochrome de 2 nm des spectres d'absorptions, et l'apparition d'un point isobestique à 520 nm. L'intensité de fluorescence diminue quant à elle suite à l'ajout de potassium sans déplacement des spectres d'émission. La différence des propriétés photophysiques et des effets photo-induits par le potassium vont maintenant être discutées.

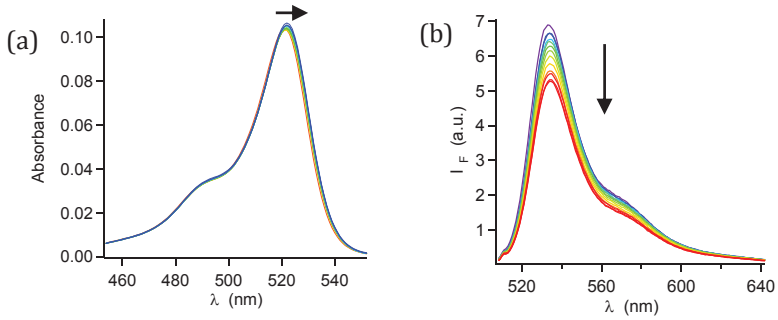


Figure 202 - *Evolution des spectres d'absorption (a) et d'émission (b) du Calix-Bodipy en présence d'une concentration croissante de potassium. Solvant =CH_3CN; [Calix-Bodipy] = 1,0 µM λ_{exc} = 521 nm $\lambda_{em\ max}$ = 533 nm*

5) Phénomènes photo-induits mis en jeu

La différence de propriétés photophysiques entre le Calix-Aza-Bodipy et le Calix-Bodipy, est due au mode de désexcitation dominant différent des deux composés. Cette différence de comportement observée entre un bodipy substitué par un groupement amino ou benzo couronne a été étudiée par Rurack et al.[258,259]. La comparaison des quatre bodipys Figure 203 permet de mieux comprendre cela.

Le bodipy **124** non substitué est fortement fluorescent en solution, la désexcitation radiative étant prédominante. Au contraire, en solution le bodipy **125** substitué par un groupement amino est peu fluorescent. Ceci est dû à l'existence d'un rapide transfert de charge intramoléculaire entre le groupement amino donneur et le bodipy accepteur favorisant une désexcitation non radiative. Le bodipy **126** substitué par une benzo couronne est quant à lui fortement fluorescent en solution. Les groupements oxygènes ne sont pas des groupements suffisamment donneurs pour que le transfert de charge intramoléculaire, et donc la désexcitation non radiative, puisse concurrencer la désexcitation radiative. L'insertion de groupements accepteurs sur le bodipy **127** augmente la vitesse du transfert de charge intramoléculaire entre les oxygènes et le bodipy appauvri en électron. La désexcitation non radiative devient alors prédominante, rendant la molécule peu fluorescente en solution.

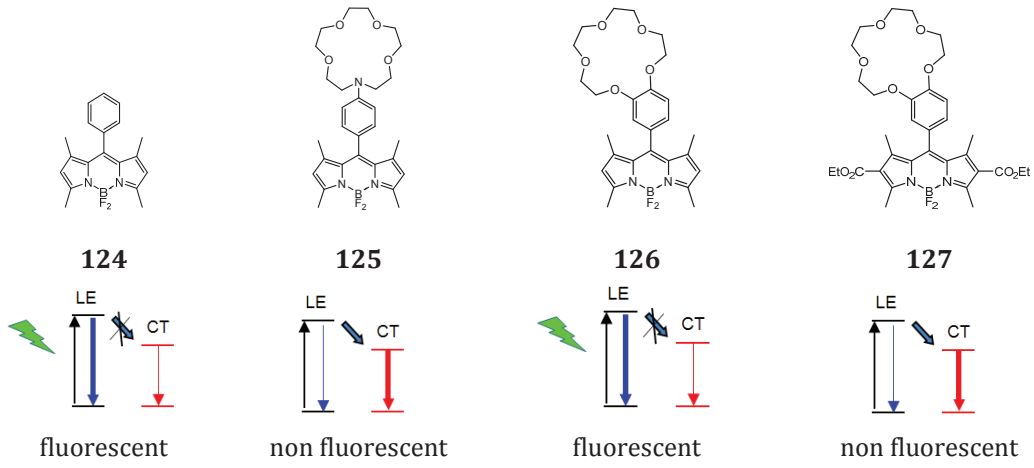
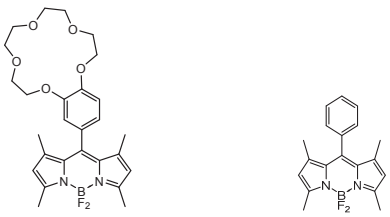


Figure 203 - *Comparaison du mode de désexcitation majoritaire de différents bodipys*

Lors de l'ajout de potassium, une diminution de l'intensité de la fluorescence du Calix-Bodipy est observée. Ceci est dû à une diminution du caractère donneur des oxygènes. En présence de potassium, les groupements ne sont plus donneurs, ce qui revient à considérer les propriétés spectroscopiques du bodipy non substitué. La comparaison des propriétés spectrales des bodipy **124** et **126** (Figure 204) nous montre que le rendement quantique du bodipy non substitué **124** est légèrement plus faible que celui du bodipy **126** substitué par une benzo couronne. Nous pouvons donc supposer dans notre cas que la diminution de la fluorescence observée est liée au plus faible rendement quantique du bodipy non substitué **124** par rapport au bodipy **126**.



126
$\lambda_{abs\ max}$ = 497nm
$\lambda_{abs\ max}$ = 507 nm
ε = 82 000 M^{-1}. cm^{-1}
ϕ =0,63

124
$\lambda_{abs\ max}$ = 497nm
$\lambda_{abs\ max}$ = 505 nm
ε = 83 000 M^{-1}. cm^{-1}
ϕ =0,60

Figure 204 - *Comparaison des propriétés spectrales des bodipys* **126** *et* **124**

6) Conclusions sur l'utilisation du Bodipy-E

Les problèmes rencontrés lors de la synthèse du Calix-Bodipy-E ne nous ont pas permis d'obtenir la molécule cible. Néanmoins, ce travail nous a permis de mieux comprendre certains phénomènes photo-induits mis en jeu. Cette meilleure compréhension pourrait aboutir à la synthèse de nouvelles sondes pour des applications en microfluidique.

Après cela, nous avons choisi de repartir sur une structure rigide liant l'ionophore et le fluorophore :

- soit en remplaçant la coumarine par un fluorophore de type phénoxazine,
- soit en modifiant la structure de la coumarine dans le but de déplacer ses spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes (Figure 205).

Les travaux sur les phénoxazines seront dans un premier temps présentés, puis ceux sur les coumarines.

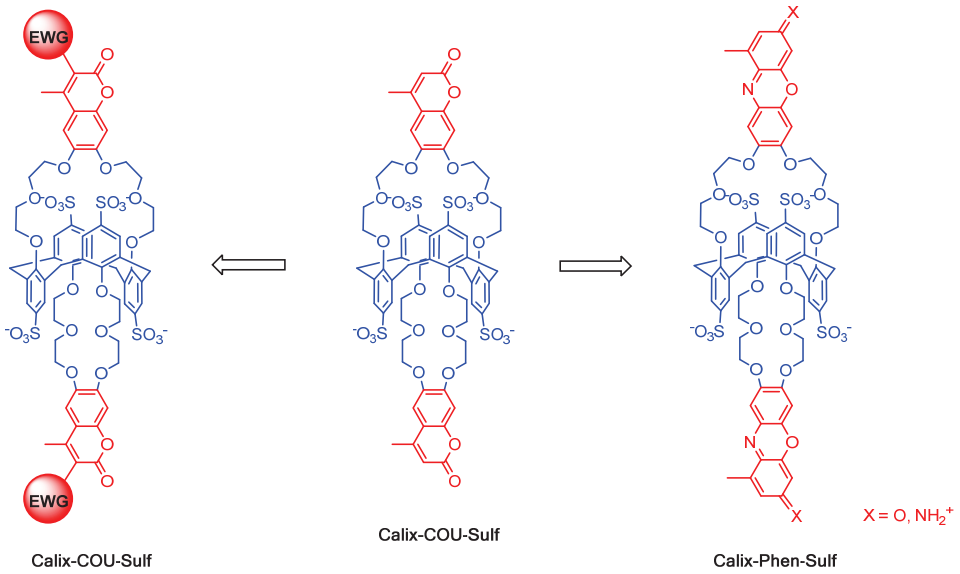
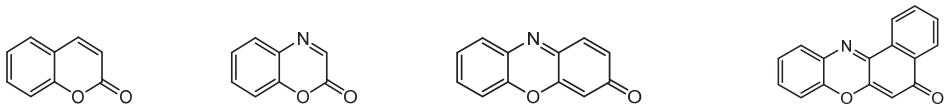


Figure 205 - *Modifications envisagées, extension de la conjugaison de la coumarine et remplacement de la coumarine par un dérivé de phénoxazine*

D. Remplacement de la coumarine par une phénoxazin-3-one

Les oxazines ont une structure proche des coumarines, l'atome de carbone à l'opposé de l'oxygène est remplacé par un azote, et elles peuvent posséder un ou deux cycles de plus que les coumarines dans le cas des phénoxazines et benzophénoxazines (Figure 206).

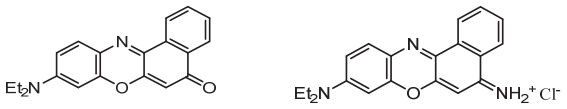


Coumarine Oxazinone Phénoxazin-3-one Benzophénoxazin-3-one

Figure 206 - *Structures de la coumarine, oxazinone, phénoxazin-3-one et benzophénoxazin-3one*

Ce sont, comme la coumarine, des fluorophores à transfert de charge intramoléculaire où une partie donneuse d'électrons (alcool, amine) est conjuguée à une partie acceptrice d'électrons (cétone), les molécules sans groupement donneur ou accepteur d'électron n'étant pas fluorescentes. Leur plus grande conjugaison entraîne un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes, raison pour laquelle nous souhaitons utiliser ce type de molécule.

Les phénoxazin-3-ones appartiennent à la famille des phénoxazines qui regroupe aussi les phénoxaziniums, fluorophores où la fonction cétone est remplacée par un iminium. Les deux représentants les plus connus de ces familles sont respectivement le Nile Blue et le Nile Red [260](Figure 207). Leurs caractéristiques photophysiques vont être brièvement présentées ainsi que les raisons du choix de la phénoxazin-3-one, puis les essais de synthèse de la phénoxazin-3-one.



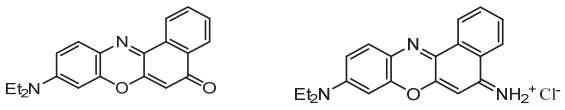
Nile Red Nile Blue

Figure 207 - *Structures du Nile Red et du Nile Blue*

1) Phénoxazin-3-ones et phénoxaziniums

a) Comparaison du Nile Red et du Nile Blue

Le Nile Red[261] possède un groupement carbonyle en position 3 et appartient à la famille des benzophénoxazin-3-ones. Ses propriétés spectroscopiques sont fortement dépendantes de la polarité du solvant. Intensément fluorescent autour de 530 nm en solvant apolaire, l'augmentation de la polarité du solvant entraîne une chute de son rendement quantique et un déplacement bathochrome d'une centaine de nanomètres de son spectre d'émission. Le Nile Red a été utilisé pour mesurer la polarité de milieux biologiques[262,263], pour de l'imagerie de fluorescence de tissus vivants[264] ou pour la réalisation de sondes moléculaires fluorescentes[265].



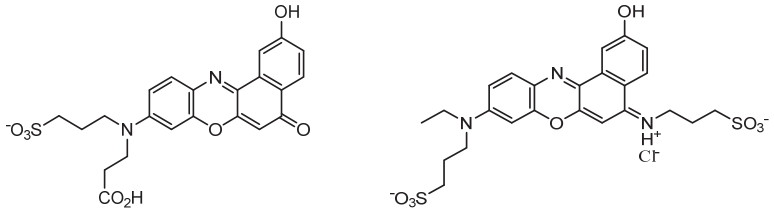
Nile Red
λ_{abs} = 554 nm
λ_{em} = 638 nm
ϕ = 0,38
MeOH

Nile Blue
λ_{abs} = 626 nm
λ_{em} = 668 nm
ϕ = 0,27
MeOH

Figure 208 - *Propriétés spectrales du Nile Red et du Nile Blue*

Le Nile Blue[266] possède lui, un groupement iminium chargé positivement en position 3 et appartient à la famille des benzophénoxaziniums. Comme le Nile Red, il est également fortement sensible à la polarité de son environnement. Il a aussi été utilisé pour le marquage de matériel biologique[267], l'imagerie de fluorescence de tissus[268] ou la réalisation de sondes moléculaires fluorescentes[269].

Le Nile Red et le Nile Blue sont malheureusement très peu solubles et fluorescents en milieu aqueux, mais leur greffage sur un calixarène hydrosoluble devrait permettre d'empêcher tout phénomène d'agrégation comme cela peut être le cas des fluorophores seuls en solution. De plus, l'utilisation en milieu biologique d'analogues hydrosolubles de Nile Red et Nile Blue synthétisés par Burgess et al.[270,271] nous a confortés dans notre choix. Ces analogues portant des groupements solubilisant (Figure 209) présentent des propriétés spectroscopiques dans l'eau semblables à celles du Nile Red et du Nile Blue dans le méthanol.



128
λ_{abs} = 558 nm
λ_{em} = 652 nm
ε = 7876 $M^{-1}.cm^{-1}$
ϕ = 0,37
Phosphate Buffer

129
λ_{abs} = 630 nm
λ_{em} = 671 nm
ε = 42400 $M^{-1}.cm^{-1}$
ϕ = 0,14
Phosphate Buffer

Figure 209 - *Propriétés spectrales d'analogues hydrosolubles du Nile Red et du Nile Blue*

Ces fluorophores sont principalement utilisés comme marqueurs fluorescents pour des applications en imagerie de fluorescence. Néanmoins quelques fluorionophores incorporant une phénoxazin-3-one ou phénoxazinium existent, dont deux exemples vont maintenant être présentés.

b) Fluoroionophore à base de phénoxazin-3-one et de phénoxazinium

La molécule **130** (Figure 210) est un fluoroionophore de type PCT comportant une phénoxazin-3-one. Cette molécule permet la détection de mercure en milieu aqueux[272]. Elle se compose d'une entité complexante sélective du mercure conjuguée à la partie donneuse phénoxazin-3-one. Le mercure qui lors de la complexation interagit avec la partie donneuse du fluorophore entraîne une diminution du transfert de charge intramoléculaire. Cela se traduit par un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption et d'une diminution de la fluorescence (Figure 211).

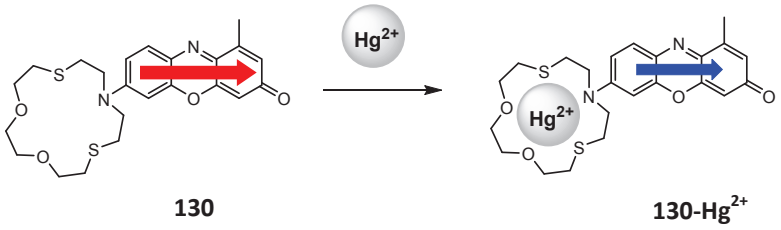


Figure 210 - *Diminution du transfert de charge intramoléculaire suite à la complexation du mercure*

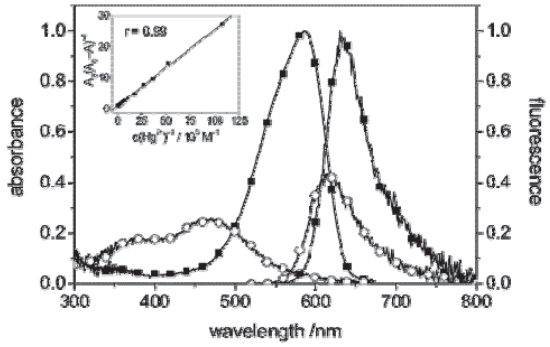


Figure 211 - *Spectres d'absorption et de fluorescence en absence (•) et en présence de mercure (°) dans l'eau*

La molécule **131** (Figure 212) permet la détection de zinc en milieu biologique. Elle se compose d'un benzophénoxazinium sur lequel est attaché un motif bis-pyridylamine permettant la complexation sélective du zinc[273]. La complexation du potassium entraîne une exaltation de fluorescence vraisemblablement liée à des interactions orbitalaires entre le zinc et le groupement amino donneur du benzophénoxazinium (Figure 213).

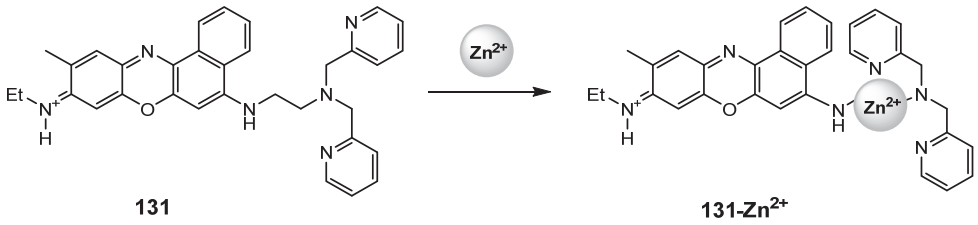


Figure 212 - *Sondes fluorescentes du zinc incorporant un benzophénoxazinium*

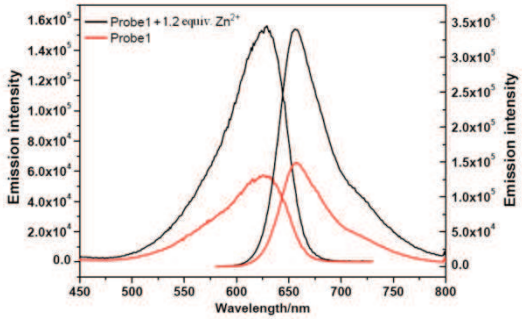


Figure 213 - *Spectres d'excitation et d'émission de la molécule 82 dans l'eau (λ_{em} = 650, λ_{exc} = 579 nm)* [274]

c) Choix du fluorophore

Entre ces deux fluorophores, nous avons choisi, pour plusieurs raisons, de remplacer la coumarine par une phénoxanzin-3-one plutôt qu'un phénoxazinium (Figure 214). Tout d'abord, les phénoxazin-3-ones avec leurs fonctions cétones ont une structure plus proche des

coumarines. De plus les propriétés spectrales du Nile Blue sont dépendantes du pH. En conditions basiques, l'iminium peut être déprotonné, diminuant son caractère accepteur, en condition acide au contraire, la fonction amine à l'opposé peut être protonée, diminuant son caractère donneur. Enfin, le groupement iminium des phénoxazinium peut aussi être hydrolysé en cétone en condition acide, ce qui peut poser problème lors de la synthèse.

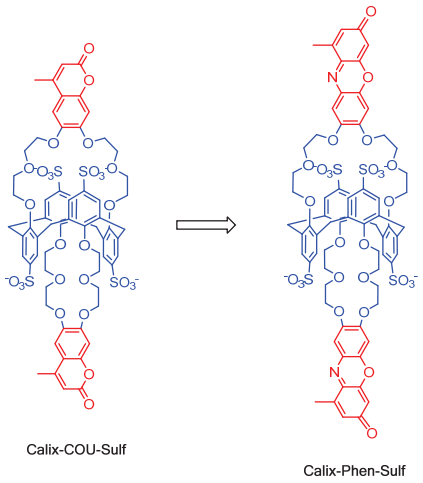
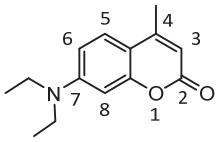
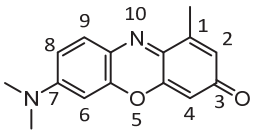


Figure 214 - *Remplacement de la coumarine par une phénoxazin-3-one*

Suite à ce choix, la comparaison des propriétés spectroscopiques de la 7-diéthylaminocoumarine et de la 7-diméthylaminophénoxazin-3one (Figure 215) nous permet d'espérer un déplacement d'une centaine de nanomètres des spectres d'absorption et d'émission tout en gardant un rendement quantique élevé.



132
7-diéthylaminocoumarine
λ_{abs} = 373 nm
λ_{em} = 445 nm
ϕ = 0,71
EtOH



133
7-diméthylaminophénoxazin-3-one
λ_{abs} = 525 nm
λ_{em} = 610 nm
ϕ = 0,65
ACN

Figure 215 - *Comparaison des propriétés spectrales de la Coumarine 460 et de la 7-diméthylaminophénoxazin-3-one*

2) Synthèse de la 7-8-dihydroxy-1-méthylphénoxazin-3-one

a) Rétrosynthèse envisagée

La retrosynthèse envisagée (Figure 216) s'inspire de la synthèse de Calix-COU-Sulf, où une phénoxazin-3-one dihydroxylé **135** serait fonctionnalisée par deux bras éthylène glycol, puis greffée sur un calixarène et rendue hydrosoluble par sulfonation. La complexation de potassium devrait ainsi produire des effets similaires à ceux observés chez Calix-COU-Sulf, l'étape clé étant la synthèse de la phénoxazin-3-one dihydroxylée **135**. Aucune phénoxazin-3-one dihydroxylée

n'a jamais à notre connaissance été reportée. La plupart sont substituées par un groupement amino donneur. Quelques exemples existent néanmoins avec une fonction hydroxyle.

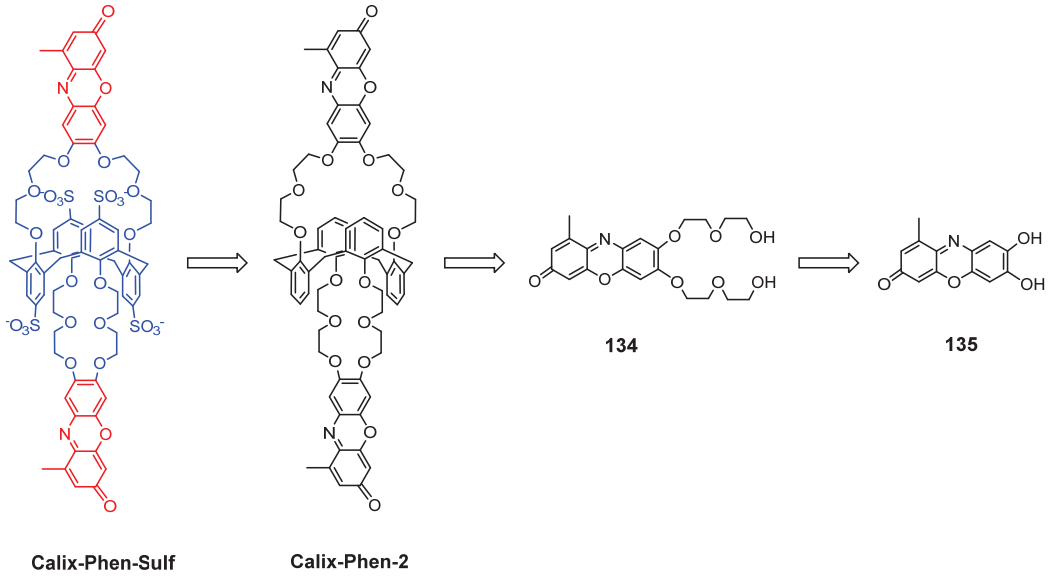


Figure 216 - *Retrosynthèse envisagée pour l'obtention du Calix-Phen-Sulf*

Classiquement les phénoxazin-3-ones sont obtenues par condensation d'un nitrosoarène[275] **137** ou d'un nitrosophénol[276,277] **139** avec un autre phénol (Figure 217). Les réactions de condensation à partir de nitrosophénol semblent mieux fonctionner. La nitrosation de cycle aromatique peut soit se faire en milieu aqueux en présence de nitrite de sodium et en condition acide, soit en milieu organique via une autre source de NO^+ tel le nitrite d'isoamyle[278] toujours en condition acide (Figure 217).

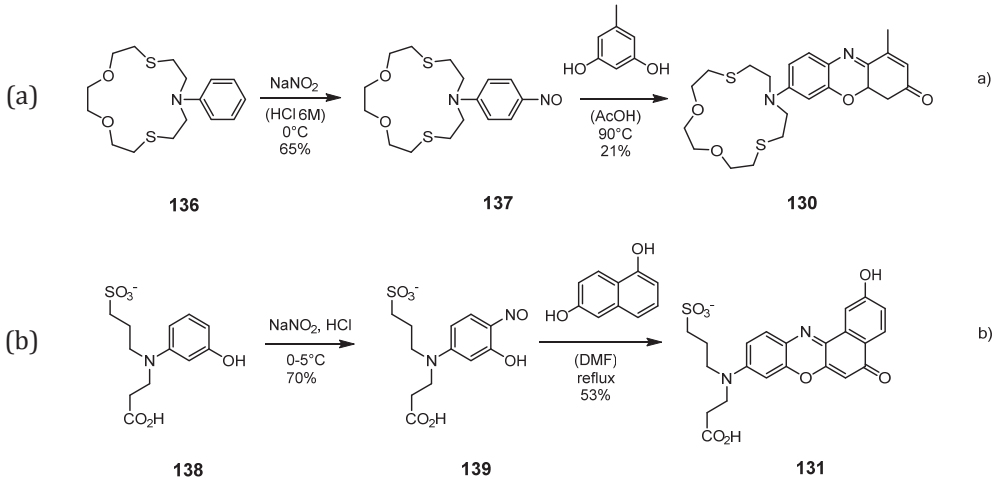


Figure 217 - *Synthèse de phénoxazine par condensation entre un nitrosoarène et un phénol voie a) et un nitrosophénol et un phénol voie b)*

Une autre méthode décrite récemment par Anderson et al[279] permet d'obtenir des phénoxazin-3-ones par substitution nucléophile aromatique, puis condensation intramoléculaire. Ainsi la 7-amino-3,4-diméthylphénoxazin-3-one **140** a été obtenue à partir du dinitrodiméthoxy éther d'aryle **141** (Figure 218). La déprotection des éthers méthyliques, puis la réduction des groupements nitro en amines est suivie d'une cyclisation entraînant la formation de la phénoxazin-3-one désirée. Le dinitrodiméthoxy éther d'aryle **141** est quant à lui facilement

obtenu à partir des composés **142** et **145** commerciaux. En plus de permettre l'introduction de substituants, les rendements obtenus avec cette méthode semblent être meilleurs qu'avec une synthèse classique à partir de composés nitrosés.

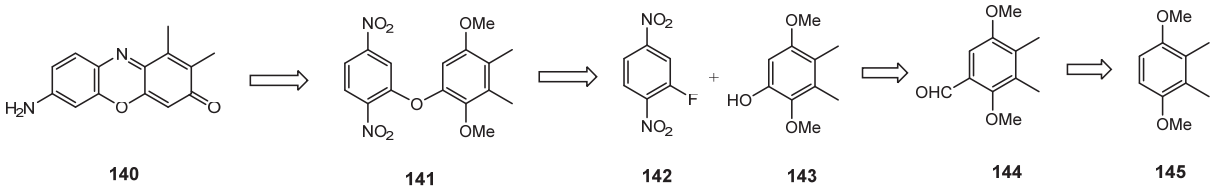


Figure 218 - *Retrosynthèse de la 7-amino-3,4-diméthylphénoxazin-3-one décrite*[280]

Au cours de ce travail, deux voies de synthèses ont été explorées : la voie 1 classique faisant intervenir la condensation d'un nitrosophénol et d'un phénol, et la voie 2 impliquant une substitution nucléophile aromatique puis une cyclisation intramoléculaire. D'autre voies de synthèse existent, mais n'ont pas été étudiées ici.

b) Voie 1 : condensation d'un nitrosophénol et d'un phénol

Des essais de nitrosation en milieu aqueux et organique ont été effectués sur trois différents substrats. Les premiers essais ont été effectués sur le 1,2-dihydroxybenzène **146**. En milieu aqueux acide et en présence de $NaNO_2$, le suivi de la réaction par CCM a montré l'apparition de différents produits, mais en fin de réaction aucun produit trisubstitué n'a pu être isolé par précipitation ou par chromatographie (Figure 219).

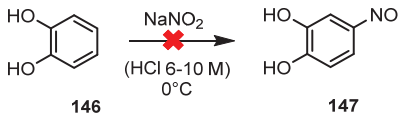


Figure 219 - *Essais de nitrosation du 1,2-dihydroxybenzène en utilisant le nitrite de sodium*

Le même substrat dans l'éthanol en présence de nitrite d'isoamyle n'a pas non plus permis d'isoler de produit trisubstitué (Figure 220). Bien que des réactions de nitrosation soient décrites à partir de phénol[281], celle-ci semble mieux fonctionner sur des anilines disubstituées type diéthylaniline, le doublet non liant de l'azote facilitant la substitution électrophile aromatique.

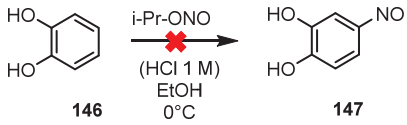


Figure 220 - *Essais de nitrosation du 1,2-dihydroxybenzène en utilisant le nitrite d'isoamyle*

L'utilisation d'anilines disubstituées ne servirait à rien dans notre cas, vu que nous souhaitons obtenir une phénoxazin-3-one dihydroxylée. Par contre, la nitrosation d'aniline monosubstituée a été reportée[282,283] bien que ce soit une amine secondaire, celle-ci étant normalement transformée en nitrosamine. Un cas particulier existe : celui des amines aromatiques secondaires. En présence d'ion nitrosyle, celles-ci sont dans un premier temps transformées en nitrosamine, puis en condition acide, elles se réarrangent en nitrosoaniline[284] (Figure 221).

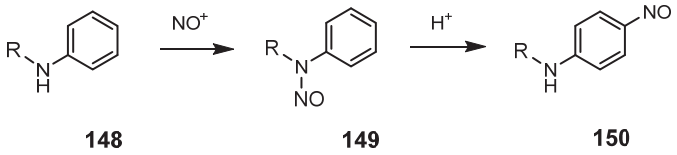


Figure 221 - *Réarrangement de Fischer-Hepp*

Nous avons donc essayé la nitrosation du N-acéthyl-2-aminophénol **151** dans le but d'obtenir un composé nitrosé et tenté la synthèse d'une phénoxazin-3-one, la fonction amine en position 7 pouvant ultérieurement être transformée en alcool via une réaction de Sandemeyer[285] ou utilisée telle quelle. Les essais à partir du N-acéthyl-2-aminophénol **151** en présence de nitrite d'isopropyle dans l'éthanol n'ont pas permis d'isoler de produit nitrosylé (Figure 222).

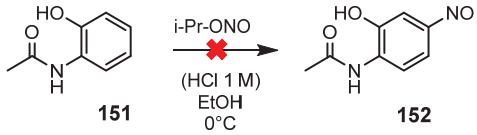


Figure 222 - *Essais de nitrosation du N-acéthyl-2-aminophénol en utilisant le nitrite de sodium*

En présence de nitrite de sodium (Figure 223) un solide beige a été isolé par précipitation conformément à ce qui est décrit dans certains modes opératoires. Des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont montré la formation d'un produit trisubstitué. Par contre, les analyses infra-rouge réalisées sur le produit n'ont pas permis d'identifier la bande caractéristique du groupement nitroso autour de 1550 cm^{-1}, ni un autre groupement azoté. De même, la masse du produit trisubstitué n'a pas pu être déterminée.

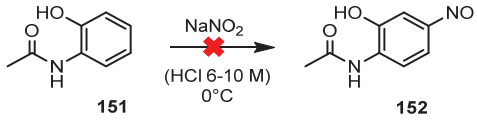


Figure 223 - *Essais de nitrosation du N-acéthyl-2-aminophénol en utilisant le nitrite d'isoamyle*

Une partie du produit isolé a été utilisée telle quelle en présence d'orcinol et d'acide sulfurique dans le butanol à 90°C[286]. Aucun produit de condensation n'a pu être isolé en fin de réaction (Figure 224).

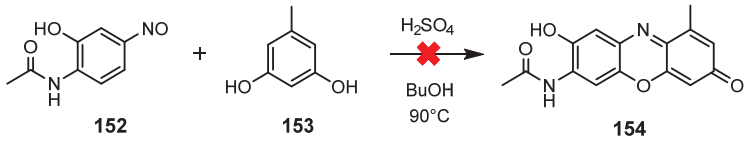


Figure 224 - *Essai de condensation à partir du composé* **152**

Bien que la masse du produit n'ait pas pu être déterminée, des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C ont montré la formation d'un produit trisubstitué. Le produit nitrosé a très bien pu être formé et ne pas réagir lors de l'étape suivante de condensation. L'étude plus détaillée des conditions de condensation (Figure 217) nous montre que celle-ci semble mieux fonctionner à partir de nitrosophénol voie b) qu'à partir d'un nitrosoarène voie a). De même, la présence d'un groupement hydroxyle pourrait aussi faciliter la réaction de nitrosation. Nous avons donc

effectué des essais de nitrosation à partir du 3,4-diméthoxyphénol **155**. Les essais en présence de nitrite de sodium (Figure 225) dans l'eau ont donné des mélanges de produit de départ et d'un produit tétrasubstitué identifié par RMN ^{1}H et ^{13}C.



Figure 225 - *Essais de nitrosation du 3,4-diméthoxyphénol en utilisant le nitrite de sodium*

La réaction a été testée en présence de nitrite d'isoamyle (Figure 226). Des cristaux jaune vif ont été obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice. Des analyses RMN ^{1}H et ^{13}C ont montré la formation d'un produit tétrasubstitué, mais des analyses infra-rouge n'ont encore une fois pas permis de déterminer si le groupement ajouté était bien un groupement nitroso. La masse du produit n'a pas non plus pu être déterminée. Ne disposant pas de service de spectrométrie de masse sur site, celle-ci a été effectuée à l'extérieur plusieurs semaines après la synthèse du produit. Il est possible que celui-ci ait pu se dégrader entretemps.

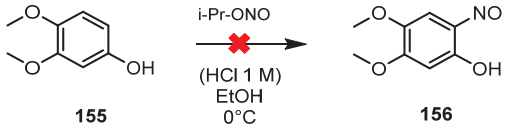


Figure 226 - *Essais de nitrosation du 3,4-diméthoxyphénol en utilisant le nitrite d'isoamyle*

Comme pour le N-acéthyl-2-aminophénol, une partie des cristaux jaunes obtenus ont été utilisés pour des essais de condensation avec l'orcinol sans qu'un produit de condensation ne puisse être isolé (Figure 227).

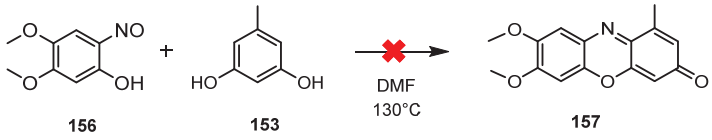


Figure 227 - *Essai de condensation à partir du composé* **156**

Après ces essais infructueux, nous nous sommes intéressés à la seconde voie de synthèse des phénoxazin-3-ones envisagée par substitution nucléophile aromatique puis cyclisation intramoléculaire.

c) Voie 2 : substitution nucléophile aromatique

La rétrosynthèse de la 7,8-dihydroxy-1-méthylphénoxazin-3-ones **135** a été envisagée suivant la méthode décrite par Anderson et al[287]. Celle-ci peut être obtenue par substitution nucléophile aromatique entre le dérivé fluoré **159** et le dérivé phénolique **161** eux-mêmes obtenus à partir des composés **160** et **163** (Figure 228).

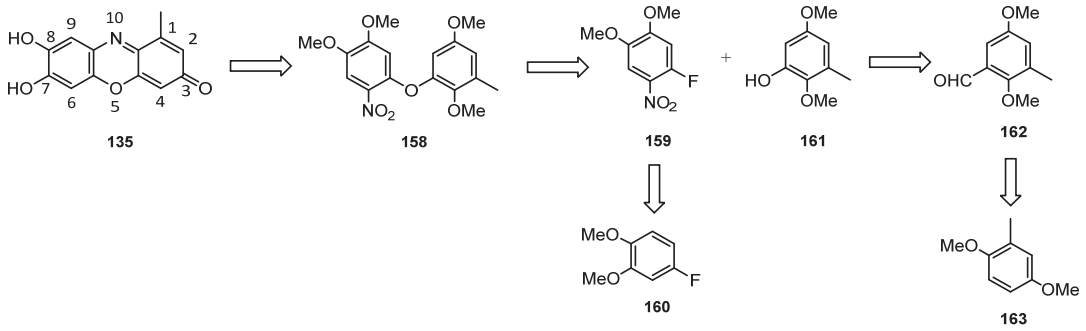


Figure 228 - *Rétrosynthèse de la dihydroxyphénoxazin-3-one envisagée*

Le composé **159** a été obtenu par nitration du 4-fluoroveratrole **160** à l'aide d'un mélange d'acide acétique et d'acide nitrique fumant dans le dichlorométhane à 0°C avec 97% de rendement.

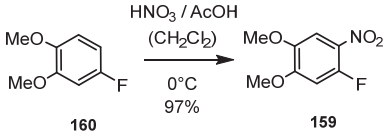


Figure 229 - *Nitration du 4-fluoroveratrole*

La formylation du 2,3-dimethoxytoluene **163** en utilisant les conditions de Duff a entrainé la formation majoritaire du composé **164** et le composé **162** n'a pas pu être isolé (Figure 230). L'utilisation de l'aldéhyde **164** à la place de l'aldéhyde **162** entraînerait la formation d'une phénoxazine-3-one méthylé en position 2 et non en position 1 comme souhaité. A la place de cela, nous avons préféré remplacer le 2,3-dimethoxytoluene **163** par le 1,4-diméthoxy-2,3-diméthylebenzène **167** pour obtenir la phénoxazine-3-one doublement méthylée.

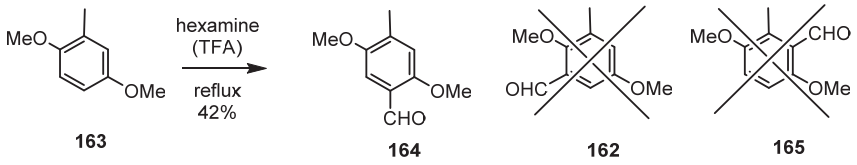


Figure 230 - Formylation du composé **163**

Le 1,4-diméthoxy-2,3-diméthylebenzène **167** est obtenu à partir de la 2,3-diméthylhydroquinone. Sa formylation suivant les conditions de Duff permet d'obtenir le composé formylé **168** avec 44% de rendement. La fonction aldéhyde est ensuite transformée en alcool par une oxydation de Bayer-Williger à l'aide de magnésium monoperoxyphthalate (MMPP) avec 55% de rendement (Figure 231).

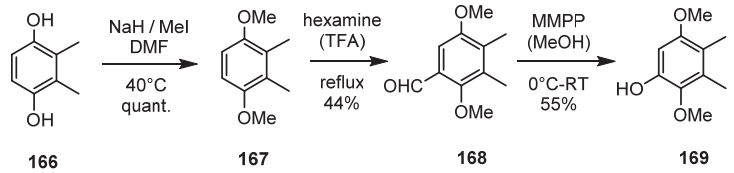


Figure 231 - *Synthèse des composés* **167** *à* **169**

L'éther d'aryle **170** a ensuite été obtenu à partir des composés **160** et **169** en présence de NaH dans le DMF avec 83% de rendement. Un essai de déprotection des éthers méthyliques a été effectué en présence de 4 équivalents de BBr_3 à -78°C entraînant la dégradation du produit (Figure 232).

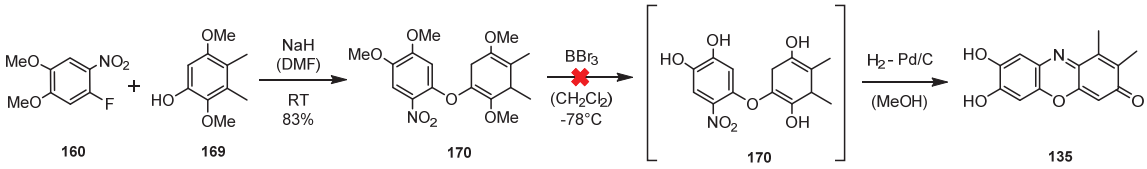


Figure 232 - Synthèse de l'éther d'aryle **170**

L'utilisation de moins d'équivalent de BBr_3 ou l'ajout plus lent du BBr_3 pourrait permettre d'obtenir le produit de déprotection attendu. Ayant entre temps progressé sur la synthèse d'analogues de la coumarine, cette piste a été abandonnée.

3) Conclusions sur le remplacement de la coumarine par une benzophénoxazin-3-one

Ces réactions m'ont pris beaucoup de temps et ne m'ont pas permis d'isoler une phénoxazin-3-one dihydroxylée permettant la synthèse de la sonde voulue. En parallèle de ce travail, les progrès faits sur la synthèse d'analogues de la coumarine nous ont poussés à renoncer à l'utilisation de phénoxazin-3-ones et à nous concentrer sur la synthèse d'analogues de la coumarine.

E. Extension de la conjugaison de la coumarine

Simultanément aux essais de synthèse de phénoxazin-3-one dihydroxylée entrepris, nous avons cherché à modifier la structure de la coumarine dans le but de déplacer ses spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes. Le but était d'obtenir une première molécule permettant la réalisation de tests préliminaires, afin de déterminer si ce type de sonde peut permettre des mesures de potassium extracellulaire, ou au contraire si elle perturbe l'activité biologique.

Partant de la 6,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine commerciale, nous avons cherché à introduire des groupements insaturés et/ou électroattracteurs en position 3, pour obtenir des analogues excitables au-dessus de 405 nm (Figure 233). En effet, la modification des groupements donneurs en positions 6 et 7 aurait entrainé la modification de l'ionophore, et donc des propriétés de complexation. Plusieurs stratégies ont pour cela été envisagées. Nous avons dans un premier temps effectué la synthèse puis l'étude des propriétés photophysiques d'analogues de la 6,7-dihydroxy-4-méthylcoumarine portant deux bras éthylène glycol, avant de modifier la structure de Calix-COU-Sulf et d'étudier les propriétés photophysiques des molécules obtenues.

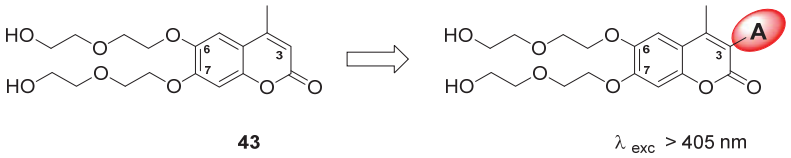


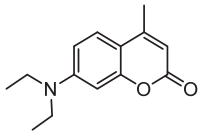
Figure 233 - *Fonctionnalisation de la position 3 de la coumarine pour déplacer les spectres d'absorption et d'émission*

1) Coumarines modifiées

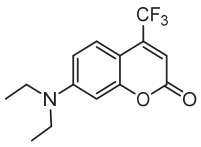
L'ajout de groupement électro-donneurs en positions 6 et 7 ou de groupements électro-attracteurs en position 3 et 4 permet d'augmenter le transfert de charge intramoléculaire et donc de déplacer les spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes. L'introduction de groupements électroattracteurs a plus d'influence sur le déplacement des spectres[288], ce qui est intéressant vu que nous n'envisageons pas de modifier positions 6 et 7. De même, l'extension du système π insaturé via l'introduction de substituant insaturé en position 3 ou 4 entraîne aussi un déplacement vers les plus hautes longueurs d'ondes[289,290]. La chimie combinatoire[291,292] a permis, avec la réalisation de bibliothèques de composés, de mieux comprendre les propriétés spectroscopiques de la famille des coumarines. Nous allons maintenant voir plus en détail différentes stratégies utilisées dans la littérature pour déplacer les spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes, avant de voir les modifications que nous avons envisagées.

a) 4-trifluorométhylcoumarines

Le remplacement du groupement méthyle en position 4 par un groupement trifluorométhyle électroattracteur permet d'augmenter le transfert de charge intramoléculaire, déplaçant les spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes. La comparaison des propriétés spectroscopiques de la coumarine 460 et de la coumarine 481 - son équivalent trifluoré - montre bien un déplacement vers les plus hautes longueurs d'ondes des spectres d'absorption et d'émission, de même que l'agrandissement de déplacement de Stokes (Figure 234). De plus, la présence d'un groupement perfluoroalkyle en position 4 de la coumarine permet d'en augmenter la photostabilité[293].



