HAL
open science

Conception de faux substrats fluorescents (FFS) dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotides et de la Sialine

Lilian Dubois

To cite this version:

Lilian Dubois. Conception de faux substrats fluorescents (FFS) dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotides et de la Sialine. Chimie organique. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05P638 . tel-01151635

HAL Id: tel-01151635

https://theses.hal.science/tel-01151635

Submitted on 13 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

De l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Conception de faux substrats fluorescents (FFS) dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotides et de la Sialine.

Présentée par :

Lilian DUBOIS

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

CNRS UMR 8601

Université Paris-Descartes

45, rue des Saints-Pères, 75 270 Paris Cedex 06

Soutenance prévue le 15 novembre 2013 devant le jury composé de :

Dr Jean-Marc ESCUDIER	Rapporteur
Pr Didier DUBREUIL	Rapporteur
Pr Isabelle GILLAIZEAU	Examinateur
Dr Franck DENAT	Examinateur
Dr Bruno GASNIER	Examinateur
Dr Isabelle McCORT	Directeur de Thèse
Dr Nicolas PIETRANCOSTA	Co-Directeur

THESE DE DOCTORAT

De l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Conception de faux substrats fluorescents (FFS) dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotides et de la Sialine.

Présentée par :

Lilian DUBOIS

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

CNRS UMR 8601

Université Paris-Descartes

45, rue des Saints-Pères, 75 270 Paris Cedex 06

Soutenance prévue le 15 novembre 2013 devant le jury composé de :

Dr Jean-Marc ESCUDIER	Rapporteur
Pr Didier DUBREUIL	Rapporteur
Pr Isabelle GILLAIZEAU	Examinateur
Dr Franck DENAT	Examinateur
Dr Bruno GASNIER	Examinateur
Dr Isabelle McCORT	Directeur de Thèse
Dr Nicolas PIETRANCOSTA	Co-Directeur

A ma fille,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à M. Didier DUBREUIL et M. Jean-Marc ESCUDIER qui me font l'honneur d'être les rapporteurs scientifiques de ma thèse ainsi qu'à Mme Isabelle GILLAIZEAU, M. Franck DENAT et M. Bruno GASNIER d'examiner mon travail.

Je remercie MmeFrancine ACHER pour m'avoir acceuilli au sein de son équipe et de m'avoir laissé une grande autonomie de travail.

Je tiens à remercier ma Directrice de thèse, Mme Isabelle McCORT, pour son aide, ses conseils et sa bonne humeur constante pendant ces trois années. Je m'excuse pour ces innombrables heures passées à corriger ma thèse, celle-ci n'aurait sûrement jamais vu le jour si tu n'avais pas été présente. Tu as toujours été là dans les moments de doutes et tu m'as beaucoup appris scientifiquement, tu resteras ma « maman » de labo. Merci pour tous ces bons moments et merci de m'avoir appris que le soppalin était commestible…

Je tiens également à remercier un acteur important de cette thèse, Mr Nicolas PIETRANCOSTA, , mon co-directeur de thèse. Un merci de niveau international por ta patience, tes conseils, ta gentillesse et ton soutien dans les moments difficiles. Cette thèse n'aurait pas pu grandir sans toi, ton apport scientifique et personnel m'a beaucoup apporté. Tu m'as tant appris que je ne sais comment te remercier. Pour finir, un dernier remrciement car aujourd'hui, grâce à toi, j'ai compris tout le sens du mot ZEN…

Ah oui et Chef, quand t'aura 5 min j'aurais une dernière question…

Un grand merci à mes Collègues et Amis sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur :

Mon Franky, après ton départ les journées étaient étrangement plus longues. Merci pour tous ces merveilleux moments, ta présence, ton aide et ton soutient. Je n'oublierais jamais ces journées à rallonge que l'on passait au labo baigner par de douces vapeurs d'éther. Merci de m'avoir formé… euh… déformé, peut-être un jour l'élève dépassera le maître…

Dédé, le labo ne tournerait pas sans toi ! Tu as toujours été présente pour m'apprter ton aide et ton soutien et toujours avec le sourire ! Merci pour tous ces bons moments et pour m'avoir appris à faire passer des idées sans parler ! J'ai appris à te connaître, par exemple, je sais maintenant que quand tu as ton manteau et ton sac sur l'épaule c'est en fait… que tu as froid… Merci d'être toi-même.

Assia, merci, bien sûr pour le temps passé à chercher mes molécules sur le spectro, mais avant tout pour ton soutient et ta bonne humeur. Tu m'as permis de comprendre que tous pouvait s'obtenir à l'aide d'un simple sourir.

Merci à Bruno, ma porte sera toujours grande ouverte, tu seras toujours le bienvenue ! A Younes, dit la « rascasse ,; à Toinette et Babar ! A Rominou, c'était cours mais intense, à toi de reprendre le flambeau !

Ce fut dur, ce fut long, mais qu'est ce que ce fut bon ces quatres annéess passés à vos côtés !

Je remercie M. Bruno Gasnier et Anne-Chrisine LONGIN pour leurs implication et leurs conseils avisés sur la réalisation et la mise en place de tests biologiques. Mais surtout pour les nombreuses molécules testés par leurs soins.

Je remercie aussi M. Marcal PASTOR-ANGLADA et son équipe pour avoir pris pars à ces sujet et testé les molécules synthétisées.

A tous les membres de l'UMR et à mes anciens professeurs, pour ces années passées à vos côtés, les nombreuses interactions scientifiques, les bons moments et les fous rires que nous avons pu partager. Un remerciement tout particulier à Karine, mon professeur qui m'a suivie depuis ma première année de FAC, les loulous finissent par grandir…

Enfin, un grand merci à tous mes proches. Merci à ma mère et mon frère de m'avoir épaulé tout au long de ma vie. Merci à Lucie, qui m'accompagne et me supporte depuis plus de 10 ans et sans qui je n'en serais pas là. Merci à ma princesse, Sarah, pour tout le bonheur que tu m'as apporté et qui m'a permis de tenir bon.

Et merci à vous, lecteurs de cette thèse.

Abréviations :

λem : longueur d'onde d'émission
λexc : longueur d'onde d'excitation
ΔpH : gradient de pH
ΔS : déplacement de Stokes
^{13}C : ^{13}Carbone
^{1}H : ^{1}proton
2-NBDG : 2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-désoxyglucose-nitrobenzofurazane)
6-NBDG : 6-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxyglucose (6-désoxyglucose-nitrobenzofurazane)
AcOH : acide acétique
Ach : acétylcholine
ADP : adénosine diphosphate
AMP : adénosine monopohosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APTS : acide *para*-toluène sulfonique
AP_3P : diadénosine triphosphate
Arg : arginine
ARN : acide ribonucléique
Asp : aspartate
ATP : adénosine triphosphate
BIM : bis-indolylmaléimide
BFP : blue fluorescent protein
Boc : *tert*-butyloxycarbonyle
Boc_2O : dicarbonate de di-*tert*-butyle
Cbz : benzyloxycarbonyle
CCM : chromatographire sur couche mince
CDI : carbodiimidazole
CI_{50} : concentration nécéssaire pour inhiber 50 % de l'activité mesurée
CFP : cyan fluorescent protein
CNT : concentrative nucleoside transporter
Cys : cystéine
DABCO : 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane
DAT : transporteur plasmique de dopamine
DBU : 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-ène
DDQ : dichlorodicyanoquinone
DDP : dichlorodicyanophénol
DIDS : acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique
DIEA : *N,N*-diisopropyléthylamine
dNTP : désoxynucléotide triphosphate
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxide
DO : densité optique
EDC : 1-éthyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ENT : equilibrium nucleotide transporter
ESI : electrospray
FFN : false fluorescent neurotransmitter (faux neurotransmetteur fluorescent)
FFS : false fluorescent substrat (faux substrat fluorescent)
Fmoc : 9-fluorénylméthylèneoxycarbonyle
FRET : transfert d'énergie de fluorescence par résonance ou Förster resonance energy transfer
GABA : gamma-aminobutyric acid (acide γ-aminobutyrique)
Gln : glutamine
GlpT : transporteur de glycérol-3-phosphate
GLT : transporteur plasmique de glutamate
Glu : glutamate
GLUT : transporteur plasmique de glucose
GTP : guanosine triphosphate
Gly : glycine

h : constante de Planck
His : histidine
HBTU : hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HMBC : heteronuclear multiple bond correlation (corrélation proton-carbone à longue distance)
HSQC : heteronuclear single quantum correlation (corrélation proton-carbone à courte distance)
HPLC : high perfomance liquid chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
HOBt : hydroxybenzotriazole
HRMS : high resolution mass spectrometry (spectromérie de masse à haute resolution)
I_λ : intensité de fluorescence à la longueur d'onde λ
I_A : intensité de fluorescence absorbée
I_f : intensité de fluorescence ou brillance
IR : infra-rouge
ISSD : infantile sialic acide storage disease
ITP : inositol triphosphate
*K*m : constante de Mickaëlis
Lys : lysine
MFS : major facilitator superfamily
MHz : mégahertz
NBZ : nitrobenzofurazane
NET : transporteur plasmique de noradrénaline
Neu5Ac : acide *N*-acétyl-5-neuraminique
Neu5Gc : acide *N*-glycolyl-5-neuraminique
NOESY : nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (corrélation proton-proton dans l'espace)
n : indice de réfraction
η : indice de viscosité d'un solvant
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NPT : transporteur plasmique phosphate Na^+-dépendant
pH : potentiel d'hydrogène
p*K*a : potentiel d'acidité
PKA : protéine kinase A
ppm : partie par million
RMN : résonance magnétique nucléaire
RSA : relation structure activité
SE_{Ar} : substitution électrophile aromatique
SERT : transporteur plasmique de sérotonine
SLC : solute carrier
SN_1 : substitution nucléophile de type 1
SN_2 : substitution nucléophile de type 2
SN_{Ar} : substitution nucléophile aromatique
SNC : système nerveux central
SNP : système nerveux périphérique
STh : noyau sous-tahalmique
$t_{1/2}$: temps de demi-vie
T.A. : température ambiante
TBTU : tétrafluoroborate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TEP : tomographie à émission de positrons
THF : tétrahydrofurane
UTP : uridine triphosphate
UV : Ultra-violet
VAChT : transporteur vésiculaire d'acétylcholine
v-ATPase : pompe à protons vésiculaire
vHTS : virtual high troughput screening
VGAT ou VIAAT : transporteur vésiculaire d'amino-acides inhibiteurs
VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate
VMAT : transporteur vésiculaire de monoamines
VNUT : transporteur vésiculaire de nucléotides
YFP : yellow fluorescent protein

Table des matières

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION **1**

I. INTRODUCTION A LA FLUORESCENCE **4**

I.1 HISTORIQUE **4**

I.1.a Origine de la fluorescence : luminescence *5*

I.2 PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE LA FLUORESCENCE **6**

I.2.a Longueurs d'onde d'excitation et d'émission (maximum du spectre) : λex/em et déplacement de Stokes *6*

I.2.b Coefficient d'extinction ou absorbance spécifique: ε *7*

I.2.c Rendement quantique de fluorescence: Φ_F *7*

I.2.d Temps de vie de fluorescence: $t_{1/2}$ *8*

I.3 INFLUENCE DE L'ENVIRONNEMENT SUR LA FLUORESCENCE **8**

I.3.a Quenching : inhibition de la fluorescence *9*

I.3.b Auto-fluorescence *10*

I.3.c Mécanismes d'oxydations : « photobleaching » et « fading » *11*

I.3.d Effet de température *11*

I.3.e Effet de la viscosité, de la polarité et du pH de la solution *11*

I.3.e.i Effet de la viscosité du solvant : 11

I.3.e.ii Effet de la polarité du solvant : 11

I.3.e.iii Effet du pH : 12

I.3.e.iv Bilan : 12

II. FLUORESCENCE EN BIOLOGIE **14**

II.1 HISTORIQUE **14**

II.2 PRINCIPE ET UTILISATION **14**

II.2.a Les protéines fluorescentes : GFP et dérivées *14*

II.2.b Quantum-dots *18*

II.2.c Les « petites » molécules organiques fluorescentes : colorants, sondes fluorescentes *19*

II.2.d Conclusion *21*

III. ÉTUDES DE TRANSPORTEURS PAR FLUORESCENCE **22**

III.1 LES TRANSPORTEURS **22**

III.2 LES SLCS **23**

III.2.a Généralités *23*

III.2.b Etude de transporteurs appartenant aux SLCs par fluorescence *24*

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS **29**

IV. OBJECTIFS : LES SLCS 17 ..... **31**

IV.1 GÉNÉRALITÉS **31**

IV.2 LE TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DE NUCLÉOTIDES (VNUT) **32**