Coumarine 460
λ_{abs} = 373 nm
λ_{em} = 445 nm
ϕ = 0,50
EtOH



Coumarine 481
λ_{abs} = 405
λ_{em} = 510 nm
ϕ = 0,08
EtOH

Figure 234 - *Comparaison des caractéristiques spectrales des coumarines 460 et 481*

b) 3-Cyanocoumarines

Les groupements nitriles comme les groupements perfluoroalkyles sont aussi fortement électroattracteurs. Leur introduction en position 3 permet aussi un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes tout en conservant un bon rendement quantique[294] (Figure 235).



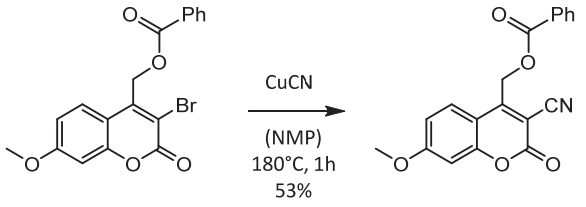
171 **172**

λ_{abs} = 380 nm
λ_{em} = 460 nm
EtOH

λ_{abs} = 428 nm
λ_{em} = 474 nm
EtOH

Figure 235 - *Comparaison des caractéristiques spectrales de coumarines cyanées et non cyanées en position 3*

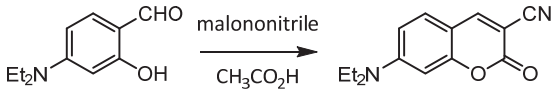
La réaction de cyanation décrite par Jullien et al.[295] se fait à partir d'une coumarine bromée en position 3 (Figure 236). La coumarine cyanée est obtenue après une heure dans le NMP à 180°C en présence de cyanure de cuivre.



173 **174**

Figure 236 - *Synthèse de la 3-cyanocouamrine à partir de la 3-bromocoumarine*

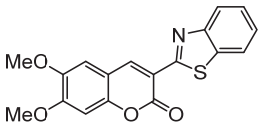
Le groupement nitrile en position 3 peut aussi être obtenue par condensation de Perkin du salicylaldéhyde et du malonitrile en condition acide (Figure 237) [296], la réaction en condition basique entraînant la formation de l'acide[297]. La condensation peut aussi se faire en condition acide en remplaçant le malononitrile par l'acide cyanoacétique[298]. Mais ces méthodes entraînent la formation de coumarines non substituées en position 4 ce qui n'est pas ce que nous souhaitons.



175 **172**

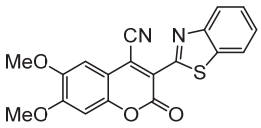
Figure 237 - *Synthèse de 3-cyanocoumarines à partir de salicylaldéhyde*

Les groupements nitriles peuvent aussi être introduits en position 4[299,300], induisant aussi un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes (Figure 238).



176

λ_{abs} = 405 nm
λ_{em} = 474 nm
ϕ = 0,86
CH_3CN

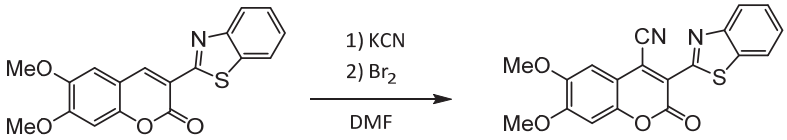


177

λ_{abs} = 455 nm
λ_{em} = 549 nm
ϕ = 0,41
CH_3CN

Figure 238 - *Propriétés spectrales de coumarines portant ou étant dépourvue de groupements cyanos en position 4*

Le groupement cyano est introduit sur la coumarine par ajout de KCN puis de Br_2 dans le DMF, entraînant la formation sélective de la 4-cyanocomarine (Figure 239). Dans notre cas la position 4 de la coumarine étant occupée par un méthyle, seule l'introduction d'un groupement nitrile en position 3 a été envisagée.



176 **177**

Figure 239 - *Synthèse de coumarine cyané en position 4*

c) Ajout de groupements instaurés en position 3 et 4

L'introduction de groupements électroattracteurs en positions 3 et 4 permet d'augmenter le transfert de charge intramoléculaire entraînant un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes. Une autre façon de déplacer les spectres vers les plus hautes longueurs d'ondes est l'introduction de groupements insaturés en positions 3 et 4 pour étendre la conjugaison de la coumarine.

L'introduction de substituants insaturés en position 3 peut se faire à partir d'une coumarine bromée ou iodée via des réactions de couplage pallado-catalysées, comme la réaction de Heck[301], de Suzuki-Miyaura[302,303], de Sonogashira-Hagihara[304] (Figure 240), ou encore de Stille[305]. Ces réactions faciles à mettre en œuvre permettent l'introduction sélective et avec de bons rendements de substituants insaturés.

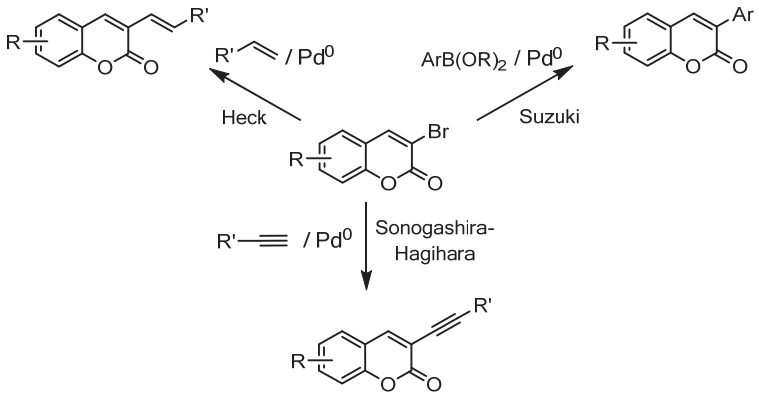


Figure 240 - *Insertion de substituants insaturés en position 3 via des réactions pallado-catalysés*

Plus récemment, des conditions ont été développées pour permettre l'arylation[306] et l'oléphination[307] sélective de coumarine via des réactions de C-H activation pallado-catalysées (Figure 241), l'avantage étant l'introduction de substituants sur des coumarines non activées. Néanmoins, les rendements de réactions décrits sont pour l'instant inférieurs à ceux obtenus à partir de coumarines préalablement halogénées.

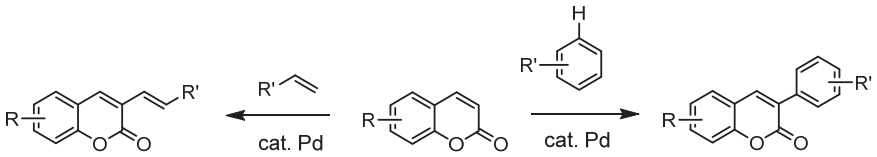


Figure 241 - *Introduction de substituants en position 3 par C-H activation pallado-catalysé*

L'insertion de substituants peut aussi se faire par condensation de Knoevenagel (Figure 242) entre une coumarine portant une fonction aldéhyde en position 3 et une espèce électrodefficiente[308], entraînant la formation d'un fluorophore hybride de type coumarine-hemicyanine[309,310] . La coumarine formylée est obtenue en suivant les conditions de la réaction de Vilsmeier-Haack[311].

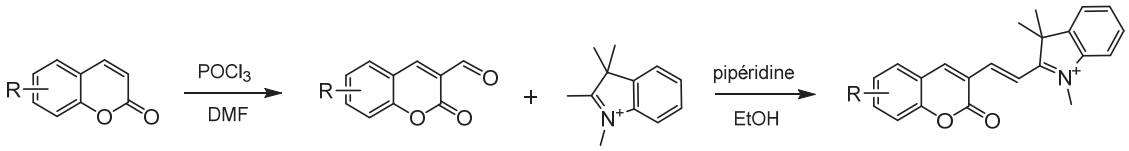


Figure 242 - *Formylation d'une coumarine suivie de l'ajout d'un substituant électroattracteur par condensation*

Enfin, des réactions de condensation à partir de dérivés de salicylaldéhydes (Figure 243), un précurseur de la coumarine, permettent aussi l'obtention de coumarines substituées en position 3 [312,313].

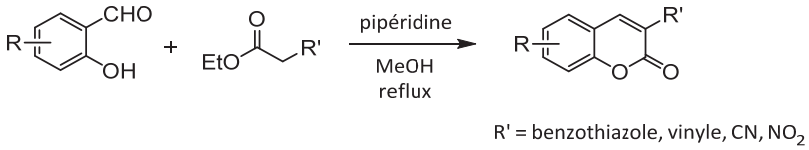


Figure 243 - *Synthèse de coumarine substituée en position 3 à partir de salicylaldéhyde*

Des substituants aryles peuvent aussi être introduits en position 4, aussi via des réactions de C-H activation pallado-catalysées[314,315,316] (Figure 244). Néanmoins, comme précédemment, les rendements de réactions décrits ne sont pas toujours très bons.

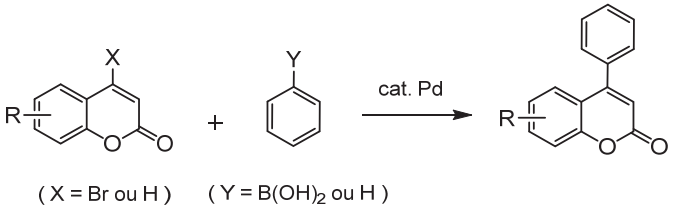


Figure 244 - *Introduction de substituant en position 4 par C-H activation pallado-catalysé*

d) Choix des modifications

Après cette présentation de différentes modifications possibles, il est important de rappeler que nous souhaitons conserver la structure de la coumarine de départ, avec un méthyle en position 4 et une lactone en position 2 (Figure 245). Parmi les groupements électroattracteurs possibles, nous avons choisi d'insérer un groupement cyano en position 3 et un groupement trifluorométhyle en position 4, la structure d'un méthyle et d'un trifluorométhyle étant proches.

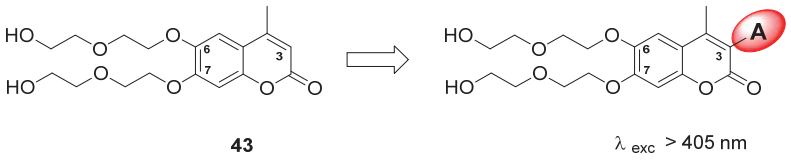
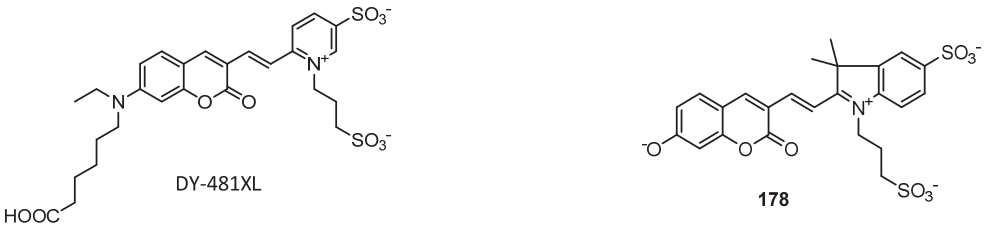


Figure 245 - *Modification de la position 3 de la coumarine*

En ce qui concerne l'extension de la conjugaison de la coumarine, les réactions de condensation à partir de salicylaldéhyde ne permettant pas l'introduction de méthyl en position 4 n'ont pas été retenues. De même, l'introduction de substituant en position 4 par C-H activation ne nous a pas intéressés pour la même raison. Nous nous sommes donc intéressés aux réactions pallado-catalysées à partir de coumarine halogénée en position 3 pour obtenir de bons rendements de couplage. Pour que la conjugaison soit la plus étendue possible, nous nous sommes restreints aux couplages de Heck et de Sonogashira-Hagihara. Le choix entre ces deux couplages s'est fait en fonction de leurs propriétés photophysiques et de la réactivité de la liaison formée.

Les hybrides coumarine-hémicyanine ont des caractéristiques photophysiques fortement déplacées vers les plus hautes longueurs d'ondes et disposent de déplacements de Stokes relativement importants (Figure 246), mais leurs rendements quantiques lorsqu'ils sont décrits sont souvent faibles[317].



λ_{abs} = 515 nm	λ_{abs} = 573
λ_{exc} = 650 nm	λ_{exc} = 636 nm
ε = 50000 L. $mol^{-1}.cm^{-1}$ (EtOH)	ε = 70400 L. $mol^{-1}.cm^{-1}$ (PBS)
-	ϕ = 0, 013

Figure 246 - *Propriétés spectrales de deux hybrides coumarine-hémicyanines*

De plus, ce type de structure bien qu'inerte vis-à-vis des acides aminés souffrés (Cystéine (Cys), Homocystéine (Hcy) et Glutathion (GSH)[318], a néanmoins été utilisé en tant que chémodosimètre pour la détection de radicaux hydroxyl OH° [319], de cyanure CN^- [320] (Figure 247) et de sulfite SO_3^{2-} ou bisulfite HSO_3^- [321].

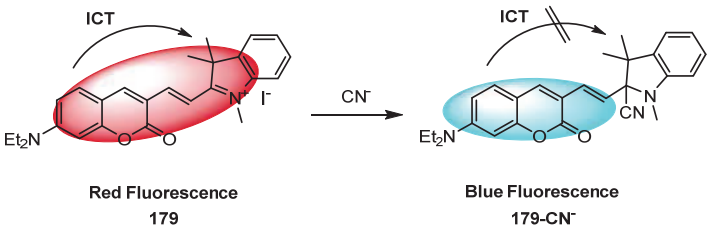
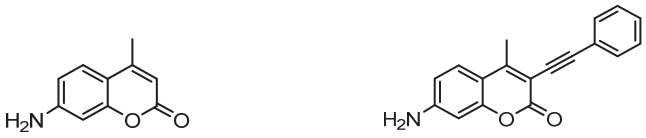


Figure 247 - *Sondes moléculaires permettant la détection d'ions cyanures*

Au contraire, l'insertion d'une triple liaison ne semble pas affecter le rendement quantique (Figure 248) tout en permettant un déplacement vers les plus hautes longueurs d'ondes des spectres d'absorption et d'émission en fonction de l'alcyne couplé.



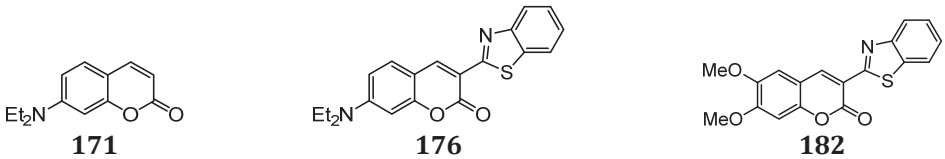
180 **181**

λ_{abs} = 354 nm	λ_{abs} = 397
λ_{exc} = 430 nm	λ_{exc} = 455 nm
ϕ = 0, 75 (EtOH)	ϕ = 0, 98 (EtOH)

Figure 248 - *Comparaison des propriétés spectrales de la 7-aminocoumarine et de la 7-amino-4-phenylacéthylènecoumarine*

Pour éviter tout problème lors de la synthèse ou au cours de mesures, et suite aux résultats obtenus précédemment avec le TCF et l'iodure de 1,2,3,3-Tetramethyl-3h-indolenium, nous avons préféré étendre la conjugaison de la coumarine en introduisant une triple liaison plutôt qu'un lien styrilique.

Pour finir, en plus des couplages de Sonogashira envisagés, nous nous sommes aussi intéressés à l'insertion d'un groupement benzothiazole. En effet, l'insertion d'un groupement benzothiazole semble entraîner un fort déplacement des spectres vers les plus hautes longueurs d'ondes (Figure 249). Celui-ci serait introduit aussi à partir d'une coumarine iodée via une réaction de C-H activation.



171 **176** **182**

λ_{abs} = 380 nm	λ_{abs} = 458 nm	λ_{abs} = 408 nm
λ_{em} = 460 nm	λ_{em} = 505 nm	λ_{em} = 474 nm
-	ϕ = 0,78	ϕ = 0,73
EtOH	EtOH	EtOH

Figure 249 - *Comparaison des propriétés spectrales de la coumarine 460 et de deux coumarines avec des groupements benzothiazole*

Pour résumer, l'insertion des groupements CF_3, CN et benzothiazole ont été retenus ainsi que l'extension de la conjugaison via des couplages de Sonogashira-Hagihara.

e) Molécules envisagées

Parmi les différentes modifications choisies, 7 analogues de la coumarine ont été envisagés (Figure 250) :

COU-CF_3 avec un groupement trifluorométhyle en position 4.

COU-CN avec un groupement CN en position 3.

COU-Benz avec un groupement benzothiazole en position 3.

COU-Alcyne avec un groupement phénylacéthylène en position 3.

COU-Amonium avec un groupement éthynylanilinium en position 3.

COU-Benz-CN avec un groupement éthynylbenzonitrile en position 3.

COU-Py avec un groupement éthynylpyridine en position 3.

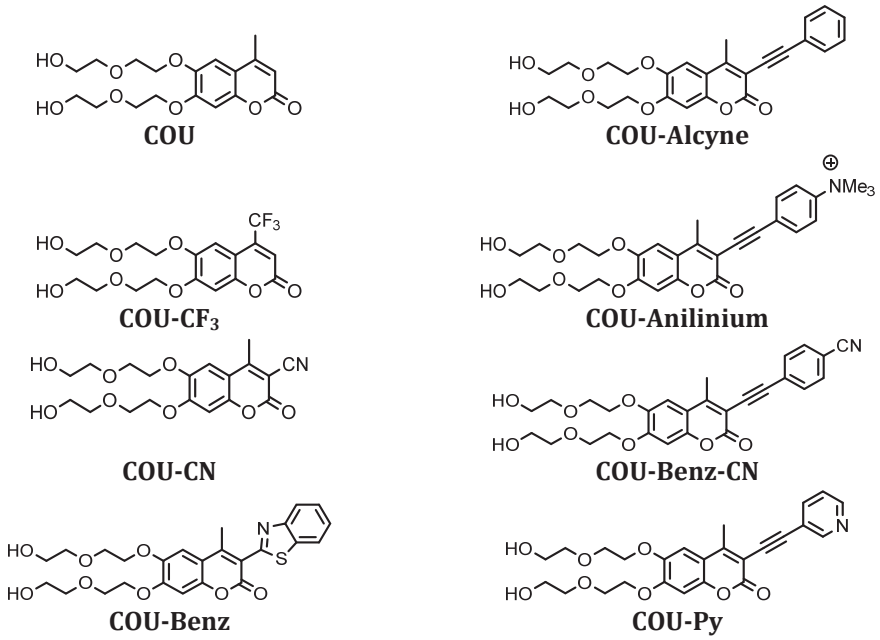


Figure 250 - *Analogues de la coumarine envisagés*

Quatre couplages de Sonogashira-Hagihara ont été envisagés afin de voir l'influence du groupement inséré sur les propriétés photophysiques des molécules. La présence de groupements électroattracteurs peut en effet entraîner un transfert de charge intramoléculaire plus important et donc un déplacement des spectres plus important. Ainsi **COU-Alcyne** sans groupement électroattracteur sert de référence. **COU-Benz-CN** possède un groupement nitrile électroattracteur en para de la triple liaison. **COU-Anilinium** possède un groupement électroattracteur et chargé, ce qui peut en plus aider à la solubilisation de la molécule dans l'eau. **COU-Py** avec son groupement pyridine est aussi fortement électroattracteur, l'azote ayant aussi la possibilité d'être substitué comme **COU-Anilinium**. La synthèse puis l'étude photophysique de ces composés a été effectuée dans le but d'obtenir des molécules excitables au-dessus de 405 nm.

2) *Synthèse et études photophysiques des composés modèles*

a) Synthèses effectués

Iodation de la coumarine

Les réactions de couplage pallado-catalysé ont été effectuées à partir d'une coumarine iodée plus réactive que son équivalent bromée. Celle-ci a été iodée en présence de N-iodosucinimide (1,5 éq) d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique (0,3 éq) au reflux de l'acétonitrile[322] (Figure 251). L'absence d'acide trifluoroacétique ne permet pas d'isoler le produit iodé. De même, l'utilisation d'un autre solvant que l'acétonitrile, comme le méthanol ou le DMF, conduit à des rendements d'iodation beaucoup plus faibles.

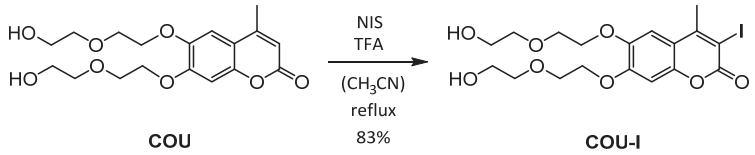


Figure 251 - *Iodation de la position 3 de la coumarine*

Couplages de Sonogashira

Les couplages de Sonogashira ont été effectués en présence d'une quantité catalytique de $Pd(PPH_3)_4$ (0,1 éq) et de CuI, (0,5 éq), de 2,5 équivalents d'alcyne et 10 équivalents de triéthylamine dans le dioxane à 110°C, permettant l'obtention de quatre dérivés acétyléniques (Figure 252, Tableau 22). Trois des quatre réactions de couplage ont bien fonctionné avec la conversion totale du produit iodé en fin de réaction. Les couplages pour obtenir **COU-Alcyne** et **COU-aniline** à partir d'alcynes riches en électrons n'ont duré que quelques heures. Au contraire, **COU-Benz-CN** et **COU-Py** issues de couplages avec des alcynes plus pauvres en électrons ont pris plus de temps. **COU-Benz-CN** a été obtenue à partir de l'éthynylbenzonitrile avec un rendement de 31%, bien inférieur aux autres, du faite de la désactivation du composé.

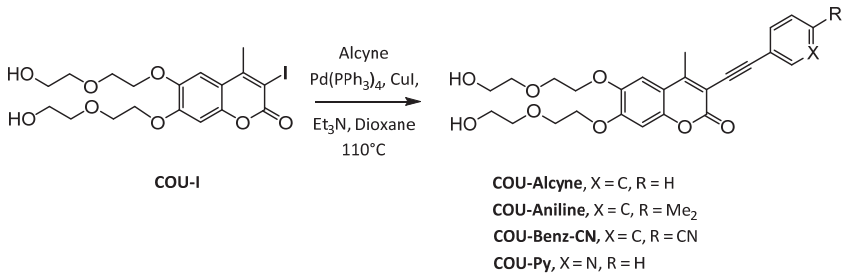


Figure 252 - *Couplage de Sonogashira effectué sur la coumarine*

molécule	Temps de réaction	R
COU-Alcyne	3 h	81%
COU-Aniline	1 h 30	96%
COU-Benzonitrile	24 h	31%
COU-Py	24 h	85%

Tableau 22 - *Temps de réaction nécessaire et rendement obtenu pour les couplages de Sonogashira*

La **COU-Aniline** a ensuite été transformée en **COU-Anilinium** en présence d'iodure de méthyle dans le dichlorométhane (Figure 253).

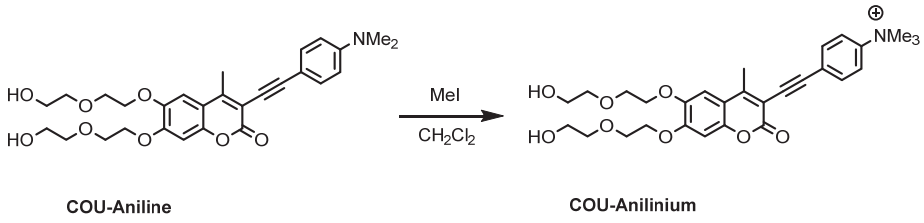


Figure 253 - Synthèse de COU-Anilinium

COU-Benz

L'insertion d'un benzothiazole à partir de la coumarine iodée a été effectuée dans les mêmes conditions, le produit de couplage a été obtenu, mais avec un rendement de seulement 18% (Figure 254). L'optimisation des conditions de réaction est nécessaire si l'on souhaite utiliser cet analogue pour remplacer la coumarine. Néanmoins, suffisamment de produit a pu être isolé pour pouvoir étudier l'influence du groupement benzothiazole sur les propriétés spectrales de la coumarine.

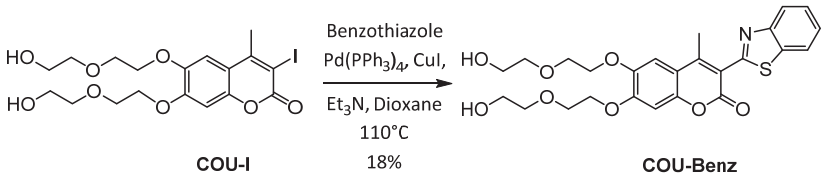


Figure 254 - *Insertion d'un benzothiale en position 3*

COU-CF_3

Les 4-trifluorocoumarines sont généralement obtenues par condensation de Pechman entre l'éthyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate et un dérivé phénolique en présence d'un acide de Lewis[323] ou d'acide trifluoroacétique. (Figure 255). Malheureusement, des essais à partir de la molécule **183** en présence d'acide trifluoroacétique n'ont pas permis d'isoler la 4-trifluoro-6,7-dihydroxycoumaine.

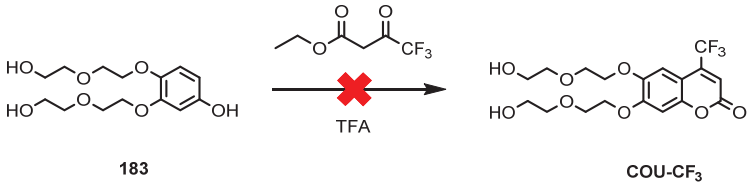


Figure 255 - *Essai de synthèse de la 4-trifluorométhylcoumarine*

Sa synthèse a nécessité l'utilisation de conditions plus dures, toujours en présence de 4,4,4-trifluoroacetoacetate, mais à partir du 1,2,4 triacetoxybenzene **184** et dans une solution d'acide sulfurique à 85% (Figure 256)[324]. Après une nuit à température ambiante et purification sur colonne, le produit **185** est obtenu avec seulement 24% de rendement. La quantité obtenue a néanmoins permis d'effectuer l'étape suivante de O-alkylation à l'aide d'éthylène glycol monotosylé en présence de K_2CO_3 au reflux de l'acétonitrile. Après deux jours au reflux et purification sur colonne, **COU-CF_3** a été obtenu avec 61% de rendement.

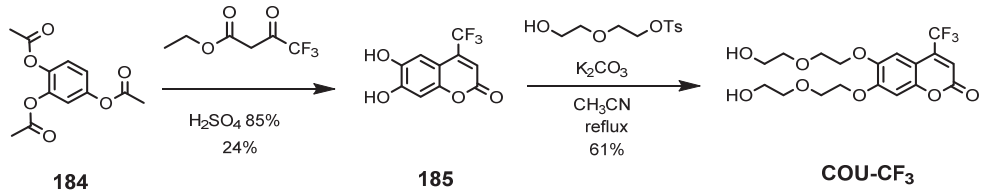


Figure 256 - *Synthèse de la 4-trifluorométhylcoumarine*

Dans le but d'introduire des groupements insaturés en position 3 via des réactions pallado-catalysés, l'iodation de **COU-CF$_3$** a aussi été tentée (Figure 257). Malgré différents essais en présence de NIS et d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile, nous n'avons pas réussi à isoler de produit iodé. Belov et al.[325] ont aussi tenté l'iodation ou la formylation de la position 3 sans succès. Une coumarine formylée en position 3 aurait permis l'insertion de groupements via une condensation de Knoevenagel. Belov et al. ont néanmoins réussi à obtenir une coumarine chlorée en position 3, en effectuant la condensation de Pechman à partir du 2-chloro-4,4,4-trifluoro-3-oxobutyrate, ce qui leur a permis d'introduire des groupements insaturés via un couplage de Stille.

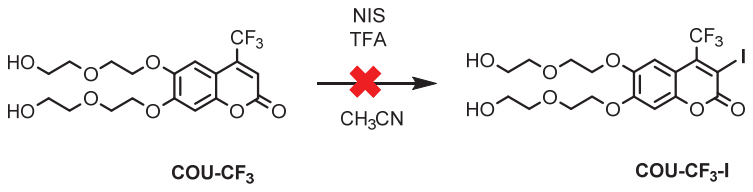


Figure 257 - *Essai d'iodation de 4-trifluorométhylcoumarine*

COU-CN

L'insertion du groupement nitrile en position 3 a été effectuée suivant les conditions décrites par Jullien et al[326]. à partir d'une coumarine bromée en présence de CuCN dans le NMP a 180°C. Disposant d'une coumarine iodée en position 3, nous avons effectués la réaction à partir de celle-ci et non du composé bromé. La coumarine iodée en présence de cyanure de cuivre chauffée 4h à 180°C dans le NMP a permis d'obtenir la coumarine disposant d'un groupement nitrile en position 3 (Figure 258).

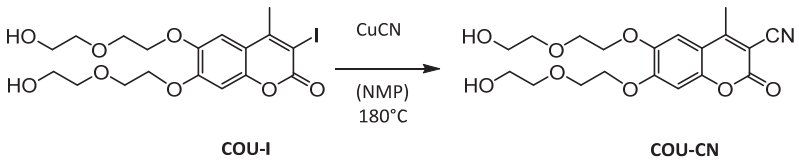


Figure 258 - *Synthèse de la 4-méthyl-3-cyanocoumarine*

Les propriétés photophysiques de la coumarine et des 7 analogues obtenus ont ensuite été étudiées dans l'acétonitrile.

b) Etudes des propriétés photophysiques des 7 analogues réalisés

Les propriétés photophysiques dans l'acétonitrile des différents analogues synthétisés ont été étudiées. Dans un premier temps, les coumarines **COU-CF$_3$** et **COU-CN** portant des groupements

électroattracteurs ont été comparées avec la coumarine modèle **COU** (Figure 259, Tableau 23). Puis, les coumarines issues des réactions de couplages ont été comparées entre elles et à la coumarine modèle **COU** (Figure 260, Tableau 24).

Propriétés photophysiques de COU-CF_3 et COU-CN

Le maximum d'absorption de la coumarine modèle **COU** est à 338 nm et son maximum d'émission à 411 nm. Le remplacement du groupement méthyle en position 4 par un groupement trifluorométhyle, **COU-CF_3** entraîne un déplacement du spectre d'absorption de 17 nm par rapport à la coumarine modèle. Par contre, le spectre d'émission est déplacé de plus de 64 nm, entraînant l'agrandissement du déplacement de Stokes (120 nm) comme c'est souvent le cas pour des coumarines avec un groupement trifluorométhyle. L'insertion du groupement cyano en position 3, **COU-CN** entraîne lui un déplacement des spectres d'absorption et d'émission respectivement de 33 et 29 nm.

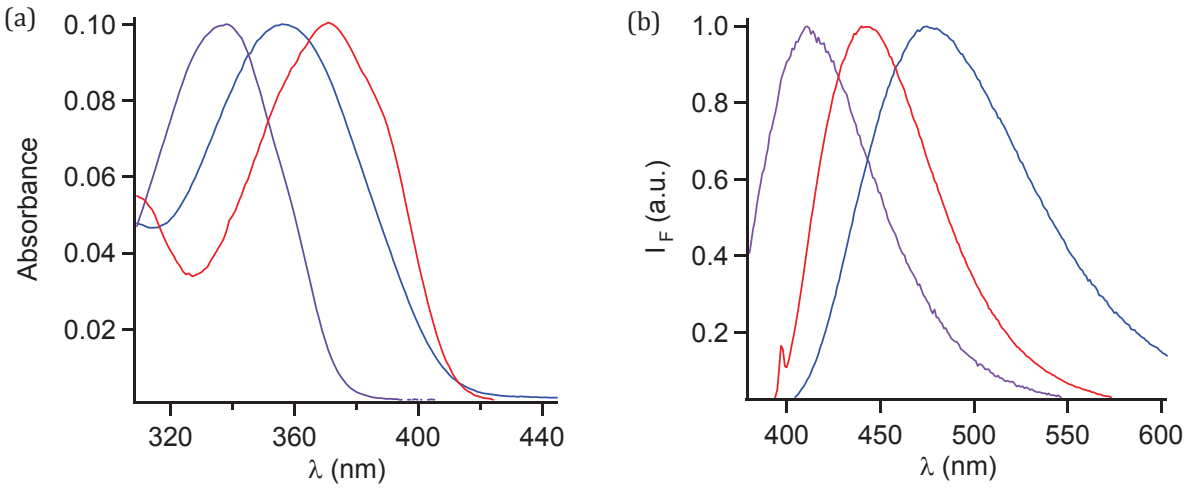


Figure 259 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* **COU** *(violet)* **COU-CF_3** *(bleu) et* **COU-CN** *(rouge) dans l'acétonitrile*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϕ
COU	338	411	73	0.39
COU-CF_3	355 (+17)	475 (+64)	120	0.39
COU-CN	371 (+33)	440 (+29)	69	-

Tableau 23 - *Déplacements spectraux des coumarines*

Propriétés photophysiques des coumarines à conjugaison étendues

L'insertion d'un benzothiazole en position 3, **COU-Benz** a entrainé un déplacement du maximum d'absorption de 34 nm. Le maximum d'émission a quant à lui été plus fortement déplacé, avec un déplacement de 62 nm entraînant l'agrandissement du déplacement de Stokes. L'insertion du groupement phénylacétylène en position 3, **COU-Alcyne** a entrainé un déplacement de 36 et 30 nm des maxima d'absorption et d'émission. L'ammonium électroattracteur présent à l'extrémité de **COU-Anilinium** n'a pas entrainé de déplacement supplémentaire des spectres contrairement à ce que l'on pouvait attendre. De même, les spectres d'absorption et d'émission de **COU-Py** ne sont pas plus déplacés malgré le remplacement du groupement phényle par un groupement

pyridine. Le spectre d'absorption de **COU-Benz-CN** est lui déplacé de 46 nm soit dix de plus que le COU-Alcyne. La présence du groupement nitrile entraîne quand même un léger déplacement supplémentaire. Le spectre d'émission de **COU-Benz-CN** est aussi déplacé d'une quarantaine de nanomètre.

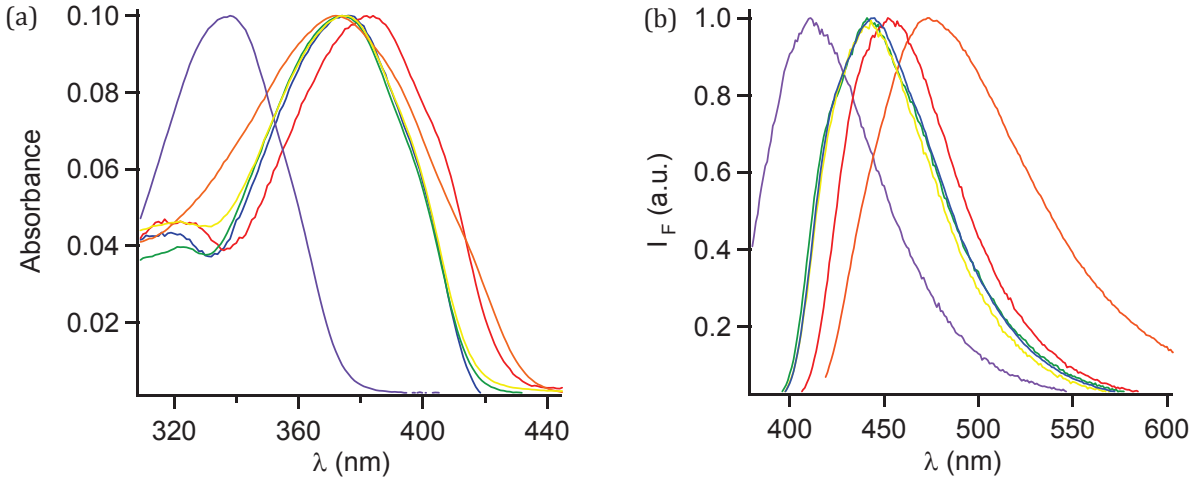


Figure 260 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* **COU** *(violet)* **COU-Benz** *(orange)* **COU-Alcyne** *(vert)* **COU-Anilinium** *(jaune)* **COU-Benz-CN** *(rouge) et* **COU-Py** *(bleu) dans l'acétonitrile*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϕ
COU	338	411	73	0.08
COU-Benz	373 (+34)	473 (+62)	101	0.35
COU-Alcyne	374 (+36)	441 (+30)	67	0,68
COU-Anilinium	375 (+37)	445 (+34)	70	0,59
COU-Benz-CN	384 (+46)	452 (+41)	68	0,63
COU-Py	375 (+37)	446 (+35)	71	-

Tableau 24 - *Déplacements spectraux des coumarines à conjugaisons étendues*

Effet induit par le potassium

Pour vérifier que les coumarines synthétisées sont bien sensibles à la présence de potassium, de rapides dosages dans l'acétonitrile ont été effectués sur les différentes coumarines. L'ajout de potassium entraîne à chaque fois un déplacement hypsochrome de quelques nanomètres des spectres d'absorption et d'émission et une diminution de la fluorescence comme nous pouvons le voir dans le cas de la **COU-CF_3** (Figure 261).

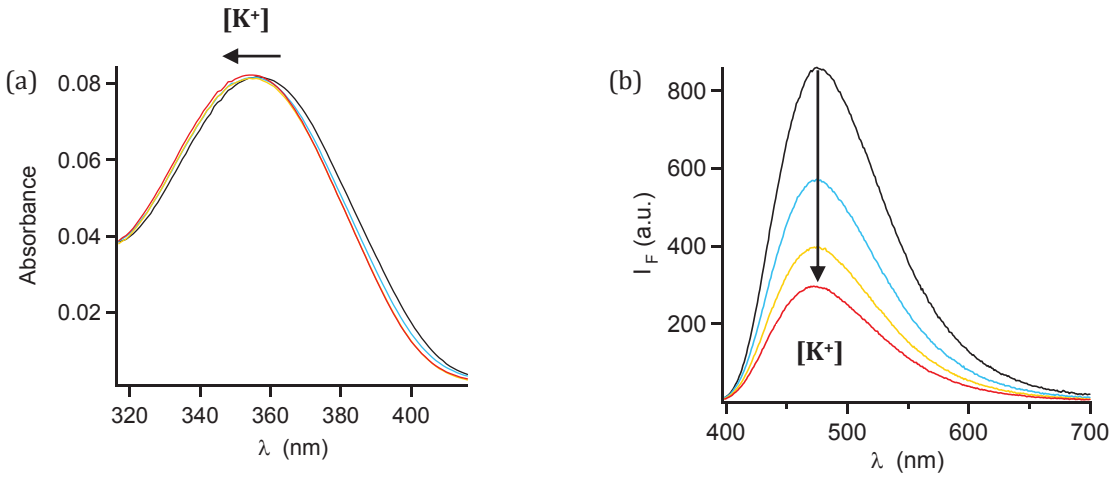


Figure 261 - *Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) de* **COU-CF$_3$** *en présence de, 5, 10 et 15 mM de potassium dans l'acétonitrile*

Comme observé sur le **Calix-COU-2**, l'interaction du potassium avec les oxygènes donneurs 6 et 7 de la coumarine entraîne une diminution de leur caractère donneur, et donc une diminution du transfert de charge intramoléculaire suite à l'absorption d'un photon. Ce qui se traduit par un déplacement hypsochrome des spectres d'absorption et d'émission et une diminution de la fluorescence (Figure 262).

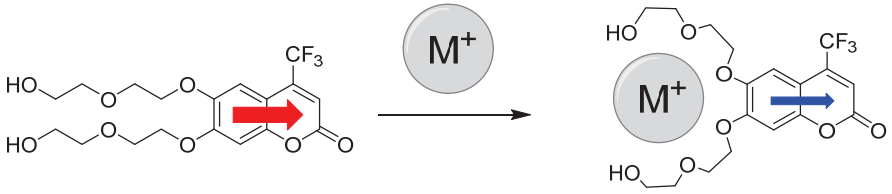


Figure 262 - *Diminution du transfert de charge interne suite à la complexation d'un cation au niveau des oxygènes 6 et 7 de la coumarine*

c) Conclusions sur la synthèse et les propriétés photophysiques des analogues de la coumarine

Bilan des déplacements observés

Globalement, les déplacements des spectres d'absorption et d'émission obtenus, sont parfois moins importants que pour les séries contenants des aminocoumarines. Mais en s'intéressant en première approximation à la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité donné par le spectre d'absorption, nous voyons que la stabilisation liée à l'ajout de groupements en position 3 est du même ordre de grandeur en série aminée que hydroxylée (Tableau 25). Des résultats similaires ont été trouvés pour le groupement cyano ou le groupement benzothiazole.

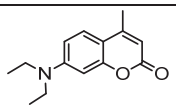
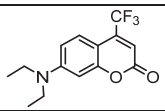
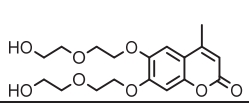
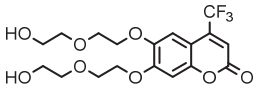
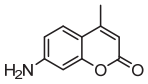
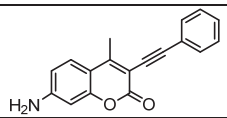
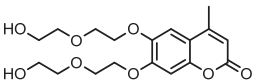
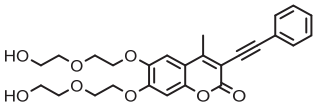
		Différence d'énergie
λ_{abs} = 373 nm	λ_{abs} = 405 (+32) nm	$\Delta\nu = 2{,}1.10^3$ cm^{-1}
		Différence d'énergie
λ_{abs} = 338 nm	λ_{abs} = 355 (+17) nm	$\Delta\nu = 1{,}4.10^3$ cm^{-1}
		Différence d'énergie
λ_{abs} = 354 nm	λ_{abs} = 397 (+43) nm	$\Delta\nu = 3.10^3$ cm^{-1}
		Différence d'énergie
λ_{abs} = 338 nm	λ_{abs} = 374 (36) nm	$\Delta\nu = 2{,}8.10^3$ cm^{-1}

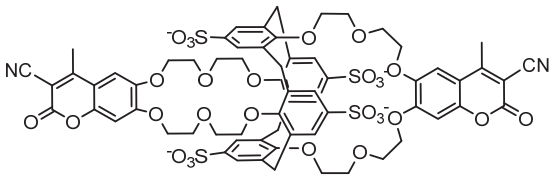
Tableau 25 - *Comparaison de la différence d'énergie de stabilisation apportée par le groupement CF_3 et le groupement phénylacétylène pour des coumarines portant des groupements amines ou alcools*

Choix des modifications du Calix-COU-Sulf

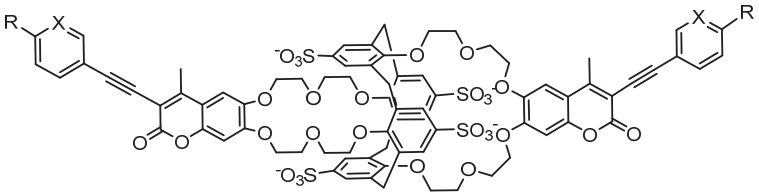
Tous les composés obtenus sauf le **COU-CF_3** peuvent être excités à 405 nm. Nous pouvons donc envisager certaines de ces modifications pour le Calix-COU-Sulf, comme l'insertion d'un groupement cyano en position 3 ou l'extension de la conjugaison par couplage.