IV.2.a Généralités *32*

IV.2.b État de l'art *33*

IV.3 LE TRANSPORTEUR LYSOSOMAL D'ACIDE SIALIQUE : SIALINE **34**

IV.3.a Généralités *34*

IV.3.b Résultats préliminaires *35*

V. APPROCHE CHIMIQUE **38**

CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT DE MOLECULES FLUORESCENTES **45**

VI. SYNTHESE DE FLUOROPHORES **47**

VI.1 MOTIF ÉTHENO-ADÉNINE **47**

VI.1.a Synthèse *48*

VI.1.b Fonctionnalisation : Alkylation de l'adénine en N-9 ..... *48*

VI.1.c Formation du cycle éthéno *51*

VI.1.d Bilan *52*

VI.2 COUMARINE **53**

VI.2.a Synthèse par la méthode de Pechmann (catalysée par Acide de Brønsted) *55*

VI.2.b Synthèse par la méthode de Pechmann (Acide de Lewis) *56*

VI.2.c Fonctionnalisation des coumarines en 4 et 7 ..... *58*

VI.2.d Bilan : *61*

VI.3 QUINOLÉINE/QUINOLINONE **62**

VI.3.a Motif quinoléine *62*

VI.3.a.i Généralités : 62

VI.3.a.ii Synthèse : 63

VI.3.b Motif quinolinone *64*

VI.3.b.i Généralités : 64

VI.3.b.ii Synthèse : 66

VI.3.c Bilan : *68*

VI.4 NITROBENZOFURAZANE (NBZ) **69**

VI.5 RÉSORUFINE **70**

VI.6 MOTIF XANTHÈNE (DÉRIVÉ DE LA FLUORESCÉINE) **71**

VI.6.a Synthèse : *71*

VI.6.b Bilan *75*

VI.7 CONCLUSION **75**

VII. SYNTHESES DE FFNS POTENTIELS DE VNUT 77

VII.1 PRÉPARATION DE RIBOSE MODIFIÉ 77

VII.1.a Synthèse du « ribose activé » 77

VII.1.b Synthèse de ribosylamine 82

VII.2 COUPLAGES ENTRE FLUOROPHORE ET RIBOSE 83

VII.2.a A partir du ribose "activé" 83

VII.2.b A partir de l'aminoribose : 88

VII.2.c A partir d'autres motifs fluorescents : 89

VII.3 CONCLUSION 91

VIII. PHOSPHORYLATION 93

VIII.1 INTRODUCTION: 93

VIII.2 SYNTHÈSES 94

VIII.3 CONCLUSION 98

IX. SYNTHESES DE FFS POTENTIELS DE LA SIALINE. 99

IX.1 ETUDE DE SMA ET RSA AUTOUR DE LA TOUCHE N8 100

IX.1.a Importance de la chaine latérale/nature des acides aminés 100

IX.1.b Préparation de 2 acides aminés d'intérêt pour un couplage ultérieure : 101

IX.2 INSERTION DE MOTIFS FLUORESCENTS SUR LES ACIDES AMINÉS 102

IX.2.a Couplage par formation d'une liaison amide et thio-ester 102

IX.2.b Couplage par liaison carbamate 106

IX.2.c N-alkylation d'acides aminés par substitution Nucléophile 107

IX.2.d Autres dérivés : 109

IX.3 CONCLUSION 110

CHAPITRE 4 : MESURES DES PROPRIETES DE FLUORESCENCE 111

X. PROPRIETES DE FLUORESCENCE DES COMPOSES 113

X.1 CALCULS DES PROPRIÉTÉS DE FLUORESCENCE 113

X.2 RÉSULTATS 115

X.2.a Motif éthéno 115

X.2.b Motif coumarine 116

X.2.b.i Modification de la position 7 : 116

X.2.b.ii Etude de la position 4 : 119

X.2.c Motif quinolinone 121

X.2.d Motif résorufine 123

X.2.e Motif xanthènes *123*

X.3 CONCLUSION **124**

CHAPITRE 5 : EVALUATIONS BIOLOGIQUES **127**

XI. LE TRANSPORTEUR VESICULAIRE DE NUCLEOTIDES : VNUT **131**

XI.1 MISE EN PLACE DES TESTS BIOLOGIQUES **131**

XI.1.a Tests d'inhibition *132*

XI.2 CONCLUSION **135**

XI.3 VALORISATION DES DÉRIVÉS NUCLÉOSIDIQUES : ÉTUDE SUR CNT/ENT **136**

XI.3.a Généralités *136*

XI.3.b Implication physiologique et physiopathologique *137*

XI.3.c Résultats préliminaires des tests biologiques *138*

XII. LA SIALINE **140**

XII.1 PRÉSENTATION DU TEST BIOLOGIQUE **140**

XII.2 RÉSULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES **142**

XII.2.a Test d'inhibition *143*

XII.2.b Conclusion *146*

XII.2.c Perspectives *147*

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **151**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **153**

ANNEXE **157**

PARTIE EXPERIMENTALE **165**

EXPERIMENTAL PART **167**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **231**

Chapitre 1 : Introduction

La fluorescence est un phénomène découvert il y a plusieurs siècles dont l'étude a été réellement approfondie au début du XXème siècle. Il est la conséquence de l'excitation d'une molécule par une lumière incidente qui en revenant à un état stable va réémettre une onde lumineuse différente de celle absorbée. La microscopie en fluorescence, qui est en développement constant, permet d'observer l'onde lumineuse réemise et d'obtenir des images de plus en plus précises au fil des années. Au cours du XXème et XXIème siècle, l'émergence de nouvelles molécules ou protéines, avec des propriétés de fluorescence et des propriétés physicochimiques a augmenté de manière exponentielle. La fluorescence a permis de grandes avancées dans de nombreux domaines de la biologie. Il est aujourd'hui possible de marquer génétiquement n'importe quel organisme ou type cellulaire à l'aide de molécules fluorescentes adéquates (Figure 1).

Figure 1 : Marquage par protéines fluorescentes de différents organismes et types cellulaires. A/ Marquage de deux colonies de bactéries (Myxococcus xanthus en vert et Escherichia coli en rouge).[1] B/ Marquage de nématode, C. Elegans.[2] C/ Marquage de différents compartiments cellulaires : protéines membranaires (vert et rouge) et noyaux (bleu) dans des cellules de hamster en culture.[2] D/ Marquage de neurones d'hippocampe de souris.[3]

L'utilisation de la fluorescence a permis une meilleure compréhension de mécanismes clés en biologie cellulaire, neurologie, bactériologie, virologie, immunologie… Parmi les multiples applications de la fluorescence en biologie nous nous sommes intéressés à un concept très récent : les faux neurotransmetteurs fluorescents (FFNs), que nous avons étendus à la conception de faux substrats fluorescents (FFSs).

Ce concept a été introduit par le groupe du Dr Sames qui a conçu et optimisé des molécules fluorescentes reconnues comme substrats par le transporteur vésiculaire de monoamine (VMAT2). Ces composés, une fois accumulés dans des vésicules synaptiques, ont permis la visualisation de l'activité neuronale monoaminergique en temps réel.[4-6] Les transporteurs membranaires appartiennent à une classe de protéines difficilement cristallisables, de par leur ancrage dans les membranes. Le développement de nouveaux outils permettant une étude plus approfondie de ces transporteurs est aujourd'hui un enjeu important pour les biologistes. Ce concept a servi de base pour ce travail de thèse.

Après une introduction générale sur la fluorescence et sur les familles de transporteurs membranaires, nous replacerons le contexte biologique et les approches chimiques de cette thèse. La synthèse et l'évaluation biologique de deux familles chimiques fluorescentes, en tant que faux substrats fluorescents de transporteurs appartenant aux SLC17 : le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT) et le transporteur d'acide sialique (Sialine) seront ensuite détaillées. Enfin, l'évaluation biologique sera étendue aux transporteurs nucléosidiques (CNTs/ENTs, SLC28 et 29).

I. Introduction à la Fluorescence

Après un bref historique sur la fluorescence, nous expliciterons ses principales caractéristiques (telles que le rendement quantique, le coefficient d'extinction molaire, le temps de demi-vie…), puis, nous aborderons l'influence du milieu sur les caractéristiques de fluorescence que nous aurons détaillées.

I.1 Historique

La fluorescence a été observée à de multiples reprises à travers les âges. C'est en 1565 que le chercheur N. Monardes, publie pour la première fois l'observation de l'émission de lumière par une infusion de bois de *lignum.* E. Becquerel découvre en 1842, à l'aide d'une solution de sulfure de cadmium excité par UV, que la longueur d'onde de la lumière émise est plus grande que celle reçue. Un peu plus tard c'est au tour de J. Herschel (1845) et G. G. Stokes (1852) d'observer l'émission de lumière issu de solutions de quinine (Figure 2).

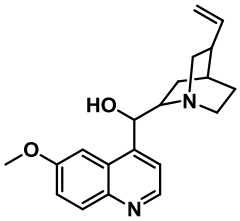


Figure 2 : Structure de la Quinine.

En 1853, G. G. Stokes introduit le terme de « fluorescence », qui désigne l'émission de photon par une molécule qui a été irradiée par une onde lumineuse. Les années suivantes apparaissent les premières mesures de luminescence (phosphoroscope conçu par E. Becquerel en 1859, et construit par L. J Duboscq), analyses fluorimétriques et synthèses de fluorophores, dont l'un des plus connu et plus étudié est la fluorescéine conçue par Baeyer en 1871 (Figure 3).

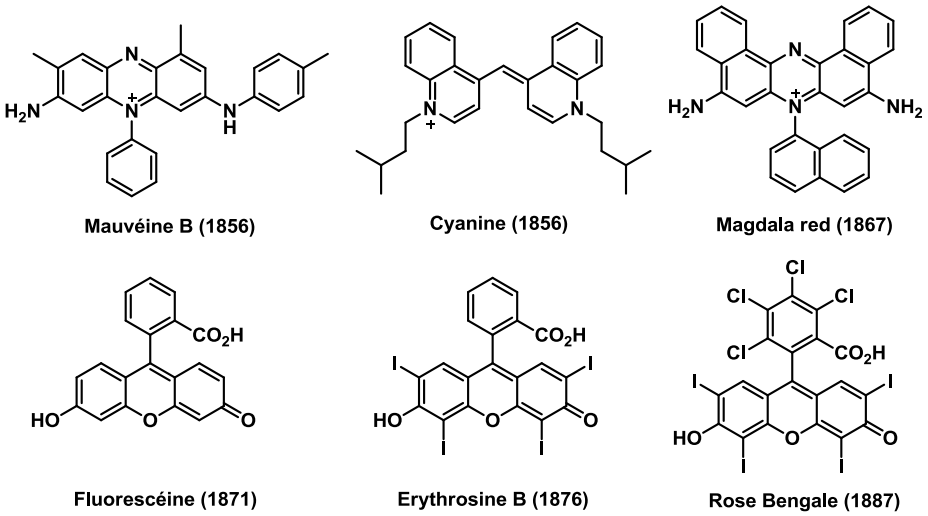


Figure 3 : Structure des premiers fluorophores synthétisés à la fin du 19ième siècle.[7]

En 1888 E. Wiedemann introduit le terme de « luminescence », qui désigne l'émission de lumière produite lors du retour vers un état de moindre énergie des électrons excités par une lumière incidente. La théorie de la

fluorescence apparait au début du XXème siècle avec la description des premiers spectres d'excitation de colorants. De nombreuses études conduites par E.L Nichols, H.L Howes et E. Merritt ont permis l'essor de la théorie de la fluorescence. J. Perrin, prix Nobel de Physique en 1926, mais aussi grand chimiste français a décrit la théorie photochimique des colorants et a beaucoup contribué au développement de la photochimie. Tout au long de sa vie J. Perrin apportera une aide précieuse pour la compréhension théorique des mécanismes de fluorescence et phosphorescence. Les physiciens Stern et Volmer, décrivent en 1919 via une l'équation portant leurs noms, la cinétique d'un mécanisme de désactivation photochimique intermoléculaire ou désactivation par quenching. Les années suivantes de nombreuses caractéristiques de la fluorescence, telles que le temps de demi-vie d'une espèce excitée ($t_{1/2}$), le rendement quantique (Φ_F) ou le coefficient d'extinction molaire (ε) sont détaillées sous forme de formule physique. En 1935, le diagramme de Perrin et Jablonski explique le phénomène complet d'absorption de la lumière par la matière et les différentes voies par lesquelles cette énergie lumineuse est réémise.

Depuis la fluorescence a été largement étudiée et utilisée, et représente aujourd'hui une alternative de choix à l'analyse par radioactivité lors de l'étude de processus biologique. [8-10]

I.1.a Origine de la fluorescence : luminescence

La luminescence regroupe tout phénomène émettant de la lumière après une excitation par une lumière incidente (Figure 4). Différentes voies d'émission de lumière sont possibles, telles que la chimiluminescence qui se produit au cours d'une réaction chimique ou encore la bioluminescence qui est la production de lumière au cours de réactions biologiques (ex : réactions enzymatiques). Ce type de phénomène passe par l'excitation de molécules ou protéines via différents mécanismes chimiques ou biologiques, qui vont en revenant à l'état fondamental émettre une source d'énergie sous forme de lumière (hv).

Figure 4 : Phénomène de luminescence[8]

L'émission d'un ou plusieurs photons par une molécule irradiée par un faisceau lumineux est un phénomène appelé photoluminescence. Ce phénomène regroupe la phosphorescence et la fluorescence qui se différencie par l'état excité énergétique impliqué lors du retour à l'état fondamental. Le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 5) décrit les divers processus impliqués dans le phénomène de photoluminescence.

Figure 5 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié[11]

L'absorption de l'onde lumineuse incidente possédant une certaine quantité (quantum) d'énergie, permet le passage de l'état fondamental S_0 à un état excité S_1. Seuls les photons dont le quantum d'énergie correspond à un niveau d'énergie autorisé de la molécule peuvent être absorbés. Dans le cas contraire les photons sont réfléchis par la molécule ou la traverse sans aucun effet. La majorité des molécules sont excitées par absorption de photons couvrant une gamme de longueur d'onde de l'ultraviolet au visible (200 à 800 nm). Plusieurs niveaux vibrationnels existent pour chaque niveau énergétique (S_2, S_1, T_1…). La désexcitation d'un

électron vers le niveau vibrationnel de plus faible énergie (ex : passage de l'état S_2 à S_1) est très fréquente. Ce processus est appelé conversion interne. Il est extrêmement rapide (10^{-11} à 10^{-9} s) et induit une perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis. Une fois l'électron à l'état excité S_1 celui-ci peut retourner à l'état fondamental S_0 par deux phénomènes de relaxations différents :

- La relaxation non radiative : dans certains cas l'électron peut revenir à son état fondamental sans émission de lumière par des voies de transition non radiatives qui dépendent de l'environnement. Lorsque la désexcitation a lieu lors de collisions avec d'autres molécules (quencheurs), il s'agit d'une inhibition dynamique de la fluorescence. Cette inhibition peut aussi être statique lorsque la désexcitation a lieu par interaction avec des molécules de solvant ou à cause de la formation d'un complexe (ou d'agglomérats) à l'état fondamental. On peut également assisté à des transferts d'énergie non-radiatifs entre molécules fluorescentes (FRET) ou des phénomènes de photoblanchiments qui seront détaillés par la suite.
- La relaxation radiative : deux phénomènes radiatifs sont également envisageables lors du retour de la molécule excitée à son état fondamental.
    - ✓ La fluorescence : Ce phénomène intervient rapidement après l'absorption du photon (de 10^{-10} à 10^{-7} secondes après l'excitation) en conduisant à une libération d'énergie sous forme de lumière. Cette lumière émise possède une longueur d'onde toujours supérieure à celle de l'excitation.
    - ✓ La phosphorescence : Ce phénomène est plus lent que la fluorescence (compris entre 10^{-7} à 1 s). Il intervient lorsque l'électron passe dans un état excité triplet T_1 par croisement intersystème non-radiatif qui implique une modification du spin de la molécule. Le passage d'un état excité triplet T_1 à un état fondamental S_0 par émission d'un photon est appelé phosphorescence.

I.2 Principales caractéristiques de la fluorescence

La fluorescence se définit par plusieurs constantes mesurables à l'aide d'un fluorimètre (Figure 6).

Figure 6 : Principe d'un fluorimètre

La source émet une lumière qui atteint l'échantillon (de concentration C), après avoir traversé une lentille et un monochromateur qui fixe une intensité et une longueur d'onde précise ($I_{\lambda 1}$). L'échantillon réémet alors une lumière avec une intensité et une longueur d'onde précise ($I_{\lambda 2}$), qui après avoir traversé un second monochromateur atteint le détecteur fournissant ainsi l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence I_f peut être calculée, pour un échantillon donné à une concentration C et pour une longueur d'onde d'excitation précise. Les différentes constantes intervenant dans le phénomène de fluorescence seront détaillées par la suite.

I.2.a Longueurs d'onde d'excitation et d'émission (maximum du spectre) : λex/em et déplacement de Stokes

Le spectre d'excitation représente les variations de l'intensité de fluorescence (I_f) en fonction de la longueur d'onde d'excitation (λex) pour une longueur d'onde d'émission fixe. Le spectre d'excitation d'une espèce est strictement superposable au spectre d'absorption (courbe de niveau auquel le composé absorbe la lumière en fonction de la longueur d'onde choisie). Pour déterminer la longueur d'onde d'excitation maximale (λex_{max}) d'une substance, on mesure la fluorescence émise à une longueur d'onde d'émission fixe (et souvent connue) en faisant varier la longueur d'onde d'excitation. Le spectre d'émission reflète les variations de l'intensité de fluorescence émise en fonction de la longueur d'onde d'émission (λem) pour une longueur d'onde d'excitation fixe. Pour déterminer la longueur d'onde d'émission maximale (λem_{max}) d'une substance on mesure la fluorescence émise à une longueur d'onde d'excitation fixe (et souvent connue) et en laissant varier la longueur d'onde d'émission. L'excitation d'un fluorophore à différentes longueurs d'onde ne change pas la λem, en revanche, l'intensité d'émission est proportionnelle à l'intensité de l'excitation (Figure 7).

Figure 7 : Spectres d'émission et d'excitation en fonction des longueurs d'onde et de l'intensité[12]

La différence entre la $\lambda\ ex_{max}$ et la λem_{max}, se traduit par la perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis lors des conversions internes ou d'autres processus non radiatifs, décrit précédemment. Cette différence est appelée déplacement de Stokes (Figure 8) et représente un effet bathochrome (déplacement du spectre vers les plus zone des plus hautes longueurs d'onde : zone infra-rouge (IR)) lors de la perte d'énergie.

Figure 8 : Déplacement de Stokes [8]

Un déplacement de Stokes élevé permet une meilleure détection du signal. En effet, un faible déplacement de Stokes et donc, un recouvrement important entre les spectres d'absorption et d'émission peut produire des phénomènes parasites. Par exemple, la réabsorption des photons émis par une molécule identique, diminue le rendement quantique et l'intensité de fluorescence rendant la détection et la visualisation du signal plus difficile par microscopie.

I.2.b Coefficient d'extinction ou absorbance spécifique: ε

Le coefficient d'extinction molaire correspond à la probabilité d'absorption de photon à une longueur d'onde d'excitation fixée. Il est généralement exprimé en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ (compris entre 5000 et 250000) et est directement corrélé avec l'intensité de fluorescence. Pour une longueur d'onde donnée, l'intensité de fluorescence sera d'autant plus grande que le coefficient d'absorption molaire sera grand.

I.2.c Rendement quantique de fluorescence: Φ_F

Si l'ε traduit la probabilité d'absorption photonique d'un composé, le rendement quantique (Φ_F) sera caractéristique de sa capacité à restituer l'énergie absorbée par fluorescence.

Le Φ_F (sans unité, compris entre 0.05 et 1) correspond donc à la probabilité d'émission d'un photon après son absorption. Plus le rendement quantique sera élevé, plus la probabilité d'émission des photons absorbés sera grande et meilleure sera l'observation de la fluorescence. Il peut être défini par le rapport entre l'intensité de fluorescence émise (I_f) sur l'intensité lumineuse absorbée (I_a) (Équation 1), nécessairement plus faible :

Équation 1 : $\boldsymbol{\Phi_F = I_f / I_a}$

Le Φ_F dépend de la molécule étudiée (polarité, concentration…), du solvant, du pH et également de la température (une augmentation de la température induit une diminution du Φ_F). L'intensité de fluorescence (sans unité), à une longueur d'onde précise, est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence :

$$I_f = \Phi_F \times I_a = \Phi_F \times (I_0 - I)$$

Avec I_0 : Intensité lumineuse incidente

I : intensité lumineuse transmise

L'intensité de fluorescence absorbée (sans unité) suit la loi de Beer-Lambert, l'expression de l'If devient alors :

$$\boldsymbol{I_f = 2.3.I_0.\ \Phi_{\lambda em}.\varepsilon.l.C}$$

L'intensité de fluorescence n'a généralement pas d'unité mais elle peut être exprimée en Einstein par secondes (avec 1 Einstein = 6.1023 photons). L'I_f dépend de l'I_0 de la source, la concentration en fluorophore, la nature du solvant, du pH et de la température.

I.2.d Temps de vie de fluorescence: $t_{1/2}$

Le temps de demi-vie correspond au temps durant lequel le fluorophore demeure dans un état excité (avant de réémettre l'énergie absorbée). Ce temps varie en fonction des fluorophore, de quelques picosecondes à plusieurs centaines de nanosecondes. Plus le $t_{1/2}$ sera court (de quelques nanosecondes jusqu'à la seconde), plus la sensibilité du fluorophore sera élevée.

I.3 Influence de l'environnement sur la fluorescence

La plupart des paramètres de fluorescence, sont dépendants des caractéristiques du milieu (le solvant (viscosité, polarité…), le pH, la température, la pression…) dans lequel se déroule ce phénomène de fluorescence. (Figure 9).[8]

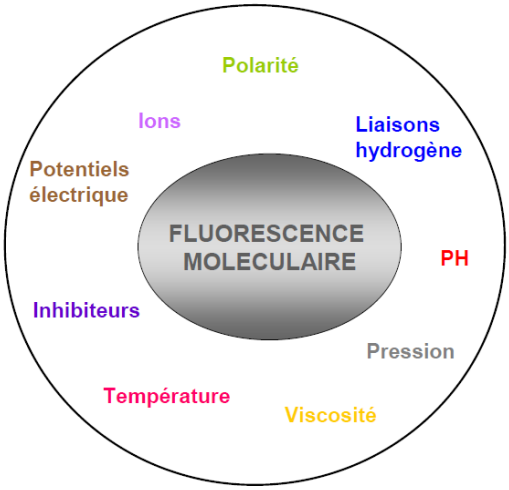


Figure 9 : Représentation des différents paramètres du milieu pouvant intervenir dans la modification de l'intensité de fluorescence.[8]

La présence dans le milieu d'autres molécules (chromophores ou oxydants…) peuvent également induire des modifications de la fluorescence. Le phénomène d'absorption étant très rapide (10^{-15} s), les spectres d'absorption seront peu sensibles au phénomène de diffusion et à la dynamique moléculaire du milieu, seul l'environnement immédiatement adjacent aux chromophores peut affecter les spectres d'absorption. A l'inverse, l'émission de photons (fluorescence) étant plus lente (temps de vie moyen ≈ 10 ns), l'environnement peut influer de manière beaucoup plus importante le spectre d'émission de fluorescence. Nous allons aborder brièvement les différents paramètres du milieu ayant un impact sur les propriétés de fluorescence.

I.3.a Quenching : inhibition de la fluorescence

Il existe quatre phénomènes possibles d'inhibition/extinction de la fluorescence (quenching), qui sont dus à la présence dans le milieu d'autres espèces moléculaires qui vont jouer le rôle d'inhibiteur de la fluorescence.[8]

« quenching de couleur » :

Ce quenching est observable lorsque des colorants sont présents dans la solution observée. Les paramètres de fluorescence du fluorophore observé restent inchangés mais lorsque que celui-ci retourne à son état fondamental en émettant un photon celui-ci est absorbé par les colorants présentants généralement de faibles propriétés de fluorescence.

« quenching statique » :

Le fluorophore à l'état fondamental établit un complexe stable et non fluorescent avec une deuxième molécule. Cette association est généralement due à des effets hydrophobes ou électrostatiques. Le fluorophore va pouvoir être excité par absorption de la lumière incidente mais son retour à l'état fondamental passera par d'autres voies que la fluorescence. Ce phénomène va dépendre de la concentration du quencheur. En effet, plus celle-ci sera élevée, moins il y aura de fluorophore libre et plus la fluorescence sera faible. Le quenching statique ne fait pas varier le $t_{1/2}$ et ne dépend ni de la viscosité du milieu, ni de la température.

« quenching dynamique » :

Le fluorophore absorbe l'énergie lumineuse, passe à l'état excité et se désactive avant réémission du photon, en subissant un contact avec un quencheur. Le quencheur se désexcitera ensuite, sans émission de lumière. Ce transfert d'énergie est rendu possible par le rapprochement de ces deux molécules par des effets électrostatiques ou hydrophobes. Le quenching dynamique fait varier le $t_{1/2}$ et est dépendant de la viscosité et de la température du milieu en agissant sur la probabilité de rencontre de ces deux molécules.

« Quenching FRET » :

Ce phénomène de FRET (Transfert d'énergie de fluorescence par résonance) s'apparente au quenching dynamique, en revanche, le quencheur présent n'absorbe qu'une partie de l'énergie du fluorophore excité, et va à son tour émettre une onde lumineuse pour retourner à l'état fondamental. On observe une diminution de l'énergie émise par le fluorophore. Ce phénomène intervient principalement par des interactions dipôle-dipôle entre le fluorophore et le quencheur, et est possible lorsque le spectre d'émission du fluorophore possède un recouvrement avec le spectre d'excitation du quencheur. Le FRET est aujourd'hui exploité dans de nombreuses études biologiques.