Le trop faible déplacement du spectre d'absorption de **COU-CF_3** ne permet donc pas d'envisager cette modification pour le Calix-COU-Sulf. L'insertion d'un groupement benzothiazole en position 3 ne sera pas non plus entreprise. Bien que les déplacements spectraux de **COU-Benz** sont semblables à ceux des coumarines issues de couplage de Sonogashira, le rendement de la réaction de couplage permettant d'obtenir **COU-Benz** est nettement plus faible. Les coumarines issues de couplages de Sonogashira seront donc préférées à **COU-Benz**.

Deux types de modifications ont donc été entreprises : l'insertion d'un groupement cyano en position 3 et l'extension de la conjugaison via des couplages de Sonogashira (Figure 263).



Calix-COU-CN-Sulf



R = H / X = C Calix-COU-Alcyne-Sulf

R = CN / X = C Calix-COU-Benz-CN-Sulf

R = NMe_3^+ / X = C Calix-COU-Anilinium-Sulf

R = H / X = N Calix-Py-Alcyne-Sulf

Figure 263 - *Modifications du Calix-COU-Sulf envisagées*

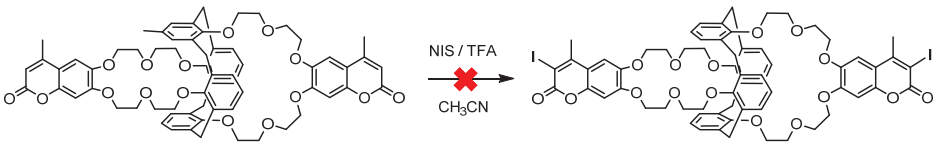
3) Synthèse des analogues de Calix-COU-Sulf

a) Synthèses effectuées

La Calix-COU-Sulf a dans un premier temps été iodée, pour permettre les couplages de Sonogashira et l'insertion du groupement CN.

Iodation Calix-COU-Sulf

L'insertion du groupement nitrile ou les couplages de Sonogashira envisagés nécessitent tous deux de disposer d'une espèce iodée en position 3. Dans un premier temps, nous avons essayé sans succès de di-ioder directement le Calix-COU-2 en présence de NIS et de TFA (Figure 264). Des essais à l'aide d'I_2 n'ont pas été tentés, car dans le cadre de la synthèse du Calix-COU-Acide (Chapitre 2) des essais de dibromation du Calix-COU-2 à l'aide de Br_2 ont été effectués et ont conduit à un mélange de produit polybromés. L'utilisation d'I_2 aurait vraisemblablement conduit au même résultat.



Calix-COU-2 Calix-COU-2-I

Figure 264 - *Essais de diiodantion sélective de Calix-COU-2*

Suite à cela, deux alternatives étaient envisageables. Repartir des coumarines obtenues et effectuer une synthèse entière pour chaque coumarine, ce qui peut être long et nécessiter une quantité importante de chacun des analogues de la coumarine, ou bien tenter l'iodation de Calix-COU-Sulf pour effectuer les réactions sur le calixarène iodé. En effet, le calixarène étant sulfoné, seule la position 3 sur la coumarine peut être iodée. Nous avons donc tenté l'iodation du Calix-COU-Sulf, ce qui pouvait permettre un gain de temps en évitant de longues synthèses.

Les meilleures conditions pour l'iodation de la coumarine modèle sont l'utilisation de N-iodosuccinimide en présence d'une quantité catalytique d'acide trifluoroacétique dans l'acétonitrile. Un premier essai dans l'acétonitrile, où le Calix-COU-Sulf n'est pas soluble n'a pas entrainé la formation du produit iodé. Un second essai a été effectué dans le méthanol solvant où Calix-COU-Sulf est plus soluble avec un excès de NIS (5éq) et un équivalent de TFA. Après 24 heures, le produit a été isolé par précipitation et centrifugation. Le spectre RMN ^{1}H montre un mélange de produit iodé et initial. Le produit étant uniquement isolable par précipitation, la réaction doit être totale. Le NIS étant peu soluble dans le méthanol, un essai a été effectué dans un mélange 1/1 acétonitrile/méthanol pour permettre une bonne solubilisation de tous les réactifs. Après 48 heures à 65 °C et l'utilisation de 10 équivalents de NIS et 5 équivalents de TFA, le produit di-iodé a été obtenu par précipitation avec 54% de rendement (Figure 265).

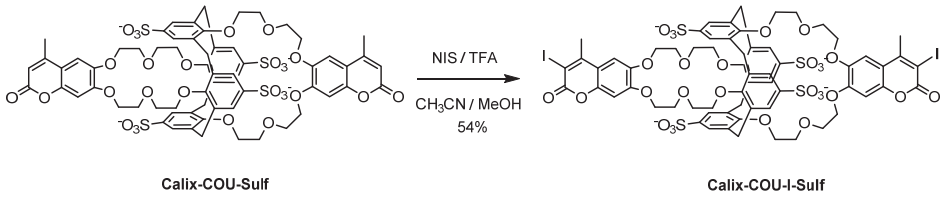


Figure 265 - *Diiodation de Calix-COU-SUlf dans un mélange CH_3CN /MeOH*

Couplage de Sonogashira

A partir du Calix-COU-Sulf iodé, nous avons tenté les couplages de Sonogashira précédemment effectués sur la coumarine modèle. En présence de 8 équivalents d'alcynes, 1 équivalent de CuI, 0,5 équivalent de $Pd(PPh_3)_4$ et 20 équivalents de triéthylamine, et après 36h dans le DMF à 80°C, les produits de couplage impliquant le phénylacéthylène et la 4-éthynyldiméthylaniline ont été obtenus respectivement avec 91 et 97% de rendement après précipitation (Figure 266). Le couplage avec le 4-éthynylbenzonitrile a moins bien fonctionné. Un mélange du produit de couplage et de Calix-COU-Sulf non séparable est visible par RMN ^{1}H. Les déplacements spectraux de **COU-Py** étant semblables à ceux de **COU-Alcyne** et **COU-Anilinium,** mais son couplage plus difficile, celui-ci n'a pas été tenté.

En résumé deux produits de couplage de Sonogashira ont été obtenus : **Calix-COU-Alcyne-Sulf** et **Calix-COU-Anilinium-Sulf.**

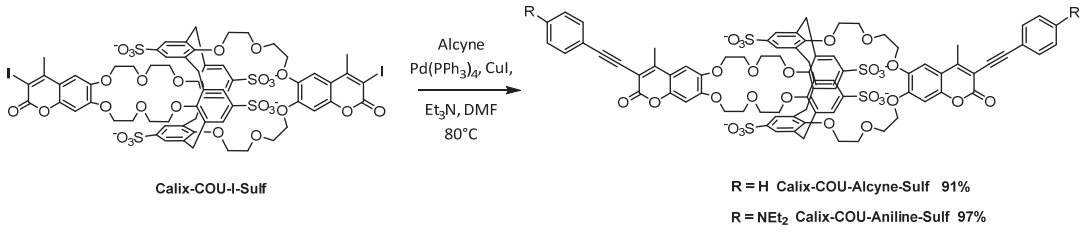


Figure 266 - *Couplages de Sonogashira effectués à partir du Calix-COU-I-Sulf*

Le **Calix-COU-Aniline-Sulf** a par la suite été transformé en **Calix-COU-Anilinium-Sulf** en présence d'iodure de méthyle dans le DMF (Figure 267). Après 24h à température ambiante, le produit a été récupéré après plusieurs précipitations dans un mélange méthanol/acétone avec 67% de rendement.

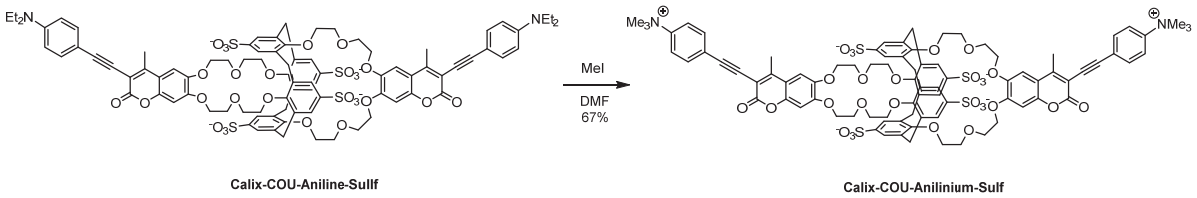


Figure 267 - *Synthèse du Calix-COU-Anilinium-Sulf*

Synthèse du Calix-COU-CN

En plus de ces réactions de couplage, l'insertion du groupement nitrile a aussi été effectuée. Le calixarène iodé en présence de CuCN dans le NMP à 180°C a permis après précipitation l'obtention du calixarène cyané en position 3 **Calix-COU-CN-Sulf** (Figure 268). L'iodation effectuée après sulfonation a l'avantage de permettre l'introduction d'une fonction sensible à la sulfonation comme le nitrile, qui pourrait être hydrolysée lors de l'étape de sulfonation.

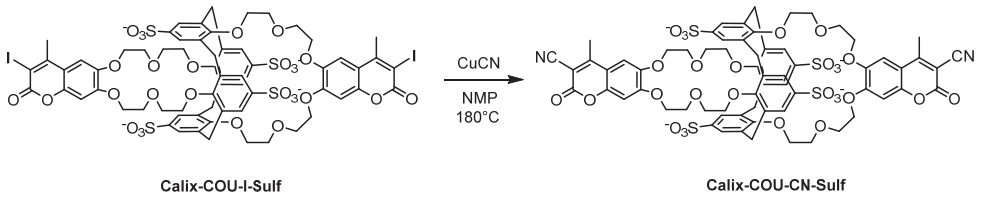


Figure 268 - *Synthèse de Calix-COU-CN-Sulf*

b) Conclusion sur les analogues du Calix-COU-Sulf obtenus

En résumé, sur les 5 analogues possibles, trois ont été obtenus, tous excitables à 405 nm. Le **Calix-COU-alcyne-Sulf** portant un groupement phenylacéthylène en position 3, le **Calix-COU-Anilinium-Sulf** portant un groupement anilinium en para de la triple liaison, et le **Calix-COU-CN-Sulf** portant un groupement nitrile en position 3 (Figure 269). L'étude des propriétés photophysiques et de complexation du potassium en milieu aqueux de ces trois molécules va maintenant être présentée.

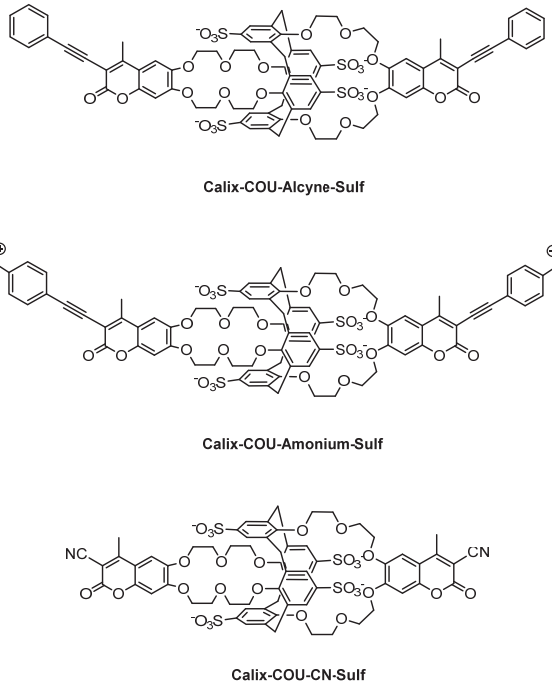


Figure 269 - *Analogues de Calix-COU-Sulf synthètisés*

4) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Alcyne-Sulf

La molécule a dans un premier temps été caractérisée et étudiée dans l'eau, puis dans des conditions proches des conditions physiologiques.

a) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes dans l'eau

Propriétés photophysiques dans l'eau

L'extension de la conjugaison de la coumarine a permis un déplacement de 37 nm du maximum du spectre d'absorption, le maximum d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf se situant à 371 nm (Figure 270). Le coefficient d'absorption molaire au maximum de l'absorption à lui aussi logiquement augmenté passant de 21000 M^{-1}. cm^{-1}.pour le Calix-COU-Sulf à 37500 M^{-1}. cm^{-1}.pour le Calix-COU-Alcyne-Sulf (Tableau 26). Cette valeur correspond à un peu moins du double de celle du composé modèle COU-Alcyne qui est de 19500 M^{-1}. cm^{-1}. Ce qui montre qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux fluorophores à l'état fondamental. L'insertion du groupement phénylacétylène a aussi entrainé un déplacement bathochrome de 25 nm du spectre d'émission. Le maximum d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf se trouvant à 445 nm. Le rendement quantique du Calix-COU-Alcyne-Sulf dans l'eau est de 0,43 ce qui est du même ordre de grandeur que celui du Calix-COU-Sulf.

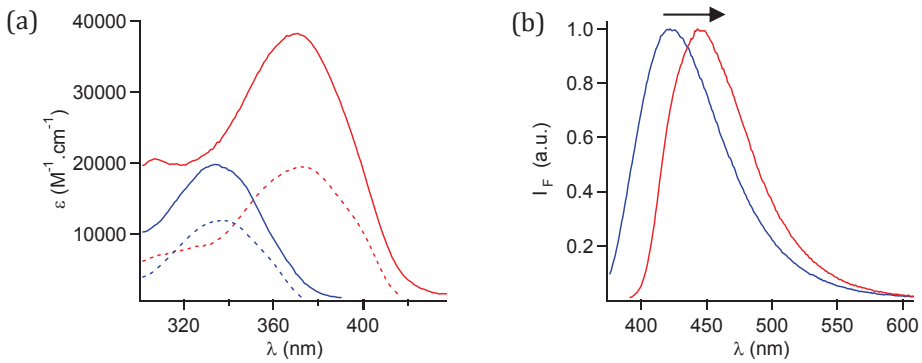


Figure 270 - *(a) Spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rouge trait plein), COU-Alcyne (rouge trait pointillé), Calix-COU-Sulf (bleu trait plein), COU (bleu trait pointillé). (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-Alcyne-Sulf (rouge)*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
COU	338	411	11800	0,39
Calix-COU-Sulf	334	420	21000	0,39
COU-Alcyne	372	441	19500	0,58
Calix-COU-Alcyne-Sulf	371	445	37500	0,43

Tableau 26 - *Comparaison des propriétés photophysqiues des composés modèle COU et COU-Alcyne et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Alcyne-Sulf*

Etudes de la complexation par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

L'ajout de potassium entraîne un déplacement bathochrome de 6 nm des spectres d'absorption, ainsi qu'une légère baisse du coefficient d'absorption molaire. Ce déplacement bathochrome entraîne une forte augmentation de l'absorbance entre 390 et 410 nm, et particulièrement à 405 nm la longueur d'onde d'excitation choisie (Figure 271).

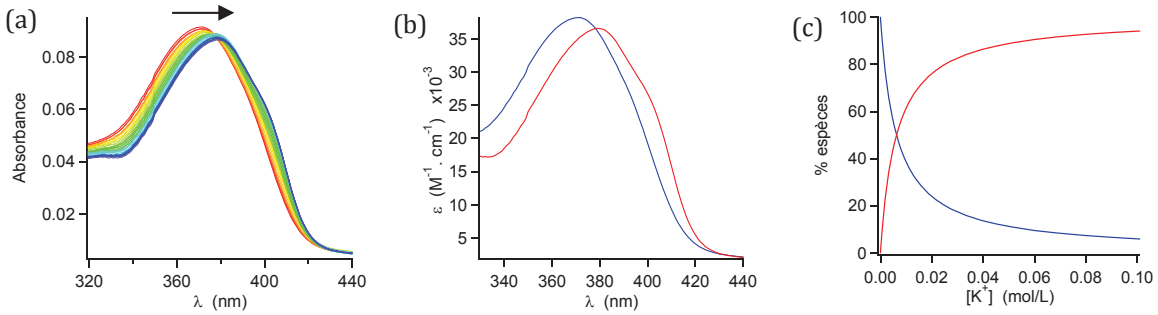


Figure 271 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O, [L] = 2,4 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium.*

L'ajustement numérique à l'aide du logiciel specfit permet d'obtenir la valeur de la constante de formation du complexe ML qui est log K_{11} = 2,20 ± 0,03. Cette valeur est plus élevée que celle trouvée pour le Calix-COU-Sulf où log K_{11} = 1,58 ± 0,05.

L'ajout de potassium entraîne aussi une augmentation de l'intensité de la fluorescence d'un facteur 2 entre 0 et 100 mM de potassium sans déplacement des spectres (Figure 272). Entre 0

et 20 mM, cette augmentation est d'un facteur 1,9, soit une augmentation de 4,5% par mM de potassium.

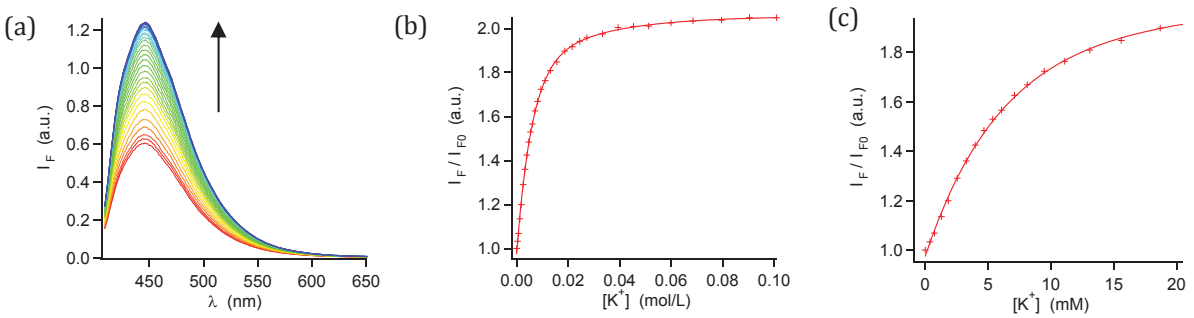


Figure 272 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.*

Etudes de la complexation par spectroscopie de fluorescence résolue en temps

Des études par fluorescence résolue en temps ont aussi été effectuées sur le Calix-COU-Alcyne-Sulf pour déterminer le temps de vie à l'état excité de la molécule et l'influence du potassium sur celui-ci. Le déclin de fluorescence a été caractérisé comme la somme de deux exponentielles, la durée de vie moyenne de la molécule est quant à elle de 1,96 ns. Comme on peut le voir sur la Figure 273, l'ajout de potassium entraîne une légère augmentation de cette durée de vie, mais celle-ci est trop faible pour permettre de mesurer des variations de concentration de potassium.

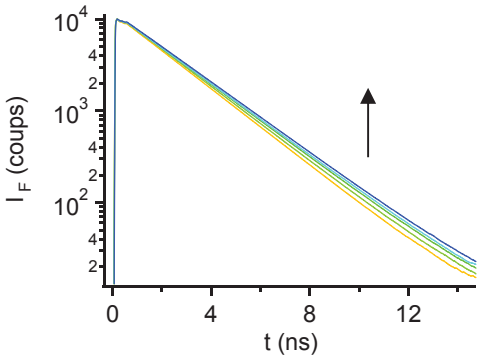


Figure 273 - *Evolution de la duré de vie du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium*

$[K^+]$ (mM)	α_1	τ_1	α_2	τ_2	τ_{moy} (ns)	χ^2
0	0,83	2,11	0,17	0,39	1,94	1,04
2	0,91	2,14	0,09	0,29	1,96	1,18
6	0,89	2,20	0,11	0,24	1,99	1,07
13	0,91	2,23	0,09	0,32	2,05	1,10
200	0,91	2,26	0,09	0,26	2,08	1,10

Tableau 27 *Valeurs des déclins de fluorescence pour différentes concentrations de potassium*

b) Etudes des propriétés photophysiques dans des conditions proches des conditions physiologiques

Tout comme pour le Calix-COU-Sulf, les propriétés complexantes du Calix-COU-Alcyne-Sulf ont été étudiées dans des conditions proches des conditions physiologiques. Les mesures ont ainsi été effectuées en présence de 146 mM de NaCl, 2,5 mM de $CaCl_2$, 1,3 mM de $MgSO_4$ et 11 mM de glucose.

Etudes de la complexation par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

Dans ces conditions, l'ajout de potassium entraîne aussi un déplacement bathochrome des spectres d'absorption de 8 nm cette fois, ce qui entraîne l'apparition d'un point isobestique à 378 nm (Figure 274). Une baisse du coefficient d'absorption molaire est également observée.

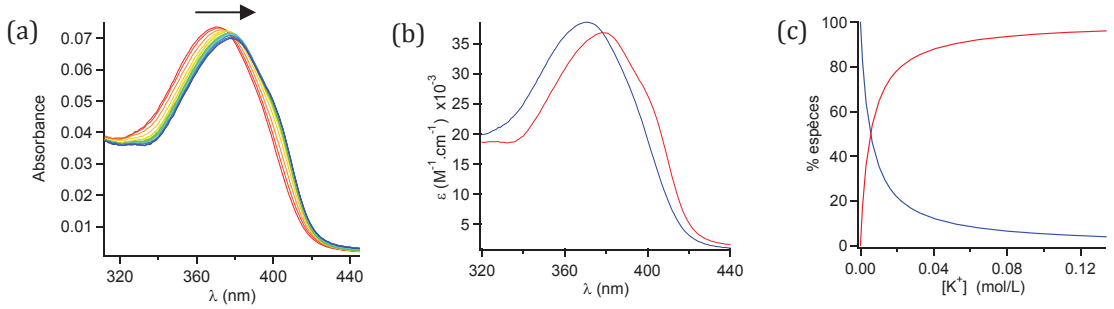


Figure 274 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Alcyne-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O, [L] = 2,4 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruit à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium.*

De même, l'ajout de potassium entraîne aussi une augmentation de la fluorescence sans déplacement des spectres. L'intensité de la fluorescence est multipliée par deux entre 0 et 20 mM de potassium (Figure 275).

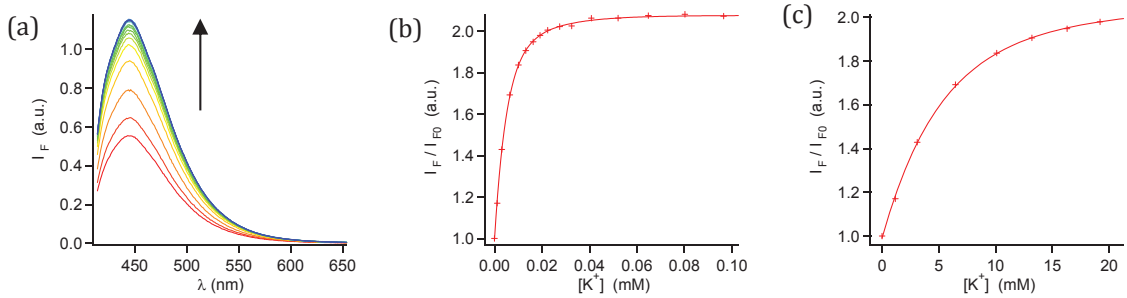


Figure 275 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 445 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 2,4 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 445 nm.*

L'ajustement numérique effectué avec le logiciel specfit permet d'obtenir la valeur de la constante de formation du complexe ML qui est log K_{11} = 2,26 ± 0,04. Il s'agit bien entendu d'une constante de complexation apparente dans ce milieu. Tout comme l'exaltation de la fluorescence, les constantes de formation du complexe ML dans l'eau et en condition physiologique sont proches.

5) Influence du milieu d'études sur les propriétés photophysiques du Calix-COU-Alcyne-Sulf

L'influence du sodium Na^+, du magnésium Mg^{2+}, et du calcium Ca^{2+}, sur l'intensité de la fluorescence à 445 nm a été étudiée. Comme nous pouvons le voir Figure 276, l'exaltation de la fluorescence dans le milieu d'étude (rouge) est très proche de celle obtenu dans l'eau pure (bleu). Par contre, nous pouvons aussi remarquer que l'exaltation de la fluorescence en présence de 150 mM de sodium (turquoise) est 20% plus faible que dans l'eau pure. L'exaltation de la fluorescence en présence de 2,5 mM de calcium (orange) ou 1,3 mM de magnésium (vert) n'est pas modifié.

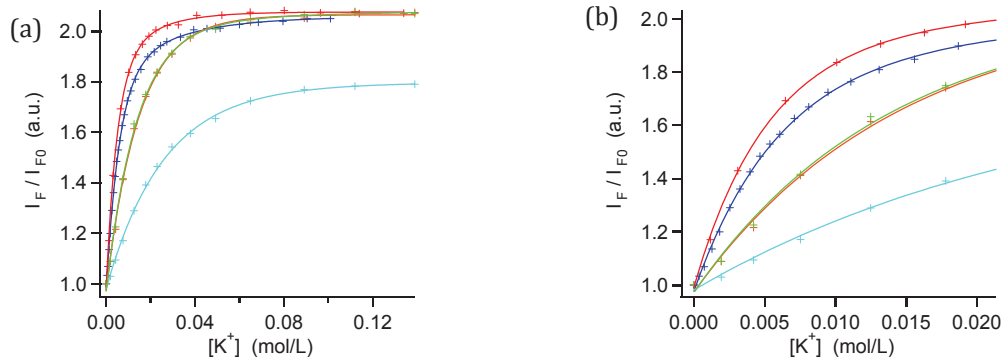


Figure 276 - *Comparaison de l'évolution de la fluorescence à 445 nm en fonction des conditions ; H_2O (bleu), H_2O + Na^+ (turquoise), H_2O + Mg^{2+} (vert), H_2O + Ca^{2+} (orange), H_2O + Na^+, H_2O + Na^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} (rouge).*

En l'absence de potassium, la présence de 150 mM de sodium entraîne une exaltation de fluorescence. La fluorescence de base en l'absence de potassium est donc plus élevée que dans l'eau pure, ce qui explique pourquoi l'exaltation de la fluorescence observée avec l'ajout de potassium est 20% plus faible. Par contre, en présence des trois cations, l'évolution de la fluorescence est proche de celle observée dans l'eau pure. Nous pouvons supposer qu'en l'absence de potassium, le Calix-COU-Alcyne-Sulf complexe préférentiellement le calcium et le magnésium plutôt que le sodium. Le calcium et le magnésium sont deux cations divalents. Leur complexation par le Calix-COU-Alcyne-Sulf compense les deux charges négatives apparentes apportées par les groupements sulfonates. Les cations sont donc complexés, mais sans entraîner de variations significatives de la fluorescence de base. L'addition de potassium entraîne par la suite une exaltation de la fluorescence similaire à celle observée dans l'eau, mais qui résulte en fait du remplacement du calcium et du magnésium par le potassium. La différence d'évolution des courbes doit elle être liée à la différence d'affinité de la molécule pour les différents cations.

6) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-Anilinium-Sulf dans l'eau

Propriétés photophysiques dans l'eau

Tout comme le Calix-COU-Alcyne-Sulf, le maximum d'absorption du Calix-COU-Anilinium-Sulf est déplacé de 37 nm par rapport au Calix-COU-Sulf (Figure 277), le maximum d'absorption se situant à 371 nm. Le coefficient d'absorption molaire de molécule est de 28 000 $M^{-1}.cm^{-1}$ au maximum d'absorption (Tableau 28). Le spectre d'émission du Calix-COU-Anilinium-Sulf est

déplacé de 29 nm par rapport au Calix-COU-Sulf, soit 4 nm de plus que le Calix-COU-Alcyne-Sulf, le maximum se situant à 449 nm. Son rendement quantique de fluorescence est de 0,22.

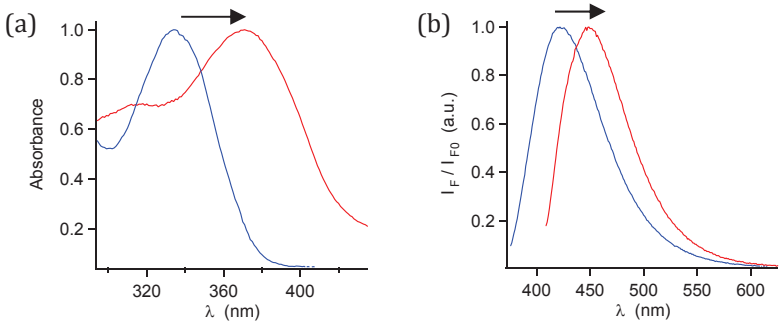


Figure *277 - Comparaison des spectres d'absorption (a) et d'emission (b) du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-Anilinium-Sulf (rouge).*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
COU	338	411	11800	0,39
Caix-COU-Sulf	334	420	21000	0,39
COU-Amonium	372	443	20500	0,60
COU-Amonium-Sulf	371	449	28000	0,22

Tableau 28 - *Comparaison des propriétés photophysqiues des composés modèles COU et COU-Anilinium et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-Anilinium-Sulf*

Etudes de la complexation par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

L'ajout de potassium entraîne un déplacement bathochrome de 6 nm des spectres d'absorption, ainsi qu'une baisse du coefficient d'absorption molaire (Figure 278). Après ajustement numérique la constante de formation du complexe ML est log K_{11} = 2,00 ± 0,04.

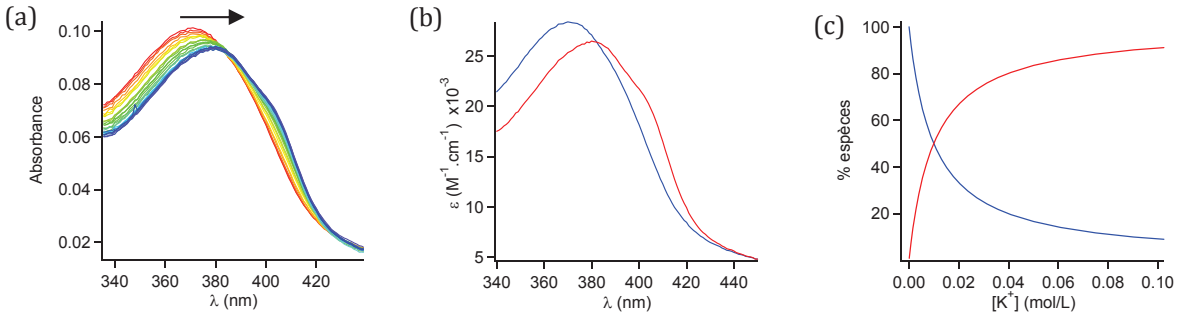


Figure 278 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-Anilinium-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium Solvant = H_2O [L] = 3,6 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-Anilinium-Sulf avec l'ajout de potassium.*

L'ajout de potassium entraîne aussi une exaltation de fluorescence sans déplacement des spectres. La fluorescence est multipliée par un facteur 2 entre 0 et 100 mM de potassium et par un facteur 1,8 entre 0 et 20 mM de potassium, ce qui est semblable au résultat obtenu pour le Calix-COU-Alcyne-Sulf (Figure 279).

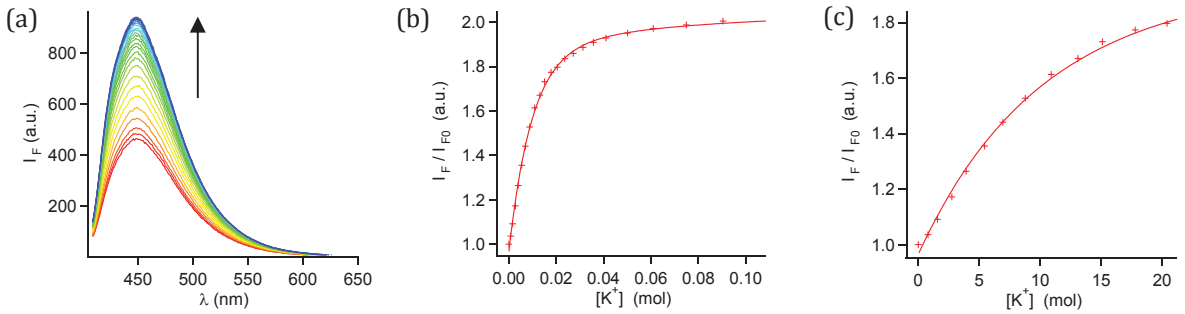


Figure 279 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Anilinium-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 450 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O; [L] = 3,6 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 450 nm.*

Les déplacements spectraux du Calix-COU-Anilinium-Sulf sont proches de ceux du Calix-COU-Alcynes-Sulf, mais son rendement quantique et son coefficient d'absorption molaire sont plus faibles. De plus, sa synthèse nécessite une étape supplémentaire. Pour ces raisons le Calix-COU-Alcyne-Sulf a été préféré au Calix-COU-Anilinium-Sulf.

7) Etudes des propriétés photophysiques et complexantes du Calix-COU-CN-Sulf dans l'eau

Propriétés photophysiques dans l'eau

L'insertion du groupement cyano en position 3 a permis un déplacement de 37 nm du maximum du spectre d'absorption, le maximum d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf se trouvant à 371 nm (Figure 280). Le coefficient d'absorption molaire à lui aussi augmenté passant de 21000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour le Calix-COU-Sulf à 26000 $M^{-1}.cm^{-1}$.pour le Calix-COU-CN-Sulf (Tableau 29). Cette valeur n'est pas tout à fait le double du coefficient molaire d'absorption de la molécule modèle COU-CN dont le coefficient d'absorption molaire est de 16000 $M^{-1}.cm^{-1}$. Le spectre d'émission a été déplacé de 34 nm par rapport au Calix-COU-Sulf, le maximum du spectre d'émission du Calix-COU-CN-Sulf se trouvant à 454 nm, soit 9 nm de plus que le Calix-COU-Alcyne-Sulf.

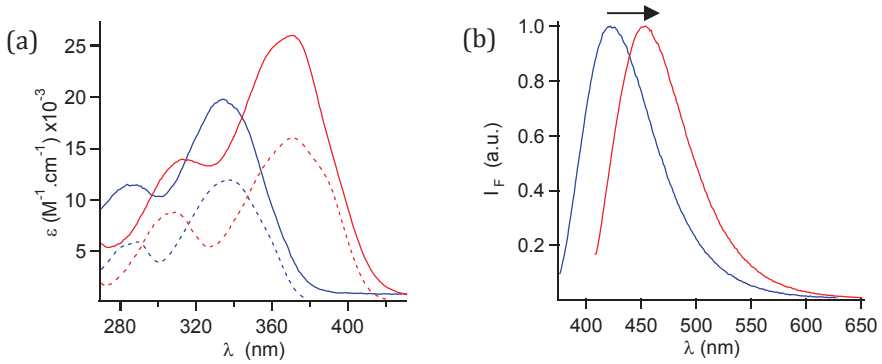


Figure 280 - *(a) Spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf (rouge trait plein), COU-CN (rouge trait pointillé), Calix-COU-Sulf (bleu trait plein), COU (bleu trait pointillé). (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Sulf (bleu) et du Calix-COU-CN-Sulf (rouge)*

	$\lambda_{abs\ max}$ (nm)	$\lambda_{em\ max}$ (nm)	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	ϕ
COU	338	411	11800	0,39
Caix-COU-Sulf	334	420	21000	0,39
COU-CN	371	440	16000	0,75
Calix-COU-CN-Sulf	371	454	26000	0,49

Tableau 29 - *Comparaison des propriétés photophysiques des composés modèles COU et COU-CN et des Calix-COU-Sulf et Calix-COU-CN-Sulf*

Etudes de complexation par spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire

L'ajout de potassium entraîne un déplacement bathochrome de 6 nm des spectres d'absorption, ainsi qu'une légère augmentation du coefficient d'absorption molaire, entraînant l'apparition d'un point isobestique à 369 nm (Figure 281). L'ajustement numérique effectué avec le logiciel specfit permet de déterminer la valeur de la constante de formation du complexe ML qui est log K_{11} = 2,38 ± 0,03.

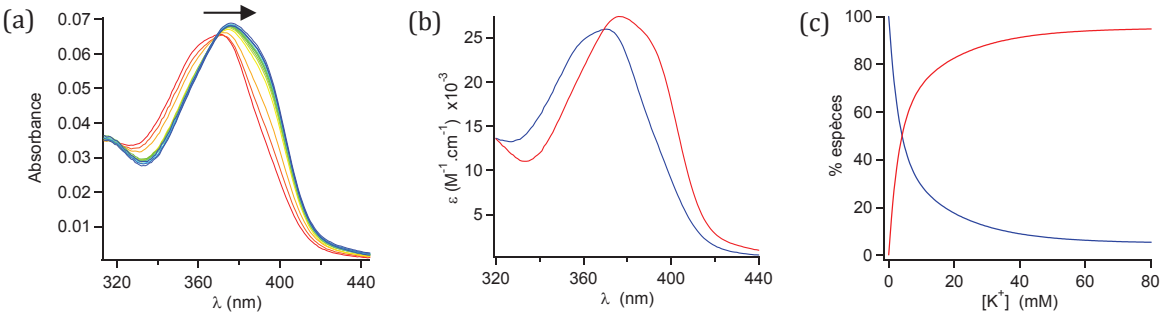


Figure 281 - *(a) Evolution des spectres d'absorption du Calix-COU-CN-Sulf en présence de concentrations croissantes de potassium. Solvant = H_2O ; [L] = 2,5 µM. (b) Spectres d'absorption du ligand L et du complexe ML reconstruits à l'aide du logiciel specfit. (c) Diagramme de spéciation du Calix-COU-CN-Sulf avec l'ajout de potassium.*

L'ajout de potassium entraîne une augmentation de l'intensité de la fluorescence (Figure 282). Celle-ci est multipliée par un facteur 2,5 entre 0 et 100 mM de potassium et par un facteur 2,3 entre 0 et 20 mM de potassium, soit 6,5% d'augmentation par mM de potassium. L'ajout de potassium entraîne aussi un déplacement hypsochrome de 4 nm, ce qui n'a pas été observé dans le cas du Calix-COU-Alcyne-Sulf et du Calix-COU-Anilinium-Sulf.

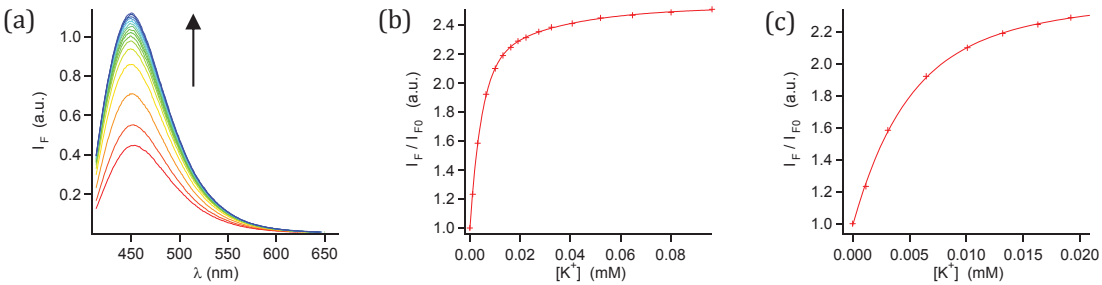


Figure 282 - *Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-CN-Sulf (a) et de l'intensité de fluorescence à 455 nm entre 0 et 100 mM (b) et 0 et 20 mM de potassium (c). Solvant = H_2O; [L] = 3,6 µM, λ_{exc} = 405 nm, $\lambda_{em\ max}$ = 454 nm.*

8) Etudes en deux photons et mesures in vitro effectuées

Bien qu'excitable à 405 nm, le Calix-COU-Alcyne-Sulf ne peut pas être utilisé à cette longueur d'ondes pour les mesures envisagées. En effet, le montage utilisé pour la mesure de l'activité des tranches de tissus cérébraux n'est pas équipé de source d'excitation à 405 nm. Par contre, celui-ci dispose d'un laser pulsé permettant des mesures d'imagerie à deux photons avec une longueur d'onde ajustable entre 690 et 1040 nm. Nous avons donc souhaité caractériser les propriétés d'absorption à deux photons du Calix-COU-Alcyne-Sulf afin de déterminer si des mesures du potassium extracellulaire en deux photons étaient envisageables. Cette caractérisation a été effectuée par le Dr. Celine Fiorini au Laboratoire d'Electronique et nanoPhotonique Organique (LEPO) du CEA de Saclay. Les mesures biologiques ont été effectuées par le Dr. Elena Dossi et le Dr. Gilles Huberfeld au Collège de France, dans l'équipe du Dr. Nathalie Rouach.

a) Etudes des propriétés d'absorption à deux photons du Calix-COU-Alcyne-Sulf

Pour déterminer la section efficace maximale d'absorption à deux photons, le spectre d'excitation a été mesuré entre 750 et 850 nm. (Figure 283). Le maximum de signal de fluorescence à deux photons a été enregistré à 760 nm, soit pour une énergie proche de celle nécessaire en absorption monophotonique. La section efficace d'absorption de la molécule a été déterminée en comparant le signal de la molécule au signal de fluorescence de la fluorescéine utilisée comme référence[327]. Une section efficace maximale de 14 GM a été mesurée à 760 nm, la section efficace de la fluorescéine à cette longueur d'onde étant elle de 36 GM. Il est a noter que le spectre d'absorption à 2 photons apparait plus étroit que le spectre d'absorption linéaire. Cependant étant donné l'accordabilité du laser utilisé (750-950 nm), l'ensemble de la bande d'absorption n'a pu être testée en excitation biphotonique. En deux photons, le maximum d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf est déplacé de 30 nm par rapport au spectre issu d'une excitation monophotonique (Tableau 30). Nous n'avons pour l'heure pas réussi à expliquer ce déplacement. Des mesures supplémentaires sont prévues afin de déterminer l'origine de ce déplacement.

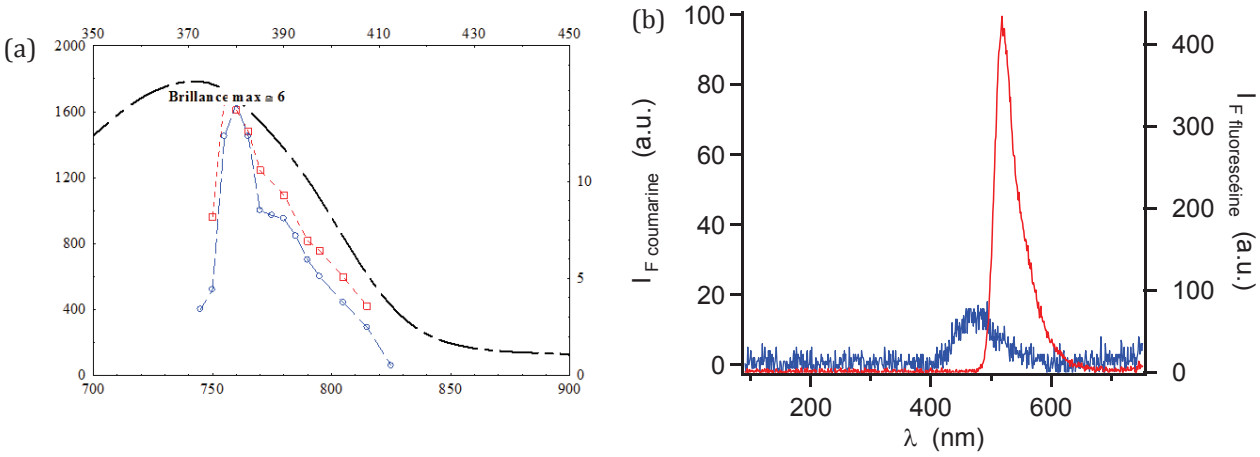


Figure 283 -- *(a) Spectres d'absorption à un photon (noir), à deux photons (rouge)et brillance de la molécule (bleu) du Calix-COU-Alcyne-Sulf. (b) Spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf (bleu) et de la fluorescéine (rouge) λ_{exc} = 760 nm. [Calix-COU-Alcyne-Sulf] = 109 µM, solvant H_2O, [Fluorescéine] = xx, solvant H_2O pH 12.*

caractéristiques	à 1 photon	à 2 photons
$\lambda_{abs\ max}$	371 nm	760 nm
$\lambda_{em\ max}$	445 nm	475 nm
ε / δ	ε = 37 500 $M^{-1}.cm^{-1}$	δ = 14 GM

Tableau 30 - *Comparaison des propriétés spectrales à 1 et 2 photons du Calix-COU-Alcyne-Sulf*

L'influence du potassium sur l'intensité de la fluorescence émise en conditions physiologiques a ensuite été étudiée. Malgré une faible section efficace d'absorption, l'ajout de potassium entraîne une augmentation de fluorescence mesurable (Figure 284). Celle-ci est d'ailleurs linéaire entre 0 et 10 mM de potassium. L'excitation à 800 nm pour tirer parti du déplacement bathochrome des spectres d'absorption, permet comme en un photon d'obtenir une exaltation de fluorescence plus importante. Celle-ci est multipliée par un facteur 1,8 entre 0 et 10 mM de potassium, alors qu'en excitant la molécule à 760 nm la fluorescence n'est multipliée que d'un facteur 1,3. L'ajout de potassium entraîne aussi une légère augmentation de la durée de vie de fluorescence. Les valeurs mesurées (Figure 284 (b)) sont du même ordre de grandeur que ce qui avait été obtenu en un photon (Figure 273). Malgré la faible section efficace d'absorption à deux photons une augmentation de fluorescence est mesurable, des essais in vitro ont donc été tentés.

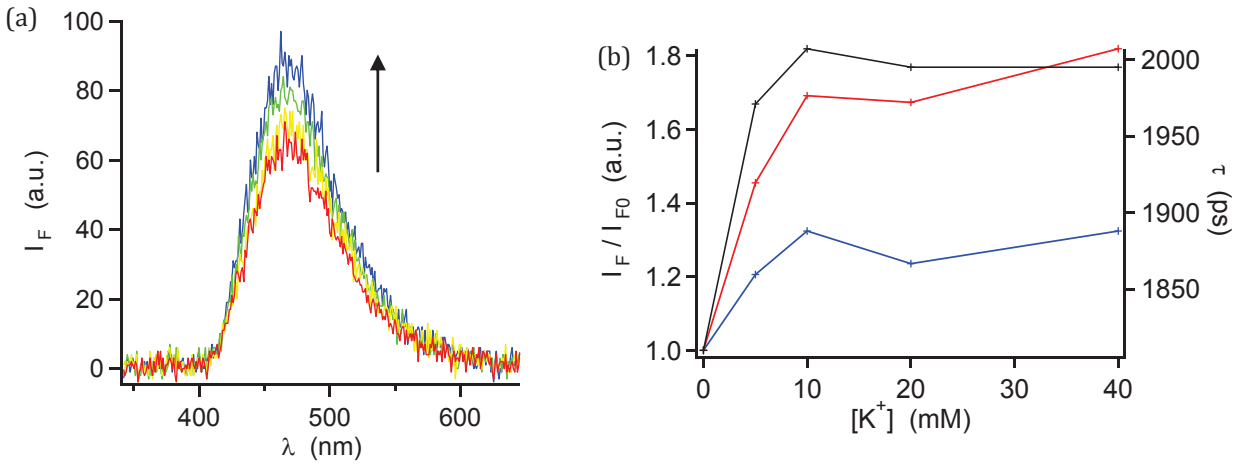


Figure 284 - *(a) Evolution des spectres d'émission du Calix-COU-Alcyne-Sulf avec l'ajout de potassium (λ_{exc} = 760 nm). (b) Evolution de l'intensité de fluorescence à 475 nm (bleu λ_{exc} = 760 nm, rouge λ_{exc} = 800 nm) et de la durée de vie (noir, λ_{exc} = 760 nm) entre 0 et 40 mM de potassium. Solvant = H_2O ; [NaCl] = 146 mM ; [$CaCl_2$] = 2,5 mM ; [$MgSO_4$] = 1,3 mM ; [Gluose] = 11mM ; [L] = 108 µM.*

b) Mesures effectuées in vitro en condition biologique

Des essais de mesure du potassium extracellulaire par fluorescence ont été entrepris avec le Calix-COU-Alcyne-Sulf. Ces mesures ont été effectuées sur des tranches d'hippocampe de rat dont l'activité a simultanément été mesurée à l'aide d'électrodes extracellulaires. Les électrodes extracellulaires utilisées, ou MEA pour 'Multi Electrode Array' sont composées d'un réseau d'électrodes en titane incorporées au sein d'une plaque de verre où seule la pointe des électrodes affleure, et sur laquelle est placé l'échantillon (Figure 285 (a) et (b)). La tranche de tissu cérébral au contact du verre trempe dans un mélange ACSF (Artificial Cerebro-Spinal Fluid) reproduisant les conditions physiologiques et est alimentée en oxygène. Le grand nombre d'électrodes présentes permet de mesurer l'activité de nombreux neurones individuellement ainsi que celle d'ensembles neuronaux avec une bonne résolution spatiale. Cette technique est

de plus non invasive. Le montage complet se compose d'un système permettant la stimulation et la mesure de l'activité des neurones, de la plaque de verre contenant les électrodes extracellulaire sur laquelle repose l'échantillon et d'un microscope permettant de visualiser l'échantillon (Figure 285 (c)).

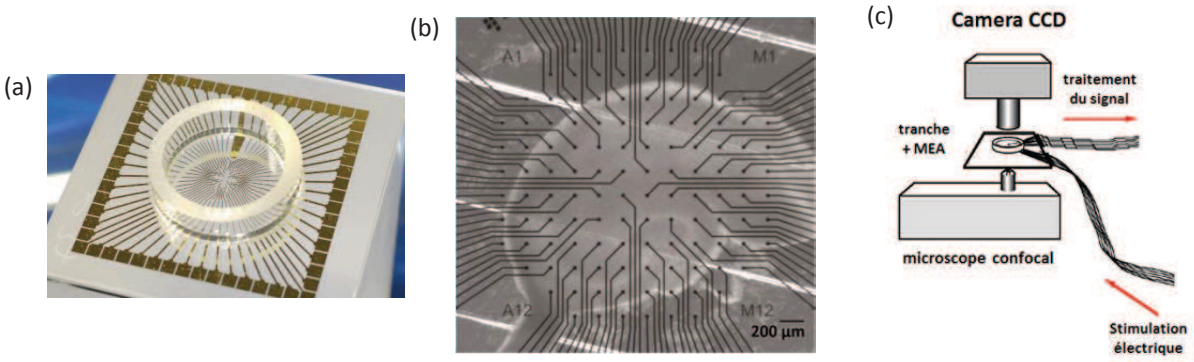


Figure 285 - *(a) photographie du réseau d'électrodes extracellulaires, (b) image d'une tranche d'hippocampe de rat sur un réseau d'électrodes extracellulaires, (c) schéma du montage*

L'influence de la sonde sur l'activité des neurones a d'abord été étudiée. La comparaison de l'activité d'une tranche perfusée avec ACSF dans un premier temps sans sonde (contrôle) puis avec une solution d'ACSF contenant 6,5 µM de sonde, montre que celle-ci ne modifie pas la fréquence des bursts d'activité neuronale induite par une drogue excitant le réseau local, la picrotoxine (toxine bloquant les récepteurs $GABA_A$), et permettant d'induire des bursts semblables à certaines décharges épileptiques (Figure 286 (a)). L'activité de six échantillons différents a été mesurée en l'absence et en présence de sonde, sans que cela ne modifie la fréquence des bouffées (Figure 286 (b)).

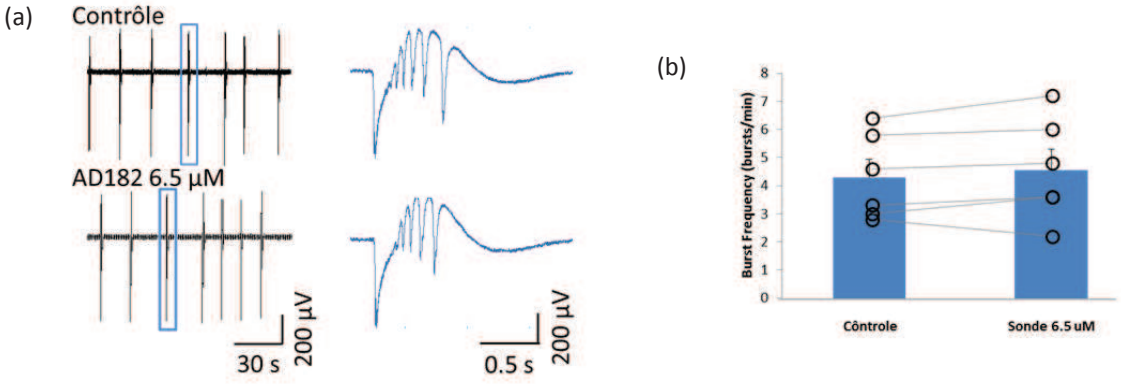
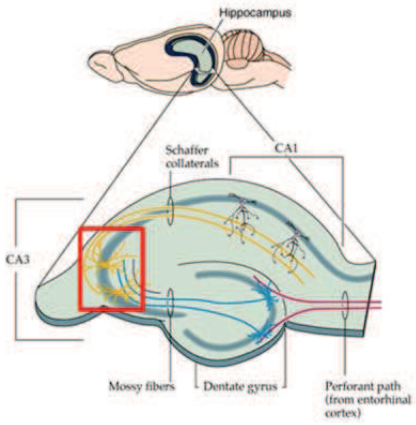


Figure 286 - *(a) enregistrement de bursts d'activité neuronale induite par une drogue excitant le resau local, la picrotoxine en l'absence (contrôle) et en présence de 6,5 µM de sonde. (b) Comparaison de la fréquence des bursts mesurées sur 6 échantillons en l'absence et en présence de 6.5 µM de sonde.*

Les mesures d'imagerie de fluorescence en excitant à 405 nm, ont aussi permis de démontrer que la sonde ne pénétrait pas à l'intérieur des cellules. La Figure 287 (b) est une photographie de la région CA3 de l'hippocampe de rat en présence de sonde. La bande sombre au centre de l'image représente une couche de corps cellulaire de neurones pyramidaux, les parties claires de part et d'autre, le milieu extracellulaire. Le fait que la bande soit sombre montre que la sonde n'a pas pénétré à l'intérieur des neurones et qu'elle est au contraire restée dans le milieu extracellulaire.

(a)



(b)

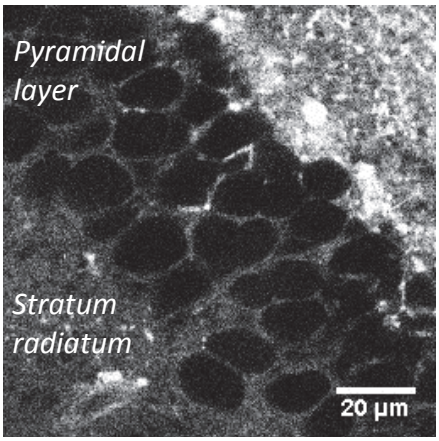


Figure 287 - *Schéma d'une coupe longitudinale de l'hippocampe d'un rat. (b) imagerie de fluorescence de la région CA3 de l'hippocampe en présence de 6,5 µM de Calix-COU-Alcyne-Sulf.*

Ensuite, pour visualiser les variations transitoires de potassium liées à l'activité neuronale, des tranches de cerveau ont été incubées dans une solution d'ACSF contenant 6,5 µM de sonde et de la picrotoxine. Les bursts générés ont été enregistrés par électrophysiologie. Dans ces circonstances, aucune variation de la fluorescence n'a pu être mesurée, malgré une fréquence d'acquisition des images de 20Hz dans une aire restreinte. L'hypothèse d'un échantillonnage insuffisant est peu probable, sauf si les paroxysmes d'augmentation du potassium extracellulaire sont plus brefs que les activités neuronales recueillies. Il peut par ailleurs être postulé un échantillonnage mal positionné spatialement (dans une aire de la tranche ou les augmentations de potassium extracellulaire ne sont pas produites ni propagées), une association du potassium au site de liaison trop lente, une trop faible sensibilité de la sonde.

Une autre méthode plus soutenue et prolongée d'élévation du potassium extracellulaire a été testée afin de visualiser l'augmentation du potassium extracellulaire par imagerie de fluorescence. Les tranches de cerveau ont cette fois été incubées dans une solution d'ACSF contenant 6,5 µM de sonde et 200µM de chlorure de baryum $BaCl_2$. Le $BaCl_2$ permet de bloquer les canaux potassiques entraînant une élévation progressive de la concentration extracellulaire en potassium. Cette fois, une augmentation progressive de la fluorescence a été mesurée (Figure 288). Cette élévation de la fluorescence peut correspondre à une élévation lente de la concentration extracellulaire en potassium. Il ne peut cependant pas être exclu que cette élévation qui n'atteint pas un plateau alors que les concentrations de potassium sont censées se stabiliser, ne soit pas en rapport linéaire avec le potassium. En tout état de cause, la capacité de la sonde à fixer le Ba^{2+} est exclue.

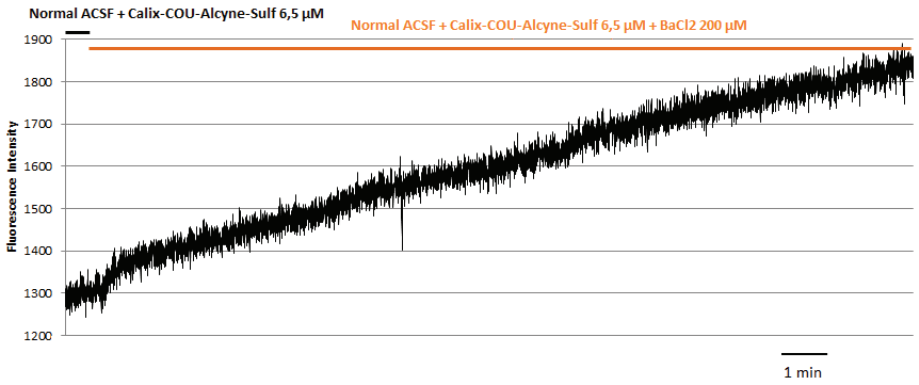


Figure 288 *Evolution de la fluorescence mesurée en présence de 200 µM de $BaCl_2$.*

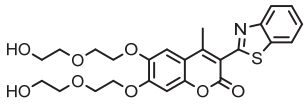
La trop faible intensité de fluorescence émise en excitant à deux photons, n'a pas permis de mesurer de variations transitoires de la concentration extracellulaire en potassium. Néanmoins ces mesures ont montré que la sonde ne perturbait pas l'activité neuronale (Figure 286), ne pénétrait pas à l'intérieur des cellules (Figure 287) et répondait à une augmentation du potassium extracellulaire (Figure 288). La modification de la coumarine pour permettre son excitation à de plus hautes longueurs d'ondes par un photon, devrait permettre de visualiser des variations transitoires du potassium extracellulaire. Des mesures supplémentaires sur des cultures cellulaires plus facilement imageables, ainsi que des variations contrôlées du potassium extracellulaire dans l'ACSF sont aussi en cours.

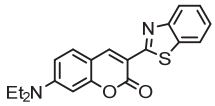
IV. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail était de disposer de sondes fluorescentes du potassium excitables dans le visible, hydrosolubles et capable de mesurer des variations de potassium comprises en 0 et 20 mM. Les premiers essais à partir de Calix[4]-bis-aza-couronne-5, n'ont pas permis d'obtenir de molécules permettant la détection sélective de potassium dans les conditions souhaitées. Des mesures effectuées avec le Calix-COU-Sulf, un calix[4]-bis-aza-couronne-6 dont la cage complexante est légèrement plus grande ont montré que celui-ci permettait la détection sélective de potassium dans les conditions souhaitées. Différentes stratégies ont alors été entreprises pour remplacer la coumarine par un fluorophore excitable à plus hautes longueurs d'ondes. Parmi elles, l'extension de la conjugaison de la coumarine pour obtenir le Calix-COU-Alcyne-Sulf, le Calix-COU-Amonium-Sulf et le Calix-COU-CN-Sulf a permis de satisfaire les critères imposés. Des expériences d'imagerie à deux photons, menées sur des échantillons de tissus neuronaux de rat, ont montré que le Calix-COU-Alcyne-Sulf restait dans le milieu extracellulaire, ne modifiait pas l'activité neuronale et répondait à une élevation lente du potassium extracellulaire. Malheureusement, à cause de la faible intensité de fluorescence émise en excitant à deux photons, des variations transitoires du potassium extracellulaire n'ont pas pu être visualisées. De nouvelles mesures, cette fois sur des cultures cellulaires, sont en cours.

Les sondes de potassium basées sur un triazacryptand décrites dans la littérature présentent une exaltation de fluorescence totale plus importante que les molécules synthétisées, néanmoins elles ont l'inconvénient de franchir la membrane plasmique. De plus, la comparaison de l'exaltation de la fluorescence de ces sondes et des molécules synthétisées entre 0 et 20 mM de potassium, nous montre que la différence d'exaltation de fluorescence n'est pas si grande. L'intensité de la fluorescence de sondes basées sur des triazacryptands est multipliée par un facteur 5 ou 8 entre 0 et 20 mM de potassium. Dans notre cas, l'intensité de la fluorescence est multipliée par un facteur 2 ou 3. Disposer de sondes excitables à un photon pourrait permettre de visualiser des variations transitoires du potassium extracellulaire.

La synthèse de nouveaux analogues de la dihydroxycoumarine dans le but d'obtenir une sonde excitable à de plus hautes longueurs d'ondes que les composés obtenus, peut être longue et sans garantie de succès. Le remplacement de la dihydroxycoumarine par une aminocoumarine permettrait d'obtenir une sonde excitable à de plus hautes longueurs d'ondes. En effet, la comparaison des propriétés spectrales de COU-Benz et de la coumarine 6 (Tableau 31) nous montre que le maximum d'absorption de la coumarine 6 se situe à 458 nm. L'utilisation de ce fluorophore pourrait permettre de disposer d'une sonde excitable à 477 nm avec un laser argon pour tirer profit du déplacement bathochrome des spectres d'absorption. La coumarine 6 est de plus obtenue facilement à partir du 4-(diethylamino)salicylaldéhyde avec de bons rendements.





COU-Benz	**Coumarine 6**
λ_{abs} = 373 nm	λ_{abs} = 458 nm
λ_{em} = 473 nm	λ_{em} = 505 nm
ϕ = 0,35	ϕ = 0,78
H_2O	EtOH

Tableau 31 - *Comparaison des propriétés spectroscopiques de COU-Benz et de la coumarine 6*

La conservation de la structure Calix[4]arène-bis-couronne-6 est par contre essentielle à la sélectivité de la sonde. Cette aminocoumarine devra donc être insérée au sein de l'éther couronne à la place d'un oxygène comme le montre la Figure 289. Ce qui implique de disposer de deux chaînes de longueurs différentes sur la fonction amine de la coumarine.

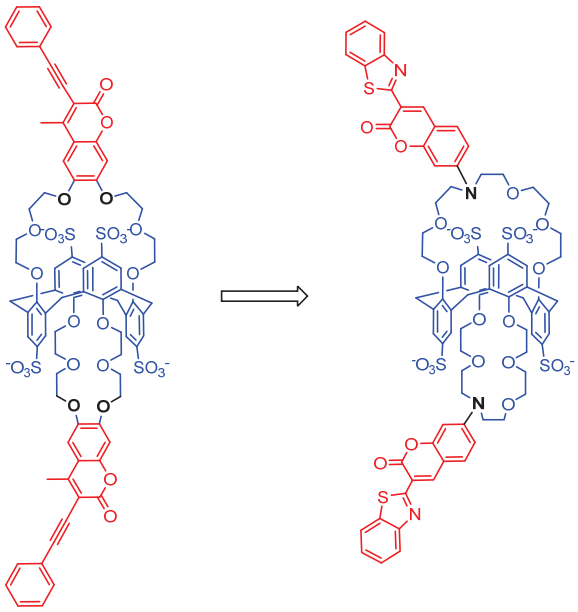


Figure 289 - *Remplacement de la dihydroxycoumarine par une aminocoumarine*

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, je me suis intéressé à la synthèse et à l'étude de sondes fluorescentes de cations alcalins solubles en milieu aqueux. Deux problématiques ont été abordées en vue du développement d'applications tant environnementales que médicales :

- la mesure de traces de césium en milieu aqueux
- la mesure de variations de potassium en milieu biologique

La première partie de la thèse a été effectuée en collaboration avec EDF. Le travail a porté sur la synthèse et l'étude de sondes fluorescentes du césium, ainsi que sur leur utilisation au sein d'un dispositif de mesure. Le but était la mesure en continu de la concentration en césium d'eaux issues de canalisations du circuit de vapeur de centrales nucléaires. Pour cela, différentes sondes ont été synthétisées pour permettre la mesure de concentrations de césium comprises entre 10^{-3} et 5 ppm. Si les différentes sondes obtenues n'ont pas permis de balayer l'ensemble de la gamme imposée de concentrations, le travail a cependant permis de mieux cerner les phénomènes photophysiques mis en jeu. Des modifications de l'architecture moléculaire comme le remplacement des groupements sulfonates par des groupements phosphonates sont envisagées pour induire une exaltation de fluorescence plus importante ou pour augmenter l'affinité de la sonde, et balayer l'ensemble de la gamme de concentrations. Cela étant, certaines sondes synthétisées couvrent déjà une bonne partie de la gamme imposée de concentrations. Elles se sont aussi révélées parfaitement fonctionnelles au sein du dispositif de mesure développé au laboratoire. Des limites de détection plus faibles qu'en cuve ont d'ailleurs été obtenues avec ce dispositif. Les sondes et le dispositif mis au point pour EDF, peuvent aussi très bien servir à des applications purement environnementales, comme l'analyse d'échantillons issus de prélèvements effectués en zone polluée.

La seconde partie de la thèse a porté sur la détection du potassium. Le but n'a pas été la mesure en soi de traces de potassium, mais bien la mesure de ses variations dans une gamme donnée de concentrations, et ce dans des conditions physiologiques. Ce projet a été effectué en collaboration avec des neurobiologistes qui s'intéressaient à la variation de la concentration extracellulaire en potassium lors de crises épileptiques. Une cage complexante sélective du potassium a dans un premier temps été identifiée. Puis, différentes stratégies pour remplacer la coumarine par un fluorophore excitable à plus hautes longueurs d'ondes ont été étudiées. Des difficultés ont été rencontrées, notamment liées à l'insertion des groupements sulfonates, mais les différentes stratégies d'insertion du fluorophore explorées ont cependant permis ici encore de mieux comprendre les phénomènes photophysiques mis en jeu. Certaines stratégies serviront sûrement à l'avenir. Pour ce projet, une partie du cahier des charges a aussi été remplie. En effet le Calix-COU-Alcyne-Sulf permet la mesure du potassium en milieu physiologique. Les expériences menées sur des tranches de tissus neuronaux de rat, ont aussi montré que celui-ci restait dans le milieu extracellulaire et qu'il ne perturbait pas l'activité des neurones. Des efforts restent maintenant à faire pour déplacer les spectres d'absorption et d'émission vers les plus hautes longueurs d'ondes, et permettre des mesures par excitation à un photon. Le remplacement de la dihydroxycoumarine par une aminocoumarine devrait permettre d'atteindre cet objectif, avant d'envisager des modifications plus importantes du fluorophore.

Outre le remplacement des groupements sulfonates par des groupements phosphonates, des modifications plus importantes de la structure complexante de la sonde sont à envisager pour obtenir des effets photophysiques plus importants. En effet, la complexation du césium ou du potassium par un Calix[4]arène-bis-Azacouronne-5 tetrasulfonné ou un Calix[4]arène-bis-benzocouronne-6 tetrasulfonné génère deux effets contradictoires. D'une part, la complexation du cation diminue la densité électronique du ou des atomes donnneurs, d'autres part le rapprochement des groupements sulfonates augmente la densité électronique de ces mêmes atomes. Si ces deux effets s'additionnaient, ou si un seul effet subsistait, les changements photophysiques seraient sûrement plus importants. C'est pourquoi il serait intéressant de disposer de sondes où les groupements solubilisants ne participent pas à la complexation des cations. Ceci serait envisageable en ne conservant qu'un seul des deux sites de complexation des sondes actuelles (Figure 290). Le bord supérieur du calixarène porterait les fonctions solubilisantes, sulfonates, phosphonates ou autres, et le bord inférieur le site de complexation.

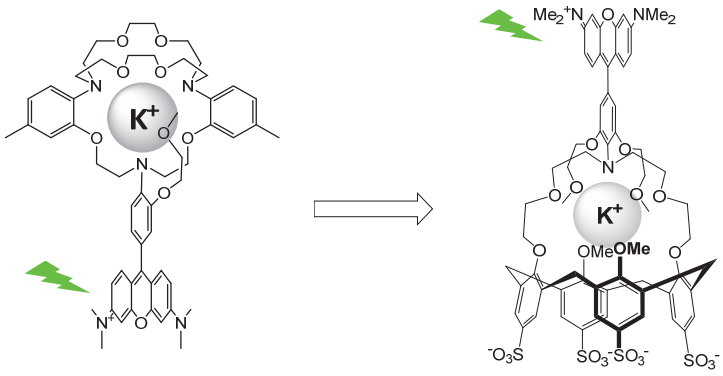


Figure 290 - *Modification de la structure de la sonde envisageable*

Sans la participation des groupements sulfonates, des fluoroionphores hydrosolubles de type PET pourraient ainsi être envisagés. De plus, ceci pourrait aussi permettre d'augmenter les rendements de synthèse des sondes. En effet, avec les sondes actuelles comportant deux sites de complexation, le greffage ou la construction de deux fluorophores est nécessaire, entraînant des rendements plus faibles que pour une molécule ne disposant que d'un seul site de complexation.

Deux pistes sont envisageables, l'une s'inspirant des cryptands, l'autre des cryptophanes :

La piste s'inspirant des cryptands serait plutôt destinée à la mesure de variations brèves de concentrations ioniques, et serait donc plus adaptée à la mesure du potassium. L'analyse du TAC-Red[328] - une sonde moléculaire fluorescente du potassium présentée plus tôt - nous permet d'envisager une sonde de type PET basée sur un calixarène. Le TAC-RED se compose d'un triazacryptand portant un groupement méthoxyéthoxy et d'une rhodamine. La complexation du potassium inhibe le transfert d'électrons photo-induits entre l'azote et la rhodamine, ce qui entraîne une exaltation de la fluorescence. La participation du groupement méthoxyéthoxy à la complexation du potassium renforce l'exaltation de la fluorescence[329]. En effet, la participation du bras méthoxyéthoxy entraîne la rotation de la rhodamine, ce qui entraîne un découplage total entre l'azote et la rhodamine (Figure 291).



TAC-RED **Calix-Cryptand**

Figure 291 - *Sondes moléculaires de cations alcalins*

L'immobilisation de ce motif sur une calix[4]arène pourrait permettre d'obtenir un comportement similaire (Figure 291), et ainsi de tirer parti de la bonne affinité des calix[4]arènes couronne pour les cations alcalins et d'un mécanisme de reconnaissance intéressant. La participation des groupements méthoxyéthoxy à la complexation du potassium entraînerait là aussi la rotation de la rhodamine. La présence de ces bras non attachés de manière covalente au calixarène est essentielle pour assurer une bonne sélectivité de la cage complexante. Ils doivent aussi permettre une cinétique de complexation et une dissociation rapide, ce qui est important pour la mesure de variations brèves de concentrations de cations comme c'est le cas en milieu biologique.

La structure de cette molécule est aussi facilement modifiable. Le nombre de bras méthoxyéthoxy et la taille de l'éther couronne peuvent être modifiés pour s'adapter au cation ciblé. Le fluorophore ou les groupements solubilisants pourront aussi être facilement modifiés. Des études de modélisation moléculaire pourraient permettre de sélectionner les molécules les plus intéressantes.

La seconde piste, inspiré des cryptophanes, est plutôt destinée à la mesure de faibles concentrations, et serait donc plus adaptée à une problématique environnementale, comme la détection de traces de césium. Contrairement à la première piste où une molécule flexible a été envisagée pour mesurer des processus rapides, cette seconde piste envisage une structure beaucoup plus rigide pour disposer d'une très bonne sélectivité pour un cation donné.

Les cryptophanes sont des molécules fortement rigides composées de deux demi-sphères cyclotrivératrylène. Elles disposent pour certaines de très bonnes affinités pour le césium[330] avec des constantes de complexations de l'ordre de 6.10^9 M^{-1}. La fonctionnalisation du bord inférieur d'un calix[4]arène par quatre chaînes diéthylène glycol permettrait de disposer d'une cage complexante aussi fortement rigide avec une sélectivité importante pour un cation donné. (Figure 292).

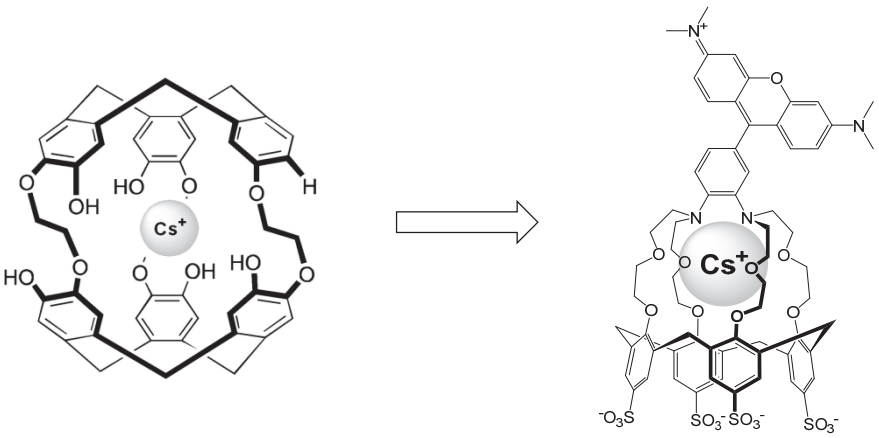


Figure 292 - *Structure d'un cryptophanes sélectif du césium, et d'un calixarène inspiré par cette structure*

Partie expérimentale

I. Synthèses effectuées

A. Généralités

1) Solvants et chromatographies

Les solvants utilisés lors des synthèses effectuées sont tous de qualité commerciale, disponibles chez Sigma Aldrich ou SDS et ont été utilisés sans traitement supplémentaire. Les produits chimiques commerciaux utilisés sont aussi tous disponibles chez Sigma Aldrich ou TCI. Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées sur des plaques 60 F250 de 0,2 mm d'épaisseur. Les purifications par chromatographie sur colonne de gel de silice ont été réalisées manuellement avec du gel de silice Merck 60 (63-200 µm) ou automatiquement par un collecteur Armen Instruments Spot II Ultimate avec des colonnes pré-pacquées INTERCHIM silice ou silice phase inverse.

2) Spectres RMN

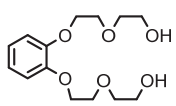
Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton (^{1}H), et du carbone (^{13}C) ont été enregistrés sur un spectromètre JEOL JNM ECS 400 MHz (100 MHz pour ^{13}C). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par million (ppm). Trois solvants deutérés ont été utilisés, le chloroforme-d ($CDCl_3$) le méthanol-d4 (CD_3OD) et le l'eau-d2 (D_2O). Pour les spectres protons (^{1}H) le TMS (triméthylsilane, 0 ppm) a servi de référence, pour les spectres carbons (^{13}C) les pics du solvant deutéré utilisé ont servi de référence. La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, dd = doublet dédoublé, td = triplet dédoublé. Les constantes de couplage (J_{HH}) sont exprimées en Hz.

3) Spectroscopie de masse

Les spectres de masse ont été effectués par le service de spectrométrie de masse - IMAGIF/ICSN-CNRS à Gif sur Yvette.

B. Protocole de synthèse

Bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxycathecol : compound 61



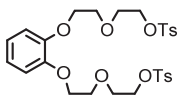
61

In a round bottom flask, were introduced 5 g (45.4 mmol) of catechol, 15g (10.9g mmol) of K_2CO_3 and 200 mL of DMF. The mixture was then stirred at 90°C before adding 15 mL (136.2 mmol) of 2-(2-chloroethoxy)ethanol in 15 mL DMF and 18 g (108.98) of potassium iodide KI. The mixture was then stirred at 100°C for 72 hours. After TLC analysis, one equivalent of 2-(2-chloroethoxy)ethanol was added and the mixture was further stirred 24 hours at 100°C. The DMF was then partially removed and 150 mL of water were added to the mixture. The product was extracted with CH_2Cl_2, washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure; yielding 12.7 g of a brown oil (97%) requiring no further purifications.

NMR ^{1}H (400 MHz, CDCl3): δ (ppm) 6.68 (m, 4H, $H_{catechol}$), 4.20-4.11 (m, 4H, OCH_2), 3.93-3.85 (m, 4H, OCH_2), 3.77-3.63 (m, 8H, OCH_2).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 148.68 ($2C_q$), 121.71 ($2CH_{ar}$), 113.81 ($2CH_{ar}$); 73.05 ($2OCH_2$), 69.55 ($2OCH_2$), 68.67 ($2OCH_2$), 61.86 ($2OCH_2$).

Bis(2-(2-tosylethyleneoxy)ethoxycathecol : compound 63



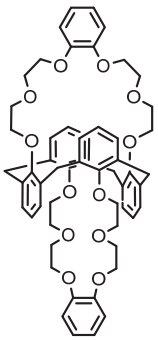
63

In a round bottom flask under argon 6g (21 mmol) of bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxycathecol and 20 g (100 mmol) of tosyl chloride were dissolved in 200 mL of CH_2Cl_2. The mixture was then cooled to 0°C using an ice bath, before adding dropwise a solution of 14 mL (100 mmol) of Et_3N in 50 mL of CH_2Cl_2. The mixture was stirred for 18 hours at room temperature. The reaction was then quenched by addition of water; the organic layers were washed with 100 mL of a 1M HCl solution and with water until neutrality, before being dried over $MgSO_4$. The solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/Acetone 95/5) giving 8.6 g (70%) of a yellow oil.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.78 (d, $^{3}J_{HH}$=8.2 Hz, 4H, H_{tosyl}), 7.29 (d, $^{3}J_{HH}$ =8.2 Hz, 4H, H_{tosyl}), 6.97-6.85 (m, 4H, $H_{catechol}$), 4.17 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.5 Hz, 4H, OCH_2), 4.06 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.5 Hz, 4H, OCH_2), 3.84-3.72 (m, 8H, OCH_2), 2.40 (s, 6H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 148.76 ($2C_{q\ catechol}$), 144.69 ($C_{q\ tosyl}$), 132.85 ($C_{q\ tosyl}$), 129.72 (CH_{tosyl}), 127.88 (CH_{tosyl}), 121.66 ($2CH_{catechol}$), 114.68 ($2CH_{catechol}$), 69.79 ($2OCH_2$), 69.31 ($2OCH_2$), 68.78 ($2OCH_2$), 68.72 ($2OCH_2$), 21.53 ($2CH_3$).

Calix[4]arene-bis-[(1,2-phenylene)-crown-6] : compound 60



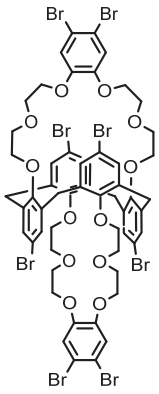
60

1.77 g (4.16 mmol) of Calix[4]arene, 11.5 g (83.3 mmol) of K_2CO_3 and 250 mL of dry acetonitrile were introduced in a round bottom flask under argon. The mixture was refluxed for one hour before adding 4.95 g (8.33 mmol) of Bis(2-(2-tosylethyleneoxy)ethoxycathecol in 30 mL of dry acetonitrile. The mixture was then kept at reflux for 5 days before removing the solvent under reduced pressure. The residue was dissolved in 200 mL of CH_2Cl_2 and washed with water. The organic layers were dried over $MgSO_4$ concentrated under vacuum. The crude product was then purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/MeOH 9/1) and precipitated with diethyl ether giving 2.38g (62%) of a white powder.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.07 (d, $^{3}J_{HH}$ =7.3 Hz, 8H, H_{-calix}), 6.99 (s, 8H, $H_{-catechol}$), 6.68 (t, $^{3}J_{HH}$ =7.3 Hz, 4H, $H_{p\text{-}calix}$), 4.13 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.6 Hz, 8H, OCH_2), 3.77 (s, 8H, CH_2), 3.69 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.6 Hz, 8H, OCH_2), 3.60 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.6 Hz, 8H, OCH_2), 3.53 (t, $^{3}J_{HH}$ =4.6 Hz, 8H, OCH_2).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 154.49 ($C_{q\ calix}$), 149.23 ($C_{q\ catechol}$), 134.13 ($C_{q\ calix}$), 130.18 ($C_{q\ calix}$), 122.61 ($CH_{ar\ calix}$), 122.08 ($CH_{ar\ catechol}$), 115.59 ($CH_{ar\ catechol}$), 70.33 (OCH_2), 70.26 (OCH_2), 70.21 (OCH_2), 69.95 (OCH_2), 37.91 (4-CH_2).

5,11,17,23-tetrabromocalix[4]arene-bis-[(1,2-phenylene-4,5-dibromo)-crown-6] : compound 64



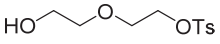
64

In a round bottom flask under argon 1g (1.08 mmol) of Calix[4]arene-bis-[(1,2-phenylene)-crown-6] was dissolved in 170 mL of CH_2Cl_2. The mixture was cooled to 0°C using an ice bath, and a solution of bromine 1.05 mL (20.5 mmol) in 10 mL of CH_2Cl_2 was added dropwise, the mixture was further stirred for 4 hours at room temperature. After four hours the mixture was diluted with 100 mL of CH_2Cl_2 and washed with a 10% $Na_2S_2O_5$ solution and water before being dried on $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/MeOH 99/1) and precipitated with acetone to give 1.06 (63%) of the product as white crystals.

NMR ^{1}H (400 MHz, CD_3Cl): δ (ppm) 7.21 (s, 8H, $H_{\text{-calix}}$), 7.16 (s, 4H, $H_{\text{-catechol}}$), 4.12 (m, 8H, OCH_2), 3.86-3.68 (m, 16H, CH_2 + OCH_2), 3.53 (t, $^3J_{HH}$ =5.9 Hz, 8H, OCH_2), 3.39 (t, $^3J_{HH}$ =5.9 Hz, 8H, OCH_2).

NMR ^{13}C (400 MHz, CD_3Cl): δ (ppm) 155.43 ($C_{q\ calix}$), 149.51 ($C_{q\ catechol}$), 135.79 ($C_{q\ calix}$), 132.34 ($C_{q\ calix}$), 120.07 ($CH_{ar\ Calix}$), 115.36 ($C_{q\ catechol}$), 115.23 ($C_{q\ catechol}$), 70.44 (OCH_2), 70.37 (OCH_2), 69.93 (OCH_2), 69.77 (OCH_2), 37.04 (CH_2).

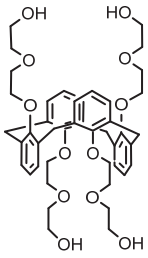
2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate



In a round bottom flask under argon 80g (0.76 mmol) of diethylene glycol and 51 mL (0.38 mmol) of Et_3N were dissolved in 500 mL of CH_2Cl_2. The mixture was stirred for half an hour at room temperature before adding 35.49 g (0.19 mmol) of tosyl chloride in one time. The mixture was then stirred overnight at room temperature. The reaction was then quenched with water, extracted with CH_2Cl_2, washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product contains a mixture of mono-tosylated and di-tosylated product. The di-tosylated product was precipitated in isopropanol, mono and di-tosylated product were then separated by filtration, affording 37.60 g (77%) of 2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate as a yellow oil.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.80-7.77 (d, $^3J_{HH}$=8.24 Hz, 2H, H_{tosyl}), 7.35-7.33 (d, $^3J_{HH}$ =8.24 Hz, 2H, H_{tosyl}), 4.18-4.17 (t, $^3J_{HH}$ =4.58 Hz, 2H, OCH_2), 3.69-3.68 (m, 4H, OCH_2) 3.52-3.50 (t, $^3J_{HH}$ =4.58 Hz, 2H, OCH_2), 2.43 (s, 3H, CH_3).

25,27,26,28-tetradiethylene glycol-calix[4]arene : compound 66



66

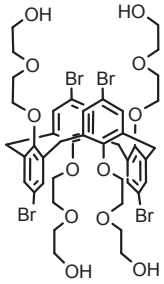
In a round bottom flask under argon, 1.18 g (2.78 mmol) of Calix[4]arene and 1.92 g (13.9 mmol) of K_2CO_3 were stirred in 15 mL of dry acetonitrile. After 30 min at room temperature 4.35 g (16.68 mmol) of monotosylated diethylene glycol in 15 mL of dry acetonitrile were added in one time. The mixture was further refluxed for 3 days. After three days the mixture was cooled down to room temperature, the solvent removed under reduced pressure and the mixture dissolved in 30 mL de CH_2Cl_2. The organic

layer was washed with 30 mL of 1M HCl solution, 30 mL of a saturated $NaHCO_3$ solution, and 30 mL of water. The organic layer was then dried with $MgSO_4$ and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was crystalized in a few mL of ethyl acetate, and the crystals were collected by vacuum filtration. The residue was evaporated crystalized again a couple of time. 0.90 g of light brown crystals were isolated with 42% yield.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.11 (d, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, 8H, $H_{m\text{-}calix}$), 6.82 (t, 4H, $^3J_{HH}$= 7.8 Hz, $H_{p\text{-}calix}$), 3.86-3.74 (m, 16H, OCH_2), 3.69 (s, 8H, CH_2), 3.65-3.58 (m, 16H, OCH_2).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 155.99 (C_q); 133.77 (C_q); 130.45 (C_q); 122.80 (CH_{ar}); 72.71 ($2OCH_2$); 71.07 ($2OCH_2$); 70.22 ($2OCH_2$); 61.74 ($2OCH_2$); 36.60 ($4CH_2$)

5,11,17,23-tetrabromo-25,27,26,28-tetradiethylene glycol-calix[4]arene : compound 65



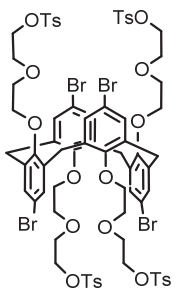
65

In around bottom flask under argon, 0.73 g (0.93 mmol) of compound 66 were dissolved in 70 mL of CH_2Cl_2. The mixture was cooled to 0°C with an ice bath, before adding dropwise 0.75 mL (14 mmol) of Br_2 under stirring. The mixture was then further stirred for 18 hours at room temperature. After 18 hours, the organic layer was washed with 2 x 150 mL a 10% $Na_2S_2O_5$ solution, 100 mL of water, and 100 mL of brine. The organic layers were then dried over $MgSO_4$ and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/MeOH 9/1) yielding 0.554g (54%) of a yellow solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): *δ* 7.30 (s, 8H, $H_{\text{-}calix}$), 3.98-3.78 (m, 40 H, $OCH_2 + CH_2$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): *δ* 134.65 (C_q); 133.03 (C_q); 115.10 (CH_{ar}); 100.03 (C_q); 72.78 ($2OCH_2$); 72.17 ($2OCH_2$); 70.73 ($2OCH_2$); 62.05 ($2OCH_2$); 29.73 ($4CH_2$).