I.3.b Auto-fluorescence

L'auto-fluorescence ou fluorescence primaire est due à la présence de molécules biologiques naturelles intrinsèquement fluorescentes, de structure simple ou plus élaborée (

Tableau 1).

Tableau 1 : Exemple des caractéristiques des différentes molécules biologiques fluorescentes.

Chromophores	λex_{max} (nm)	λem_{max} (nm)	Φ_F	Catégorie
Tryptophane	280	348	0.2	Acides aminés
Tyrosine	275	303	0.15	Acides aminés
Phénylalanine	257	282	0.02	Acides aminés
NADH	360	460	0.02	Cofacteur
FAD/FMN	445-470	520	0.2/0.26	Cofacteur
Hème (protoporphyrine)	400	608	0.5	Cofacteur
Lipofuscines	Spectre entier	540-650	//	Lipides
EGFP	480	580	0.6	Protéine (*Aequorea victoria*)

Ce phénomène peut induire un bruit de fond important et biaiser les résultats observés. En effet, en fonction du matériel biologique utilisé et du processus observé, le fluorophore doit absorberà une longueur d'onde différente des molécules endogènes. Afin de limiter la fluorescence intrinsèque, des filtres spécifiques ont été développés permettant de ne pas exciter ou de supprimer la lumière émise par ces molécules.[13] L'ajout de quencheurs peut être une alternative. Par exemple, les lipofuscines issues des lipides ont des rendements quantiques variables et sont excitables à de très nombreuses longueurs d'onde. Lors de l'étude par fluorescence de ce type de matériel biologique, différentes méthodes ont été décrites pour pallier ce

phénomène d'auto-fluorescence, comme l'ajout de sel de cuivre ($CuCl_2$ ou $CuSO_4$) ou de colorant (Soudan black, Trypan blue) permettent de réduire considérablement voire d'abolir leurs auto-fluorescence.[14]

L'auto-fluorescence à pu également être exploitée, notamment, lors de mesures sur des tissus issus de biopsie permettant de différencier les cellules saines du colon de cellules d'adénocarcinome.[15]

I.3.c Mécanismes d'oxydations : « photobleaching » et « fading »

Le « photobleaching » (photoblanchiment) et le « fading » sont deux phénomènes issus de l'oxydation de molécules fluorescentes. Le photoblanchiment correspond à l'oxydation de la molécule fluorescente dans son état excité, conduisant à la perte irréversible de la fluorescence, contrairement au «fading » qui conduit à une diminution de l'intensité de fluorescence sur une longue période sans nécessité d'excitation lumineuse (simple oxydation). Pour limiter ces phénomènes il est possible soit, d'introduire dans le milieu des antioxydants, comme le DABCO, pour réduire la concentration d'oxygène, soit, de diminuer l'intensité lumineuse excitatrice ou d'utiliser des appareillages permettant de limiter le temps d'exposition à cette lumière.

I.3.d Effet de température

La température du milieu influence directement les propriétés de fluorescence. Une baisse de température diminue l'agitation thermique ce qui limite la probabilité de collision entre différentes molécules (solvant, quencheur…) et par conséquent diminue le quenching dynamique. Le refroidissement ralentit également les vibrations et les rotations intramoléculaires du fluorophore et conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence (

Figure 10), du rendement quantique et du temps de demi-vie.

Figure 10 : Fluorescence de la 7-diméthylcoumarine-3-carbaldéhyde en fonction de la température.[16]

I.3.e Effet de la viscosité, de la polarité et du pH de la solution

I.3.e.i Effet de la viscosité du solvant :

La viscosité du solvant, qui varie en fonction de la température et de la pression, va affecter directement l'intensité de fluorescence en faisant varier le rendement quantique et le $t_{1/2}$. L'augmentation de la viscosité du milieu (η élevé) produit le même effet que la baisse de température ; la diminution de la « liberté de mouvement » du fluorophore (vibration, rotation, déplacement) limite les différentes formes alternatives d'extinction de la fluorescence.

I.3.e.ii Effet de la polarité du solvant :

La polarité du solvant va agir sur tous les paramètres de la fluorescence. En effet, les nombreuses interactions possibles entre le fluorophore et le solvant (interaction dipôle-dipôle, liaison hydrogène…) peuvent faire varier les caractéristiques chimiques du fluorophore et ainsi entrainer des variations de ses propriétés de fluorescence. On peut observer ci-dessous les changements de longueur d'onde d'excitation et les variations de l'intensité de fluorescence émise en fonction de la polarité du solvant pour un même composé Figure 11).

Figure 11 : Exemple d'analyses de propriétés de fluorescence de la 7-diméthylcoumarine-3-carbaldéhyde en fonction de la polarité des solvants A/ Spectres d'excitation normalisés dans différents solvants *(λ_{Em} = 490 nm).* B/ Spectres d'émission dans différents solvants *(λ_{Ex} = 357 nm).*[16]

La polarité du solvant est quantifiée par unfacteur de polarité (Δf) d'après la relation de Lippert et Mataga établie à partir des constantes diélectriques des solvants (ε) et de leur indice de réfraction (n). On peut également observer de fortes variations des rendements quantiques (Φ_F) en fonction du solvant (Figure 12). Plus généralement, lorsque la polarité augmente, le rendement quantique diminue.

Figure 12 : Rendements quantiques de fluorescence (Φ_F) de la 7-diméthylcoumarine-3-carbaldéhyde en fonction du facteur de polarité (Δf) (λex = 357 nm).[16]

I.3.e.iii Effet du pH :

La protonation ou la déprotonation de groupes fonctionnels présents sur le fluorophore étudié modifient ces caractéristiques de fluorescence, soit au niveau de son rendement quantique, soit au niveau des spectres d'excitation ou d'émission. La fluorescéine est un très bon exemple pour observer l'influence du pH sur la fluorescence. En effet cette molécule possède plusieurs fonctions acido/basique qui en fonction du pH vont faire varier ses propriétés de fluorescence (Figure 13).

Figure 13 : Etude de la fluorescéine en fonction du pH A/ Spectre d'absorption B/ Spectre d'émission C/ Représentations des équilibres acido-basique. [12]

On peut observer sur les spectres d'absorption et d'émission l'impact du pH sur la fluorescence de la fluorscéine. On atteint les maximas d'absoprtion et d'émission à pH = 9, pour lequel on considère que la fluorescéine est 100% sous forme dianionique. Le passage sous forme phénolate augmente l'effet électronique mésomère donneur de cette fonction ce qui conduit à un enrichissement électronique des cycles aromatiques de la fluorescéine impactant directement ses propriétés de fluorescence. A l'inverse lorsque le pH diminue, l'intensité de fluorescence diminue jusqu'à obtenir une fluorescence presque éteinte à pH = 5 pour lequel il y un équilibre entre la forme monoanionique et neutre. Ce cas n'est pas du tout isolé et de nombreux fluorophores sont substitués par un ou plusieurs groupements ionisables.

I.3.e.iv Bilan :

Il sera donc très important de prendre en compte les différentes caractéristiques du milieu lors de futures études en fluorescence. En effet, les paramètres de fluorescence sont très variables en fonction des différents paramètres du milieu dans lequel sera placé le fluorophore. Les conditions expérimentales dans lesquelles les différentes études biologiques seront réalisées devront être précisées pour permettre une reproductibilité efficace. Par exemple, la nature des tampons (phosphate, potassium…) employés peut faire varier énormément les propriétés de fluorescence.

II. Fluorescence en Biologie

II.1 Historique

L'utilisation de la fluorescence en biologie débute avec l'arrivée des premières sondes fluorescentes (rhodamine, fluorescéine…) et du développement de la microscopie en fluorescence.

Les années 1920 voient apparaître les premiers marquages d'organismes unicellulaires (bactéries, protozoaires). Au début des années 1930, l'équipe du docteur Hopkins démontre qu'une réaction entre un isocyanate et une amine libre d'un anticorps est possible en milieu légèrement basique (pH = 9), pour la formation d'une fonction urée relativement stable. L'équipe du Dr Albert Coons utilise cette réaction pour fonctionnaliser un anticorps avec des sondes fluorescentes, marquant le début de l'immunofluorescence. Par la suite, différentes équipes ont développé une large gamme d'anticorps secondaires couplés à une grande variété de fluorochromes permettant de multiples marquages.[17-22] L'immunofluorescence a permis une avancée prodigieuse en biologie cellulaire, dans la découverte et la compréhension des mécanismes d'infections virales et bactériologiques.[23-29] Une autre avancée impressionnante concerne la découverte de la GFP. Au début des années 1960, l'équipe du Dr Shimomura isole à partir de la méduse *Aequorea*, la Green Fluorescent Protein (GFP). [30] Le concept des protéines fluorescentes a permis un nouveau bond dans l'utilisation de la fluorescence en biologie, dont le développement s'est accentué au fil des années. Le concept des quantum-dots, apparu en 1970, a connu un véritable essor à la fin des années 90. Ces nanoparticules fluorescentes ont été utilisées pour la compréhension des mécanismes clés, le marquage, la détection et la quantification de cellules eucaryotes (in-vitro et in-vivo) [31] et procaryotes.[32, 33] Le champ d'application de ces nombreux outils biologiques fluorescents s'élargit un peu plus chaque année.

II.2 Principe et utilisation

Les GFP, les quantum-dots ou encore les sondes fluorescentes, sont aujourd'hui des outils indispensables en biologie. Nous allons revenir brièvement sur chacun de ces outils.

II.2.a Les protéines fluorescentes : GFP et dérivées

- *La GFP (Green Fluorescent Protein)*

La Green Fluorescent Protein, isolée à partir de la méduse *Aequorea* (
Figure 14), a été décrite pour la première fois par l'équipe du Dr Shimomura en 1962.[30]

Figure 14 : Méduses *Aequorea Victoria* observées en chambre noire

La fluorescence de cette protéine de 238 acides aminés[34] résulte de la formation spontanée d'un chromophore, la 4-(*p*-hydroxybenzylidène)-5-imidazolinone formée à partir des résidus Ser65-Tyr66-Gly67. Lors

du repliement de la protéine, une torsion positionne idéalement la Gly67 et la Ser65 permettant l'addition nucléophile de l'azote de la glycine 67 sur le carbonyle de la sérine 65 puis la déshydratation de l'imidazolidinone conduit à la formation de l'imidazolone (Schéma 1). En présence d'oxygène moléculaire, la déshydrogénation de la liaison α-β du résidu 66 conduit à la formation du chromophore conférant à la GFP ses propriétés de fluorescence.[35, 36] Ce motif, qui se situe dans une hélice α encerclée par un cylindre de feuillet β, possède une λex_{max} avoisinant les 400 nm avec une λem_{max} à 505 nm.[37-39]

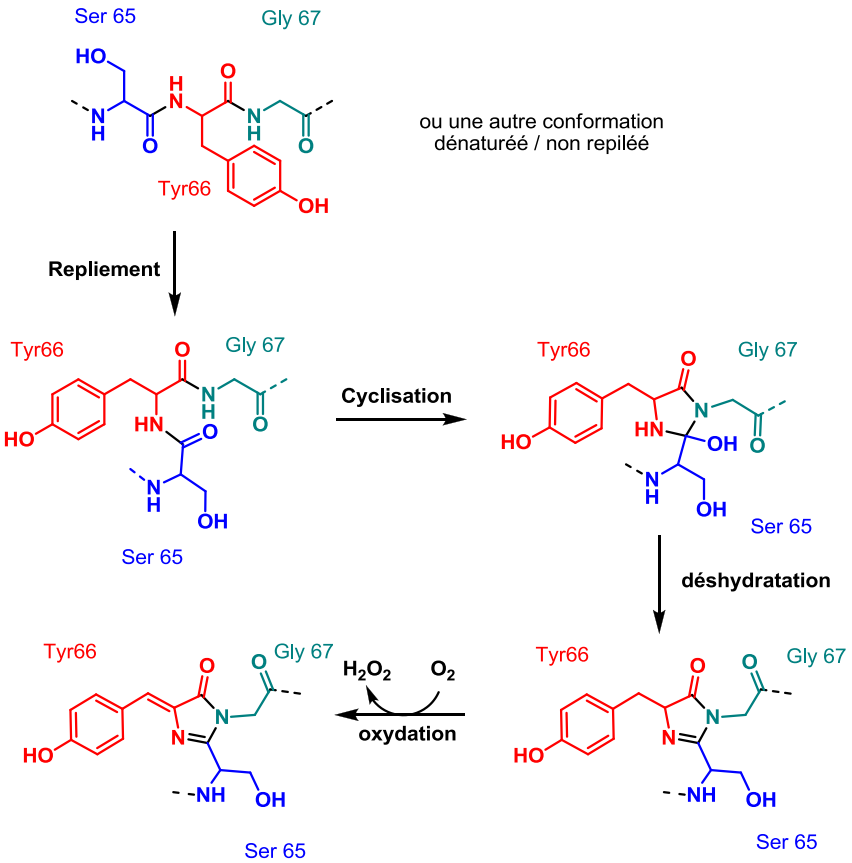


Schéma 1 : Formation du chromophore de la GFP à partir de la séquence Ser65-Tyr66-Gly67 [37]