5,11,17,23-tetrabromo-25,27,26,28-tetradiethylene glycol-tetratosyl-calix[4]arene : compound 67



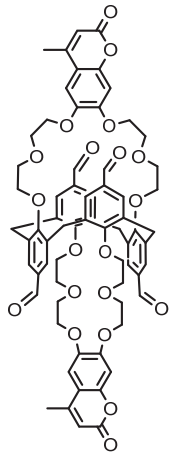
67

In a round bottom flask under argon, 0.32 g (0.29 mmol) of compound 65, and 0.46 g (2.3 mmol) of tosyl chloride were dissolved in 13 mL of THF. The mixture was cooled to 0°C using an ice bath. A solution of 0.18 g (2.9 mmol) of NaOH in 1,3 mL of water was added dropwise and the mixture was further stirred at 0°C for 3 hours. The mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in 30 mL CH_2Cl_2, washed twice with 30 mL of water and once with 30 mL of brine. The organic layer was then dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/AcOEt 9/1) yielding 91 mg (18%) of lights brown crystals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.80 (d, $^3J_{HH}$= 8 Hz, 8H, $H_{\text{-}tosyl}$), 7.29 (d, $^3J_{HH}$= 8 Hz, 8H, $H_{\text{-}tosyl}$), 7.17-7.15 (m, 8H, $H_{\text{-}calix}$), 4.34 (m, 8H, OCH_2), 3.99-3.74 (m, 32H, $OCH_2 + CH_2$), 2.38 (s, 12H, $CH_{3\text{-}tosyl}$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ 154.43 (C_q), 144.80 (C_q), 134.53 (C_q), 132.97 ($2C_q$), 129.98 ($CH_{ar\text{-}tosyl}$), 128.03 ($CH_{ar\text{-}calix}$ + $CH_{ar\text{-}tosyl}$), 71.97 ($2OCH_2$), 70.80 ($2OCH_2$), 69.50 ($2OCH_2$), 68.98 ($2OCH_2$), 29.83 ($4CH_2$); 21.77 (4-CH_3).

5,11,17,23-tetraformyl-calix[4]arene-bis-[(6,7-dihydroxy-4-methyl-2*H*-chromen-2-one)-crown-6] : compound 68



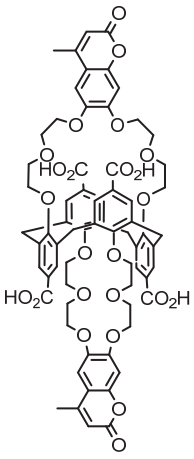
68

In a round bottom flask under argon were introduced 1 mL (9.18 mmol) of $TiCl_4$ and 1.66 mL (18.36 mmol) of 1,1-dichloromethyl methyl ether. To this mixture at room temperature was added dropwise a solution of 100 mg (0.09 mmol) of Calix-COU-2 in 1 mL $CHCl_3$. The mixture was stirred for one hour at 40°C, leading to the formation of a precipitate. The mixture was then diluted with 10 mL $CHCl_3$ and poured onto crushed ice. The aqueous layers were extracted with 3 x 20 mL de $CHCl_3$. The organic layers were gathered, washed with water and brine, dried over $MgSO_4$ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by preparative chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 95/5) yielding 65 mg (56%) of yellow crystals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 9.68 (s, 4H, CHO), 7.70 (d, 8H, H_{calix}), 7.06 (s, 2H, $H_{coumarin}$), 6.84 (s, 2H, $H_{coumarin}$), 6.19 (s, 2H, $H_{coumarin}$), 4.09 (m, 4H, OCH_2), 3.97 (m, 8H, CH_2), 3.74 (m, 8H, OCH_2), 3.65-3.46 (m, 12H, OCH_2), 2.43 (s, 6H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ 191.15 (CHO), 161.67 (C_q), 152.78 (C_q), 152.62 (C_q), 150.00 (C_q), 145.49 (C_q), 134.61 (C_q), 132.28 (C_q), 132.25 (C_q), 131.65 (CH_{ar}), 113.25 (CH_{ar}), 112.60 (C_q), 110.14 (CH_{ar}), 101.80 (CH_{ar}), 71.03 ($2OCH_2$), 70.46 ($2OCH_2$), 70.34 (OCH_2), 70.24 (OCH_2), 69.98 ($2OCH_2$), 51.02 ($2OCH_2$), 37.59 ($CH_{2\text{-}calix}$), 19.03 ($CH_{3\text{-}coumarin}$).

5,11,17,23-tetracarboxy-calix[4]arene-bis-[(6,7-dihydroxy-4-methyl-2*H*-chromen-2-one)-crown-6] : Calix-COU-Acid



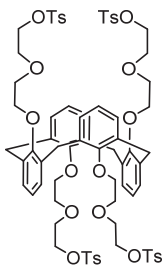
Calix-COU-Acid

In a round bottom flask under argon were dissolved 100 mg (0.083mmol) of compound 68 in 14 mL of a $CHCl_3$/acetone (1/1) mixture. 103 mg (0.91 mmol) of $NaClO_2$ and 105 mg of NH_2SO_3H (1.08 mmol) in 2 mL of water were then added dropwise, the reaction mixture was further stirred for 20 hours. After removal of the solvent, the residue was washed with a 10% HCl solution and precipitated with CH_2Cl_2, to yield 79 mg (75%) of a yellow powder.

NMR ^{1}H (400 MHz, D_2O+NaOD): δ 7.56 (s, 8H, $H_{\text{-}calix}$), 6.41 (s, 2H, $H_{\text{-}coumarin}$), 6.04 (s, 2H, $H_{\text{-}coumarin}$), 5.65 (s, 2H, $H_{\text{-}coumarin}$), 4.10-2.93 (m, 40H, CH_2 + OCH_2), 1.83 (s, 6H, CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+Na]^+$ = 1287.3666; Calc. for $C_{68}H_{64}O_{24}$: $[M+Na]^+$ = 1287.3686

25,27,26,28-tetra-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate)-calix[4]arene : compound 98



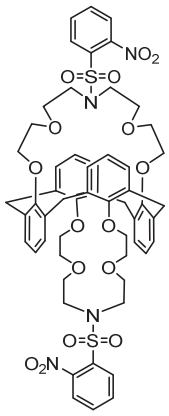
98

In a round bottom flask under argon, 1 g (1.29 mmol) of compound 66, and 1.96 g (10.3 mmol) of tosyl chloride were dissolved in 40 mL of THF. The mixture was cooled to 0°C using an ice bath. A solution of 0.515 g (12.9 mmol) of NaOH in 2.5 mL of water was added dropwise and the mixture was further stirred for 2 days at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure; the residue was dissolved in 30 mL CH_2Cl_2, washed twice with 30 mL of water and once with 30 mL of brine. The organic layer was then dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/AcOEt 95/5) yielding 1.20 g (67%) of white crystals.

NMR ^{1}H ($CDCl_3$, 400MHz) : δ = 7.80 (d, $^3J_{HH}$= 8.2 Hz, 8H, H_{tosyl}), 7.32 (d, $^3J_{HH}$= 8.2 Hz, 8H, H_{tosyl}), 6.97 (d, $^3J_{HH}$= 7.7 Hz, 8H, H_{calix}), 6.64 (t, $^3J_{HH}$= 7.6 Hz, 4H, H_{calix}); 4.18 (m, 8H, OCH_2), 3.69 (s, 8H, CH_2), 3.64 (m, 16H, OCH_2), 3.46 (m, 8H, OCH_2), 2.42 (s, 12H, CH_3).

NMR ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) : δ = 155.0 ($C_{q\text{-}calix}$), 145.0 ($C_{q\text{-}tosyl}$), 133.7 ($C_{q\text{-}calix}$), 133.1 ($C_{q\text{-}calix}$), 130.0 ($CH_{ar\text{-}tosyl}$ + $CH_{ar\text{-}calix}$), 128.1 ($CH_{ar\text{-}tosyl}$), 122.2 ($CH_{ar\text{-}calix}$), 70.5 (OCH_2), 70.3 (OCH_2), 69.5 (OCH_2), 68.8 (OCH_2), 36.1 ($CH_{2\text{-}Calix}$), 21.8 ($CH_{3\text{-}tosyl}$).

Calix[4]arene-bis-[(2-nitrophenyl)sulfonyl)-aza-crown-5] : compound 99



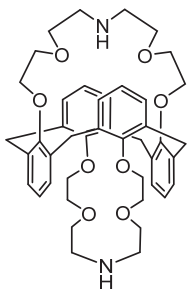
99

In a round bottom flask under argon were introduced 0.970 g (0.696 mmol) of compound 98, 0.423 g (3.06 mmol) of K_2CO_3, and 20 mL of dry DMF. The mixture was stirred 15 min at room temperature before adding 0.310 g (1.53 mmol) of 2-nitrobenzensulfonamide. The reaction mixture was then stirred at 100°C for 48 hours. After 48 hours the solvent was removed and the residue dissolved in CH_2Cl_2. The reaction mixture was washed with a 2M NaOH solution and water, before being dried on $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2. - CH_2Cl_2/AcOEt 6/4) yielding 417 mg (54%) of white crystals.

NMR ^{1}H ($CDCl_3$, 400MHz) : δ =8.07 (m, 2H, $H_{\text{-}nosyl}$)7.69 (m, 6H, $H_{\text{-}nosyl}$), 7.08(d, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 8H, $H_{\text{-}calix}$), 6.88 (t, $^3J_{HH}$= 7.3 Hz, 4H, $H_{\text{-}calix}$), 3.84 (s, 8H, $CH_{2\text{-}calix}$), 3.52 (m, 8H, OCH_2), 3.47 (m, 8H, OCH_2), 3.35 (m, 8H, OCH_2), 3.05 (m, 8H, NCH_2).

NMR ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz) : δ = 157.5 ($C_{q\text{-}nosyl}$), 148.2 ($C_{q\text{-}nosyl}$), 133.9 ($C_{q\text{-}calix}$), 133.7 ($C_{q\text{-}calix}$), 133.4 ($CH_{ar\text{-}nosyl}$), 131.8 ($CH_{ar\text{-}nosyl}$), 131.1 ($CH_{ar\text{-}nosyl}$), 129.8 ($CH_{ar\text{-}calix}$), 124.3 ($CH_{ar\text{-}nosyl}$), 122.6 ($CH_{ar\text{-}calix}$), 70.6 (OCH_2), 69.4 (OCH_2), 47.7 (OCH_2), 38.3 (NCH_2), 36.6 ($CH_{2\text{-}calix}$).

Calix[4]arene-bis-[aza-crown-5] : compound 91



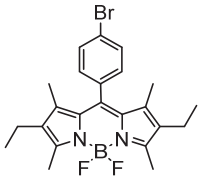
91

To a round-bottom flask under argon, containing 355 mg (0.32 mmol) of compound 99, 132 mg (0.96 mmol) of K_2CO_3 and 4 mL DMF, was added 85 µL (0.83 mmol) thiophenol, the reaction was then stirred three days at room temperature. The DMF was then removed and the residue dissolved in CH_2Cl_2, the organic layers were washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was too polar to be purified by column chromatography using silica gel, so it was purified using reverse phase column chromatography and precipitated couple of times in ether, yielding a small amount of the expected product.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.17-7.16 (d, $^{3}J_{HH}$ = 6.88 Hz, 8H, CH_{ar}), 6.86-6.83 (d, $^{3}J_{HH}$ = 6.88 Hz, 4H, CH_{ar}), 3.72 (s, 8H, CH_2), 3.68-3.65 (m, 4H, OCH_2), 3.63-3.61 (m, 4H, OCH_2), 3.58-3.55 (t, $^{3}J_{HH}$ = 5.48 Hz,4H, OCH_2), 2.84-2.81 (t, $^{3}J_{HH}$ = 5.04 Hz, 4H, NCH_2).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 156.69 (C_q), 134.07 (CH_{ar}), 131.33 (CH_{ar}), 122.26 (C_q),71.15 ($2OCH_2$), 70.83 ($2OCH_2$), 70.37 ($2OCH_2$), 49.11 ($2NCH_2$), 17.87 (CH_3).

4,4-difluoro-2,6-diethyl-1,3,5,7-dimethyl-8-(4-bromophenyl)-4-bora-3a,4a-diazas-Indacene

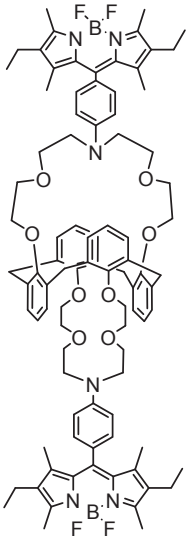


In a round-bottom flask under argon were introduced 2.26 g (12.2 mmol) of 4-bromobenzaldéhyde, 3.3 mL (24.4 mmol) of 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole (kryptopyrrole) and 250 mL of CH_2Cl_2. Once all reactants were dissolved a catalytic amount of TFA (a few drops) was added, and the reaction was stirred at room temperature until complete consumption of the aldehyde (TLC analysis).After 90 min 2.77 g (12.2 mmol) of chloranil were added, 15 min later 12.5 mL (73 mmol) of DIPEA were added. After 30 more min 12.1 mL (97.6 mmol) of $BF_3.OEt_2$ were added, the reaction was then stirred for 18 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of water. The product was extracted with CH_2Cl_2 washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was first purified by column chromatography on silica gel (PE/ CH_2Cl_2 2/8) and then precipitated in diethyl ether, to afford 1.39 g (22%) of a purple solid.

NMR ^{1}H ($CDCl_3$, 400MHz): δ = 7.63 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.0 Hz, 2H), 7.18 (d, $^{3}J_{HH}$ =8.0 Hz, 2H), 2.53 (s, 6H), 2.30 (q, $^{3}J_{HH}$ =7.3 Hz, 4H), 1.31 (s, 6H), 0.98 (t, $^{3}J_{HH}$ =7.3 Hz, 6H)

NMR ^{13}C ($CDCl_3$, 100MHz): δ = 154.3 (C_q), 138.6 (C_q), 138.3 (C_q), 134.9 (C_q), 132.5 (CH_{ar}), 133.2 (C_q), 130.7 (C_q), 130.3 (CH_{ar}), 123.1 (C_q), 17.2 (CH_2), 14.7 (CH_3), 12.7 (CH_3), 12.1 (CH_3).

Calix-Aza-Bodipy

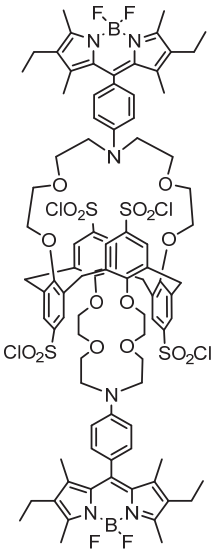


In a round-bottom flask under argon were introduced 1 g (1.1 mmol) of Calix-Adehyde, 570 µL (4.2 mmol) of 3-ethyl-2,4-dimethylpyrrole (kryptopyrrole) and 30 mL of CH_2Cl_2. Once all reactants were dissolved a catalytic amount of TFA (a few drops) was added, and the reaction was stirred at room temperature until complete consumption of the aldehyde (TLC analysis).After 45 min 570 mg (2.3 mmol) of chloranil were added, 30 min later 1.3 mL (7.4 mmol) of DIPEA were added. After 90 more min 1.4 mL (11.6 mmol) of $BF_3.OEt_2$ were added, the reaction was then stirred for 6 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of water. The product was extracted with CH_2Cl_2 washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was first purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc 2/8) and then precipitated in diethyl ether, to afford 280 mg (17%) of a purple solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.17-7.13 (m, 12H, $8CH_{ar\text{-}calix}$ + $4CH_{ar\text{-}bodipy}$), 6.86-6.84 (d, $^3J_{HH}$ = 9.16 Hz, 4H, $4CH_{ar\text{-}bodipy}$), 6.63-6.59 (t, $^3J_{HH}$ = 7.56 Hz, 4H, $4CH_{ar\text{-}calix}$), 3.85-3.83 (m, 8H, OCH_2), 3.81-3.79 (m, 8H, OCH_2), 3.73 (s, 8H, $CH_{2\text{-}calix}$), 3.63-3.60 (t, $^3J_{HH}$ = 7.32 Hz, 8H, OCH_2), 3.43-3.40 (t, $^3J_{HH}$ = 7.34 Hz, 8H, OCH_2), 2.53 (s, 12H, $CH_{3\text{-}bodipy}$), 2.32-2.27 (q, $^3J_{HH}$ = 7.49 Hz, 8H, $CH_{2\text{-}bodipy}$), 1,46 (s. 12H, $CH_{3\text{-}bodipy}$), 0.99-0.96 (t, $^3J_{HH}$ = 7.78 Hz, 12H, $CH_{3\text{-}bodipy}$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+2NH_4]^+$ = 1512.8521 ; Calc. for $C_{90}H_{104}B_2F_4N_6O_8$ $[M+2NH_4]^+$ = 1512.8423

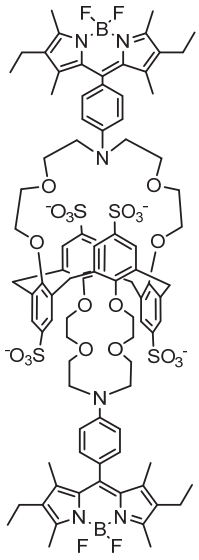
Calix-Aza-Bodipy-SO_2Cl



To a solution of 70 mg ($4.7.10^{-5}$ mol) of Calix-aza-bodipy in 1 mL of $CHCl_3$ at -10°C was added dropwise 60 µL ($4.7.10^{-4}$ mol) of HSO_3Cl. After 3 h at room temperature the mixture was poured into an ice water solution. The product was then extracted with EtOAc, dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The crude product was dissolved in MeOH and precipitated by addition of acetone. White 78 mg (88%) of crystals were collected by filtration; the purity of the product was controlled by ^{1}H NMR.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.86 (s, 8H,$CH_{ar\text{-}calix}$), 7.03-7.01 (d, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, 4H, CH_{ar}), 6.66-6.64 (d, $^3J_{HH}$ = 8.28 Hz, 4H, CH_{ar}), 4.10 (s, 8H, $CH_{2\text{-}calix}$), 3.69-3.67 (m, 8H, OCH_2), 3.54-3.52 (m, 8H, OCH_2), 3.41-3.39 (m, 8H, OCH_2), 3.14-3.12 (m, 8H, OCH_2), 2.52 (s, 12H, $4CH_3$), 2.33-2.27 (q, $^3J_{HH}$ = 7.33Hz, 8H, $4CH_2$), 1.43 (s, 12H, $4CH_3$), 1.00-0.96 (t, $^3J_{HH}$ = 7.32 Hz, 12H, $4CH_3$).

Calix-Aza-Bodipy-Sulf

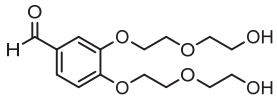


In a round bottom flask under argon, 78 mg of Calix-Aza-Bodipy-SO_2Cl were dissolved in 1 mL of pyridine. 0.2 mL of water were then added and the mixture was stirred at room temperature for two hours. After two hours the pyridine was removed under reduced pressure, 1 mL of water was added and the mixture was carefully neutralized by addition of a 10% $NaHCO_3$ solution. The product was then precipitated by addition of isopropanol.

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.63 (s, 8H,$CH_{ar\text{-}calix}$), 7.19 (m, 4H, CH_{ar}), 6.93 (m, 4H, CH_{ar}), 4.05 (s, 8H, $CH_{2\text{-}calix}$), 3.64-3.52 (m, 32H, OCH_2), 2.46 (s, 12H, $4CH_3$), 2.37 (M, 8H, $4CH_2$), 1.36 (s, 12H, $4CH_3$), 1.01-0.97 (t, $^3J_{HH}$ = 7.56 Hz, 12H, $4CH_3$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M\text{-}3Na+2H\text{-}B_2F_4]^-$ = 1739.6030 ; Calc. for $C_{90}H_{100}B_2F_4N_6O_8$ $[M\text{-}3Na+2H\text{-}B_2F_4]^-$ = 1739.6086./ found: $[M\text{-}3Na+2H\text{-}BF_2]^-$ = 1787.6021 ; Calc. $C_{90}H_{100}B_2F_4N_6O_8$ $[M\text{-}3Na+2H\text{-}BF_2]^-$ = 1787.6069./ found: $[M\text{-}3Na+2H]^-$ = 1834.6113 ; Calc. for $C_{90}H_{100}B_2F_4N_6O_8$ $[M\text{-}3Na+2H]^-$ = 1835.6052.

3,4-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)benzaldehyde : compound 109



109

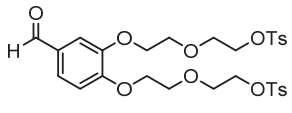
In a round-bottom flask under argon were introduced 4 g (29 mmol) of 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 13.7 g (115.9 mmol) of potassium carbonate and 200mL of dry acetonitrile. This mixture was stirred for half an hour at room temperature, before adding 18.8 g (72.4 mmol) of monotosylated ethylene glycol in 50mL of dry acetonitrile. The reaction mixture was then refluxed until complete consumption of the starting material checked by TLC analysis. The solvent was then removed under reduced pressure; the mixture was washed with a 1M HCl solution, water and extracted with CH_2Cl_2. The organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/EtOH 94:6) to afford 7.47g (87%) of a light yellow oil.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 9.83 (s, 1H, CHO), 7.44 (dd, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.41 (d, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz, 1H, CH_{ar}) 6.96 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 1H, CH_{ar}), 4.24- 4.20 (m, 4H, OCH_2), 3.95- 3.91 (m, 4H, OCH_2), 3.75- 3.73 (m, 4H, OCH_2), 3.69-3.67 (m, 4H, OCH_2).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 190.92 (CHO), 153.86 (C_q), 148.74 (C_q), 130.37 (C_q), 127.09 (CH_{ar}), 111.76 (CH_{ar}), 110.61 (CH_{ar}), 72.98 (OCH_2), 72.92 (OCH_2), 69.08 (OCH_2), 68.96 (OCH_2), 68.58 (OCH_2), 68.45 (OCH_2), 61.71 ($2OCH_2$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+H]^+$ = 315.1433 ; Calc. for $C_{15}H_{22}O_7$ $[M+H]^+$ = 315.1444

3,4-bis(2-(2-tosylethyoxy)ethoxy)benzaldehyde : compound 113



113

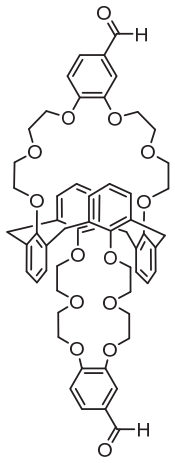
In a round-bottom flask under argon, 6.2 g (19.6 mmol) of 3,4-bis (2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)benzaldehyde were dissolved in 250 mL dry CH_2Cl_2. 26.5 mL (196.1 mmol) of Et_3N were added and the solution was stirred for one hour at room temperature. 18.7g (98.1 mmol) of tosyl chloride were then added and the reaction was stirred overnight at room temperature. Thereafter, the mixture was treated with a 1M HCl solution, water and extracted with CH_2Cl_2. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$. The solvent was then removed and the crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc 8:2) to afford 7.99g (68%) of a white solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9.78 (s, 1H), 7.71 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 4H, $CH_{ar\text{-}tosyl}$), 7.39 (dd, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz 1H, CH_{ar}), 7.31 (d $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.22 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 4H, $CH_{ar\text{-}tosyl}$), 6.90 (d, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, 1H, CH_{ar}), 4.12-4.09 (m, 6H, OCH_2), 4.05-4.03 (m, 2H, OCH_2), 3.79-3.77 (m, 2H, OCH_2), 3.76-3.73 (m, 2H, OCH_2), 3.73-3.69 (m, 4H, OCH_2), 2.40 (s, 6H, $CH_{3\text{-}tosyl}$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 190.98 (CHO), 154.31 (C_q), 149.17 (C_q), 144.96 ($C_{q\text{-}tosyl}$), 133.05 ($C_{q\text{-}tosyl}$), 130.49 (C_q), 129.93 ($CH_{\text{-}tosyl}$), 128.08 ($CH\text{-}_{tosyl}$), 127.01 (CH_{ar}), 112.58 (CH_{ar}), 111.68 (CH_{ar}) , 69.73 (OCH_2), 69.65 (OCH_2), 69.48 ($2OCH_2$), 69.20 (OCH_2), 68.10 (OCH_2), 69.79 ($2OCH_2$), 21.78 ($CH_{3\text{-}tosyl}$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+H]^+$ = 623.1616 ; Calc. for $C_{29}H_{34}O_{11}S_2$ $[M+H]^+$ = 623.1621

Calix[4]arene-bis-[(3,4-phenylenecarbaldehyde)-crown-6] : Calix-Aldehyde



Calix-aldehyde

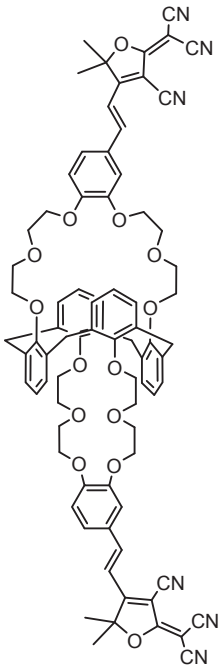
In a round-bottom flask under argon, 3.1 g (7.3 mmol) of calix[4]arene and 16.0 g (116.1 mmol) of potassium carbonate in dry acetonitrile (400 mL) were stirred for one hour at room temperature. 9.0 g (14.5 mmol) of compound 113 in dry acetonitrile (100mL) were then added and the reaction mixture was refluxed for 6 days. The solvent was then removed under reduced pressure, the mixture treated with a 1M HCl solution, water, and extracted with CH_2Cl_2. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on a silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc 6:4) to afford 4.0g (76%) of a white solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 9.88 (s, 2H, CHO), 7.51 (dd, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.49 (d, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.07-7.04 (m, 10H, $CH_{ar\text{-}calix}$ + CH_{ar}), 6.64 (t, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, 4H), 4.23-4.17 (m, 8H, OCH_2), 3.81-3.75 (m, 16H, $CH_{2\text{-}calix}$ + OCH2), 3.62-3.56 (m, 16H, OCH_2).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 190.97 (CHO), 156.58 (C_q), 154.47 (C_q), 149.42 (C_q), 134.18, 134.12 (C_q), 130.63 (C_q), 130.25 (CH_{ar}), 127.07 (CH_{ar}), 122.41 (CH_{ar}), 112.83 (CH_{ar}), 112.21 (CH_{ar}), 70.60 ($2OCH_2$), 70.39 (OCH_2), 70.27 (OCH_2), 69.97 (OCH_2), 69.92 (OCH_2), 69.69 (OCH_2), 69.58 (OCH_2), 37.77 ($CH_{2\text{-}calix}$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+Na]^+$ = 1003.3992 ; Calc. for $C_{58}H_{60}O_{14}$ $[M+Na]^+$ = 1003.3881

Calix-TCF



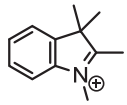
In a round-bottom flask under argon, 200 mg (0.2 mmol) of Calix-aldehyde and 160 mg (0.8 mmol) of TCF were stirred in 5 mL of EtOH. 10 µL (0.06 mmol) of piperidine were then added and the mixture was refluxed for 6 hours until complete consumption of the starting aldehyde was observed by TLC. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was directly purified by chromatography on a silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc 6:4) to afford after precipitation 126 mg (47%) of an orange solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.63 (d, $^3J_{HH}$ = 16 Hz, 2H), 7.32 (dd, $^4J_{HH}$ = 1.3 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 2H, CH_{ar}) 7,25 (d, $^4J_{HH}$ = 1.3 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.07 (m, 8H, $CH_{ar\text{-}calix}$), 7.01 (d, $^3J_{HH}$ = 8.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.89 (d, $^3J_{HH}$ = 16 Hz, 2H), 6.67 (t, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 4H, $CH_{ar\text{-}calix}$), 4.23-4.16 (m, 8H, OCH_2), 3.83-3.81 (m, 4H, OCH_2), 3.76 (s, 8H, CH_2), 3.71-3.69 (m, 4H, OCH_2), 3.63-3.55 (m, 16H, OCH_2), 1.79 (s, 12H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 175.63 (CH_q), 174.15 (CH_q), 156.55 (CH_q), 156.46 (CH_q), 154.06 (CH_q), 149.47 (CH_q), 147.54 (CH_{ar}), 134.15 (CH_q), 130.39 (CH_{ar}), 127.52 (CH_{ar}), 126.10 (CH_{ar}), 122.44 (CH_{ar}), 114.29 (CH_{ar}), 113.71 (CH_{ar}), 112.88 (CH_{ar}), 110.67 (CH_q), 98.46 (CH_q), 97.65 (CH_q), 70.66 (OCH_2), 70.60 (OCH_2), 70.39 (2 OCH_2),70.06 (2 OCH_2), 69.93 (OCH_2), 69.76 (OCH_2), 37.83 (CH_2), 26.63 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+H]^+$ = 1343.5359 ; Calc. for $C_{80}H_{74}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$ = 1343.5342

1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium iodide

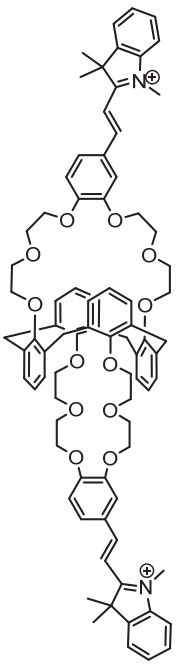


In a round-bottom under argon, 500 mg (3.1 mmol) of 2,3,3-triméthylindoléine were dissolved in 10 mL of dry toluene. 250 µL (4.1 mmol) of methyl iodide were then added and the mixture was heated at 80°C until complete conversion of the starting material was observed by TLC. The product was isolated by filtration and recrystallized in hexane giving 680 mg (72%) of white cristals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.91-7,88 (m, 1H, CH_{ar}), 7.82-7.80 (m, 1H, CH_{ar}), 7.62-7.59 (m ,2H, $2CH_{ar}$), 3.95 (s, 3H), 2.75 (s, 3H, CH_3), 1.51 (s, 6H, $2CH_3$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 196.48 (CH_q), 142.61 (CH_q), 142.06 (CH_q), 129.85 (CH_{ar}), 129.35 (CH_{ar}), 123.83 (CH_{ar}), 115.66 (CH_{ar}), 54.45 (CH_q), 35.27 (CH_3), 22.22 ($2CH_3$), 14.61 (CH_3).

Calix-Ind



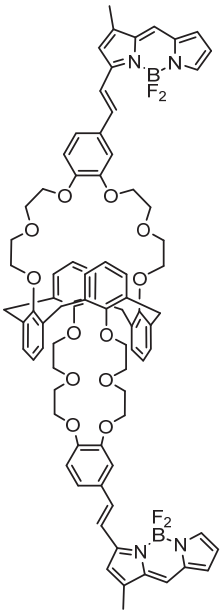
In a round-bottom flask under argon, 200 mg (0.2 mmol) of calix-aldehyde and 245 mg (0.8 mmol) of 1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indolium iodide were stirred in 5 mL EtOH. 10 µL (0.06 mmol) of piperidine were then added and the mixture was refluxed for 5 hours until complete consumption of the starting aldehyde was observed by TLC. The EtOH was removed under reduced pressure and the crude product was directly purified by chromatography on a silica gel (CH_2Cl_2/EtOAc 6:4) to afford after precipitation 126 mg (53%) of a red solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 8.24 (d, $^{3}J_{HH}$ = 16.2 Hz, 2H), 7.86-7.80 (m, 4H, $4CH_{ar}$), 7.67 (d, $^{3}J_{HH}$ = 16.2 Hz, 2H), 7.53-7.49 (m, 8H, $8CH_{ar}$), 7.05-6.98 (m, 10H, $2CH_{ar}$ + $8CH_{ar\text{-}calix}$), 6.64-6.58 (m, 4H, $CH_{ar\text{-}calix}$), 4.44 (m, 4H, OCH_2), 4.40 (s, 6H, $2CH_3$), 4.19-4.15 (m, 4H, OCH_2), 3.77-3.67 (m, 16H, OCH_2 + OCH_2), 3.52-3.50 (m, 8H, OCH_2), 3.45 (s, 8H), 1.82 (s, 12H, $4CH_3$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 182.01 (C_q), 156.44 (C_q), 156.39 (C_q), 155.30 (CH_{ar}), 155,11 (C_q), 149.65 (C_q), 142.89 (C_q), 141.49 (C_q), 134.13 (C_q), 134.06 (C_q), 130.37 (CH_{ar}), 130.15 (CH_{ar}), 129.62 (CH_{ar}), 128.83 (CH_{ar}), 127.76 (C_q), 122.71 (CH_{ar}), 122.50 (CH_{ar}), 115.33 (CH_{ar}), 144.50 (CH_{ar}), 113.64 (CH_{ar}), 110.56 (CH_{ar}), 71.34 (OCH_2), 70.54 (OCH_2), 70.17 ($2OCH_2$), 69.91 ($2OCH_2$), 69.77 (OCH_2), 69.63 (OCH_2), 52.37 (C_q), 37.79 (CH_2), 37.01 (CH_3), 27.18 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found $[MH]^{2+}$: 646.3149; Calc. for $C_{82}H_{88}N_2O_{12}2+$ $[MH]^{2+}$: 646.3163.

Calix-Bodipy-S



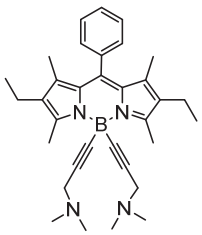
In a round-bottom flask under argon, 200 mg (0.2 mmol) of Calix-aldehyde and 175 mg (0.8 mmol) of 1,3-dimethylbodipy were stirred in 5 mL EtOH. 10 µL (0.06 mmol) of piperidine were then added and the mixture was refluxed for 20 h, until complete consumption of the starting aldehyde was observed by TLC. The EtOH was removed under reduced pressure and the crude product was directly purified by chromatography on a silica gel with the following eluent (CH_2Cl_2/EtOAc 6:4) to afford after precipitation 35 mg (12%) of purple cristals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.66 (s, 2H, CH_{ar}), 7.55-7.50 (d, $^{3}J_{HH}$ = 16.2 Hz, 2H), 7.38-7.33 (d, $^{3}J_{HH}$ = 17.4 Hz, 2H), 7.15 (s, 2H, CH_{ar}), 7.10-7.06 (m, 12H, $4CH_{ar}$ + $8CH_{ar\text{-}calix}$),), 6.98-6.96 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.91, (d, $^{4}J_{HH}$ = 3.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.76 (s, 2H, CH_{ar}), 6.71-6.67 (t, $^{3}J_{HH}$ = 7.56 Hz 4H, $CH_{ar\text{-}calix}$),6.45 (s, 2H, CH_{ar}), 4.18 (m, 8H, OCH_2), 3.77 (m, 16H, OCH_2 + CH_2), 3.71-3.69 (m, 4H, OCH_2), 3.63-3.61 (m, 4H, OCH_2), 3.58-3.53 (m, 8H, OCH_2), 2.33 (s, 6H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 159.30 (C_q), 156.47 (C_q) 151.34 (C_q), 149.21 (C_q), 144.61 (C_q), 140.19 (CH_{ar}), 138.46 (CH), 138.06 (C_q), 134.20 (C_q), 133.07 (C_q), 130.30 (CH_{ar}), 129.80 (C_q), 125.53 (CH_{ar}), 123.50 (CH_{ar}), 122.61 (CH_{ar}), 122.54 (CH_{ar}), 117.31 (CH_{ar}), 116.95 (CH_{ar}), 116.29 (CH_{ar}), 114.33 (CH_{ar}), 113.99 (CH_{ar}), 70.42 (OCH_2), 70.30 (OCH_2), 70.29 (OCH_2), 70.18 ($2OCH_2$), 70.09 ($2OCH_2$), 69.75 (OCH_2), 37.88 (CH_2), 11.60 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found $[M+Na]^+$: 1407.5840; Calc. for $C_{80}H_{78}B_2F_4N_4O_{12}$ $[M+Na]^+$: 1407.5636.

Compound 123



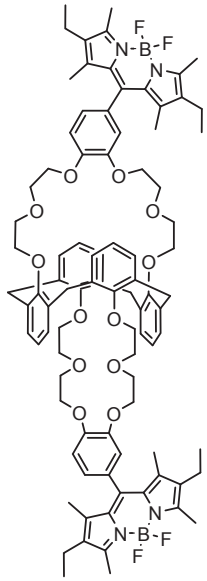
123

In a schlenk flask under argon 600 µL (5.26 mmol) of 3-dimethylaminopyridine and 10 mL of dry THF were introduced. The reaction mixture was cooled at -78°C, and 4.1 mL (6.56 mmol) of Butyl lithium (1.6 M in hexane) were added, the reaction mixture was further stirred at -78°C for 45 min. The resulting anion was then transferred via cannula to a solution of bodipy (250 mg, 0.66 mmol) in 10 mL of dry THF. The reaction mixture was further stirred for 30 min at room temperature and diluted with CH_2Cl_2. Organic layers were washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/MeOH 9/1) to afford 215 mg (64%) of an orange solid.

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.42 (m, 3H, CH_{ar}), 7.31 (m, 2H, CH_{ar}), 3.10 (m, 4H, $2CH_2$), 2.70 (m, 6H, $2CH_3$), (m, 16H, $4CH_3$ + $2CH_2$), 1.20 (m, 6H, $2CH_3$), (m, 6H, $2CH_3$).

HMRS (TOF MS ES+): found $[MH]^+$: 507.3655; Calc. for $C_{33}H_{43}BN_4$ $[MH]^+$: 507.3659.

Calix-Bodipy



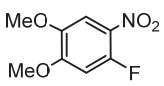
In a round-bottom flask under argon were introduced 0.5 g (0.5 mmol) of Calix-adehyde, 275 µL (2 mmol) of 3-ethyl-2,4-dimethylpyrole (kryptopyrole) and 15 mL of CH_2Cl_2. Once all reactants were dissolved a catalytic amount of TFA (a few drops) was added, and the reaction was stirred at room temperature until complete consumption of the aldehyde (TLC analysis).After 40 min 125 mg (0.5 mmol) of chloranil were added, 5 min later 620 µL (3.6 mmol) of DIPEA were added. After 30 more min 690 µL (5.6 mmol) of BF_3, OEt_2 were added, the reaction was then stirred for 2 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of water. The product was extracted with CH_2Cl_2 washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was first purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2-CH_2Cl_2/EtOAc 2/8) and then precipitated with diethyl ether, to afford 280 mg (35%) of a purple solid.

NMR ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.21 (m, 2H, CH_{ar}), 7.05-6.99 (m, 10H, $2CH_{ar}$ + $8CH_{calix}$), 6.83 (m, 4H, $2CH_{ar}$), 6.67-6.62 (m, 4H, CH_{calix}), 4.05-4.03 (4H, m, OCH_2), 4.16-4.13 (4H, m, OCH_2), 3.76-3.70 (16H, m, OCH_2 + $CH_{2\ calix}$), 3.57-3.49 (16H, m, OCH_2), 2.47 (s, 12H, $4CH_3$), 2.22-2.27 (q, $^3J_{HH}$ = 7.76 Hz, 8H, $4CH_2$), 1.35 (s, 12H, $4CH_3$), 0.94-0.90 (t, $^3J_{HH}$ = 8 Hz, 12H, $4CH_3$).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 156.51 (C_q), 153.83 (C_q) 149.96 (C_q), 149.34 (C_q), 144.95 (C_q), 138.34 (C_q), 134.17 (C_q), 138.06 (C_q), 132.80 (C_q), 131.13 (C_q), 130.28 (CH_{ar}), 128.93 (C_q), 122.45 (CH_{ar}), 121.66 (CH_{ar}), 114.70 (CH_{ar}), 114.60 (CH_{ar}), 70.39 ($2OCH_2$), 70.29 ($2OCH_2$), 70.17 (OCH_2), 70.05 (OCH_2), 69.91 (OCH_2), 69.71 (OCH_2), 37.89 (CH_2),17.13 (CH_2), 14.72 (CH_3), 12.62 (CH_3), 11.70 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found M^+: 1528.7638; Calc. for $C_{90}H_{102}B_2F_4N_4O_{12}$ M^+: 1528.7616.

4-Fluoro-3-nitroveratrole : compound 160



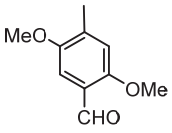
160

In a round-bottom flask under argon 0.5 g (3.2 mmol) of 4-Fluoroveratrole were dissolved in 5 mL of CH_2Cl_2. The mixture was cooled to 0°C using an ice bath, 0.4 mL (9.6 mmol) of red fuming nitric acid in 1mL of acetic acid were then dropwise added. The mixture was stirred 15 min at room temperature before quenching the reaction with a saturated $NaHCO_3$ solution. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2, organic layers were combined washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure, giving 603 mg (97%) of yellow crystals requiring no further purification.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):7.59-7.58 (d, $^3J_{HF}$ = 7.32 Hz, H_m), 6.75-6.72 (d, $^3J_{HF}$ = 12.36 Hz, H_o), 3.97 (s, 3H, OCH_3)

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm):155.27-155.16 (d C_q); 153.45 (C_q); 150.80 (C_q); 145.14 (C_q); 107.35 (CH_{ar}), 101.07-100.89 (d CH_{ar}); 56.95 (OCH_3); 56.71 (OCH_3)

2,5-dimethoxy-4-methylbenzaldehyde : compound 164



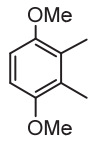
164

In a round-bottom flask under argon, 0.5 g (3.3 mmol) of 2,3-dimethoxytoluene were dissolved in 5 mL of TFA. 0.485 g (3.4 mmol) of hexamethylenetetramine was then added and the mixture was refluxed for one hour. The reaction was quenched and neutralized with a saturated $NaHCO_3$ solution, the product was extracted with CH_2Cl_2, organic layers were washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure, giving a yellow oil. The crude product was purified by chromatography on silica gel (PE/CH_2Cl_2 5/5 - CH_2Cl_2,) giving 250 mg (42%) of white crystals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.38 (s, 1H, CHO), 7.24 (s, 1H, H_{ar}), 6.80 (s, 1H, H_{ar}), 3.87 (s, 3H, CH_3), 3.81 (s, 3H, CH_3), 2.27 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm): 189.41 (CHO), 156.67 (C_q), 151.94 (C_q), 136.74 (C_q), 122.93 ((C_q), 114.77 (CH_{ar}), 107.72 (CH_{ar}), 56.24 (OCH_3), 55.85 (O CH_3), 17.38 (CH_3)

1,4-dimethoxy-2,3-dimethylbenzene : compound 167

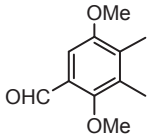


167

In a round-bottom flask under argon, 1g (7.2 mmol) of 2,3-dimethylhydroquinone were dissolved in 25 mL of DMF. 0.64g (15.9 mmol) of NaH was then added by portion, followed by dropwise addition of 1.5 mL (29.0 mmol) of methyl iodide. The reaction was stirred at 40°C for 3 hours. The reaction was quenched with water, the product extracted with diethyl ether, washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was then purified on column (PE/CH_2Cl_2 5/5 - CH_2Cl_2,) giving 1.12 g (94%) of white cristals

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 6.66 (s, 2H, H_{ar}); 3.79 (s, 6H, OCH_3); 2.16 (s,6H, CH_3)

2,5-dimethoxy-3,4-dimethylbenzaldehyde : compound 168



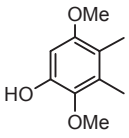
168

In a round-bottom flask under argon, 1.38 g (8.3 mmol) of 1,4-dimethoxy-2,3-dimethylbenzene were dissolved in 15 mL of TFA. 1.22 g (8.7 mmol) of hexamethylenetetramine was then added and the mixture was refluxed for one hour. The reaction was quenched and neutralized with a saturated $NaHCO_3$ solution, the product was extracted with CH_2Cl_2, organic layers were washed with water, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure, giving a yellow oil. The crude product was purified by chromatography on silica gel (PE/CH_2Cl_2 5/5 - CH_2Cl_2,) giving 616 mg (44%) of colorless oil.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.34 (s, 1H, CHO); 7.14 (s, 1H, H_{ar}); 3.84 (s, 3H, OCH_3); 3.81 (s, 3H, OCH_3); 2.24 (s, 3H, CH_3); 2.21 (s,3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 190.24 (CHO), 156.58 (C_q), 151.94 (C_q), 154.43 (C_q), 135.45 (C_q), 131.87 (C_q), 126.68 (C_q), 105.02 (CH_{ar}), 63.84 (OCH_3), 55.79 (OCH_3), 13.08 (CH_3), 12.29 (CH_3)

2,5-dimethoxy-3,4-dimethylphenol : compound 169



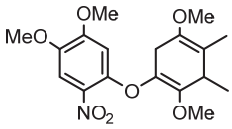
169

In a round bottom-flask 1.56 g (3.15 mmol) of MMPP were stirred in 7 mL of MeOH at 0°C. 0.51 g (2.63 mmol) of 2,5-dimethoxy-3,4-dimethylbenzaldehyde in 3 mL of CH_2Cl_2 were then added dropwise, the reaction mixture was further stirred at room temperature. After 6 hours 4.2 mL (4.2 mmol) of a 1M NaOH solution was added to the mixture. After one hour at room temperature, the solvent was partially removed; the residue was dissolved in water and acidified with a 1 M HCl solution. The product was then extracted with CH_2Cl_2 washed with water, dried and concentrated under vacuum. The crude was purified by chromatography on silica gel (PE/acetone 95/5 – PE/acetone 80/20) yielding 260 mg (55%) of a colorless oil.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.40 (s, 1H, CH_{ar}), 5.48 (s, 1H,OH), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.19 (s, 3H, CH_3), 2.05 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) : 154.16 (C_q), 146.74 (C_q), 138.68 (C_q), 130.29 (C_q), 117.09 (C_q), 96.42 (CH_{ar}), 61.16 (OCH_3), 55.79 (OCH_3), 12.82 (CH_3), 11.39 (CH_3).

1-((2,5-dimethoxy-3,4-dimethylcyclohexa-1,4-dien-1-yl)oxy)-4,5-dimethoxy-2-nitrobenzene: compound 170



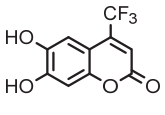
170

In a round-bottom flask under argon, 300 mg (1.7 mmol) of 2,5-dimethoxy-3,4-dimethylphenol were dissolved in 5 mL of dry DMF. 75 mg (1.8 mmol) of NaH were added portionwise and the reaction mixture was stirred 20 min at room temperature. 340 mg (1.7 mmol) of 4-Fluoro-3-nitroveratrole dissolved in 3 mL of DMF were then added dropwise. After two hours the reaction was quenched by adding water, the product was extracted with diethyl ether, dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (PE-CH_2Cl_2), yielding 515 mg (83%) of an orange solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.62 (s, 1H, CH_{ar}), 6.43 (s, 1H, CH_{ar}), 6.33 (s, 1H, CH_{ar}), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 3.71 (s, 3H, OCH_3) 2.21 (s, 3H, CH_3), 2.14 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) : 154.69 (C_q), 153.98 (C_q), 148.13 (C_q), 145.41 (C_q), 143.87 (C_q), 143.12 (C_q), 132.76 (C_q), 131.45 (C_q), 122.96 (C_q), 108.06 (CH_{ar}), 101.44 (CH_{ar}), 101.36 (CH_{ar}), 61.16 (OCH_3), 5.61 (OCH_3), 56.55 (OCH_3), 56.04 (OCH_3), 11.96 (OCH_3), 12.66 (OCH_3).

6,7-dihydroxy-4-(trifluoromethyl)-2*H*-chromen-2-one : compound 185



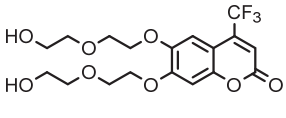
185

In a round-bottom flask in an ice bath, 1g (3.96 mmol) of 1,2,4-triacetoxybenzene and 580 µL (3.96 mmol) of ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate were dissolved in 30 mL of 75% H_2SO_4, the mixture was further stirred overnight. The reaction was then diluted with water and neutralized. The product was extracted with EtOAc and purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 – CH_2Cl_2/MeOH 9/1) yielding 300 mg (24%) of yellow cristals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.07-7.06 (d, $^3J_{HF}$ = 1.84 Hz, 1H, CH_{ar}), 6.82 (s, 1H, CH_{ar}), 6.61 (s, 1H, CH_{ar}).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$):161.85 (C=O), 153.14 (C_q), 151.30 (C_q), 145.00 (C_q), 121.86 (C_q), 120.63 (C_q), 112.49 - 112.31 (CF_3), 107.47 (CH_{ar}), 106.24 (CH_{ar}), 101.43 (CH_{ar}).

6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-(trifluoromethyl)-2H-chromen-2-one : COU-CF3



COU-CF_3

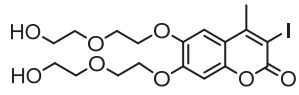
In a round-bottom flask under argon were introduced 300 mg (0.12 mmol) of 6,7-dihydroxy-4-trifluoromethylcoumain, 590 mg (5 mmol) of potassium carbonate and 10mL of dry acetonitrile. This mixture was stirred for half an hour at room temperature, before adding 805 mg (3.1 mmol) of monotosylated ethylene glycol in 5 mL of dry acetonitrile. The reaction mixture was then refluxed until complete consumption of the starting material was observed by TLC. The solvent was then removed under reduced pressure; the mixture was washed with a 1M HCl solution, water and extracted with CH_2Cl_2. The organic layers were dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to

dryness. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 - CH_2Cl_2/MeOH 95/5) yielding 310 mg (61%) of yellow crystals.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) : 7.01-7.00 (d, $^3J_{HF}$ = 1.84 Hz, 1H, CH_{ar}), 6.83 (s, 1H, CH_{ar}), 6.58 (s, 1H, CH_{ar}), 4.20-4.17 (m, 2H, OCH_2), 4.15-4.13 (m, 2H, OCH_2), 3.92-3.87 (m, 4H, OCH_2), 3.72-3.70 (m, 4H, OCH_2), 3.65-3.64 (m, 4H, OCH_2), 3.52 (s, 2H, OH).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$):159.50 (C=O), 153.30 (C_q), 150.78 (C_q), 145.89 (C_q), 123.05 (C_q), 120.24 (C_q), 112.74 – 112.64 (CF_3), 107.47 (CH_{ar}), 106.24 (CH_{ar}), 101.43 (CH_{ar}), 72.87 ($2OCH_3$), 69.19 (OCH_3), 69.04 (OCH_3), 68.89 (OCH_3), 68.69 (OCH_3), 61.57 ($2OCH_3$).

6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-3-iodo-4-methyl-2H-chromen-2-one : COU-I



COU-I

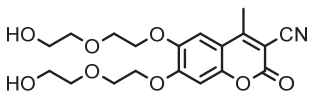
In a round-bottom flask under argon, 1.57 g (4.3 mmol) of 6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one were dissolved in 40 mL of dry acetonitrile. 1.44 g (6.4 mmol) of N-iodosuccinimide (NIS) and 100 µL (1.3 mmol) TFA were then added. The reaction mixture was refluxed for three hours until complete consumption of the starting material was observed by TLC (CH_2Cl_2/MeOH 94/6). The reaction was quenched by addition of water; and the excess of NIS was neutralized using a sodium thiosulfate solution. The acetonitrile was then removed under reduced pressure and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on a silica gel (CH_2Cl_2/MeOH 94/6) yielding 1.66 g (83%) of a light yellow solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.07 (s, 1H, CH_{ar}), 6.84 (s, 1H, CH_{ar}), 4.22-4.20 (m, 4H, OCH_2), 3.96-3.94 (m, 4H, OCH_2), 3.77-3.75 (m, 4H, OCH_2), 3.71-3.69 (m, 4H, OCH_2), 2.66 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 158.27 (C=O), 156.20 (C_q), 152.73 (C_q), 148.78 (C_q), 145.73 (C_q), 112.42 (C_q), 108.52 (CH_{ar}), 100.83 (CH_{ar}), 89.60 (C_q), 73.00 (OCH_2), 72.95 (OCH_2), 69.56 (OCH_2), 69.28 (OCH_2), 68.78 (2 OCH_2), 61.71 (2 OCH_2), 25.78 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[MH]^+$ = 495.0535; Calc. for $C_{18}H_{23}IO_8$: $[MH]^+$ = 495.0516

6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2-oxo-2H-chromene-3-carbonitrile : COU-CN

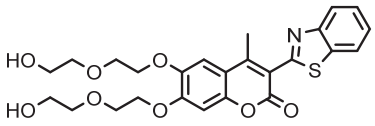


COU-CN

In a round-bottom-flask under argon were introduced 125 mg (0.25 mmol) of COU-I, 29.5 mg (0.33 mmol) of CuI and 0.8 mL of NMP. The mixture was heated up to 190°C and stirred one hour at this temperature. After one hour the reaction mixture was cool down, the mixture was filtered to remove the copper and the NMP was removed under reduced pressure. The crude product was then purified by chromatography on silica gel, to affort 51 mg (52%) of a yellow powder.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.04 (s, 1H, CH_{ar}), 6.85 (s, 1H, CH_{ar}), 4.27-4.21 (m, 4H, OCH_2), 4.40-3.95 (m, 4H, OCH_2), 3.79-3.76 (m, 4H, OCH_2), 3.72-3.69 (m, 4H, OCH_2), 2.72 (s, 3H, CH_3).

3-(benzo[d]thiazol-2-yl)-6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one : COU-Benz



COU-Benz

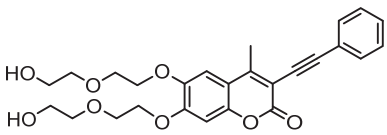
In a schlenck under argon 200 mg (0.45 mmol) of COU-I, 100 µL (0.9 mmol) of benzothiazole, 26 mg (0.13 mmol) of CuI; and 290 mg (0.9 mmol) of Cs_2C0_3, were combined in 6 mL of dioxane. After homogenization 52 mg (0.45 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 110°C. After 20 hours the reaction was stopped by addition of CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by preparative chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) giving 40 mg (18%) of the expected product.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 8.11-8.09 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, $^4J_{HH}$ = 0.92 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.95-7.97 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, $^4J_{HH}$ = 0.92 Hz, 1H, CH_{ar}), 8.11-8.09 (td, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, $^4J_{HH}$ = 0.92 Hz, 1H, CH_{ar}), 8.11-8.09 (td, $^3J_{HH}$ = 7.8 Hz, $^4J_{HH}$ = 0.92 Hz, 1H, CH_{ar}), 7.19 (s, 1H, CH_{ar}), 6.89 (s, 1H, CH_{ar}), 4,26-4,24 (m, 4H, OCH_2), 3,99-3,97 (m, 4H, OCH_2), 3,78-3,77 (m, 4H, OCH_2), 3,72-3,71 (m, 4H, OCH_2), 2,79 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 161.77 (C=O), 160.45 (C_q), 153.43 (C_q), 153.28 (C_q), 152.37 (C_q), 149.12 (C_q), 145.87 (C_q), 136.27 (C_q), 126.09 (CH_{ar}), 108,52 (CH_{ar}), 125.57 (CH_{ar}), 123.33 (CH_{ar}), 121.54 (CH_{ar}), 116.80 (C_q), 113.34 (C_q), 108.68 (CH_{ar}), 100.84 (CH_{ar}), 72.98 (OCH_2), 72,93 (OCH_2), 69,40 (OCH_2), 69,24 (OCH_2), 68,84 (OCH_2), 68.76 ($2OCH_2$), 61,72 (2 OCH_2), 17.43 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[MH]^+$ = 502.1548; Calc. for $C_{25}H_{27}NO_8S$: $[MH]^+$ = 502.1555

6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-3-(phenylethynyl)-2H-chromen-2-one : COU-Alcyne



COU-Alcyne

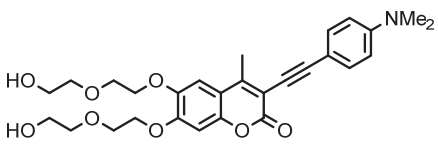
In a schlenck under argon 310 mg (0.63 mmol) of COU-I, 140 µL (1.25 mmol) of phenylacetylene, 60 mg (0.5 mmol) of CuI; and 870 µL (6.27 mmol) of Et_3N, were combined in 6 mL of dioxane. After homogenization 73 mg (0.06 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 110°C. After 3 hours the reaction was stopped by addition of CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) yielding 240 mg (81%) of the expected product.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 7.55-7.53 (m, 2H, CH_{ar}), 7.33-7.32 (m, 3H, CH_{ar}), 6.98 (s, 1H, CH_{ar}), 6.76 (s, 1H, CH_{ar}), 4.20-4.17 (m, 4H, OCH_2), 3.93-3.92 (m, 4H, OCH_2), 3.76-3.74 (m, 4H, OCH_2), 3.69-3.67 (m, 4H, OCH_2), 2.61 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 159.90 (C=O), 153.75 (C_q), 152.52 (C_q), 148.46 (C_q), 145.69 (C_q), 131.81 (CH_{ar}), 128.89 (CH_{ar}), 128.46 (CH_{ar}), 122.82 (C_q), 112.78 (C_q), 108.62 (C_q), 108.52 (CH_{ar}), 101.12 (CH_{ar}), 98.80 (C_q), 83.25 (C_q), 72.85 (OCH_2), 72.81 (OCH_2), 69.39 (OCH_2), 69.19 (OCH_2), 68.82 (OCH_2), 68.75 (OCH_2), 61.60 (2 OCH_2), 17.71 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M-H+HCOOH]^-$ = 513.1786; Calc. for $C_{26}H_{28}O_8$: $[M-H+HCOOH]^-$ = 513.1850

3-((4-(dimethylamino)phenyl)ethynyl)-6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one : COU-Aniline



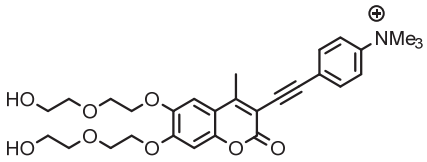
COU-Aniline

In a schlenck under argon 500 mg (0.63 mmol) of COU-I, 295 mg (2.00 mmol) of 4-Ethynyl-N,N-dimethylaniline, 96 mg (0.5 mmol) of CuI; and 1.4 mL (10 mmol) of Et_3N, were combined in 8 mL of dioxane. After homogenization 117 mg (0.1 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 110°C. After 2 hours the reaction was stopped by addition of CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) yielding 505 mg (98%) of the expected product

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.44-7.42 (d, $^3J_{HH}$ = 9.6 Hz, 2H, CH_{ar}), 6.97 (s, 1H, CH_{ar}), 6.77 (s, 1H, CH_{ar}), 6.64-6.61 (d, $^3J_{HH}$ = 9.64 Hz, 2H, CH_{ar}), 4,21-4,19 (m, 4H, OCH_2), 3,94-3,92 (m, 4H, OCH_2), 3,76-3,75 (m, 4H, OCH_2), 3,70-3,69 (m, 4H, OCH_2), 2,98 (s, 6H, $2CH_3$) 2.60 (s, 3H, CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M+H+NH_4]^+$ = 530.2387; Calc. for $C_{28}H_{33}NO_8$: $[M+H+NH_4]^+$ = 530.2669

4-((6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethynyl)-N,N,N-trimethylbenzenaminium : COU-Anilinium

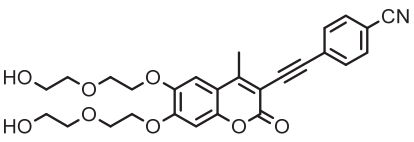


COU-Anilinium

In a round-bottom flask under argon 250 mg (0.5 mmol) of COU-Aniline were dissolved in 10 mL of CH_2CL_2, 90µL (1.5 mmol) of methyl iodide were then added the mixture was further stirred at room temperature for 4 days. After four days the product was collected by filtration.

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.96-7.94 (d, $^3J_{HH}$ = 9.6 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.81-7.79 (d, $^3J_{HH}$ = 9.6 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.30 (s, 1H, CH_{ar}), 7.05 (s, 1H, CH_{ar}), 4.29-4.24 (m, 4H, OCH_2), 3.92-3.87 (m, 4H, OCH_2), 3.70 (s, 9H, $3CH_3$), 3.67-3.64 (m, 8H, $2OCH_2$), 2.73 (s, 3H, CH_3).

4-((6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethynyl)benzonitrile: COU-Benz-CN



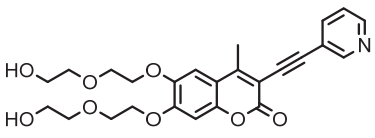
COU-Benz-CN

In a schlenck under argon 300 mg (0.6 mmol) of COU-I, 160 mg (1.21 mmol) of 4-Ethynylbenzonitrile, 60 mg (0.3 mmol) of CuI; and 850 µL (6.0 mmol) of Et_3N, were combined in 6 mL of dioxane. After homogenization 70 mg (0.06 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 110°C. After 24 hours the reaction was stopped by addition of CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by preparative chromatography (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) yielding 490 mg (31%) of the expected product

NMR ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) = 7.65-7.64 (m, 4H, CH_{ar}), 7.03 (s, 1H, CH_{ar}), 6.84 (s, 1H, CH_{ar}), 4,24-4,21 (m, 4H, OCH_2), 3,97-3,94 (m, 4H, OCH_2), 3,78-3,75 (m, 4H, $2OCH_2$), 3.71-3.69 (s, 4H, OCH_2), 2.73 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 158.27 (C=O), 156.20 (C_q), 152.73 (C_q), 148.78 (C_q), 145.73 (C_q), 132.27 (CH_{ar}), 132.11 (CH_{ar}), 127.06 (C_q), 118.36 (C_q), 112.42 (C_q), 112.21 (C_q),107.85 (CH_{ar}), 101.09 (CH_{ar}), 81.96(C_q), 81.62 (C_q), 72.98 (OCH_2), 72.91 (OCH_2), 69.37 (OCH_2), 69.21 (OCH_2), 68.83 (OCH_2), 68.74 (OCH_2), 61.72 (2 OCH_2), 17.77 (CH_3).

6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-3-(pyridin-3-ylethynyl)-2H-chromen-2-one : COU-Py



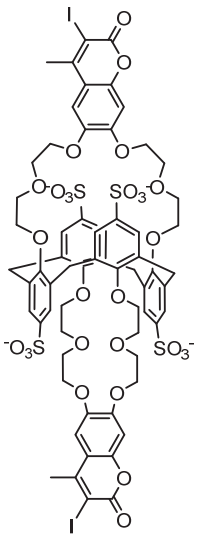
COU-Py

In a schlenck under argon 150 mg (0.3 mmol) of COU-I, 80 mg (0.80 mmol) of 3-Ethynylpyridine, 30 mg (0.2 mmol) of CuI; and 840 µL (6.0 mmol) of Et_3N, were combined in 6 mL of dioxane. After homogenization 125 mg (0.08 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 110°C. After 24 hours the reaction was stopped by addition of CH_2Cl_2 and filtered through Celite. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and evaporated to dryness. The crude product was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) yielding 120 mg (85%) of the expected product

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) = 8.77 (m, 1H, CH_{ar}), 8.55 (m, 1H, CH_{ar}), 7.86-7.84 (m, 1H, CH_{ar}), (m, 1H, CH_{ar}), 7.33-7.30 (m, 1H, CH_{ar}), 7.04 (s, 1H, CH_{ar}), 6.83 (s, 1H, CH_{ar}), 4,22-4,20 (m, 4H, OCH_2), 3,91-3,89 (m, 4H, OCH_2), 3,72-3,70 (m, 4H, $2OCH_2$), 3.67-3.65 (s, 4H, OCH_2), 2.64 (s, 3H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 159.74 (C=O), 155.20 (C_q), 153.21 (C_q), 152.41 (CH_{ar}), 149.28 (CH_{ar}), 148.95 (C_q), 146.07 (C_q), 138.72 (CH_{ar}), 123.51 (CH_{ar}), 120.32 (C_q), 112.78 (C_q), 108.21 ($CH_{ar\text{-}coumarinne}$), 107.91 ($C_q$), 101.23 ($CH_{ar\text{-}coumarine}$), 94.91 ($C_q$), 86.82 ($C_q$), 73.21 ($2OCH_2$), 69.57 ($OCH_2$), 69.44 ($OCH_2$), 69.17 ($OCH_2$), 69.03 ($OCH_2$), 61.79 (2 OCH_2), 17.87 (CH_3).

5,11,17,23-tetrasulfonate-calix[4]arene-bis-[(6,7-dihydroxy-3-iodo-4-methyl-2*H*-chromen-2-one)-crown-6] : Calix-COU-I-Sulf



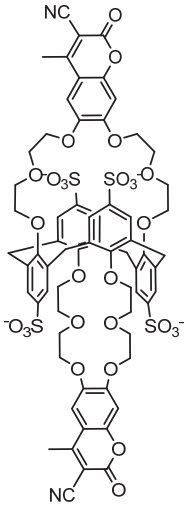
470 mg (0.3 mmol) of Calix-COU-SUlf were dissolved in 20 mL of a MeOH/CH_3CN (1/1) mixture. After complete dilution, 710 mg (3.1 mmol) of NIS and 120 µL (0.1 mmol) of TFA were added and the mixture was refluxed 36 hours until complete consumption of the starting material. The product was then precipitated by addition of acetone to give 295 mg (54%) of a yellow solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, D_2O): δ (ppm) 7.64 (s, $8H_{calix}$), 7.26 (s. 2H), 7,00 (s, 2H), 4.39-4.19 (m, 8H, OCH_2), 4.14-3.99 (m, 16H, $2OCH_2$), 3.96-3.90 (m, 8H, CH_2), 3.55-3.40 (m, 8H, OCH_2), 2.60 (s, 6H, CH_3).

NMR ^{13}C (100 MHz, D_2O): δ (ppm) 161.41 (C=O), 159.72 (C_q), 158.21 (C_q), 153.46 (C_q), 148.51 (C_q), 145.63 (C_q), 138.14 (C_q), 134.32 (C_q), 134.24 (C_q), 127.53 (CH_{ar}), 112.63 (CH_{ar}), 111.20 (C_q), 101.33 (CH_{ar}), 86.61 (C_q), 70.52 (OCH_2), 70.40 (OCH_2), 70.04 (OCH_2), 69.99 (OCH_2), 69.65 (OCH_2), 69.56 (OCH_2), 68.59 (2 OCH_2), 37.08 (CH_2), 25.36 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M-2Na]^{2-}$= 850.9946 ; Calc. for $C_{64}H_{58}I_2Na_4O_{28}S_4$ $[M-2Na]^{2-}$= 850.9941

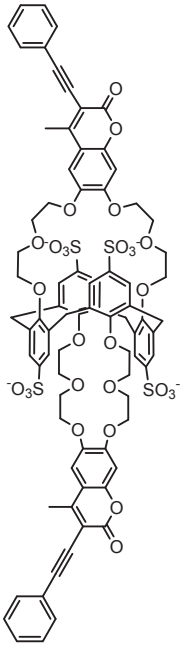
5,11,17,23-tetrasulfonate-calix[4]arene-bis-[(6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2-oxo-2H-chromene-3-carbonitrile)-crown-6] : Calix-COU-CN-Sulf



In a round-bottom-flask under argon were introduced 250 mg (0.14 mmol) of Calix-COU-I-Sulf, 33 mg (0.37 mmol) of CuCN and 0.9 mL of NMP. The mixture was heated up to 190°C and stirred one hour at this temperature. After one hour the reaction mixture was cool down, filtered and the NMP was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in MeOH and precipitated with acetone. The product was then purified by reverse chromatography, yielding 70 mg (32%) of a brown powder.

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.46 (s, $8H_{calix}$), 7.13 (s, 2H), 6.89 (s, 2H), 4.14-4.04 (m, 8H, OCH_2), 3.92-3.79 (m, 16H, OCH_2 + $CH_{2\text{-}calix}$), 3.68-3.59 (m, 8H, OCH_2), 3.48-3.37 (m, 8H, OCH_2), 2.57(s, 6H, CH_3).

5,11,17,23-tetrasulfonate-calix[4]arene-bis-[(6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-3-(phenylethynyl)-2H-chromen-2-one)-crown-6] : Calix-COU-Alcyne-Sulf



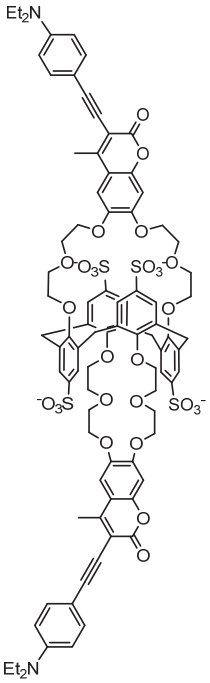
In round bottom flask under argon, 200 mg (0.11 mmol) of Calix-COU-I-Sulf, 80 µL (0.69 mmol) of phenylacetylene, 20 mg (0.09 mmol) of CuI; and 250 µL (1.8 mmol) of Et_3N, were combined in 4 mL of DMF. After homogenization 26 mg (0.02 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 100-110°C for 24 hours. The reaction mixture was then diluted with MeOH and filtered through Celite. After concentration the product was precipitated by addition of acetone to give 175 mg (91%) of a yellow solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.63 (s, $8H_{calix}$), 7.59-7.57 (m, 4H, CH_{ar}), 7.39-7.38 (m, 6H, CH_{ar}), 7.23 (s, 2H, $CH_{coumarine}$), 6.99 (s, 2H, $CH_{coumarine}$), 4.30-4.23 (m, 16H, OCH_2), 3.92-3.86 (m, 24H, CH_2 +OCH_2), 2.76 (s, 6H, CH_3).

NMR ^{13}C - DEPT-135 (100 MHz, MeOD): δ (ppm) 131.34 (CH_{ar}), 129.29 (CH_{ar}), 128.69 (CH_{ar}), 126.79 (CH_{ar}), 111.51 (CH_{ar}), 102.15 (CH_{ar}), 70.74 (OCH_2), 70.53 ($2OCH_2$), 70.31 (OCH_2), 69.97 (OCH_2), 69.87 (OCH_2), 69.31 (OCH_2), 69.26 (OCH_2), 37.17 (CH_2), 18.83 (CH_3).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M-3Na]^{3-}$= 542.4223; Calc. for $C_{80}H_{68}Na_4O_{28}S_4$ $[M-2Na]^{2-}$= 542.4225

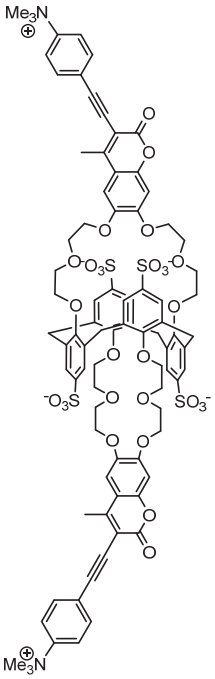
5,11,17,23-tetrasulfonate-calix[4]arene-bis-[(3-((4-(dimethylamino)phenyl)ethynyl)-6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one)-crown-6] : Calix-COU-Aniline-Sulf



In a round bottom flask under argon, 100 mg (0.06 mmol) of Calix-COU-I-Sulf, 66 mg (0.46 mmol) of 4-Ethynyl-N,N-dimethylaniline, 10 mg (0.06 mmol) of CuI; and 160 µL (1.1 mmol) of Et_3N, were combined in 4 mL of DMF. After homogenization 35 mg (0.03 mmol) of $Pd(PPh_3)_4$ were added and the mixture was stirred at 100-110°C for 24 hours. The reaction mixture was then diluted with MeOH and filtered through Celite. After concentration the product was precipitated by addition of acetone to give 110 mg (98%) of a yellow solid.

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.61 (s, 8H, CH_{calix}), 7,43-7.41 (d, $^3J_{HH}$ = 8.68 Hz, 4H, CH_{ar}), 7.26 (s, 2H, CH_{ar}), 6.90 (s, 2H, CH_{ar}), 6.74-6.71 (d, $^3J_{HH}$ = 9 Hz, 4H, CH_{ar}) 4,30-4,23 (m, 8H, OCH_2), 4.13-4.01 (m, 8H, OCH_2), 3.90 (s, 8H, CH_2), 3.78-3.65 (m, 16H, OCH_2), 2.99 (s, 12H, $4CH_3$), 2,72 (s, 6H, $2CH_3$).

5,11,17,23-tetrasulfonate-calix[4]arene-bis-[(4-((6,7-bis(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)ethynyl)-N,N,N-trimethylbenzenaminium)-crown-6] : Calix-COU-Anilinium-Sulf



In a round-bottom flask under argon 100 mg (0.05 mmol) of Calix-COU-Aniline-Sulf were dissolved in 2 mL of DMF, 100µL (1.6 mmol) of methyl iodide were then added the mixture was further stirred at room temperature for 2 days. The DMF was then removed and the product was dissolved in MeOH and precipitated with acetone.

NMR ^{1}H (400 MHz, MeOD) : δ (ppm) 7.92-7.90 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8 Hz, 4H, CH_{ar}), 7.83-7.81 (d, $^{3}J_{HH}$ = 8.2, 4H, CH_{ar}), 7.63 (s, 8H, CH_{calix}), 7.23 (s, 2H, CH_{ar}), 6.92 (s, 2H, CH_{ar}), 4,33-4,28 (m, 8H, OCH_2), 4.07-4.01 (m, 8H, OCH_2), 3.90 (s, 8H, CH_2), 3.78-3.65 (m, 16H, OCH_2), 3.69 (s, 18H, $6CH_3$), 2,72 (s, 6H, $2CH_3$).

HMRS (TOF MS ES+): found: $[M]^{2-}$ = 860.2084; Calc. for $C_{86}H_{84}N_2O_{28}S_4$ $[M]^{2-}$ = 859.7208

II. Mesures spectroscopiques

A. Produits et solvants

L'eau utilisée est une eau déionisée par traitement. Sa conductivité est inférieure à 6×10^{-8} Ω^{-1} cm^{-1} à 20°C. Les solvants organiques utilisés (acétonitrile, méthanol) sont de qualité spectroscopique et disponible chez Sigma Aldrich ou SDS.

Les sels métalliques utilisés : NaCl, KCl, KSCN, $MgCl_2$, $CaCl_2$, Cs_2CO sont tous disponibles commercialement chez Aldrich ou Fluka avec une pureté supérieure à 99 %.

B. Instrumentations

1) Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption stationnaire ont été enregistrés sur deux types de spectrophotomètres à double faisceau. Un Uvikon 943, dont le domaine spectral s'étend de 190 à 900 nm, et dont la précision est de 0,1 nm ; et un Cary-5000 dont le domaine spectral s'étend de 175 à 3300 nm avec 0,05 nm de précision. Des cuves de fluorescence en quartz (QS) de trajet optique 1 cm de la marque Hellma ont été utilisés pour les mesures.

2) Spectroscopie de fluorescence stationnaire

Les spectres d'émission ont été enregistrés sur un spectrofluoromètre Fluoromax-4 de Jobin-Yvon. Ce spectrofluorimètres est relié à un ordinateur sous Windows XP, doté du logiciel FluorEssence. La source d'excitation est une lampe à arc Xénon de 150 W, dont le domaine spectral s'étend de 200 à 950 nm. La largeur des bandes passantes des monochromateurs sont ajustées par ordinateur. Les spectres d'émission effectués ont systématiquement été corrigés de la fonction de l'appareil. Des cuves de fluorescence en quartz (QS) de trajet optique 1 cm de la marque Hellma ont été utilisés pour les mesures.

C. Protocoles expérimentaux

1) Mesure du coefficient d'absorption molaire

D'après la loi de Beer-Lambert, le coefficient d'absorption molaire ε d'un chromophore à une longueur d'onde λ, relie l'absorbance du chromophore à la longueur d'onde λ, et à la concentration C en chromophore de la solution.

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0}{I_t} = \ell \varepsilon(\lambda) C$$

Formule 10 - *Loi de Beer-Lambert*

A(λ) étant l'absorbance à la longueur d'onde λ, I_0 l'intensité du faisceau incident, I_t l'intensité du faisceau transmis, ℓ le chemin optique, ε(λ) le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde λ et C la concentration en chromophores.

La loi de Beer-Lambert s'applique uniquement pour un rayonnement monochromatique et dans un milieu homogène et dilué. Les coefficients d'absorption molaire des composés étudiés, ont été déterminés en enregistrant les spectres d'absorption des composés à différentes concentrations. Une régression linéaire de l'absorbance du composé à la longueur d'onde choisie en fonction des différentes concentrations permet ensuite de déterminer le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde choisie.

2) Mesure du rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence est défini comme le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés. Le rendement quantique d'un composé X est mesuré par rapport à une référence R dont le rendement quantique est connu. Les rendements quantiques des deux composés sont reliés par la relation suivante[331].

$$\Phi_X = \Phi_R \frac{A_R}{A_X} \frac{S_X}{S_R} \left(\frac{n_X}{n_R} \right)^2$$

Formule 11 - *Expression du rendement quantique du composé X*

où Φ est le rendement quantique, A l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'excitation, S l'intégrale sous la courbe des spectres d'émission de fluorescence et η l'indice de réfraction du solvant utilisé. Les fluorophores de référence ont été choisis afin que leurs émissions soient proches de celles des composés étudiés. Les mesures de l'échantillon et de la référence ont été faites dans les mêmes conditions (longueur d'onde d'excitation, fentes, gain de l'appareil…). Les concentrations de la référence et du composé X ont aussi été ajustées afin d'avoir une absorbance proche aux longueurs d'ondes d'excitations choisi.

Deux références ont été utilisées pour les mesures de rendement quantique de fluorescence:

- Sulfate de quinine dans une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 0,5N avec $\Phi_R = 0,55$.
- Rhodamine 6G dans l'éthanol avec $\Phi_R = 0,96$.

3) Détermination des constantes de complexation

Les constantes de stabilité des complexes ont été déterminées par dosage spectrophotométrique et spectrofluorométrique. Des spectres d'absorption et de fluorescence des composés étudiés ont été enregistrés avec des ajouts croissants de cations, tout en maintenant la concentration en ligand constante.

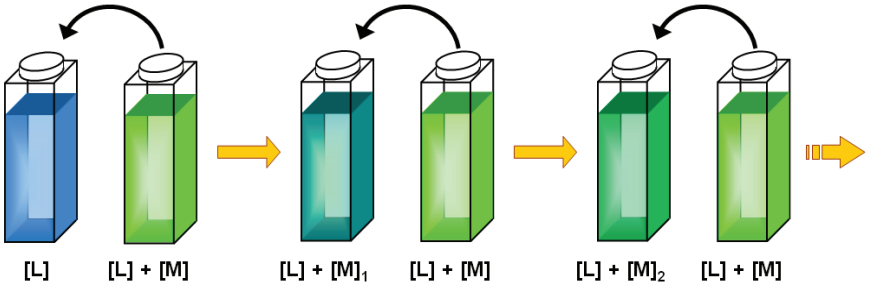


Figure 293 *Dosage de cations avec une concentration constante en ligand et une concentration en métal croissante $[M]_1<[M]_2<...[M]_i...<[M]$*

Les valeurs des constantes de complexation des complexes ont été obtenues grâce à une analyse globales des spectres par le logiciel SPECFIT/32™ Global Analysis System V3.0 32-bit pour Windows[332,333]. Ce logiciel permet aussi d'avoir accès aux spectres des différentes espèces (L, ML M_2L) et aux proportions des espèces en fonction de la concentration en cation.

Annexes

I. Détermination du taux d'humidité à partir de la concentration en césium

L'utilisation du césium comme traceur au sein des canalisations du circuit de vapeur, permet d'avoir accès à de nombreux paramètres. L'accès à certaines de ces grandeurs à partir de la concentration en traceur est ici détaillé.

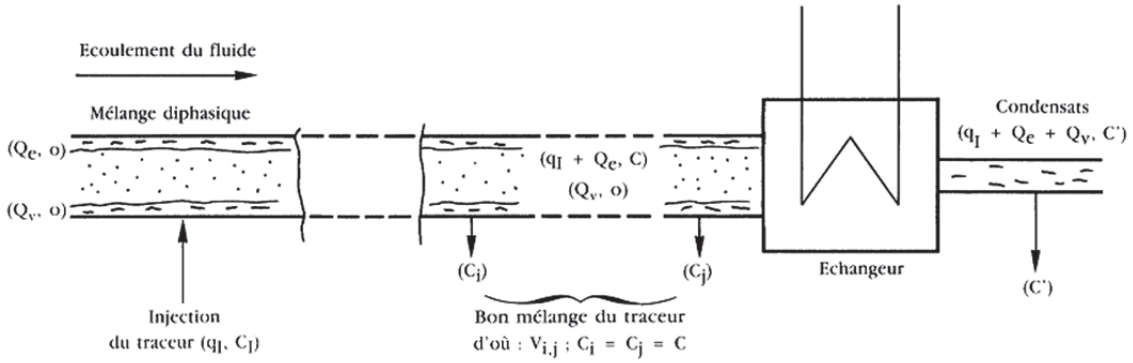


Figure 294 - *Schéma d'une canalisation du circuit de vapeur*

La concentration en traceur est mesurée au point d'injection, au point de piquage et en sortie de condenseur. En appliquant la loi de la conservation de la masse de traceur entre l'injection et les détections aux trois points de piquage, la relation suivante est obtenue :

$$q_I.C_I = (q_I + Q_e).C + Qv.C_0 = (q_I + Q_e + Q_V).C'$$

où q_I représente le débit de traceur injecté, C_I la concentration de la solution de traceur injecté, Q_e le débit d'eau liquide au sein de la canalisation de vapeur au point de piquage, C la concentration en traceur dans la phase liquide Q_v le débit de vapeur au sein de la canalisation, C_0 la concentration en traceur dans la phase vapeur en ce même point de piquage, et C' la concentration en traceur dans le condensat où un dernier piquage est réalisé.

Le traceur étant uniquement présent en phase liquide, $C_0 = 0$ et le terme $Qv.C_0$ peut être supprimé, la relation devenant :

$$q_I.C_I = (q_I + Q_e).C = (q_I + Q_e + Q_V).C'$$

q_I, C_I, sont imposés et connus alors que C, et C', doivent être mesurés pour accéder à différentes grandeurs comme :

- τ le titre en eau dans la veine de vapeur :

$$\tau = \frac{C'}{C}$$

- car Q_e le débit d'eau liquide au sein de la canalisation de vapeur est :

$$Q_e = \frac{q_I.C_I}{C}$$

• et $Q_e + Q_v$ correspondant à la valeur du débit de condensats de l'échangeur est :

$$Q_e + Q_V = \frac{q_I . C_I}{C'}$$

II. Dimensionnement du dispositif de mesure

Les calculs de mécanique des fluides pour le dimensionnement de notre dispositif de mesure sont présentés ci-dessous.

Afin de déterminer si le piquage secondaire permettait l'alimentation en eau du circuit micro-fluidique, la pression nécessaire à l'entrée du capillaire (point P1) a tout d'abord été évaluée.

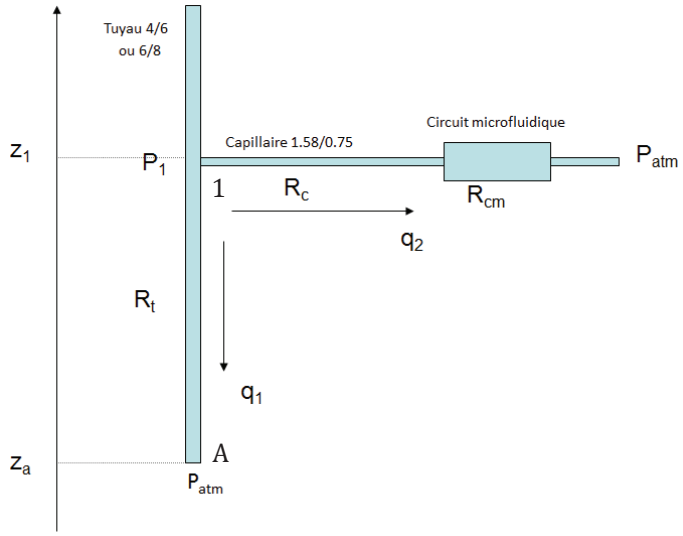


Figure 295 - *Schéma du dispositif de piquage*

Le débit circulant au sein du tuyau de piquage q_1 est compris entre 1 et 10L/h soit entre 3.10^{-7} et 3.10^{-6} m^3/s. Le débit dans le capillaire de soutirage q_2 doit être supérieur à 0,25 mL/h soit = $7\ 10^{-11}$ m^3/s

Le calcul du nombre de Reynolds dans le tuyau de piquage a dans un premier temps été effectué afin de déterminer le régime de l'écoulement :

$$R_e = \frac{\rho U d}{\mu} = \frac{4\rho Q_V}{\pi \mu d}$$

Formule 12 - *Expression du nombre de Reynolds*

où : ρ = masse volumique du fluide

μ = viscosité du fluide

U = vitesse moyenne du fluide dans le tuyau

d = diamètre hydraulique du tuyau

$U = Q_v/S$

Q_v = débit volumique

S = section de passage dans le tuyau = $\pi d^2/4$

Les nombres de Reynolds calculés en fonction des différents débits et sections de canalisations, sont tous inférieurs à 2000 (Tableau 32). Nous sommes donc dans tous les cas en régime laminaire.