La GFP est résistante à la chaleur, au pH alcalin, aux détergents, aux différentes protéases, aux sels organiques[40] et dans la majorité des cas, celle-ci est non-toxique et peut être exprimée dans différents organismes avec des effets mineurs sur leurs rôles physiologies.[41] En 1992, avec l'essor de la biologie moléculaire, le gène codant pour la GFP a été cloné,[34] et a permis le développement d'une part, de nouvelles techniques de production de protéines fluorescentes.[37,41] Suite à ces nombreux travaux, les Américains Martin Chalfie et Roger Y. Tsien et le Japonais Osamu Shimomura obtiennent le prix Nobel de chimie en 2008. Les protéines « GFP-like » permettent le suivi dans le temps et dans l'espace d'un nombre important de phénomènes dans des cellules vivantes et des organismes tels que, l'expression des gènes, la localisation des protéines et leur dynamique, les interactions protéine-protéine, la division cellulaire, la réplication des chromosomes et leurs organisations, les voies de transport intracellulaire…

- *Dérivés de la GFP et autres protéines auto-fluorescentes.*

Des mutations d'acides aminés de la GFP affectant ou interagissant avec le chromophore ont permis d'obtenir des mutants fluorescents dans une gamme de couleurs différentes, tels que la BFP (Blue Fluorescent Protein, Y66H), la CFP (Cyan Fluorescent Protein, Y66W) ou encore la YFP (Yellow Fluorescent Protein, T203Y).[42] Quelques mutations supplémentaires ont été ensuite introduites pour obtenir une intensité de luminescence accrue (S65T) et des propriétés de fluorescence améliorées.[38] À titre d'exemple, la mTurquoise2 obtenue par mutagénèse dirigée à partir de la CFP présente un rendement quantique 2 fois supérieur (respectivement Φ_F = 0.93 et 0.40).[43] De plus, certaines mutations peuvent induire une variation des paramètres de fluorescence plus importante en fonction du pH et aux différents paramètres environnementaux (température, concentrations en ions…).[44, 45]

Une autre protéine fluorescente, la DsRed[46, 47] a été isolée du corail *Discosoma*. Le chromophore résulte de la cyclisation des résidus Gln66-Tyr67-Gly68 selon le mécanisme décrit pour la GFP (Schéma 1) qui est suivie de la déshydrogénation de la liaison αC-N de la Gln66. Par la suite, l'obtention de mutants de la DsRed a permis d'élargir la gamme de longueurs d'onde de fluorescence disponible (Figure 15).

Figure 15 : Variantes de la GFP et autres protéines spontanément fluorescentes[48]

Il existe ainsi de nombreux dérivés de ces différents mutants offrant aujourd'hui un large choix de protéines fluorescentes qui seront sélectionnés en fonction de leurs propriétés et de l'application envisagée.

- *Applications :*

GFP en tant que gène rapporteur :

L'une des premières applications utilisant les GFPs a été l'étude de l'expression de gènes d'intérêt. En insérant un promoteur codant pour la GFP à la suite du gène étudié, il est possible de mesurer le niveau de son expression dans des cellules.[49-52] En effet, le pormoteur va permettre la transcription puis la traduction simultanée du gène d'intérêt et de celui de la GFP, conduisant à la formation de la GFP elle-même Cette méthode permet une analyse à la fois spatiale et temporelle ainsi qu'une quantification de l'expression d'un gène dans des tissus vivants par simple mesure de fluorescence.[53, 54] Toutefois, l'utilisation de cette technique va être limitée par le temps de formation du chromophore de la GFP (20 min) qui ne permettra pas l'étude de mécanismes post-transcriptionnel rapide. De plus elle est dépendante du type cellulaire étudié et de l'expression du gène analysé (en cas de trop faible expression du gène, la fluorescence de la GFP aura du mal à se distinguer du bruit de fond).

GFP en tant qu'outil temporel :

Certains mutants de la GFP, appelés Fluorescent-Timer (GFP-Timer) ont des spectres d'émission qui peuvent varier en fonction du temps.[55] L'émission de fluorescence est verte (émission à 500 nm) dans les premières heures suivant leur biosynthèse, et devient rouge (émission à 580 nm) à des temps plus tardifs.

Cette propriété est liée à la maturation de la protéine GFP en fonction du temps, ceci permet donc de « dater » des événements cellulaires, comme par exemple la séquence temporelle de l'expression de gènes impliqués dans le développement embryonnaire, rajoutant un volet à son utilisation en tant que gène rapporteur.[56]

GFP en tant que marqueur cellulaire et moléculaire :

Une autre application de la GFP réside dans l'étude de protéines ou d'organismes (Fusion Tag). En effet, lorsque le gène codant pour la GFP est fusionné avec le gène d'une autre protéine d'intérêt, celle-ci conserve son adressage et son activité (dans la grande majorité des cas) et la GFP conserve ses propriétés de fluorescence. Le suivi de la fluorescence par microscopie, permet l'étude de la localisation, du mouvement et de l'activité des protéines étudiées.[57] Des mutants (chimères) ont ainsi pu être générés chez les mammifères [58], les plantes[59], les champignons[60], les levures[61], les virus[62]... Cette approche a permis une grande avancée au niveau de l'étude de la dynamique moléculaire dans les cellules vivantes.

Un grand nombre d'études sont réalisées par des analyses FRET. En effet, le FRET est un processus dans lequel l'énergie est transférée, de façon non radiative, d'un fluorochrome dans un état excité (le donneur) à un second fluorochrome (l'accepteur). Pour que le transfert soit possible, il faut d'une part, que l'émission du premier fluorophore recouvre le spectre d'absorption du second fluorophore (la grande variété de dérivés de GFP permet de réunir cette condition ex : CFP et YFP) et d'autre part, que les fluorophores soient séparés de moins de 7 nm, distance conduisant à une dissipation totale de l'énergie émise, et que les dipôles soient parallèles (Figure 16).

Figure 16 : Conditions pour le FRET. A/ Recouvrement du spectre d'émission et du spectre d'excitation de deux fluorophores conduisant au « transfert de fluorescence ». B/ Exemple de la distance à respecter pour que ce transfert soit possible entre une CFP et une YFP.[63]

Cette technique a permis l'étude des interactions protéine-protéine (in-vivo et in-vitro) en « étiquetant » les protéines étudiées par des dérivés de GFP adéquates.[64-66] Par cette méthode des études ont notamment été réalisées autour de l'activité de protéases et de kinases.[67, 68]

GFP en tant qu'indicateur d'ions inorganiques et de métaux :

On retrouve également de nombreuses études sur la présence d'ion Ca2+ et même des mesures de concentration, dans les milieux étudiés, à l'aide de la technique FRET [69] ou Caméléons [70]. (Les GFP caméléons sont des GFP qui changent de longueur d'onde de fluorescence une fois lié à un ion inorganique ou un métal)

La GFP et ses dérivés ont également été employés en tant que bio-senseurs de métaux. La GFP ayant une forte affinité pour le Cu(II) et une faible affinité pour les autres métaux, permet l'étude de la concentration en cuivre par mesure de fluorescence. [71] Aujourd'hui, des mutations permettent d'améliorer l'affinité de la GFP pour d'autres métaux. Ainsi on peut quantifier voire même piéger des métaux toxiques tels que l'arsenic ou le cadmium.[72]

GFP en tant qu'indicateur de pH :

Un grand nombre de mutants de la GFP ont une fluorescence dépendante du pH, ce groupe de mutants appelé pHluorin permet de mesurer le pH in vivo. De nombreuses variantes de pHluorin existent : le rapport d'émission de fluorescence à 510 nm après excitation soit à 395 nm, soit à 475 nm, varie de manière

proportionnelle à la concentration en ions H^+. Ainsi, il est possible de mesurer en temps réel l'exocytose de vésicules synaptiques, en transfectant une chimère de la synaptobrévine (une protéine associée à la membrane des vésicules synaptiques) et d'un pHluorin dans des cellules neuronales.[73] Cette chimère présentera un profil d'émission différent selon que la protéine est associée à la membrane vésiculaire (pH intra-vésiculaire acide) et que celle-ci a ou n'a pas fusionnée avec la membrane plasmique (pH 7,4). Les changements de profil d'émission traduiront les événements de fusion à la membrane. D'autres études ont permis des mesures de pH aux niveaux du cytosol, de la mitochondrie ou encore de l'appareil de Golgi.[74]

Conclusion :

La GFP et ses dérivés ont, comme nous venons de le décrire, un très grand panel d'utilisation possible. De nombreuses études de phénomènes biologiques sont aujourd'hui possibles grâce au développement impressionnant de « GFP-like ». Ces GFP-like se sont imposés comme des outils indispensables lors d'études en biologie et biochimie. Cependant, des mécanismes post-transcriptionnel rapides ne peuvent être suivis par ces techniques du fait de la formation assez longue (20 min) du chromophore. Les GFP ne permettront pas d'étudier les changements conformationnelles d'uneprotéine iou de mesurer une activité biologique complexe.

II.2.b Quantum-dots

Le terme quantum-dots a été introduit pour la première fois en 1988, par le Pr. Reed et désigne des nano-cristaux semi-conducteurs fluorescents. Le diamètre de ces structures varie entre 1 et 20 nm et ils sont composés de quelques centaines voire plusieurs dizaines de milliers d'atomes.[75] Les quantum-dots possèdent un noyau inorganique semi-conducteur (CdS, CdSe, CdTe, CuCl, GaN, InAs…), entouré par une autre couche de matière inorganique semi-conductrice (ZnO, ZnS, ZnSe…) qui elle-même est recouverte de molécules organiques (ligand tri-*n*-octylphosphine) (Figure 17).

Figure 17 : Représentation de structure de quantum-dots composés de différentes couches.

La fluorescence de ce type de structure est déterminée par la différence d'écartement (« bande gap ») la bande de conduction et la bande de valence, qui dépend de la taille des nanocristaux (

Figure 18). La fluorescence de ces structures dépendra donc de leur taille.

Figure 18 : Evolution de la structure électronique entre des QDs de tailles croissantes conduisant à des longueurs d'onde d'émission différentes [76]

Les quantum-dots sont des outils fluorescents aux propriétés uniques. Ils possèdent une large gamme de longueurs d'onde d'absorption et d'émission, de hauts rendements quantiques (proche de 1), une grande photo-stabilité et une faible probabilité de photobleaching. Depuis les premières investigations biologiques à la fin des années 1990, le nombre d'applications liées aux quantum-dots croit de manière exponentielle. Nous allons détailler brièvement le potentiel de ces nanocristaux.

- *Applications :*

Les quantums dots, de part leur structure, sont facilement fonctionnalisables sur leur couche externe, permettant de très nombreuses applications qui sont pour la plupart encore en développement. Les quantum-dots ont d'abord été utilisés en tant qu'étiquette fluorescente pour la détection d'ADN, l'étude de protéines, le marquage cellulaire ou encore des études de site de liaison et d'interaction, principalement à l'aide de la technique FRET.[77, 78] Leurs domaines d'applications ne cessent de s'étendre, on retrouve aujourd'hui des études utilisant des quantum-dots pour l'étude de système neuronal ex-vivo. Néanmoins, l'application aux neurosciences est encore limitée par la taille de ces nanocristaux en comparaison la taille d'une synapse est comprise entre 10 et 40 nm. Le domaine le plus prometteur pour les quantum dots (outre le marquage de protéine) est l'application dans le domaine de l'adressage de médicaments. Les multiples fonctionnalisations possibles autour de ces structures permettent un adressage précis. Il est possible de polyfonctionnaliser ces structures par exemple par des médicaments ou d'autre molécules d'intérêts en plus d'un adressage qui permettra après excitation lumineuse une libération à un endroit précis.[79-81]

Ces outils d'imagerie, en pleine expansion, ouvrent de nouvelles voies d'analyses de différents processus biologiques et s'avère prometteur dans le domaine de la nanomédecine. Néanmoins, de nombreux problèmes restent encore à résoudre, tels que la mise au point d'une détection quantitative de la fluorescence de ces nanoparticules (qui pour l'instant ne permet que des analyses semi-quantitatives) ou encore le développement de quantum dots compatibles avec des études chez l'homme (diminution de la toxicité des ces nanocristaux)

II.2.c Les « petites » molécules organiques fluorescentes : colorants, sondes fluorescentes

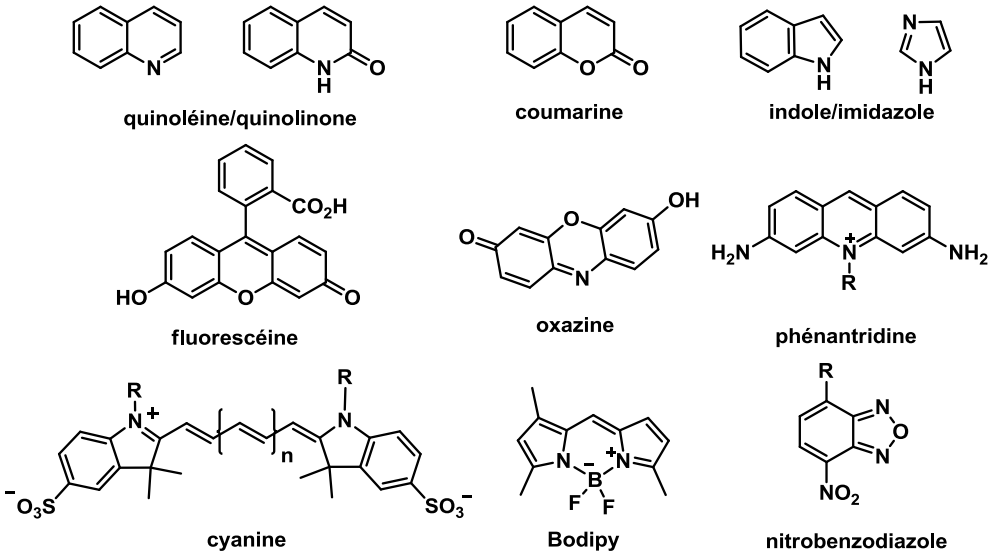


Figure 19 : Représentation des principales familles de molécules organiques fluorescentes

Depuis la découverte des premières molécules fluorescentes (type fluorescéine) et ses premières déclinaisons synthétiques, de nombreuses autres classes de fluorophores ont été mises en avant (Figure 19). Tous ces fluorophores et leurs dérivés permettent d'avoir un large choix de paramètres de fluorescence en fonction de l'étude à réaliser. De très nombreuses applications biologiques découlent aujourd'hui de ce panel de fluorophores. Nous allons présenter de manière succincte quelques une de ces applications.

➢ *Applications:*

Les petites molécules fluorescentes sont devenues des outils indispensables pour les études biologiques. Leur champ d'application ne cesse de s'élargir. Aujourd'hui, elles sont utilisées dans le marquage, la structure et les interactions au niveau cellulaire (localisation, quantifications…), dans l'étude enzymatique et protéique, en tant que marqueurs de biomolécules d'intérêt (biodisponibilité, localisation…), en tant qu'indicateurs (sondes) d'ions inorganiques, de métaux et de pH.[12] Il est difficile d'être exhaustif sur toutes les applications des petites molécules organiques fluorescentes et seules quelques applications utilisant ces sondes fluorescentes seront détaillées ci-dessous.

Indicateurs d'ions inorganiques et de métaux (Ca^{2+}, K^{+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}…) :

Les premiers indicateurs d'ions ont été synthétisés par l'équipe du Dr Tsien dans les années 80 pour la quantification des ions calciques au niveau cytosolique. Ces indicateurs possèdent en général 4 ou 5 fonctions acide carboxylique qui vont jouer le rôle de pince spécifique (chélatant). Lorsque l'ion calcique chélate les carboxylates, les propriétés de fluorescence des sondes vont être modifiées permettant ainsi la détection et la quantification des ions (Figure 20).

Figure 20 : A/ Représentation du fura-2 et de son interaction avec les ions calcium B/Spectre d'excitation et d'émission de fura-2 en fonction des concentrations en ions calcium (0-39.8 µM)[12]

Depuis ces premières études, de nombreux autres indicateurs d'ions inorganiques mais également des indicateurs de métaux ont été développés. Outre les études biologiques permettant une meilleure compréhension de l'implication des ions inorganiques dans différents mécanismes physiologiques [82, 83]ces sondes sont aujourd'hui utilisées dans des mesures quantitatives de métaux lourds (cadmium, plomb, mercure…) ayant de fortes implications pathologiques. Ces mesures peuvent être réalisées chez l'homme et les plantes permettant ainsi des mesures facilitées et plus rapides (Figure 21).[84]

Figure 21 : Exemple d'utilisation de molécules fluorescentes pour la détection de métaux. Présence de zinc aux niveaux des tissus des nervures et du limbe d'une feuille de peuplier. (Photo: Pierre Vollenweider (WSL))

Indicateurs de pH :

De nombreux indicateurs de pH sont aujourd'hui disponibles sur le marché. Comme nous l'avons vu précédemment, le pH joue un rôle important dans les propriétés de fluorescence des fluorophores possédant des groupements ionisables (Figure 22).

Figure 22 : A/ Structure de deux indicateurs de pH acide. B/ Spectre d'excitation et d'émission de l'Oregan green 514 en fonction du pH[12]

En utilisant cette propriété, de nombreuses études ont été réalisées dans le but d'étudier le pH de différents compartiments cellulaires, tels que les organelles ou les lysosomes.[85]

Marquages de protéines :

Les sondes fluorescentes, appelées aussi « tag » ou traceurs, présentent un groupement fonctionnel électrophile permettant la formation d'une liaison covalente avec une fonction réactive (amine, thiol) présente sur les chaînes latérales de la protéine. En général, ces sondes sont fixées de manière covalente sur la partie terminale de la protéine afin de ne pas altérer les propriétés physiologiques de la protéine (Figure 23). De nombreuses méthodes de marquage de protéines d'intérêt ont ainsi été développées.[86]

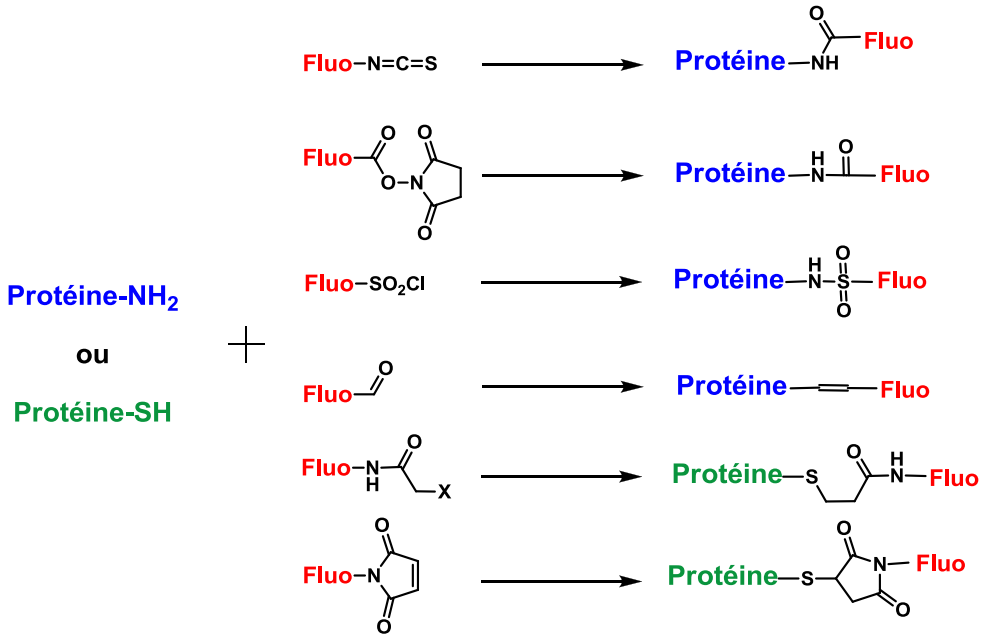


Figure 23 : Exemples de réactions conduisant au marquage des protéines par des fluorophores.

A l'aide de ce marquage on peut détecter, observer la distribution et la localisation mais aussi étudier les fonctions biologiques des protéines marquées [87]

Mime de substrat fluorescent :

Des molécules fluorescentes ont aussi été développées en tant que « faux » substrats fluorescents dans le cadre d'études d'enzymes, de récepteurs ou encore de transporteurs pour des études de compétition entre ligand ou substrat naturel et un mime fluorescent.[4, 88, 89] Ce mime possède des propriétés de fluorescence différentes quand il est à l'état libre ou quand il interagit avec la cible permettant de nombreuses analyses, d'affinité, de sélectivité, de biodisponibilité… Nous reviendrons plus en détail par la suite sur ce type de sondes fluorescentes.

II.2.d Conclusion

Les différents types de sondes que nous venons de détailler sont aujourd'hui indispensables à la biologie. On observe chaque année un nombre impressionnant de publications concernant le développement et les applications de nouvelles sondes mais également sur leur utilisation croisée. En effet, les différentes propriétés de ces sondes peuvent être associées afin d'améliorer la détection et l'analyse des phénomènes observés.[90, 91] En parallèle, les méthodes spectroscopiques de mesure de fluorescence ne cessent de s'améliorer et ainsi d'affiner les mesures effectuées.

Une grande famille de protéine, les transporteurs, restent encore difficilement étudiable de part leurs propriétés physiologiques. Le manque important d'outils pour l'étude spécifique des transporteurs plasmiques, lysosomaux ou vésiculaires nous a conduit à développer au cours de cette thèse des outils d'imagerie fluorescents permettant leurs études.

III. Études de transporteurs par fluorescence

III.1 Les transporteurs

Dans les cellules procaryotes et eucaryotes, les systèmes de transport des petites molécules organiques sont très nombreux. On trouve différentes classes de transporteurs classés selon leur mode de transport : passif ou actif.

- Le transport dit passif va permettre le passage d'ions et de petites molécules (H_2O, nucléotides, glucides…) à travers la bicouche phospholipidique sans apport d'énergie extérieur. Il englobe la diffusion simples et la diffusion facilitée (Figure 24).
  - ✓ La diffusion simple va dépendre de la membrane du type cellulaire traversé. Mais dans la grande majorité des cas, seules les molécules non chargées, liposoluble et ayant un faible poids moléculaire vont pouvoir diffusées aux travers des membranes (ex : H_2O, urée, dioxygène, éthanol…). Cette diffusion s'effectue toujours dans le sens du gradient de concentration et ne dépend que de ce paramètre.
- La diffusion facilitée regroupe toutes les protéines-canal qui peuvent être assimilées à des pores à travers la membrane et à certains transporteurs. Ces canaux et transporteurs permettent le passage de petites molécules ne répondant pas aux critères de la diffusion direct à travers la membrane. Ainsi des molécules telles que des ions (Na^+, K^+, Cl^-…), des molécules polaires chargées ou non (Glucose, ATP…) vont pouvoir traversé la membrane. Ces canaux et transporteurs peuvent être couplé à des récepteur et des protéines G et vont s'ouvrir de manières épisodiques en réponses à des stimuli spécifiques. Ces stimuli peuvent provenir de variation du potentiel de membrane, de la liaison d'un ligand aux récepteurs ou à la protéine couplé, à des variations de concentrations d'autres molécules… Ce transport va dépendre également d'un gradient de concentrations et pour le transport des ions d'un gradient électrochimique qui permet une diffusion facilitée des molécules. Ce mode de transport joue un rôle essentiel dans la réponse induite par la libération de neurotransmetteurs ou d'hormones, dans la contraction musculaire, la conduction du signal nerveux etc….
-
- Le transport actif regroupe trois types de protéines de transport : les uniporteurs, les symporteurs et les antiporteurs (Figure 24). Ces trois types de protéines ont toutes besoin d'un apport énergétique pour réalisés le transport de leur(s) substrat(s). Ces protéines ont été rassemblées en fonction de la nature de cet apport énergétique nécessaire.

- ✓ Les transporteurs appelés « pompes ioniques » utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Ils permettent le maintient du gradient ioniques (Na^+, K^+, Cl^-…) aux travers des membranes plasmiques, permettant ainsi de maintenir une pression osmotique stable entre les différents compartiments cellulaire et permettant la propagation des signaux électriques aux niveaux des nerfs et des muscles. Il est définit comme le transport actif primaire car les concentrations ioniques instaurées par ces pompes vont permettre de fournir l'énergie nécessaire aux transports d'autres molécules (transport actif secondaire).
- ✓ Les symporteurs et antiporteurs (principalement) vont utiliser l'énergie amené par l'instauration préalable d'un gradient électrochimique (via ces pompes ioniques), Ce transport actif (dit secondaire) permet le transport de molécules allant contre leurs gradients de concentration. Ce transport va permettre le passage membranaire de très nombreuses molécules (sucres, acides aminés…) indispensables aux bons fonctionnements de la quasi-totalité des processus biologiques.

Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à l'étude de transporteurs, plus particulièrement aux transporteurs SLC17 membre de la famille des SLCs (solute carrier family).

Figure 24 : Représentation des différents transporteurs classés selon leur mode de transport.