	Q_1 = 1L/h	Q_1 =10L/h
d = 4 mm	R_{e1} = 100	R_{e2} = 1000
d = 6mm	R_{e1} = 60	R_{e2} = 600

Tableau 32 - *Nombres de Reynolds en fonction du débit*

L'écoulement d'eau dans les tuyaux et les capillaires est régi par l'équation de Bernoulli:

$$P_1 + \rho g z_1 + \frac{1}{2}\rho U_1^2 = P_A + \rho g z_A + \frac{1}{2}U_A^2 + R_T q_1$$

Formule 13 - *Equation de Bernoulli*

Où : P_1: pression au point 1 d'altitude z_1

P_A: pression au point A d'altitude z_A = pression atmosphérique

U_1 : vitesse du fluide au point 1

U_A : vitesse du fluide au point A

ρ : masse volumique du fluide, pour l'eau 1000kg/m^3

RT : résistance hydrodynamique du tuyau de piquage primaire : en écoulement laminaire les pertes de charge sont supposées proportionnelles au débit circulant.

q_1 : débit du fluide dans le tuyau de piquage

g : accélération de la pesanteur

La vitesse ne variant pas dans l'ensemble du tuyau, $U_1 = U_A$

L'équation précédente devient alors :

$$P_1 = P_{Atm} - \rho g(z_1 - z_A) + R_T q_1$$

$$\Delta P = P_1 - P_{Atm} = R_T q_1 - \rho g(z_1 - z_A)$$

Pour la branche comprenant le capillaire et le circuit microfluidique en négligeant la différence d'altitude entre le point 1 et la sortie du microsystème :

$$P_1 = P_{Atm} + (R_c + R_{cm})q_2$$

$$\Delta P = P_1 - P_{Atm} = (R_c + R_{cm})q_2$$

De ces développements on tire :

$$R_T q_1 - \rho g(z_1 - z_A) = (R_c + R_{cm}) q_2 \qquad (1)$$

Pour le tuyau de piquage de section circulaire, en écoulement laminaire, la résistance vaut :

$$R_T = \frac{8\mu L}{\pi r^4}$$

où μ : viscosité dynamique du fluide, pour l'eau 10^{-3} kg/m.s

r : rayon du tuyau = 2 mm = 2 10^{-3} m

L : longueur de tuyau = L_T ou L_C

R_T = 160 10^6 L_T

R_c = 4 10^{10} $kg.s^{-1}.m^{-4}$ pour une longueur de 30 cm de capillaire L_C.

Pour un capillaire de section rectangulaire, la résistance vaut :

$$R_{cm} = \frac{3\mu L}{h^3 w}$$

où L : longueur du circuit microfluidique

h : hauteur du canal = 75µm

w : largeur du canal = 200 µm

R_{cm} : résistance du circuit microfluidique ≈ 3.10^{16} L

Après calcul, pour les deux débits q_1 possibles et le débit q_2 souhaité, la relation (1) ne peut être vérifiée que pour une position du point A au-dessus du point 1. Alors zA >z1.

Il est donc nécessaire d'ajouter une garde hydraulique pour permettre le passage de l'eau par le capillaire puis le circuit (Figure 296).

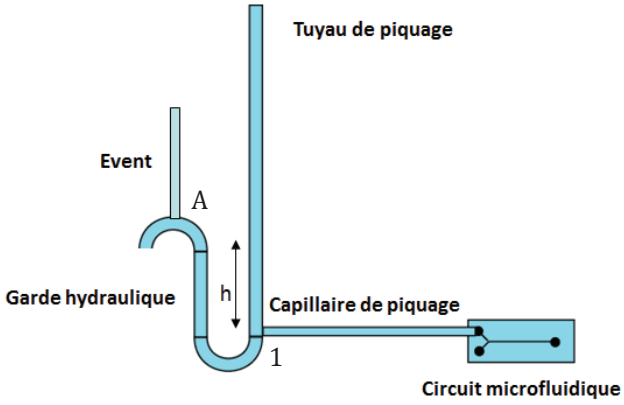


Figure 296 - *Schéma du dispositif de piquage comportant une garde hydraulique*

L'équation qui décrit la nouvelle configuration s'écrit :

$$R_T q_1 + \rho g h = (R_c + R_{cm}) q_2$$

Cette équation nous permet de déterminer la hauteur h minimale pour avoir une pression suffisante permettant l'alimentation du circuit microfluidique en eau.

Quelle que soit la longueur du tuyau, le terme $R_T q_1$ est bien inférieur au terme ρgh. De même, la résistance du capillaire R_c est bien inférieure à celle du circuit micro-fluidique R_{cm}. Ce qui nous permet de simplifier.

$$h = \frac{R_{cm} q_2}{\rho g}$$

Formule 14 - *Expression simplifiée de la hauteur h de la garde hydraulique nécessaire*

Où R_{cm} a été mesuré expérimentalement à $2\ 10^{14}$

Après calcul, une hauteur h nécessaire de 1,4 m a été déterminée pour une pression relative à l'entrée du circuit de 130 mbar. La mise en œuvre des boucles d'injection a permis de réduire la hauteur de la garde hydraulique à 25cm.

III. Modélisation de la forme des paliers

Les calculs des nombres de Reynolds et du nombre de Péclet abordés lors de la modélisation de la forme des paliers sont détaillés ci-dessous.

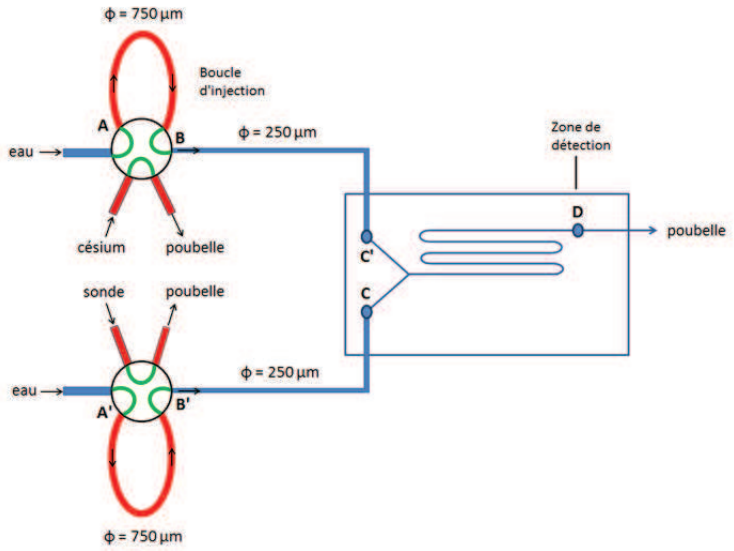


Figure 297 - *Schématisation du dispositif de mesure en situation d'injection*

Le système de mesure décrit précédemment et schématisé sur la Figure 297 peut être décomposé en trois sections :

- la boucle d'injection, constituée d'un capillaire de 250 mm de longueur et de 750 µm de diamètre intérieure ($d_1 = 2w_1$) (A-B).

- le capillaire reliant la boucle d'injection et le circuit microfluidique, de 180 mm de longueur et de 250 µm de diamètre intérieur ($d_2 = 2w_2$) (B-C).

- le circuit microfluidique de section rectangulaire, large de 200 µm, haut de 75 µm, et long de 130 mm, en négligeant le volume des chevrons (C-D).

Au sein des boucles et des capillaires, le débit est de 0,65 mL/h. Dans le circuit le débit est la somme des deux voies d'injection soit 1,3 mL/h.

Le nombre de Reynolds est un nombre sans dimension caractérisant la nature du régime d'écoulement. Le calcul du nombre de Reynolds est donné par la formule ci-dessous, où ρ est la masse volumique du fluide, U la vitesse du fluide, L la dimension caractéristique et µ la vicosité dynamique du fluide.

$$R_e = \frac{\rho U L}{\mu}$$

Formule 15 - *Expression du nombre de Reynolds*

Dans le circuit micro-fluidique de section rectangulaire, la dimension caractéristique L est le rapport de quatre fois la section S sur le périmètre mouillé p.

$$L = \frac{4S}{p}$$

Formule 16 - *Expression de la dimension caractéristique L pour une section rectangulaire*

Pour une canalisation de section cylindrique, la dimension caractéristique L est le diamètre de la canalisation, l'expression du nombre de Reynolds devient alors :

$$R_e = \frac{\rho U d}{\mu}$$

Formule 17 - *Expression du nombre de Reynolds au sein de canalisation*

Les nombres de Reynolds calculés pour les trois sections de l'écoulement sont tous bien inférieurs à 2000 (Tableau 33). Nous nous situons donc bien en régime laminaire.

Section	A-B	B-C	C-D
R_e	0,3	0,92	2,6

Tableau 33 - *Nombres de Reynolds pour les diférentes sections de l'écoulement*

Un écoulement lamimaire en géométrie cylindrique conduit a un écoulement de Poiseuille avec un profil parabolique des vitesses :

$$U(r) = U_0\left(1 - \frac{r^2}{w^2}\right)$$

Formule 18 - *Expression de la vitesse lors d'un écoulement de Poiseuille*

Où U_0 la vitesse maximale est égale à deux fois la vitesse moyenne.

Le nombre de Péclet est aussi un nombre sans dimension, comparant la diffusion au sein d'un fluide à l'écoulement convectif. Le calcul du nombre de Péclet est donné par la formule ci-dessous, où U est la vitesse du fluide, L longueur caractéristique et D le coefficient de diffusion.

$$Pe = \frac{UL}{D}$$

Formule 19 - *Expression du nombre de Péclet*

Pour ce calcul un coefficient de diffusion D de 5.10-10 $m^2 \cdot s^{-1}$ a été pris correspondant à l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion des Calix[4]arènes fonctionalisés[334]. Un nombre de Péclet de $6{,}3.10^6$ à été calculé, soit bien au dessus de 10^2 valeurs à partir de laquelle l'élargissement du temps de résidence est négligeable en mélangeur à chevrons.

Bibliographie

[1] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *« Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. » WILEY-VCH Verlag GmbH* **2012**.

[2] Lakowicz, J. R., *"Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd edition." Springer* **2006**.

[3] Pearson, R. G., *"Hard and Soft Acids and Bases." Journal of American Chemical Society* **1963,** *85*, 3533-3539.

[4] Pearson, R. G., *"Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, part 1: Fundamental principles." Journal of Chemical Education* **1968,** *45*, 581.

[5] Hancock, R. D.; Martell, A. E*., "Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution." Chemical Review* **1989,** *89*, 1875-1914.

[6] Hancock, R. D., *"The pyridyl group in ligand design for selective metal ion complexation and sensing." Chemical Society Reviews* **2013,** *42* (4), 1500-1524.

[7] Ngo, H. T.; Liu, X.; Jolliffe, K. A., *"Anion recognition and sensing with Zn(II)-dipicolylamine complexes." Chemical Society Reviews* **2012,** *41* (14), 4928-4965.

[8] Xue, L.; Liu, Q.; Jiang, H., *"Ratiometric Zn2+ Fluorescent Sensor and New Approach for Sensing Cd2+ by Ratiometric Displacement." Organic Letters* **2009,** *11* (15), 3454-3457.

[9] Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H., *"Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes." Chemical Reviews* **2014,** *114* (1), 590-659.

[10] Collot, M.; Loukou, C.; Yakovlev, A. V.; Wilms, C. D.; Li, D.; Evrard, A.; Zamaleeva, A.; Bourdieu, L.; Leger, J. F.; Ropert, N.; Eilers, J.; Oheim, M.; Feltz, A.; Mallet, J. M., *"Calcium rubies: a family of red-emitting functionalizable indicators suitable for two-photon Ca2+ imaging." Journal of American Chemical Society* **2012,** *134* (36), 14923-14931.

[11] Minta, A.; Tsien, R., *"Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium." The Journal of biological chemistry* **1989,** *264* (32), 19449-19457.

[12] Crossley, R.; Goolamal, Z.; Sarnmes, P. G., *"Synthesis and Properties of a Potential Extracellular Fluorescent Probe for Potassium." Journal of Chemical Society, Perkun Trans 2.* **1994**.

[13] He, H. R.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J. P.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K*., "A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[14] Harvey, J., *"Developments in the metal chemistry of N-confused porphyrin." Coordination Chemistry Reviews* **2003,** *247* (1-2), 1-19.

[15] Dsouza, R. N.; Pischel, U.; Nau, W. M., Fluorescent dyes and their supramolecular host/guest complexes with macrocycles in aqueous solution. *Chemical Reviews* **2011,** *111* (12), 7941-7980.

[16] Norkus, E., *"Metal ion complexes with native cyclodextrins. An overview." Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2009,** *65* (3-4), 237-248.

[17] Kappe, T., *"The Early History of Calixarene Chemistry." Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **1994**. (19) 3-15

[18] Gutsche, C. D.; Muthukrishnan, R., *"Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols." The Journal of Organic Chemistry* **1978,** *43*, 4905-4906.

[19] Gaeta, C.; Talotta, C.; Farina, F.; Campi, G.; Camalli, M.; Neri, P., *"Conformational features and recognition properties of a conformationally blocked calix[7]arene derivative." Chemistry A European Journal* **2012,** *18* (4), 1219-1230.

[20] Bistri, O.; Colasson, B.; Reinaud, O., *"Recognition of primary amines in water by a zinc funnel complex based on calix[6]arene." Chemical Science* **2012,** *3* (3), 811-818.

[21] Gutsche, C. D.; Hawan, B. A.; J, A. L.; No, K. H.; Bauer, L. J., *"Conformational isomers of the ethers and esters of Calix[4]arènes"* **1983** *39* (3) 409-426

[22] Iwamoto, K.; Shinkai, S., *"Synthesis and ion selectivity of all conformational isomers of tetrakis[(ethoxycarbonyl)methoxy]calix[4]arene." The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57* (26), 7066-7073.

[23] Joseph, R.; Rao, C. P., *"Ion and molecular recognition by lower rim 1,3-di-conjugates of calix[4]arene as receptors." Chemical Reviews* **2011,** *111* (8), 4658-4702.

[24] Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Spitz, J.-A.; Sorin, A.; Favre-Réguillon, A.; Lemaire, M., New water-soluble calix[4]arene-bis(benzocrown-6) for caesium–sodium separation by nanofiltration–complexation. *Tetrahedron* **2003,** *59* (51), 10313-10324.

[25] Arduini, A.; Pochini, A.; Reverberi, S.; Ungaro, R., *« p-t-Butyl-calix[4]arene Tetracarboxylic Acid. A Water Soluble Calixarene in a Cone Structure." Journal of Chemical Society, Chemical Communication,* **1984**, 981–982.

[26] Shahgaldian, P.; Coleman, A. W.; Kalchenko, V. I., *"Synthesis and properties of novel amphiphilic calix-[4]-arene derivatives." Tetrahedron Letters* **2001,** *42* (4), 577-579.

[27] Dondoni, A.; Marra, A., *"Calixarene and calixresorcarene glycosides: their synthesis and biological applications." Chemical Reviexs* **2010,** *110* (9), 4949-4977.

[28] Sansone, F.; Casnati, A., *"Multivalent glycocalixarenes for recognition of biological macromolecules: glycocalyx mimics capable of multitasking." Chemical Society Reviews* **2013,** *42* (11), 4623-39.

[29] Perret, F.; Lazar, A. N.; Coleman, A. W., *"Biochemistry of the para-sulfonato-calix[n]arenes." Chemical Communication* **2006,** (23), 2425-2438.

[30] Lamartine, R.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Choquar, P.; Marcillac, A., *World Patent, WO 97/49677* **1997**.

[31] Shinkai, S.; Mori, S.; Tsubaki, T.; Sone, T.; Manabe, O., *"New water-soluble host molecules derived from calix[6]arene." Tetrahedron Letters* **1984,** *25* (46), 5315-5318.

[32] Shinkai, S.; Araki, K.; Tsubaki, T.; Arimura, T.; Manabe, O., *"New Syntheses of Calixarene-p-sulphonates and p-Nitrocalixarenes." Journal of Chemical Society Perkin Trans. 1* **1987**, 2297-2299.

[33] Morzherin, Y.; Rudkevich, D. M.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N., *"Chlorosulfonylated Calix[llarenes : Precursors for Neutral Anion Receptors with a Selectivity for Hydrogen Sulfate." The Journal of Organic Chemistry* **1993,** *58*, 7602-7605.

[34] Nicod, L.; Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Lemaire, M., *"Synthesis of water soluble molecular receptor from calix 4 arene-bis-crown-6." Tetrahedron Letters* **1998,** *39* (51), 9443-9446.

[35] Clark, T. E.; Makha, M.; Sobolev, A. N.; Rohrs, H.; Atwood, J. L.; Raston, C. L., *"Engineering nanorafts of calixarene polyphosphonates*." *Chemistry A European Journal* **2008,** *14* (13), 3931-3938.

[36]. Larsen, M.; Jørgensen, M., *"Selective Halogen−Lithium Exchange Reaction of Bromine-Substituted 25,26,27,28-Tetrapropoxycalix[4]arene." The Journal of Organic Chemistry* **1996,** *61* (19), 6651-6655.

[37] Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Nicod, L.; Lemaire, M., *"Synthesis and complexation properties of 1,3-alternate calix[4]arene-bis(crown-6) derivatives." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2001,** (8), 1426-1432.

[38] Ihm, H.; Kim, H.; Paek, K., *"Molecular engineering. Part 2.1 Influence of side-chain substituents in lariat-type upper-rim calix[4]crowns on their binding properties and the reversal of these." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 1* **1997,** (13), 1997-2004.

[39] Arduini, A.; Mirone, L.; Paganuzzi, D.; Pinalli, A.; Pochini, A.; Secchi, A.; Ungaro, R., *"New Calix[4]arenes Having Electron Donating Groups at the Upper Rim as Molecular Platforms and Host Molecules." Tetrahedron* **1996,** *52* (16), 6011-6018.

[40] Gutsche, C. D.; Alam, I., *"Calixarenes. 23. the complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes." Tetrahedron* **1988,** *44* (15), 4689-4694.

[41] Mourer, M.; Psychogios, N.; Laumond, G.; Aubertin, A. M.; Regnouf-de-Vains, J. B., *"Synthesis and anti-HIV evaluation of water-soluble calixarene-based bithiazolyl podands." Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010,** *18* (1), 36-45.

[42] Psychogios, N.; Regnouf-de-Vains, J.-B., *"A new water-soluble calix[4]arene podand incorporating p-phosphonate groups and 2,2_-bipyridine units." Tetrahedron Letters* **2002,** *43*, 7691–7693.

[43] Almi, M.; Arduini, A.; Casnati, A.; Pochini, A.; Ungaro, R., *"Chloromethylation of calixarenes and synthesis of new water soluble macrocyclic hosts." Tetrahedron* **1989,** *45* (7), 2177-2182.

[44] Zadmard, R.; Schrader, T.; Grawe, T.; Kraft, A., *"Self-Assembly of Molecular Capsules in Polar Solvents." Organic Letters* **2002,** *4* (10), 1687-1690.

[45] 1. Arduini, A.; Mirone, L.; Paganuzzi, D.; Pinalli, A.; Pochini, A.; Secchi, A.; Ungaro, R., *"New Calix[4]arenes Having Electron Donating Groups at the Upper Rim as Molecular Platforms and Host Molecules." Tetrahedron* **1996,** *52* (16), 6011-6018.

[46] Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Ciotto, S. D.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N., *"Divalent Binding of a Bis(adamantyl)-Functionalized Calix[4]arene to b-cyclodextrin-based Hosts: An Experimental and Theoretical Study on Multivalent Binding in Solution and at Self-Assembled Monolayers." Journal of American Chemical Society .* **2004,** *126*, 6627-6636.

[47] Mourer, M.; Duval, R. E.; Finance, C.; Regnouf-de-Vains, J. B., *"Functional organisation and gain of activity: the case of the antibacterial tetra-para-guanidinoethyl-calix[4]arene." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006,** *16* (11), 2960-2963.

[48] de Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D., *"Fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors as potent analytical tools." Analyst* **2009,** *134* (12), 2385-93.

[49] Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M., *"New fluorescent chemosensors for metal ions in solution." Coordination Chemistry Reviews* **2012,** *256* (1-2), 170-192.

[50] He, H.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K.*, "A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." The Journal of American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[51] He, H.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K.*, "A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." The Journal of American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[52] Otsuki, J.; Akasaka, T.; Araki, K., *"Molecular switches for electron and energy transfer processes based on metal complexes." Coordination Chemistry Reviews* **2008,** *252* (1-2), 32-56.

[53] Bergonzi, R.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Mangano, C., *"Molecular switches of fluorescence operating through metal centred redox couples." Coordination Chemistry Reviews* **1998,** *170*, 31-46.

[54] Valeur, B.; Leray, I., "Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition." *Coordinatio Chemistry Reviews* **2000,** *205*, 3-40.

[55] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *« Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. » WILEY-VCH Verlag GmbH* **2012**.

[56] Habib Jiwan, J. L.; Branger, C.; Soumillion, J. P.; Valeur, B.*, "Ion-responsive fluorescent compounds V. Photophysical and complexing properties of coumarin 343 linked to monoaza-15-crown-5." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1998,** *116* (2), 127-133.

[57] Habib Jiwan, J. L.; Branger, C.; Soumillion, J. P.; Valeur, B.*, "Ion-responsive fluorescent compounds V. Photophysical and complexing properties of coumarin 343 linked to monoaza-15-crown-5." Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1998,** *116* (2), 127-133.

[58] Valeur, B.; Leray, I., "Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition." *Coordinatio Chemistry Reviews* **2000,** *205*, 3-40.

[59] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N., *« Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Second Edition. » WILEY-VCH Verlag GmbH* **2012**.

[60] Kumar, M.; Dhir, A.; Bhalla, V., *"On-Off Switchable Binuclear Chemosensor Based on Thiacalix[4]crown Armed with Pyrene Moieties." European Journal of Organic Chemistry* **2009,** *2009* (26), 4534-4540.

[61] Lee, M. H.; Quang, D. T.; Jung, H. S.; Yoon, J.; Lee, C. H.; Kim, J. S., *"Ion-induced FRET on-off in fluorescent calix[4]arene." The Journal of Organic Chemistry* **2007,** *72* (11), 4242-4245.

[62] Beaugelin-Seiller, K.; Roussel-Debet, S.; Germain, P., *« Fiche de radionucléide Césium 137 et environnement. » INRS (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire) 2005*.

[63] Butterman, W. C.; Brooks, W. E.; Reese, J.; Robert, G., *"Minreal Commodity Profil: Cesium". United States Geological Survey* **2004**.

[64] Butterman, W. C.; Brooks, W. E.; Reese, J.; Robert, G., *"Minreal Commodity Profil: Cesium". United States Geological Survey* **2004**.

[65] Garaudee, S.; Elhabiri, M.; Kalny, D.; Robiolle, C.; Trendel, J. M.; Hueber, R.; Van Dorsselaer, A.; Albrecht, P.; Albrecht-Gary, A. M., *"Allosteric effects in norbadione A. A clue for the accumulation process of Cs-137 in mushrooms?" Chemical Communications* **2002,** (9), 944-945.

[66] Korovitch, A.; Mulon, L. B.; Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B.; Mallinger, A.; Nada, B.; Le Gall, T.; Lion, C.; Ha-Duong, N. T.; Chahine, J., Norbadione A: *"Kinetics and Thermodynamics of*

Cesium Uptake in Aqueous and Alcoholic Media." Journal of Physical Chemistry B **2010,** *114* (39), 12655-12665.

[67] Beaugelin-Seiller, K.; Roussel-Debet, S.; Germain, P., *« Fiche de radionucléide Césium 137 et environnement. » INRS (Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire) 2005*.

[68] Patnaik, P.*, "Dean's Analytical Chemistry Handbook." McGraw-Hill Handbooks* **2004**.

[69] Weiss, T.; Weiss, J., *"Handbook of Ion Chromatography*." *WILEY-VCH Verlag GmbH* **2005**.

[70] Patnaik, P.*, "Dean's Analytical Chemistry Handbook." McGraw-Hill Handbooks* **2004**.

[71] Weiss, T.; Weiss, J., *"Handbook of Ion Chromatography*." *WILEY-VCH Verlag GmbH* **2005**.

[72] Welz, B.; Sperling, M., *"Atomic Absorption Spectrometry, Third Edition*." *WILEY-VCH Verlag GmbH* **2007**.

[73] Patnaik, P.*, "Dean's Analytical Chemistry Handbook." McGraw-Hill Handbooks* **2004**.

[74] Patnaik, P.*, "Dean's Analytical Chemistry Handbook." McGraw-Hill Handbooks* **2004**.

[75] Knoll, G. F., *"Radiation Detection and Measurement, Fourth Edition*." *WILEY-VCH Verlag GmbH* **2010**.

[76] Gilmore, G.; Hemingway, J., *"Pratical Gamma-Ray Spectrometry*." *John Wiley and Sons* **1995**.

[77] Valeur, B.; Leray, I., *"Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition." Coordination Chemistry Reviews* **2000,** *205*, 3-40.

[78] Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M., *"New fluorescent chemosensors for metal ions in solution." Coordination Chemistry Reviews* **2012,** *256* (1-2), 170-192.

[79] Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J., *"Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions." Chemical Society Reviews* **2012,** *41* (8), 3210-3244.

[80] Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H., *"Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes." Chemical Reviews* **2014,** *114* (1), 590-659.

[81] Du, J.; Hu, M.; Fan, J.; Peng, X., *"Fluorescent chemodosimeters using "mild" chemical events for the detection of small anions and cations in biological and environmental media." Chemial Society Reviews* **2012,** *41* (12), 4511-4535.

[82] Xia, W.-S.; Schmehl, R. H.; Li, C.-J., *"A novel caesium selective fluorescent chemosensor." Chemical Communications* **2000,** (8), 695-696.

[83] Arnaud-Neu, F.; Asfari, Z.; Souley, B.; Vicens, J., *"Binding properties of calix[4]-bis-crowns towards alkali cations." New Journal of Chemistry* **1996,** *20* (4), 453-463.

[84] Arnaud-Neu, F.; Asfari, Z.; Souley, B.; Vicens, J., *"Binding properties of calix[4]-bis-crowns towards alkali cations." New Journal of Chemistry* **1996,** *20* (4), 453-463.

[85] Ji, H. F.; Dabestani, R.; Brown, G. M.; Sachleben, R. A., *"A new highly selective calix[4]crown-6 fluorescent caesium probe." Chemical Communications* **2000,** (10), 833-834.

[86] Kim, S. K.; Lynch, V. M.; Young, N. J.; Hay, B. P.; Lee, C. H.; Kim, J. S.; Moyer, B. A.; Sessler, J. L., *"KF and CsF recognition and extraction by a calix[4]crown-5 strapped calix[4]pyrrole multitopic receptor." Journal of American Chemical Society* **2012,** *134* (51), 20837-20843.

[87] Ungaro, R.; Casnati, A.; Ugozzoli, F.; Pochini, A.; Dozol, J. F.; Hill, C.; Rouquette, H., *"1,3-Dialkoxycalix[4]arenecrowns-6 in 1,3-Alternate Conformation : Cesium-Selective Ligands that Exploit Cation- Arene Interactions." Angewandt Chemistry International Edition in English* **1994,** *33* (14), 1506-1508.

[88] Casnati, A.; Pochini, A.; Ungaro, R.; Ugozzoli, J. F.; Arnaud, F.; Fanni, S.; Schwing, M. J.; Egberink, R. J. M.; Jong, F. d.; Reinhoudt, D. N., *"Synthesis, Complexation, and Membrane Transport Studies of 1,3-Alternate Calix[4]arene-crown-6 Conformers: A New Class of Cesium Selective Ionophores." Journal of American Chemical Society* **1995,** *117*, 2767-2777

[89] Asfari, Z.; Bressot, C.; Vicens, J.; Hill, C.; Dozol, J. F.; Rouquette, H.; Eymard, S.; Lamare, V.; Toumois, B., *"Doubly Crowned Calix[4]arenes in the 1,3-Alternate Conformation as Cesium-Selective Carriers in Supported Liquid Membranes." Analytical Chemistry* **1995,** *67*, 3133-3139.

[90] Arnaud-Neu, F.; Asfari, Z.; Souley, B.; Vicens, J., *"Binding properties of calix[4]-bis-crowns towards alkali cations." New Journal of Chemistry* **1996,** *20* (4), 453-463.

[91] Kim, J. S.; Suh, I. H.; Kimc, J. K.; Cho, M. H., *"Selective sensing of caesium ions by novel calix[4]arene bis(dibenzocrown) ethers in an aqueous environment." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 1* **1998**, 2307-2311.

[92] Kim, J. S.; Pann, J. H.; Yu, Y.; Lee, W. K.; Suh, H.; Kim, J. K.; Cho, M. H.; Kim, E. T.; Ra, D. Y., *"Calix[4]arene dibenzocrown ethers as caesium selective extractants." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **1999**, 837–846.

[93] Lamare, V.; Dozol, J.-F.; Fuangswasdi, S.; Arnaud-Neu, F.; Thuéry, P.; Nierlich, M.; Asfari, Z.; Vicens, J., *"A new calix[4]arene-bis(crown ether) derivative displaying an improved caesium over sodium selectivity: molecular dynamics and experimental investigation of alkali-metal ion complexation." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **1999**, 271-284.

[94] 1. Iwamoto, K.; Shinkai, S., *"Syntheses and Ion Selectivity of All Conformational Isomers of Tetrakis((ethoxycarbonyl)methoxy)calix[4]arene." The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57* (26), 7066-7073.

[95] Ji, H. F.; Brown, G. M.; Dabestani, R., *"Calix[4]arene-based Cs+ selective optical sensor." Chemical Communication* **1999**, 609–610.

[96] Ji, H. F.; Dabestani, R.; Brown, G. M.; Hettich, R. L., *"Synthesis and sensing behavior of cyanoanthracene modified 1,3-alternate calix[4]benzocrown-6: a new class of Cs+ selective optical sensors." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2001,** (4), 585-591.

[97] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Synthesis and binding properties of calix 4 biscrown-based fluorescent molecular sensors for caesium or potassium ions." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **2002,** (8), 1429-1434.

[98] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Photophysics of calix 4 biscrown-based ditopic receptors of caesium containing one or two dioxocoumarin fluorophores." Journal of Fluorescence* **2004,** *14* (4), 451-458.

[99] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix 4 arene-bis(crown-6-ether)." Chemical Communications* **2006,** (40), 4224-4226.

[100] Korovitch, A.; Mulon, J. B.; Souchon, V.; Lion, C.; Valeur, B.; Leray, I.; Ha-Duong, N. T.; Chahine, J., *"Kinetics, Thermodynamics, and Modeling of Complex Formation between Calix[4]biscrowns and Cesium." Journal of Physical Chemistry B* **2009,** *113* (43), 14247-14256.

[101] Nicod, L.; Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Lemaire, M., *"Synthesis of water soluble molecular receptor from calix 4 arene-bis-crown-6." Tetrahedron Letters* **1998,** *39* (51), 9443-9446.

[102] Gross, D. E.; Schmidtchen, F. P.; Antonius, W.; Gale, P. A.; Lynch, V. M.; Sessler, J. L., "*Cooperative binding of calix[4]pyrrole-anion complexes and alkylammonium cations in halogenated solvents." Journal of American Chemical Society* **2008,** *14* (26), 7822-7827.

[103] Kim, S. K.; Sessler, J. L.; Gross, D. E.; Lee, C. H.; Kim, J. S.; Lynch, V. M.; Delmau, L. H.; Hay, B. P., A *"Calix[4]arene Strapped Calix[4]pyrrole: An Ion-Pair Receptor Displaying Three Different Cesium Cation Recognition Modes." Journal of the American Chemical Society* **2010,** *132* (16), 5827-5836.

[104] Kim, S. K.; Vargas-Zuniga, G. I.; Hay, B. P.; Young, N. J.; Delmau, L. H.; Masselin, C.; Lee, C. H.; Kim, J. S.; Lynch, V. M.; Moyer, B. A.; Sessler, J. L., *"Controlling cesium cation recognition via cation metathesis within an ion pair receptor." Journal of American Chemical Society* **2012,** *134* (3), 1782-1792.

[105] Gross, D. E.; Schmidtchen, F. P.; Antonius, W.; Gale, P. A.; Lynch, V. M.; Sessler, J. L., "*Cooperative binding of calix[4]pyrrole-anion complexes and alkylammonium cations in halogenated solvents." Journal of American Chemical Society* **2008,** *14* (26), 7822-7827.

[106] Kim, S. K.; Lynch, V. M.; Young, N. J.; Hay, B. P.; Lee, C. H.; Kim, J. S.; Moyer, B. A.; Sessler, J. L., *"KF and CsF recognition and extraction by a calix[4]crown-5 strapped calix[4]pyrrole multitopic receptor." Journal of American Chemical Society* **2012,** *134* (51), 20837-20843.

[107] Brotin, T.; Dutasta, J. P., *"Cryptophanes and Their Complexes-Present and Future." Chemical Reviews* **2009,** *109* (1), 88-130.

[108] Brotin, T.; Cavagnat, D.; Berthault, P.; Montserret, R.; Buffeteau, T., *"Water-soluble molecular capsule for the complexation of cesium and thallium cations." The journal of physical chemistry. B* **2012,** *116* (35), 10905-10914.

[109] Brotin, T.; Goncalves, S.; Berthault, P.; Cavagnat, D.; Buffeteau, T., *"Influence of the cavity size of water-soluble cryptophanes on their binding properties for cesium and thallium cations." The journal of physical chemistry. B* **2013,** *117* (41), 12593-12601.

[110] Brotin, T.; Montserret, R.; Bouchet, A.; Cavagnat, D.; Linares, M.; Buffeteau, T., *"High affinity of water-soluble cryptophanes for cesium cations." The Journal of Organic Chemistry* **2012,** *77* (2), 1198-1201.

[111] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix 4 arene-bis(crown-6-ether)." Chemical Communications* **2006,** (40), 4224-4226.

[112] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Synthesis and binding properties of calix[4]biscrown-based fluorescent molecular sensors for caesium or potassium ions." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2002,** (8), 1429-1434.

[113] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Synthesis and binding properties of calix[4]biscrown-based fluorescent molecular sensors for caesium or potassium ions." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2002,** (8), 1429-1434.

[114] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Photophysics of calix 4 biscrown-based ditopic receptors of caesium containing one or two dioxocoumarin fluorophores.*" *Journal of Fluorescence* **2004,** *14* (4), 451-458.

[115] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Synthesis and binding properties of calix[4]biscrown-based fluorescent molecular sensors for caesium or potassium ions." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2002,** (8), 1429-1434.

[116] Leray, I.; Asfari, Z.; Vicens, J.; Valeur, B., *"Synthesis and binding properties of calix[4]biscrown-based fluorescent molecular sensors for caesium or potassium ions." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2002,** (8), 1429-1434.

[117] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix 4 arene-bis(crown-6-ether)." Chemical Communications* **2006,** (40), 4224-4226.

[118] Connors, K. A., *"Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability." John Wiley and Sons* **1987**.

[119] Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Nicod, L.; Lemaire, M., "Synthesis and complexation properties of 1,3-alternate calix[4]arene-bis(crown-6) derivatives." *Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2001,** (8), 1426-1432.

[120] Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Nicod, L.; Lemaire, M., *"Synthesis and complexation properties of 1,3-alternate calix[4]arene-bis(crown-6) derivatives." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2001,** (8), 1426-1432.

[121] Nicod, L.; Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Lemaire, M., *"Synthesis of water soluble molecular receptor from calix 4 arene-bis-crown-6." Tetrahedron Letters* **1998,** *39* (51), 9443-9446.

[122] Li, J.; Janout, V.; Regen, S. L., *"Gluing Langmuir-Blodgett monolayers onto hydrocarbon surfaces." Journal of American Chemical Society* **2006,** *128* (3), 682-683.

[123] Banerjee, T.; Suresh, M.; Ghosh, H. N.; Das, A., *"Competitive binding of Ba^{2+} and Sr^{2+} to 18-Crown-6 in a Receptor with a 1-Methoxyanthraquinone Analogue as the Other Binding Site." European Journal of Inorganic Chemistry* **2011,** *2011* (30), 4680-4690.

[124] Arduini, A.; Mirone, L.; Paganuzzi, D.; Pinalli, A.; Pochini, A.; Secchi, A.; Ungaro, R., *"New Calix[4]arenes Having Electron Donating Groups at the Upper Rim as Molecular Platforms and Host Molecules." Tetrahedron* **1996,** *52* (16), 6011-6018.

[125] Cao, Y.; Vysotsky, M. O.; Bohmer, V., *"Wide rim urethanes derived from calix[4]arenes: synthesis and self-assembly". The Journal of Organic Chemistry* **2006,** *71* (9), 3429-3434.

[126] Nikaido, M.; Aslanian, R.; Scavo, F.; Helquist, P., "*Acid-Catalyzed Oxidation of Benzaldehydes to Phenols by Hydrogen Peroxide*." *The Journal of Organic Chemistry* **1984,** *49*, 4741-4743

[127] Bernet, A.; Seifert, K., *"A New Approach to Sesquiterpene Arenes of the 9,11-Drimenyl Type (= [(1E,2RS,4aRS,8aRS)-Octahydro-2,5,5,8a-tetramethylnaphthalen-1(2H)-ylidene] methyl Type)." Helvetica Chimica Acta* **2006,** *89* (4), 784-796.

[128] KERANGAL, I. L.-R.; JONUSAUSKAITE, L.; LEFEVRE, J.-P.; DEPAUW, A., *« Nouveaux composés de calixarene-couronnes et leurs applications. » FR1354232- brevet EDF-CNRS-ENS-Cachan-CNAM* **10 mai 2013**.

[129] Kiliç, H., *"Ultraviolet–visible study on acid–base equilibria for some 7,8-ethylenedioxy coumarins." Journal of Molecular Liquids* **2013,** *187*, 314-319.

[130] Kiliç, H., *"Ultraviolet–visible study on acid–base equilibria for some 7,8-ethylenedioxy coumarins." Journal of Molecular Liquids* **2013,** *187*, 314-319.

[131] Pellet-Rostaing, S.; Chitry, F.; Nicod, L.; Lemaire, M., *"Synthesis and complexation properties of 1,3-alternate calix[4]arene-bis(crown-6) derivatives." Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* **2001,** (8), 1426-1432.

[132] Stroock, A. D.; Dertinger, S. K.; Ajdari, A.; Mezic, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M., Chaotic mixer for microchannels. *Science* **2002,** *295* (5555), 647-651.

[133] Zhao, L.; Wu, T.; Lefevre, J. P.; Leray, I.; Delaire, J. A., *"Fluorimetric lead detection in a microfluidic device". Lab Chip* **2009,** *9* (19), 2818-23.

[134] Zhao, L.; Wu, T.; Lefevre, J. P.; Leray, I.; Delaire, J. A., *"Fluorimetric lead detection in a microfluidic device." Lab Chip* **2009,** *9* (19), 2818-2823.

[135] Wu, T.; Zhao, L.; Faye, D.; Lefevre, J.-P.; Delaire, J.; Leray, I., *"Determination of lead in water by combining precolumn adsorption and fluorimetric detection in a microfluidic device." Analytical Methods* **2012,** *4* (4), 989.

[136] Squires, T. M.; Quake, S. R., *"Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale." Review of Modern Physics* **2005,** *77* (3), 977-1026.

[137] Cantu-Perez, A.; Barrass, S.; Gavriilidis, A., *"Residence time distributions in microchannels: Comparison between channels with herringbone structures and a rectangular channel." Chemical Engineering Journal* **2010,** *160* (3), 834-844.

[138] Frohlich, F.; Bazhenov, M.; Iragui-Madoz, V.; Sejnowski, T. J., *"Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic." The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2008,** *14* (5), 422-433.

[139] Elger, C. E.; Schmidt, D., *"Modern management of epilepsy: a practical approach." Epilepsy & behavior : E&B* **2008,** *12* (4), 501-539.

[140] 1. Huberfeld, G.; Wittner, L.; Clemenceau, S.; Baulac, M.; Kaila, K.; Miles, R.; Rivera, C., *"Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2007,** *27* (37), 9866-9873.

[141] Huberfeld, G.; de la Prida, L.; Pallud, J.; Cohen, I.; Le Van Quyen, M.; Adam, C.; Clemenceau, S.; Baulac, M.; Miles, R., *"Glutamatergic pre-ictal discharges emerge at the transition to seizure in human epilepsy." Nature Neuroscience* **2011,** *14* (5), 627.

[142] Pallud, J.; Van Quyen, M.; Bielle, F.; Pellegrino, C.; Varlet, P.; Labussiere, M.; Cresto, N.; Dieme, M.; Baulac, M.; Duyckaerts; Kourdougli, N.; Chazal, G.; Devaux, B.; Rivera, C.; Miles, R.; Capelle, L.; Huberfeld, G., *"Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma" Science Translational Medicine* **2014,** *6* (244).

[143] Frohlich, F.; Bazhenov, M.; Iragui-Madoz, V.; Sejnowski, T. J., *"Potassium dynamics in the epileptic cortex: new insights on an old topic." The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2008,** *14* (5), 422-433.

[144] Grinvald, A.; Hildesheim, R., *"VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics." Nature reviews. Neuroscience* **2004,** *5* (11), 874-885.

[145] Scanziani, M.; Hausser, M., *"Electrophysiology in the age of light." Nature* **2009,** *461* (7266), 930-939.

[146] Evan W. Miller, John Y. Lin, E. Paxon Frady, Paul A. Steinbach,c, William B. Kristan, Jr., and Roger Y. Tsien "*Optically monitoring voltage in neurons by photoinduced electron transfer through molecular wires". Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 7,* **2012** *109* (6), *2114–2119*

[147] Fromherz, P.; Hubener, G.; Kuhn, B.; Hinner, M. J., *"ANNINE-6plus, a voltage-sensitive dye with good solubility, strong membrane binding and high sensitivity." European biophysics journal :* **2008,** *37* (4), 509-514.

[148] Evan W. Miller, John Y. Lin, E. Paxon Frady, Paul A. Steinbach,c, William B. Kristan, Jr., and Roger Y. Tsien "*Optically monitoring voltage in neurons by photoinduced electron transfer through molecular wires". Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 7,* **2012** *109* (6), *2114–2119*

[149] Gonzalez, J. E.; Tsien, R. Y., *"Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells." Biophysical Journal* **1995,** *69* (4), 1272-1280.

[150] Gonzalez, J. E.; Tsien, R. Y., "*Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer." Chemistry & Biology* **1997,** *4* (4), 269-277.

[151] Gonzalez, J. E.; Tsien, R. Y., "*Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer." Chemistry & Biology* **1997,** *4* (4), 269-277.

[152] Evan W. Miller, John Y. Lin, E. Paxon Frady, Paul A. Steinbach,c, William B. Kristan, Jr., and Roger Y. Tsien "*Optically monitoring voltage in neurons by photoinduced electron transfer through molecular wires". Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 7,* **2012** *109* (6), *2114–2119*

[153] de Silva, A. P., "*Fluorescent sensors: bright ideas." Nature chemistry* **2012,** *4* (6), 440-441.

[154] Evan W. Miller, John Y. Lin, E. Paxon Frady, Paul A. Steinbach,c, William B. Kristan, Jr., and Roger Y. Tsien "*Optically monitoring voltage in neurons by photoinduced electron transfer through molecular wires". Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 7,* **2012** *109* (6), *2114–2119*

[155] Minta, A.; Tsien, R., *"Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium." The Journal of biological chemistry* **1989,** *264* (32), 19449-19457.

[156] Meuwis, K.; Boens, N.; Schryver, F. C. D.; Gallay, J.; Vincent, M., *"Photophysics of the fluorescent K+ indicator PBFI*." *Biophysical Journal* **1995**, 2469-2473.

[157] Minta, A.; Escamilla, P. R., *« Cytosolic fluorescent ion indicators » EP 2619199 A2* **31 juil. 2013**.

[158] K. Golchini, M. Makovic-Basic, S. A. Gharib, D. Masilamani, M. E. Lucas and I. Kurtz, *"Synthesis and characterization of a new fluorescent-probe for measuring potassium." American Journal of Physiology*, **1990**, 25, F438.