III.2 Les SLCs

III.2.a Généralités

Les SLCs (solute carriers) forment un sous-ensemble de la "superfamille" MFS (Major Facilitator Superfamily) qui regroupe tous les transporteurs présentés. Ces différents transporteurs ont été regroupés par homologie de séquence formant le sous-ensemble qui est le second plus grand groupe de transporteurs dérrière les « ATP binding casset » (ABCs) aux niveaux des cellules eucaryotes et procaryotes. Les SLCs regroupent des transporteurs d'acides gras, de sucres, d'ions inorganiques, d'acides aminés et de nombreux autres substrats. Elle englobe des transporteurs passifs, des symporteurs, antiporteurs ou encore des transporteurs mitochondriaux et vésiculaires (Figure 25).[92]

Figure 25 : Représentation des différents transporteurs appartenant ou non à la famille des SLC[92]

Une large étude menée par l'équipe de Dr Frederiksson, en 2008, a permis, à l'aide des 384 séquences de SLC décrites jusqu'alors, de générer un arbre phylogénétique regroupant tous les transporteurs de cette famille Aujourd'hui plus de 400 séquences de SLC ont été identifiés.[93] Les SLCs sont impliqués dans une multitude de processus biologiques. Un dérèglement au niveau des SLCs va être à l'origine de nombreuses pathologies, rapportées dans deux issues complètes du journal *Molecular Aspects of Medicine*[94]. Ceci explique les très nombreuses études décrites ces dernières années sur cette famille et qu'encore très récemment de nouveaux sous-types de transporteurs sont découverts (ex : VNUT en 2008 [95]).

Les transporteurs, comme toutes les protéines membranaires existantes, sont très difficile à cristalliser ou à exprimer, du fait de leurs parties hydrophobes encapsulées dans la bicouche phospholipidique de la membrane.

Uniquement 1% des structures cristallographiques déposés à ce jour dans la «Protein Data Bank» (PDB) (disponible à partir de www.rcsb.org/) sont des protéines membranaires alors qu'elles représentent 1/3 du protéome et 2/3 des cibles thérapeutiques visées sont des protéines membranaires. Pour pallier ce manque, il est indispensable de développer de nouveaux outils chimiques ou biologiques permettant l'élucidation de ces structures, ce qui permettraient d'étudier ces structures dans le cadre de l'élaboration de nouvelles molécules d'intérêt (Criblage virtuel). Ces nouveaux outils pourront permettre également une meilleure compréhension de leurs fonctions, de leurs rôles physiologiques et de leurs implications pathologiques. Une des possibilités, exploitées au cours de ce travail thèse, est le développement de nouveaux outils pharmacologiques fluorescents, qui permettent l'observation en temps réel des différents mécanismes de ces transporteurs ouvrant ainsi la voie à une meilleure compréhension de leurs rôles tant au niveau physiologique que pathologique. Différentes études que nous allons rapidement aborder ont permis de mettre en avant l'utilisation du phénomène de fluorescence lors de l'étude des transporteurs.

III.2.b Etude de transporteurs appartenant aux SLCs par fluorescence

- *Etude des GLUTs, SLC2*

Deux sondes fluorescentes ont été synthétisées à partir de la glucosamine, substrat naturel connu des transporteurs de glucose (GLUTs, SLC2) (Figure 26).

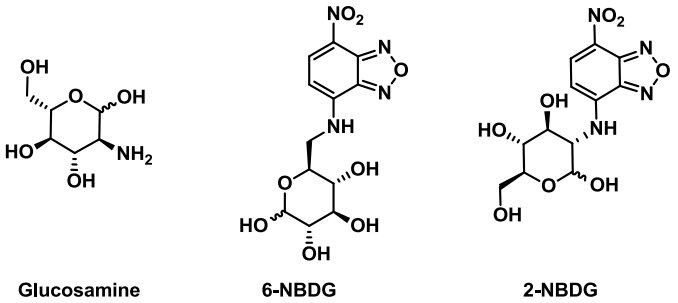


Figure 26 : Structures de la glucosamine et de sondes fluorescentes, substrats de GLUT.

Le 2-(amino-2-desoxyglucose)-nitrobenzofurazane (2-NBDG) et son analogue le 6-désoxyglucose-nitrobenzofurazane (6-NBDG) sont les premières sondes à avoir été utilisées pour étudier et caractériser les GLUTs.[96, 97] En effet, ces sondes ont permis de surveiller l'absorption du glucose par microscopie à fluorescence, assurant ainsi un suivi temporel et spatial de l'activité des GLUTs. Ces études sont rendus possibles dans divers systèmes, comme des cellules en culture, des tranches de cerveau et même sur cerveau intacte. Cette adaptabilité a permis de nombreuses applications, telles que la détection cellules tumorales[98], la visualisation du transport de glucose, après stimulation, sur des astrocytes en cultures[99, 100] ou encore la visualisation de l'absorption du glucose sur cellules gliales au niveau du cortex somato-sensoriel chez le rat.[101]

L'introduction du nitrobenzofurazane (NBZ) en position 2 et 6 du substrat n'a pas affecté la reconnaissance et le transport de substrat via GLUT, malgré l'augmentation de la taille globale de ces sondes. Une approche similaire a été réalisée sur les transporteurs CMP-acide sialique, permettant la visualisation de l'appareil de Glogi sur cellules vivantes.[102, 103] Cependant, le marquage direct de substrats naturels par des fluorophores a peu de chance d'être généralisables à tous les transporteurs. En effet, les transporteurs appartenant aux SLCs ont un site de reconnaissance très généralement adapté à la taille du substrat (généralement assez petits).

- *Etude des SLC6*

Différents substrats fluorescents ont été développés pour l'étude de différents transporteurs plasmiques de monoamines appartenant à la famille SLC6 : transporteur de dopamine (DAT, SLC6A3), transporteur noradrénaline (NET, SLC6A2) et transporteur de sérotonine (SERT, SLC6A4). Au cours du cycle synaptique ces neurotransmetteurs vont être libérés par exocytose puis réincorporés au niveau cytoplasmique via les différents transporteurs DAT, NET, SERT. L'aromaticité naturelle des monoamines, leur confèrent une autofluorescence dans l'UV. Celle-ci a été exploitée lors d'études par excitations multiphotoniques, permettant de déplacer les longueurs d'onde d'émission vers le rouge (effet bathochrome), limitant ainsi le bruit de fond dû aux autres molécules naturellement fluorescentes à ces longueurs d'onde.[104, 105] Néanmoins, cette approche est rarement employée car les signaux sont faibles. Des sondes permettant d'obtenir de meilleurs signaux ont alors été développées. Deux sondes fluorescentes, la 4-(4-diméthylaminostyryl)-*N*-méthylpyridinium (AEP^-) et la 4-(4-(diméthylamino)phényl)-1-méthylpyridinium (APP^+), dérivant de la 1-méthyl-4-phénylpyridinium (neurotoxine), ont permis de visualiser la compartimentation et le mécanisme des transporteurs plasmiques DAT, NET et SERT.[106, 107] La 5,7-dihydroxytryptamine (analogue de la sérotonine) a également été utilisée, pour étudié ces transporteurs plasmiques et vésiculaire (SLC18). Elle a permis la visualisation en temps réelle de la libération de sérotonine au niveau cellulaire[105] et a été utilisée comme étiquette des neurones monoaminergiques.[108,109] Depuis cette étude les transporteurs vésiculaires de monoamines (VMATs) ont été plus largement étudiés.

- *Etude des VMATs, SLC18*

Depuis 2009, les groupes des Dr Sames et Sulzer étudient VMAT2 à l'aide de sondes fluorescentes. VMAT2, appartenant à la famille SLC18,[110] principalement localisé dans le cerveau, est un transporteur vésiculaire de monoamines ayant une faible spécificité et une forte affinité (de l'ordre du µM) pour ces substrats naturels et non-naturels. En effet, il possède plusieurs substrats naturels tels que la sérotonine, la dopamine mais également un nombre important de substrats synthétiques portant une amine primaire (Figure 27).[111, 112]

Les substrats naturels et synthétiques connus possédant une partie aromatique, les travaux ont débuté par l'étude de la possibilité de remplacement des parties aromatiques par différents fluorophores. Le concept de faux neurotransmetteur fluorescent (FFN) est né à travers ces études. Les FFNs sont appelés ainsi par analogie avec le concept de «faux émetteur» proposé dans les années 60 par I. Kopin pour les médicaments qui subissent une libération stimulée (comme les neurotransmetteurs).[113]

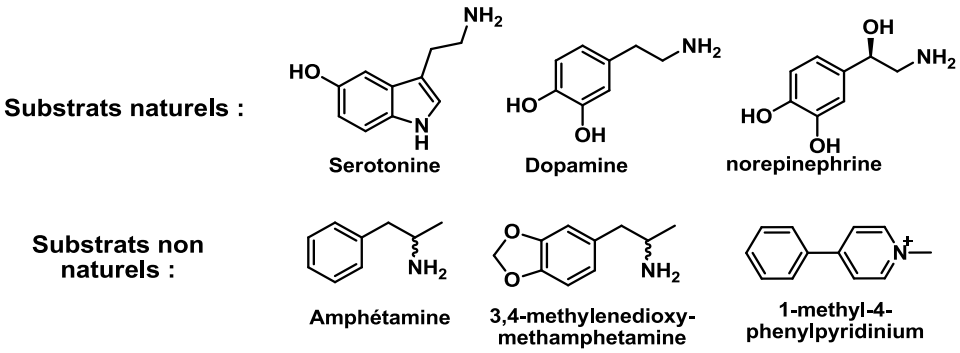


Figure 27 : Représentation structurale des différents substrats de VMAT.

Le FFN511, qui est un dérivé de coumarine, est décrit comme le premier substrat fluorescent sélectif de VMAT2 par rapport aux autres transporteurs vésiculaires.[4] Grâce à ce « traceur optique » sélectif de VMAT2, l'équipe du Dr Sames, a mis en évidence le mécanisme de transport des monoamines à l'intérieur des vésicules pré-synaptiques par observation de l'accumulation de ce FFN dans la vésicule (Figure 28).

Figure 28 : Structure du FFN511, substrats naturels de Vésicules **s vésicules.**[4]

Ils ont également réussi à visualiser la libération de monoamines au niveau de cellules de chromaffine de souris, à l'aide d'un microscope multiphotonique. En 2010, ce groupe a développé des FFNs de VMAT2 dépendant du pH.[5] Il existe une différence de pH entre le milieu extra-vésiculaire (pH = 7) et intra-vésiculaire (pH = 5-6). Ce gradient de pH instauré par la V-ATPase est indispensable pour l'entrée de monoamines dans la vésicule (

Figure 29). Il n'a jamais pu être étudié avec une aussi forte précision par manque d'outils spécifiques.

Figure 29 : Représentation du transport de monoamines via VMAT sur une vésicule pré-synaptique.[5]

Les FFNs dépendants du pH, appelés Mini possèdent un groupement électroattracteur (ex : Cl, F) en ortho de la fonction hydroxyle de la 7-hydroxycoumarine, faisant varier sensiblement le pKa. La présence et la position d'autres substituants sur le motif coumarinique modifient également le pKa du phénol (Figure 30, A/). L'analyse par un fluorimètre dans différentes conditions de pH (en tampon phosphate) a permis d'établir une courbe d'absorption/émission en fonction du pH pour le composé Mini102, qui présente une bonne sélectivité pour les synapses dopaminergique (Figure 30, B/ et C/).[6] A l'aide de ces analyses, les auteurs ont réussi à déterminer précisément le pH de 5.88 ± 0.08 à l'intérieur des vésicules (sur des cellules PC-12).

Figure 30 : A/ Structure of Mini102 and Mini202. B/ Excitation spectra of Mini202 (*λem = 458 nm*) at different pH values buffer. C/ Emission spectra of Mini202 in pH 7.43 buffer (*λex = 335 et 370 nm,*).[6]

Encore plus récemment, en 2013, ce groupe a réalisé une étude, qui a permis de remplacer un ligand radiomarqué par un dérivé fluorescent FFN206 (Km = 1.16 µM ± 0.10) lors de tests d'inhibition de VMAT2.[114]. Des mesures de déplacement de fluorescence ont permis de déterminer les CI_{50} de différents inhibiteurs connus de VMAT2 par quantification de la recapture de FFN206 par fluorescence residuel sur cellule HEK293.

Ces travaux montrent encore une fois la simplicité et la précision d'étude par fluorescence par rapport aux études classiques par mesure de radioactivité (

Figure 31).

Figure 31 : Exploitation du FFN206 pour la conception de tests d'inhibition de VMAT2. A/Mesure de CI_{50} de différents inhibiteurs par quantification de la fluorescence du FFN206 recapturé B/ Mesure d'inhibition de différents composés par quantification de la fluorescence du FFN206 recapturé.[114]

Ces études ont permis de caractériser plus précisément et de mieux comprendre le fonctionnement de VMAT2. L'objectifs de cette thèse sera d'extrapoler ces différentes études et concepts dans le cadre de l'étude de transporteurs de la famille SLC17, et plus précisément pour deux de ses transporteurs pour lesquelles assez peu d'informations sont disponibles, le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT) et la sialine.