[159] K. Golchini, M. Makovic-Basic, S. A. Gharib, D. Masilamani, M. E. Lucas and I. Kurtz, *"Synthesis and characterization of a new fluorescent-probe for measuring potassium." American Journal of Physiology*, **1990**, 25, F438.

[160] Silva, A. P. d.; Gunaratne, H. Q. N.; Samankumara, K. R. A., "*New benzo-annelated cryptand and derivative a with alkali cation-sensitive fluorescence."*
Tetrahedrons Letters **1990,** *31* (36), 5193-5196.

[161] Crossley, R.; Goolamal, Z.; Sarnmes, P. G., *"Synthesis and Properties of a Potential Extracellular Fluorescent Probe for Potassium." Journal of Chemical Society, Perkun Trans 2.* **1994**, 1615-1623.

[162] He, H.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J.; Young, S. T.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., *"A fluorescent chemosensor for sodium based on photoinduced electron transfer." Analytical Chemistry* **2003,** *75* (3), 549-55.

[163] He, H. R.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J. P.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., *"A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[164] He, H. R.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J. P.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., *"A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[165] He, H. R.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J. P.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., *"A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[166] Padmawar, P.; Yao, X.; Bloch, O.; Manley, G. T.; Verkman, A. S., *"K+ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K+-sensing fluorescent indicator." Nature methods* **2005,** *2* (11), 825-827.

[167] Magzoub, M.; Padmawar, P.; Dix, J. A.; Verkman, A. S., *"Millisecond association kinetics of K+ with triazacryptand-based K+ indicators measured by fluorescence correlation spectroscopy." The journal of physical chemistry. B* **2006,** *110* (42), 21216-21221.

[168] Namkung, W.; Padmawar, P.; Mills, A. D.; Verkman, A. S., *"Cell-based fluorescence screen for K+ channels and transporters using an extracellular triazacryptand-based K+ sensor." Journal of American Chemical Society* **2008,** *130* (25), 7794-7795.

[169] Namkung, W.; Song, Y.; Mills, A. D.; Padmawar, P.; Finkbeiner, W. E.; Verkman, A. S., *"In situ measurement of airway surface liquid [K+] using a ratioable K+-sensitive fluorescent dye." The Journal of biological chemistry* **2009,** *284* (23), 15916-15926.

[170] Carpenter, R. D.; Verkman, A. S., *Synthesis of a sensitive and selective potassium-sensing fluoroionophore. Organic Letters* **2010,** *12* (6), 1160-1163.

[171] Carpenter, R. D.; Verkman, A. S., *"Function-Oriented Synthesis of a Didesmethyl Triazacryptand Analogue for Fluorescent Potassium Ion Sensing*." *European Journal of Organic Chemistry* **2011,** *2011* (7), 1242-1248.

[172] Liu, Z.; He, W.; Guo, Z., "*Metal coordination in photoluminescent sensing." Chemical Society Reviews* **2013,** *42* (4), 1568-1600.

[173] Thibon, A.; Pierre, V. C., *"Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging." Analytical & Bioanalitical Chemistry* **2009,** *394* (1), 107-120.

[174] Thibon, A.; Pierre, V. C., *"Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging." Analytical & Bioanalitical Chemistry* **2009,** *394* (1), 107-120.

[175] Gunnlaugsson, T.; Leonard, J. P., H+, *"Na+ and K+ modulated lanthanide luminescent switching of Tb(iii) based cyclen aromatic diaza-crown ether conjugates in water." Chemical Communications* **2003,** (19), 2424-2425

[176] Li, C.; Law, G. L.; Wong, W. T., "Luminescent Tb3+ complex with pendant crown ether showing dual-component recognition of H+ and K+ at multiple pH windows." *Organic Letters* **2004,** *6* (26), 4841-4844.

[177] Li, C.; Law, G. L.; Wong, W. T., *"Luminescent Tb3+ complex with pendant crown ether showing dual-component recognition of H+ and K+ at multiple pH windows". Organic Letters* **2004,** *6* (26), 4841-4844.

[178] Thibon, A.; Pierre, V. C., *"A Highly Selective Luminescent Sensor for the Time-Gated Detection of Potassium." Journal of the American Chemical Society* **2009,** *131* (2), 434-435.

[179] Weitz, E. A.; Pierre, V. C., *"A ratiometric probe for the selective time-gated luminescence detection of potassium in water." Chemical Communication* **2011,** *47* (1), 541-543.

[180] Thibon, A.; Pierre, V. C., *"A highly selective luminescent sensor for the time-gated detection of potassium." Journal of American Chemical Society* **2009,** *131* (2), 434-435.

[181] Ast, S.; Schwarze, T.; Muller, H.; Sukhanov, A.; Michaelis, S.; Wegener, J.; Wolfbeis, O. S.; Korzdorfer, T.; Durkop, A.; Holdt, H. J., *"A highly K(+)-selective phenylaza-[18]crown-6-lariat-ether-based fluoroionophore and its application in the sensing of K+ ions with an optical sensor film and in cells." Chemistry* **2013,** *19* (44), 14911-14917.

[182] 1. Schultz, R. A.; White, B. D.; Dishong, D. M.; Arnold, K. A.; Gokel, G. W., *"12-, 15, and 18-Membered-Ring Nitrogen-Pivot Lariat Ethers: Syntheses, Properties, and Sodium and Ammonium Cation Binding Properties." Journal of American Chemical Society* 1985, 107, 6659-6668**.**

[183] Ast, S.; Schwarze, T.; Muller, H.; Sukhanov, A.; Michaelis, S.; Wegener, J.; Wolfbeis, O. S.; Korzdorfer, T.; Durkop, A.; Holdt, H. J., *"A highly K(+)-selective phenylaza-[18]crown-6-lariat-ether-based fluoroionophore and its application in the sensing of K+ ions with an optical sensor film and in cells." Chemistry* **2013,** *19* (44), 14911-14917.

[184] Marcos, P. M.; Mellah, B.; Ascenso, J. R.; Michel, S.; Hubscher-Bruder, V.; Arnaud-Neu, F., *"Binding properties of p-tert-butyldihomooxacalix 4 arene tetra(2-pyridylmethoxy) derivative towards alkali, alkaline earth, transition and heavy metal cations." New Journal of Chemistry* **2006,** *30* (11), 1655-1661.

[185] Iwamoto, K.; Shinkai, S., *"Synthesis and ion selectivity of all conformational isomers of tetrakis[(ethoxycarbonyl)methoxy]calix[4]arene." The Journal of Organic Chemistry* **1992,** *57* (26), 7066-7073.

[186] Kim, S. K.; Lee, S. H.; Lee, J. Y.; Bartsch, R. A.; Kim, J. S., *"An excimer-based, binuclear, on-off switchable calix 4 crown chemosensor." Journal of the American Chemical Society* **2004,** *126* (50), 16499-16506.

[187] Kim, J. S.; Lee, W. K.; No, K.; Asfari, Z.; Vicens, J., *"Two novel 1,3-calix[4]azacrowns." Tetrahedron Letters* **2000,** *41* (18), 3345-3348.

[188] Malval, J. P.; Leray, I.; Valeur, B., *"A highly selective fluorescent molecular sensor for potassium based on a calix 4 bisazacrown bearing boron-dipyrromethene fluorophores." New Journal of Chemistry* **2005,** *29* (8), 1089-1094.

[189] Malval, J. P.; Leray, I.; Valeur, B., *"A highly selective fluorescent molecular sensor for potassium based on a calix 4 bisazacrown bearing boron-dipyrromethene fluorophores." New Journal of Chemistry* **2005,** *29* (8), 1089-1094.

[190] J. C. Duff*, " A new method for the preparation of p-dialkylaminobenzaldehydes" Journal of. Chemical. Society.***1945***, 276.*

[191] Kollmannsberger, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; c, W. R.; Daub, J., *"Design of an efficient charge-transfer processing molecular system containing a weak electron donor: spectroscopic and redox properties and cation-induced fluorescence enhancement."* **2000**.

[192] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix[4]arene-bis(crown-6-ether*)." *Chemical Comunications* **2006,** (40), 4224-4226.

[193] Zhang, X.-X.; Buchwald, S. L., *"Efficient Synthesis ofN-Aryl-Aza-Crown Ethers via Palladium-Catalyzed Amination." The Journal of Organic Chemistry* **2000,** *65* (23), 8027-8031.

[194] Surry, D. S.; Buchwald, S. L., *"Biaryl phosphane ligands in palladium-catalyzed amination." Angewandt Chemistry International Eddition English* **2008,** *47* (34), 6338-6361.

[195] Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K., *"Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives." The Journal of Organic Chemistry* **2008,** *73* (5), 1963-1970.

[196] Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K., *"Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives." The Journal of Organic Chemistry* **2008,** *73* (5), 1963-1970.

[197] Kim, J. S.; Lee, W. K.; No, K.; Asfari, Z.; Vicens, J., *"Two novel 1,3-calix[4]azacrowns." Tetrahedron Letters* **2000,** *41* (18), 3345-3348.

[198] Kim, J. S.; Lee, W. K.; No, K.; Asfari, Z.; Vicens, J., *"Two novel 1,3-calix[4]azacrowns." Tetrahedron Letters* **2000,** *41* (18), 3345-3348.

[199] Drewry, J. A.; Fletcher, S.; Hassan, H.; Gunning, P. T., *"Novel asymmetrically functionalized bis-dipicolylamine metal complexes: peripheral decoration of a potent anion recognition scaffold." Organic & Biomolecular Chemistry* **2009,** *7* (24), 5074-5077.

[200] Ameijde, J. v.; Liskamp, R. M. J., *"Synthesis of novel trivalent amino acid glycoconjugates based on the cyclotriveratrylene ('CTV') scaffold.*" *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003,** *1* (15), 2661-2669.

[201] Kim, S. K.; Sim, W.; Vicens, J.; Kim, J. S., *"Modular chemistry. Double- and multi-1,3-alternate-calixcrowns." Tetrahedron Letters* **2003,** *44* (4), 805-809.

[202] Jabin, I.; Reinaud, O., *"First C3v-symmetrical calix[6](aza)crown." The Journal of Organic Chemistry* **2003,** *68* (9), 3416-3419.

[203] Witulski, B.; Weber, M.; Bergsträsser, U.; Desvergne, J.-P.; Bassani, D. M.; Bouas-Laurent, H., *"Novel Alkali Cation Chemosensors Based onN-9-Anthrylaza-crown Ethers." Organic Letters* **2001,** *3* (10), 1467-1470.

[204] Poronik, Y. M.; Clermont, G.; Blanchard-Desce, M.; Gryko, D. T., *"Nonlinear optical chemosensor for sodium ion based on rhodol chromophore." The Journal of Organic Chemistry* **2013,** *78* (23), 11721-11732.

[205] Beletskaya, I. P.; Bessmertnykh, A. G.; Averin, A. D.; Denat, F.; Guilard, R., *"Palladium-Catalyzed Arylation of Linear and Cyclic Polyamines." European Journal of Organic Chemistry* **2005,** *2005* (2), 261-280.

[206] Ruan, Y. B.; Depauw, A.; Leray, I., *"Aggregation-induced emission enhancement upon Al3+ complexation with a tetrasulfonated calix[4]bisazacrown fluorescent molecular sensor." Organic & Biomolecular Chemistry* **2014,** *12* (25), 4335-4341.

[207] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix 4 arene-bis(crown-6-ether)." Chemical Communications* **2006,** (40), 4224-4226.

[208] Souchon, V.; Leray, I.; Valeur, B., *"Selective detection of cesium by a water-soluble fluorescent molecular sensor based on a calix[4]arene-bis(crown-6-ether)." Chemical Communication* **2006,** (40), 4224-4226.

[209] Padmawar, P.; Yao, X.; Bloch, O.; Manley, G. T.; Verkman, A. S., *"K+ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K+-sensing fluorescent indicator." Nature methods* **2005,** *2* (11), 825-827.

[210] Magzoub, M.; Padmawar, P.; Dix, J. A.; Verkman, A. S., *"Millisecond association kinetics of K+ with triazacryptand-based K+ indicators measured by fluorescence correlation spectroscopy." The journal of physical chemistry. B* **2006,** *110* (42), 21216-21221.

[211] Namkung, W.; Padmawar, P.; Mills, A. D.; Verkman, A. S., *"Cell-based fluorescence screen for K+ channels and transporters using an extracellular triazacryptand-based K+ sensor." Journal of American Chemical Society* **2008,** *130* (25), 7794-7795.

[212] Namkung, W.; Song, Y.; Mills, A. D.; Padmawar, P.; Finkbeiner, W. E.; Verkman, A. S., *"In situ measurement of airway surface liquid [K+] using a ratioable K+-sensitive fluorescent dye." The Journal of biological chemistry* **2009,** *284* (23), 15916-15926.

[213] Hirata, T.; Terai, T.; Komatsu, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T., *"Development of a potassium ion-selective fluorescent sensor based on 3-styrylated BODIPY." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011,** *21* (20), 6090-6093.

[214] Zhou, X.; Su, F.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., *"A new highly selective fluorescent K+ sensor." Journal of American Chemical Society* **2011,** *133* (46), 18530-18533.

[215] Willets, K. A.; Nishimura, S. Y.; Schuck, P. J.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E., *"Nonlinear optical chromophores as nanoscale emitters for single-molecule spectroscopy." Accounts of Chemical Research* **2005,** *38* (7), 549-556.

[216] Wang, H.; Lu, Z.; Lord, S. J.; Willets, K. A.; Bertke, J. A.; Bunge, S. D.; Moerner, W. E.; Twieg, R. J., *"The influence of tetrahydroquinoline rings in dicyanomethylenedihydrofuran (DCDHF) single-molecule fluorophores." Tetrahedron* **2007,** *63* (1), 103-114.

[217] Ipuy, M.; Billon, C.; Micouin, G.; Samarut, J.; Andraud, C.; Bretonniere, Y., *"Fluorescent push-pull pH-responsive probes for ratiometric detection of intracellular pH." Organic & Biomolecular Chemistry* **2014,** *12* (22), 3641-3648.

[218] Willets, K. A.; Ostroverkhova, O.; He, M.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E., *"Novel fluorophores for single-molecule imaging." Journal of American Chemical Society* **2003,** *125* (5), 1174-1175.

[219] Lord, S. J.; Lu, Z.; Wang, H.; Willets, K. A.; Schuck, P. J.; Lee, H. L.; Nishimura, S. Y.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E., *"Photophysical properties of acene DCDHF fluorophores: long-wavelength single-molecule emitters designed for cellular imaging." The journal of physical chemistry. A* **2007,** *111* (37), 8934-8941.

[220] Lu, Z.; Liu, N.; Lord, S. J.; Bunge, S. D.; Moerner, W. E.; Twieg, R. J., *"Bright, Red Single-Molecule Emitters: Synthesis and Properties of Environmentally Sensitive Dicyanomethylenedihydrofuran (DCDHF) Fluorophores with Bisaromatic Conjugation." Chemistry of materials* **2009,** *21* (5), 797-811.

[221] Wang, H.; Lu, Z.; Lord, S. J.; Moerner, W. E.; Twieg, R. J., *"Modifications of DCDHF single molecule fluorophores to impart water solubility." Tetrahedron Letters* **2007,** *48* (19), 3471-3474.

[222] Willets, K. A.; Callis, P. R.; Moerner, W. E., *"Experimental and theoretical investigations of environmentally sensitive single-molecule fluorophores." Journal of Physical Chemistry B* **2004,** *108* (29), 10465-10473.

[223] Willets, K. A.; Nishimura, S. Y.; Schuck, P. J.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E., *"Nonlinear optical chromophores as nanoscale emitters for single-molecule spectroscopy." Accounts of Chemical Research* **2005,** *38* (7), 549-556.

[224] Gopalan, P.; Katz, H. E.; McGee, D. J.; Erben, C.; Zielinski, T.; Bousquet, D.; Muller, D.; Grazul, J.; Olsson, Y., *"Star-shaped azo-based dipolar chromophores: design, synthesis, matrix*

compatibility, and electro-optic activity." Journal of American Chemical Society **2004,** *126* (6), 1741-1747.

[225] Liao, Y.; Bhattacharjee, S.; Firestone, K. A.; Eichinger, B. E.; Paranji, R.; Anderson, C. A.; Robinson, B. H.; Reid, P. J.; Dalton, L. R., *"Antiparallel-aligned neutral-ground-state and zwitterionic chromophores as a nonlinear optical material." Journal of American Chemical Society* **2006,** *128* (21), 6847-6853.

[226] Font-Sanchis, E.; Céspedes-Guirao, F. J.; Sastre-Santos, Á.; Villacampa, B.; Orduna, J.; Alicante, R.; Fernández-Lázaro, F., *"Synthesis and nonlinear optical properties of chromophores for photorefractive polymer materials." Tetrahedron* **2009,** *65* (23), 4513-4520.

[227] Gallego-Gómez, F.; Álvarez-Santos, J. C.; Rodríguez-Redondo, J. L.; Font-Sanchis, E.; Villalvilla, J. M.; Sastre-Santos, Á.; Díaz-García, M. A.; Fernández-Lázaro, F., *"Millisecond photorefractivity with novel dicyanomethylenedihydrofuran-containing polymers." Journal of Materials Chemistry* **2012,** *22* (24), 12220-12228.

[228] Lee, H. L. D.; Lord, S. J.; Iwanaga, S.; Zhan, K.; Xie, H. X.; Williams, J. C.; Wang, H.; Bowman, G. R.; Goley, E. D.; Shapiro, L.; Twieg, R. J.; Rao, J. H.; Moerner, W. E., *"Superresolution Imaging of Targeted Proteins in Fixed and Living Cells Using Photoactivatable Organic Fluorophores." Journal of the American Chemical Society* **2010,** *132* (43), 15099-15101.

[229] Lee, M. K.; Williams, J.; Twieg, R. J.; Rao, J.; Moerner, W. E., *"Enzymatic activation of nitro-aryl fluorogens in live bacterial cells for enzymatic turnover-activated localization microscopydagger." Chemical Science* **2013,** *42*, 220-225.

[230] Bouffard, J.; Kim, Y.; Swager, T. M.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A., *"A highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging." Organic Letters* **2008,** *10* (1), 37-40.

[231] Wu, M. Y.; Li, K.; Li, C. Y.; Hou, J. T.; Yu, X. Q., *"A water-soluble near-infrared probe for colorimetric and ratiometric sensing of SO2 derivatives in living cells." Chemical Communication* **2014,** *50* (2), 183-185.

[232] Ipuy, M.; Billon, C.; Micouin, G.; Samarut, J.; Andraud, C.; Bretonniere, Y., "Fluorescent push-pull pH-responsive probes for ratiometric detection of intracellular pH." *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014,** *12* (22), 3641-3648.

[233] Zhou, X.; Su, F.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., *"A new highly selective fluorescent K+ sensor." Journal of American Chemical Society* **2011,** *133* (46), 18530-18533.

[234] Mishra, A.; Behera, R. K.; Behera, P. K.; Mishra, B. K.; Behera, G. B., *"Cyanines during the 1990s: A Review." Chemical Review* **2000,** *100* (6), 1973-2012.

[235] Wang, H. H.; Xue, L.; Fang, Z. J.; Li, G. P.; Jiang, H., *"A colorimetric and fluorescent chemosensor for copper ions in aqueous media and its application in living cells." New Journal of Chemistry* **2010,** *34* (7), 1239-1242.

[236] Fedorova, O. A.; Fedorov, Y. V.; Vedernikov, A. I.; Gromov, S. P.; Yescheulova, O. V.; Alfimov, M. V.; Woerner, M.; Bossmann, S.; Braun, A.; Saltiel, J., *"Thiacrown ether substituted styryl dyes: Synthesis, complex formation and multiphotochromic properties." Journal of Physical Chemistry A* **2002,** *106* (25), 6213-6222.

[237] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A., *"The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed." Angewandt Chemistry International Edition English* **2008,** *47* (7), 1184-1201.

[238] Deng, H.; Hu, H.; He, M.; Hu, J.; Niu, W.; Ferrie, A. M.; Fang, Y., *"Discovery of 2-(4-methylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile and thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as G protein-coupled receptor 35 (GPR35) agonists." Journal of Medicinal Chemistry* **2011,** *54* (20), 7385-7396.

[239] Zhou, X.; Su, F.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., *"A new highly selective fluorescent K+ sensor." Journal of American Chemical Society* **2011,** *133* (46), 18530-18533.

[240] Willets, K. A.; Nishimura, S. Y.; Schuck, P. J.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E., *"Nonlinear optical chromophores as nanoscale emitters for single-molecule spectroscopy." Accounts of Chemical Research* **2005,** *38* (7), 549-556.

[241] Zhou, X.; Su, F.; Tian, Y.; Youngbull, C.; Johnson, R. H.; Meldrum, D. R., "A new highly selective fluorescent K+ sensor." *Journal of American Chemical Society* **2011,** *133* (46), 18530-18533.

[242] Lee, J. S.; Kim, H. K.; Feng, S.; Vendrell, M.; Chang, Y. T., *"Accelerating fluorescent sensor discovery: unbiased screening of a diversity-oriented BODIPY library." Chemical Communication* **2011,** *47* (8), 2339-2341.

[243] Lee, J. S.; Kang, N. Y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T., "*Synthesis of a BODIPY library and its application to the development of live cell glucagon imaging probe." Journal of American Chemical Society* **2009,** *131* (29), 10077-10082.

[244] Zhai, D.; Lee, S. C.; Vendrell, M.; Leong, L. P.; Chang, Y. T., *"Synthesis of a novel BODIPY library and its application in the discovery of a fructose sensor." ACS combinatorial science* **2012,** *14* (2), 81-84.

[245] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A., *"The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed." Angewandt Chemistry International Edition English* **2008,** *47* (7), 1184-1201.

[246] Lee, J. S.; Kang, N. Y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T., "Synthesis of a BODIPY library and its application to the development of live cell glucagon imaging probe." *Journal of American Chemical Society* **2009,** *131* (29), 10077-10082.

[247] Lindsey, J. S.; Prathapan, S.; Johnson, T. E.; Wagner, R. W., *"Porphyrin Building Blocks for Modular Construction of Bioorganic Model Systems." Tetrahedron* **1994,** *50* (30), 8941-8968.

[248] Lee, J. S.; Kang, N. Y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T., *"Synthesis of a BODIPY library and its application to the development of live cell glucagon imaging probe." Journal of American Chemical Society* **2009,** *131* (29), 10077-100782.

[249] Lee, J. S.; Kang, N. Y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T., *"Synthesis of a BODIPY library and its application to the development of live cell glucagon imaging probe." Journal of American Chemical Society* **2009,** *131* (29), 10077-100782.

[250] Goze, C.; Ulrich, G.; Ziessel, R., *"Tetrahedral boron chemistry for the preparation of highly efficient "Cascatelle" devices." The Journal of Organic Chemistry* **2007,** *72* (2), 313-322.

[251] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A., *"The chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed." Angewandt Chemistry International Edition English* **2008,** *47* (7), 1184-1201.

[252] Goze, C.; Ulrich, G.; Ziessel, R., *"Tetrahedral boron chemistry for the preparation of highly efficient "Cascatelle" devices." Journal of Organic Chemistry* **2007,** *72* (2), 313-322.

[253] Niu, S. L.; Ulrich, G.; Ziessel, R.; Kiss, A.; Renard, P. Y.; Romieu, *"A., Water-Soluble BODIPY Derivatives." Organic Letters* **2009,** *11* (10), 2049-2052.

[254] Niu, S. L.; Ulrich, G.; Ziessel, R.; Kiss, A.; Renard, P. Y.; Romieu, *"A., Water-Soluble BODIPY Derivatives." Organic Letters* **2009,** *11* (10), 2049-2052.

[255] Niu, S. L.; Massif, C.; Ulrich, G.; Ziessel, R.; Renard, P. Y.; Romieu, A., *"Water-solubilisation and bio-conjugation of a red-emitting BODIPY marker."* *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011,** *9* (1), 66-69.

[256] Niu, S. L.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Ziessel, R., *"Water-soluble red-emitting distyryl-borondipyrromethene (BODIPY) dyes for biolabeling."* *Chemistry A European Journal* **2012,** *18* (23), 7229-7242.

[257] Niu, S.-L.; Ulrich, G.; Retailleau, P.; Harrowfield, J.; Ziessel, R., *"New insights into the solubilization of Bodipy dyes."* *Tetrahedron Letters* **2009,** *50* (27), 3840-3844.

[258] Kollmannsberger, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; Daub, J., *"Ultrafast Charge Transfer in Amino-Substituted Boron Dipyrromethene Dyes and Its Inhibition by Cation Complexation: A New Design Concept for Highly Sensitive Fluorescent Probes."* *The Journal of Physical Chemistry A* **1998,** *102* (50), 10211-10220.

[259] Kollmannsberger, M.; Rurack, K.; Resch-Genger, U.; c, W. R.; Daub, J., *"Design of an efficient charge-transfer processing molecular system containing a weak electron donor: spectroscopic and redox properties and cation-induced fluorescence enhancement."* *Chemical Physics Letters* **2000**. 363-369

[260] Jose, J.; Burgess, K., *"Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules."* *Tetrahedron* **2006,** *62* (48), 11021-11037.

[261] Jose, J.; Burgess, K., *"Syntheses and properties of water-soluble Nile Red derivatives."* *The Journal of Organic Chemistry* **2006,** *71* (20), 7835-7939.

[262] Sackett, D. L.; Wolff, J., *"Nile Red as a Polarity-Sensitive Fluorescent-Probe of Hydrophobic Protein Surfaces."* *Analytical Biochemistry* **1987,** *167* (2), 228-234.

[263] Black, S. L.; Stanley, W. A.; Filipp, F. V.; Bhairo, M.; Verma, A.; Wichmann, O.; Sattler, M.; Wilmanns, M.; Schultz, C., *"Probing lipid- and drug-binding domains with fluorescent dyes."* *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008,** *16* (3), 1162-1173.

[264] Jose, J.; Loudet, A.; Ueno, Y.; Barhoumi, R.; Burghardt, R. C.; Burgess, K., *"Intracellular imaging of organelles with new water-soluble benzophenoxazine dyes."* *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010,** *8* (9), 2052-2059.

[265] Descalzo, A. B.; Martinez-Manez, R.; Radeglia, R.; Rurack, K.; Soto, J., *"Coupling selectivity with sensitivity in an integrated chemosensor framework: Design of a Hg2+-responsive probe, operating above 500 nm."* *Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (12), 3418-3419.

[266] Jose, J.; Ueno, Y.; Burgess, K., *"Water-Soluble Nile Blue Derivatives: Syntheses and Photophysical Properties."* *Chemistry-a European Journal* **2009,** *15* (2), 418-423.

[267] Link, M.; Kele, P.; Achatz, D. E.; Wolfbeis, O. S., *"Brightly fluorescent purple and blue labels for amines and proteins."* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011,** *21* (18), 5538-5542.

[268] Madsen, J.; Canton, I.; Warren, N. J.; Themistou, E.; Blanazs, A.; Ustbas, B.; Tian, X.; Pearson, R.; Battaglia, G.; Lewis, A. L.; Armes, S. P., *"Nile Blue-based nanosized pH sensors for simultaneous far-red and near-infrared live bioimaging."* *Journal of American Chemical Society* **2013,** *135* (39), 14863-14670.

[269] Yang, X. B.; Yang, B. X.; Ge, J. F.; Xu, Y. J.; Xu, Q. F.; Liang, J.; Lu, J. M., "Benzo[a]phenoxazinium-based red-emitting chemosensor for zinc ions in biological media". *Organic Letters* **2011,** *13* (10), 2710-2713.

[270] Jose, J.; Burgess, K., *"Syntheses and properties of water-soluble Nile Red derivatives." The Journal of Organic Chemistry* **2006,** *71* (20), 7835-7939.

[271] Jose, J.; Ueno, Y.; Burgess, K., *"Water-Soluble Nile Blue Derivatives: Syntheses and Photophysical Properties." Chemistry-a European Journal* **2009,** *15* (2), 418-423.

[272] Descalzo, A. B.; Martinez-Manez, R.; Radeglia, R.; Rurack, K.; Soto, J, *"Coupling selectivity with sensitivity in an integrated chemosensor framework: Design of a Hg2+-responsive probe, operating above 500 nm*." *Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (12), 3418-3419.

[273] Yang, X. B.; Yang, B. X.; Ge, J. F.; Xu, Y. J.; Xu, Q. F.; Liang, J.; Lu, J. M., *"Benzo[a]phenoxazinium-based red-emitting chemosensor for zinc ions in biological media." Organic Letters* **2011,** *13* (10), 2710-2713.

[274] Yang, X. B.; Yang, B. X.; Ge, J. F.; Xu, Y. J.; Xu, Q. F.; Liang, J.; Lu, J. M., *"Benzo[a]phenoxazinium-based red-emitting chemosensor for zinc ions in biological media." Organic Letters* **2011,** *13* (10), 2710-2713.

[275] Descalzo, A. B.; Martinez-Manez, R.; Radeglia, R.; Rurack, K.; Soto, J., *"Coupling selectivity with sensitivity in an integrated chemosensor framework: Design of a Hg2+-responsive probe, operating above 500 nm." Journal of the American Chemical Society* **2003,** *125* (12), 3418-3419.

[276] Jose, J.; Burgess, K., *"Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules." Tetrahedron* **2006,** *62* (48), 11021-11037.

[277] Jose, J.; Burgess, K., *"Syntheses and properties of water-soluble Nile Red derivatives." The Journal of Organic Chemistry* **2006,** *71* (20), 7835-9.

[278] Kanitz, A.; Hartmann, H.; Fricke, C., *"Siemens Aktiengesellschaft (DE)." US Patent US 6.284.889 B1* **2001**.

[279] Zaytsev, A. V.; Anderson, R. J.; Bedernjak, A.; Groundwater, P. W.; Huang, Y.; Perry, J. D.; Orenga, S.; Roger-Dalbert, C.; James, A., *"Synthesis and testing of chromogenic phenoxazinone substrates for beta-alanyl aminopeptidase." Organic & Biomolecular Chemistry* **2008,** *6* (4), 682-92.

[280] Zaytsev, A. V.; Anderson, R. J.; Bedernjak, A.; Groundwater, P. W.; Huang, Y.; Perry, J. D.; Orenga, S.; Roger-Dalbert, C.; James, A., "*Synthesis and testing of chromogenic phenoxazinone substrates for beta-alanyl aminopeptidase." Organic & Biomolecular Chemistry* **2008,** *6* (4), 682-692.

[281] Petchprayoon, C.; Yan, Y.; Mao, S.; Marriott, G., *"Rational design, synthesis, and characterization of highly fluorescent optical switches for high-contrast optical lock-in detection (OLID) imaging microscopy in living cells." Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011,** *19* (3), 1030-40.

[282] Biomerieux, Patent: US2006/121551 A1. **2006**

[283] Frade, V. H. J.; Gonçalves, M. S. T.; Moura, J. C. V. P., *"Synthesis of fluorescent water-soluble functionalised benzo[a]phenoxazinium salts." Tetrahedron Letters* **2006,** *47* (48), 8567-8570.

[284] Ferrea H. *"The chemistry of the nitro and nitroso groups" Interscience Publishers John Willey and Sons* **1969**.

[285] Gan, X.; Chi, S. M.; Mu, W. H.; Yao, J. C.; Quan, L.; Li, C.; Bian, Z. Y.; Chen, Y.; Fu, W. F., *"Cu(I) and Pb(II) complexes containing new tris(7-naphthyridyl)methane derivatives: synthesis, structures, spectroscopy and geometric conversion." Dalton Trans* **2011,** *40* (28), 7365-74.

[286] BIOMERIEUX, Patent: US2006/121551 A1. **2006**

[287] Zaytsev, A. V.; Anderson, R. J.; Bedernjak, A.; Groundwater, P. W.; Huang, Y.; Perry, J. D.; Orenga, S.; Roger-Dalbert, C.; James, A., *"Synthesis and testing of chromogenic phenoxazinone substrates for beta-alanyl aminopeptidase." Organic & Biomolecular Chemistry* **2008,** *6* (4), 682-92.

[288] Schill, H.; Nizamov, S.; Bottanelli, F.; Bierwagen, J.; Belov, V. N.; Hell, S. W., *"4-Trifluoromethyl-substituted coumarins with large Stokes shifts: synthesis, bioconjugates, and their use in super-resolution fluorescence microscopy." Chemistry A European Journal* **2013,** *19* (49), 16556-65.

[289] Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bäuerle, P., *"Single-Compound Libraries of Organic Materials: Parallel Synthesis and Screening of Fluorescent Dyes." Angewandt Chemie International Edition* **2001,** *40* (24), 4677-4679.

[290] Richard, J. A.; Massonneau, M.; Renard, P. Y.; Romieu, A., *"7-hydroxycoumarin-hemicyanine hybrids: a new class of far-red emitting fluorogenic dyes." Org Lett* **2008,** *10* (19), 4175-8.

[291] Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bäuerle, P., *"Single-Compound Libraries of Organic Materials: Parallel Synthesis and Screening of Fluorescent Dyes." Angewandt Chemie International Edition* **2001,** *40* (24), 4677-4679.

[292] Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q., *"A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes." Organic Letters* **2004,** *6* (24), 4603-4606.

[293] Fletcher, A. N.; Bliss, D. E., *"Laser dye stability. Part 5." Applied Physics* **1978,** *16*, 289-295.

[294] Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H., *"New coumarin dyes with rigidized structure for flashlamp-pumped dye lasers" Optics Communications* **1975,** *13* (3), 222-225.

[295] Fournier, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Maurin, S.; Beaupierre, S.; Baudin, J. B.; Jullien, L., *"Coumarinylmethyl caging groups with redshifted absorption." Chemistry A European Journal* **2013,** *19* (51), 17494-507.

[296] Tkach, I. I.; Reznichenko, A. V.; Lukyanets, E. A., *"Reaction of 4-dimethylsalicylaldehyde with malononitrile." Chemistry of Heterocyclic Compounds.* **1992,** *28*, 872 -880.

[297] Wood, L. L.; Sapp, J., *"Coumarin-3-carboxylic Acids." The Journal of Organic Chemistry* **1965**, 312-313.

[298] Augustine, J. K.; Bombrun, A.; Ramappa, B.; Boodappa, C., *"An efficient one-pot synthesis of coumarins mediated by propylphosphonic anhydride (T3P) via the Perkin condensation." Tetrahedron Letters* **2012,** *53* (33), 4422-4425.

[299] Lee, S.; Sivakumar, K.; Shin, W. S.; Xie, F.; Wang, Q., *"Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006,** *16* (17), 4596-9.

[300] Signore, G.; Nifosi, R.; Albertazzi, L.; Storti, B.; Bizzarri, R., *"Polarity-sensitive coumarins tailored to live cell imaging." Journal of American Chemical Society* **2010,** *132* (4), 1276-1288.

[301] Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bäuerle, P., *"Single-Compound Libraries of Organic Materials: Parallel Synthesis and Screening of Fluorescent Dyes." Angewandt Chemie International Edition* **2001,** *40* (24), 4677-4679.

[302] Welser, K.; Grilj, J.; Vauthey, E.; Aylott, J. W.; Chan, W. C., "Protease responsive nanoprobes with tethered fluorogenic peptidyl 3-arylcoumarin substrates." *Chem Commun (Camb)* **2009,** (6), 671-673.

[303] Matos, M. J.; Vazquez-Rodriguez, S.; Borges, F.; Santana, L.; Uriarte, E., "Synthesis of 3-arylcoumarins via Suzuki-cross-coupling reactions of 3-chlorocoumarin." *Tetrahedron Letters* **2011,** *52* (11), 1225-1227.

[304] Schiedel, M. S.; Briehn, C. A.; Bäuerle, P., *"Single-Compound Libraries of Organic Materials: Parallel Synthesis and Screening of Fluorescent Dyes." Angewandt Chemie International Edition* **2001,** *40* (24), 4677-4679.

[305] Schill, H.; Nizamov, S.; Bottanelli, F.; Bierwagen, J.; Belov, V. N.; Hell, S. W., *"4-Trifluoromethyl-substituted coumarins with large Stokes shifts: synthesis, bioconjugates, and their use in super-resolution fluorescence microscopy." Chemistry A European Journal* **2013,** *19* (49), 16556-15565.

[306] Jafarpour, F.; Hazrati, H.; Mohasselyazdi, N.; Khoobi, M.; Shafiee, A., *"Palladium catalyzed dehydrogenative arylation of coumarins: an unexpected switch in regioselectivity." Chemical Communications* **2013,** *49* (93), 10935-10937.

[307] Min, M.; Kim, Y.; Hong, S.*, "Regioselective palladium-catalyzed olefination of coumarins via aerobic oxidative Heck reactions." Chemical Communications* **2013,** *49* (2), 196-198.

[308] Karton-Lifshin, N.; Albertazzi, L.; Bendikov, M.; Baran, P. S.; Shabat, D., *""Donor-two-acceptor" dye design: a distinct gateway to NIR fluorescence." Journal of American Chemical Society* **2012,** *134* (50), 20412-20420.

[309] Richard, J. A.; Massonneau, M.; Renard, P. Y.; Romieu, A., *"7-hydroxycoumarin-hemicyanine hybrids: a new class of far-red emitting fluorogenic dyes." Organic Letters* **2008,** *10* (19), 4175-4178.

[310] Yang, Z.; Liu, Z.; Chen, Y.; Wang, X.; He, W.; Lu, Y., *"A new ratiometric and colorimetric chemosensor for cyanide anion based on coumarin-hemicyanine hybrid." Organic & Biomolecular Chemistry* **2012,** *10* (26), 5073-5076.

[311] Wu, J. S.; Liu, W. M.; Zhuang, X. Q.; Wang, F.; Wang, P. F.; Tao, S. L.; Zhang, X. H.; Wu, S. K.; Lee, S. T., *"Fluorescence turn on of coumarin derivatives by metal cations: a new signaling mechanism based on C=N isomerization." Organic Letters* **2007,** *9* (1), 33-36.

[312] Gordo, J.; Avo, J.; Parola, A. J.; Lima, J. C.; Pereira, A.; Branco, P. S., *"Convenient synthesis of 3-vinyl and 3-styryl coumarins." Organic Letters* **2011,** *13* (19), 5112-5.

[313] Signore, G.; Nifosi, R.; Albertazzi, L.; Storti, B.; Bizzarri, R., *"Polarity-sensitive coumarins tailored to live cell imaging." Journal of American Chemical Society* **2010,** *132* (4), 1276-1288.

[314] Khoobi, M.; Alipour, M.; Zarei, S.; Jafarpour, F.; Shafiee, A., *"A facile route to flavone and neoflavone backbones via a regioselective palladium catalyzed oxidative Heck reaction." Chemical Communications* **2012,** *48* (24), 2985-2987.

[315] Li, Y.; Qi, Z.; Wang, H.; Fu, X.; Duan, C., *"Palladium-catalyzed oxidative Heck coupling reaction for direct synthesis of 4-arylcoumarins using coumarins and arylboronic acids." The Journal of Organic Chememistry* **2012,** *77* (4), 2053-2057.

[316] Min, M.; Hong, S., *"Regioselective palladium-catalyzed direct cross-coupling of coumarins with simple arenes." Chemical Communications* **2012,** *48* (77), 9613-9615.

[317] Richard, J. A.; Massonneau, M.; Renard, P. Y.; Romieu, A., *"7-hydroxycoumarin-hemicyanine hybrids: a new class of far-red emitting fluorogenic dyes." Org Lett* **2008,** *10* (19), 4175-4178.

[318] Wang, S. P.; Deng, W. J.; Sun, D.; Yan, M.; Zheng, H.; Xu, J. G., *"A colorimetric and fluorescent merocyanine-based probe for biological thiols." Organic & Biomolecular Chemistry* **2009,** *7* (19), 4017-20.

[319] Yuan, L.; Lin, W.; Song, J., *"Ratiometric fluorescent detection of intracellular hydroxyl radicals based on a hybrid coumarin-cyanine platform." Chemical Communications* **2010,** *46* (42), 7930-7932.

[320] Lv, X.; Liu, J.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Sun, Y. Q.; Wang, P.; Guo, W., *"Ratiometric fluorescence detection of cyanide based on a hybrid coumarin-hemicyanine dye: the large emission shift and the high selectivity." Chemical Communications* **2011,** *47* (48), 12843-12845.

[321] Sun, Y. Q.; Liu, J.; Zhang, J.; Yang, T.; Guo, W., *"Fluorescent probe for biological gas SO2 derivatives bisulfite and sulfite." Chemical Communications* **2013,** *49* (26), 2637-9.

[322] Castanet, A. S.; Colobert, F.; Broutin, P. E., *"Mild and regioselective iodination of electron-rich aromatics with N-iodosuccinimide and catalytic trifluoroacetic acid." Tetrahedron Letters* **2002,** *43* (29), 5047-5048.

[323] Bose, D. S.; Rudradas, A. P.; Babu, M. H., *"The indium(III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins." Tetrahedron Letters* **2002,** *2002*, 9195–9197

[324] Bayer, V.; Pastor, R.; Cambon, A., " Synthese et etude spectrale de F-alkyl-4 coumarines. " *J. Fluorine Chem.* **1982,** *20* (2), 187–202.

[325] Schill, H.; Nizamov, S.; Bottanelli, F.; Bierwagen, J.; Belov, V. N.; Hell, S. W., *"4-Trifluoromethyl-substituted coumarins with large Stokes shifts: synthesis, bioconjugates, and their use in super-resolution fluorescence microscopy." Chemistry A European Journal* **2013,** *19* (49), 16556-65.

[326] Fournier, L.; Aujard, I.; Le Saux, T.; Maurin, S.; Beaupierre, S.; Baudin, J. B.; Jullien, L., *"Coumarinylmethyl caging groups with redshifted absorption." Chemistry A European Journal* **2013,** *19* (51), 17494-17507.

[327] Albota, M. A.; Xu, C.; Webb, W. W., *"Two-Photon Fluorescence Excitation Cross Sections of Biomolecular Probes from 690 to 960 nm". Applied Optics* **1998,** *37* (31), 7352-7356.

[328] Padmawar, P.; Yao, X.; Bloch, O.; Manley, G. T.; Verkman, A. S., *"K+ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K+-sensing fluorescent indicator." Nature methods* **2005,** *2* (11), 825-827.

[329] He, H.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K., *"A fluorescent sensor with high selectivity and sensitivity for potassium in water." Journal of American Chemical Society* **2003,** *125* (6), 1468-1469.

[330] Brotin, T.; Montserret, R.; Bouchet, A.; Cavagnat, D.; Linares, M.; Buffeteau, T., "*High affinity of water-soluble cryptophanes for cesium cations." The Journal of Organic Chemistry* **2012,** *77* (2), 1198-1201.

[331] Demas, J. N.; Crosby, G. A. «*Measûrement of Photoluminescence Quantum Yields - Review*» *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, *75*, 991

[332] Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuhler, A. D. «*Calculation of equilibrium-constants from multiwavelength spectroscopic data .I. mathematical considerations*» *Talanta* **1985**, *32*, 95-101.

[333] Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbuhler, A. D. «*Calculation of equilibrium-constants from multiwavelength spectroscopic data .II. Specfit - 2 user-friendly programs in basic and standard fortran-77*» *Talanta* **1985**, *32*, 257-64.

[334] Tengo Mouelet, A., *« Propriétés extractantes des calixarènes fonctionalisés avec des fonctions neutres et carboxyliques. Effet de la longueur des groupes pendant sur la sélectivité d'extraction. » . Thèse* **2007**.