Chapitre 2 : Objectifs

IV. Objectifs : Les SLCs 17

IV.1 Généralités

Les SLC17 englobent neuf protéines : NPT 1-4 (transporteurs de phosphates), VGLUT 1-3 (transporteurs de glutamate), la sialine (transporteur d'acides sialiques) et VNUT (transporteur de nucléotides). Ces neuf protéines sont regroupées ainsi par leur similarité de séquence (Figure 32). Elles sont structurellement liées, possédant toutes 12 domaines trans-membranaires dont les partie N- et C- terminales sont situées dans le cytoplasme.[115]

Figure 32 : Arbre phylogénétique des isoformes de la famille SLC17.[115]

Les membres des SLC17 interviennent dans le transport d'anions organiques. Les premiers membres caractérisés de cette famille sont les transporteurs plasmiques de phosphates SLC17A1-4, plus communément appelés NPT1-4. Initialement identifiés comme des transporteurs de phosphates inorganiques, des travaux plus récents ont montré l'implication des NPTs dans le transport d'autres anions inorganiques, tels que les ions chlorures, iodures ou encore bromures. Un autre membre de cette famille est le transporteur d'acide sialique, SLC17A5, appelé sialine. Cette protéine permet d'exporter des « sucres » anioniques (les acides sialiques) du lysosome vers le cytoplasme. On retrouve également dans cette famille trois isoformes de transporteurs vésiculaires de glutamate, VGLUT1-3, codés respectivement par les gènes SLC17A7, SLC17A6 et SLC17A8. Ces trois protéines sont des transporteurs vésiculaires permettant le transport (l'uptake) de glutamate du cytoplasme dans les vésicules synaptiques. Le dernier membre de la famille SLC17 a été identifié récemment[95], il s'agit du transporteur vésiculaire de nucléotide, VNUT (codé par SLC17A9), assurant l'uptake d'ATP (et d'autres nucléotides) dans les vésicules présynaptiques.

Le transport de catabolites assuré par les membres des SLC17 est très dépendant du gradient électrochimique ($\Delta\mu H^+$) qui est corrélé au potentiel de membrane ($\Delta\Psi$) et au gradient de pH (ΔpH). La concentration en ions inorganiques peut être également un paramètre important (Figure 33).[116, 117]

Figure 33 : Mécanismes physiologiques des transporteurs de la sous-famille SLC17. (A) Transport d'ions organiques au niveau des tubules rénales via NPT1 et NPT4. (B) Export d'acide sialique du lysosome vers le cytosol et ces différentes voies de métabolisation. (C) Illustration du transport de neurotransmetteurs via VGLUT ou VNUT. (D) Mécanisme de transports des différents membres de la sous-famille des SLC17.[115]

Les transporteurs de phosphates, NPT1-4, sont des symporteurs, phosphate/sodium dépendant de la concentration en ions sodium. En revanche les transporteurs, VGLUTs, sialine et VNUT sont dépendant d'un gradient de protons assuré par V-ATPase (via l'hydrolyse d'ATP). La Sialine est un symporteur acide sialique/protons (1:1), le transport via VNUT et VGLUTs, s'effectue en synergie avec celui d'ions chlorures (Figure 34). Le mécanisme de transport des ions chlorures est encore débattu aujourd'hui dans la littérature[118] et pourrait être étudier plus en détails à l'aide de nouveaux outils fluorescents que nous souhaitons développés.

Figure 34 : Exemple de transport de substrats par un membre de la famille SLC17, VGLUT. Transport dépendant du gradient électrochimique ($\Delta\mu H^+$)

Nous nous sommes intéressés, au cours de ces travaux de thèse, à deux transporteurs des SLC17, VNUT et la Sialine. Nous allons replacer plus en détails le contexte biologique des cibles choisies et les travaux déjà réalisés sur ces transporteurs avant de détailler les objectifs chimiques appliqués à ce travail de thèse.

IV.2 Le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT)

IV.2.a Généralités

Le transporteur de nucléotides (VNUT), codé par le gène SLC17A9, est présent principalement dans certaines zones du cerveau[119] mais également dans de nombreux tissus périphériques, tels que dans les cellules de chromaffines des glandes thyroïdienne et surrénales[95], dans des cellules biliaires ou au niveau des lymphocytes T.[120, 121] VNUT a pour substrat différents nucléotides, tels que l'ATP, le GTP, L'UTP et d'autres substrats anioniques (Figure 35). Ces différentes molécules sont très connues, pour leurs implications dans une multitude de processus biologiques, entre autre, ce sont des neurotransmetteurs présents au niveau de système nerveux périphérique (SNP) et au niveau de système nerveux central (SNC).

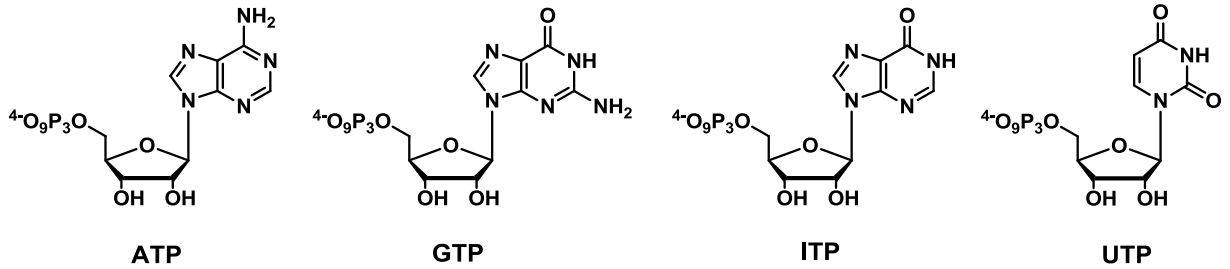


Figure 35 : Structures des principaux substrats de VNUT.

Leurs implications dans de nombreux processus biologiques et leurs importances dans la transmission synaptique en font des neurotransmetteurs essentiels. Le principal substrat de VNUT, l'ATP, est également connue pour être la principale source d'énergie des organismes vivants mais il agit également sur la régulation de nombreux mécanismes au niveau intra- et extracellulaire.

L'ATP ainsi que les autres substrats de VNUT suivent le cycle classique d'un neurotransmetteur. Sous l'effet d'un potentiel d'action, ils sont libérés dans la fente synaptique où ils vont agir sur leurs récepteurs purinergiques. On trouve dans le cerveau des neurones exclusivement purinergiques (au même titre que des neurones glutamatergiques, dopaminergiques…) qui assurent la transmission synaptique via des nucléotides et principalement à l'aide de l'ATP. Ils seront intégrés dans les vésicules pré-synaptiques via VNUT et seront relarguer dans la fente synaptique sous l'influx d'un potentiel d'action. Une fois dans la fente synaptique ils interagiront sur différents récepteurs purinergiques (P2) (Figure 36).[122, 123] Il existe 2 grandes familles de récepteurs aux nucléotides : P2X (ionotropiques) et P2Y (couplés à d'autres protéines).

Ces deux grandes familles de récepteurs sont présentes au niveau pré et post-synaptique et permettent la modulation de la libération de neurotransmetteurs primordiaux (dans le SNC et le SNP) tels que l'acétylcholine (ACh), la noradrénaline (NA), la dopamine (DA), le glutamate, la sérotonine ou encore l'acide γ-aminobutyrique

(GABA).[124] Ces récepteurs sont aussi connus pour être impliqués (directement ou indirectement) sur le contrôle des fonctions automatiques (respiration, clignement des yeux…), la transduction des sensations de douleurs, l'interaction entre neurones, le contrôle de l'angiogenèse ou encore l'agrégation plaquettaire au niveau des récepteurs purinergiques.[125]

Figure 36 : Représentation de la libération et de l'action de l'ATP au niveau synaptique[117]

Comme tous les neurotransmetteurs, l'ATP et les autres substrats de VNUT ont une durée de vie très courte (quelques nanosecondes) dans la fente synaptique. En effet, la présence de différentes enzymes (ectonucléotidases, phosphatases alkalines…) et transporteurs (CNTs/ENTs) conduisent dans un premier temps à son hydrolyse partielle ou totale et sa recapture.

Un dérèglement ou un dysfonctionnement de ce système purinergique va provoquer de nombreuses pathologies comme l'épilepsie, la migraine, désordres psychologiques… Son implication dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer apparaît importante. Le rôle de certains récepteurs P2 (6 de types P2Y et 3 de types P2X) a également été identifié dans différents types de cancer (tumeur du cerveau, cancer des poumons, de la prostate, de la peau…). L'activation de certains de ces récepteurs par l'ATP, interviendraient notamment sur la prolifération (P2Y1 et P2Y2), la différentiation (P2X5 et P2Y11) et l'apoptose (P2X7) des cellules cancéreuses.[126]

IV.2.b <u>État de l'art</u>

L'entrée de nucléotides à l'intérieur des vésicules pré-synaptiques via VNUT, est conditionnée à un gradient de proton. Par des mesures de recapture de l'ATP en présence ou non de chélatant de l'ATP (Mg^{2+} ou Ca^{2+}), l'importance de la charge dans la reconnaissance de l'ATP par VNUT a été mise en évidence. En effet, l'ATP possède 3/4 charges négatives à pH physiologique, ces charges contribueraient à maintenir l'équilibre du gradient électrochimique au niveau des vésicules. Différentes études de recapture de l'ATP ont également permis de mettre en évidence l'importance de la présence d'ion chlorure (4 à 20 mM). La concentration d'ATP dans les vésicules est très élevée (0.1-1M) et on y retrouve également d'autres nucléotides (0.2 M) tels que l'ADP, GTP ou encore l'UTP (Figure 37). La libération de l'ATP dans la fente synaptique par exocytose de la vésicule avec la membrane pré-synaptique ou par diffusion à travers des pores transmembranaires est un mécanisme encore mal connu.

Figure 37 : Histogramme représentant l'inhibition de la recapture d'ATP radiomarqués en présence de différentes molécules

La caractérisation biochimique de VNUT, a permis de déterminer les substrats principaux de VNUT : GTP > ATP > UTP ~ ATPγS ~ AP_3A. Le meilleur des substrats (GTP) a un Km de 3 mM avec VNUT. VNUT ayant été caractérisé récemment,[95] nous disposons d'assez peu d'information sur ce transporteur, notamment sur le mécanisme de recapture et de libération de l'ATP qui n'a toujours pas été mis en évidence. Le développement de composés fluorescents (substrats ou inhibiteurs) sélectifs de VNUT, permettrait une étude détaillée facilitée de ce mécanisme et répondrait à de nombreuses questions, telles que l'implication de VNUT dans différentes pathologies ou d'un point vue plus structural, identifier les différents résidus importants du site de reconnaissance de VNUT pour ces substrats. Il serait par la suite envisageable de moduler la réponse de l'ATP au niveau du système purinergique.

IV.3 Le transporteur lysosomal d'acide sialique : Sialine

IV.3.a Généralités

La Sialine, codée par le gène SLC17A5, a pour rôle principal d'exporter des acides sialiques du lysosome vers le cytoplasme.[127] L'acide sialique est un terme générique pour un groupe d'environ 40 monosaccharides anioniques avec un squelette de neuf atomes de carbone. Les acides sialiques les plus abondants chez les mammifères sont les acides *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc) (Figure 38).

En raison de leur charge négative et de leur position terminale dans les chaînes d'oligosaccharides, ils jouent un rôle important dans l'adhérence cellule-cellule et cellule-pathogène. Les acides sialiques sont également une barrière physique à d'autres mécanismes de reconnaissance. Le transport d'acide sialique est dépendant d'un gradient de pH et des concentrations en acides sialiques (saturation à un Km avoisinant 0.24 mM).[128] En effet, l'acide sialique est co-transporté avec un proton afin que ce transport soit électrochimiquement neutre et n'affecte pas le potentiel de membrane. Ce transport est dépendant d'un gradient de H^+ (gradient de pH) mis en place par une pompe à protons ATPase qui instaure un pH de 5 dans le lysosome. Il est possible que d'autres petites molécules possédant une fonction carboxylate empreinte ce transporteur, telles que le lactate, l'acide glucuronique ou encore le gluconate en revanche, des sucres neutres (glucose, mannose…) ne sont pas reconnus par ce transporteur. Une étude récente effectuée sur des vésicules reconstituées a montré le transport possible de glutamate et d'aspartate via la Sialine (nommé pour ce cas VEAT : « Vesicular Excitatory Amino Acid Transporter ») [129,]néanmoins ces travaux ont été renouvelés dans un contexte plus physiologique (vésicules isolés) et il a été démontré que le transport de ces deux molécules était indépendant de la Sialine.[130]

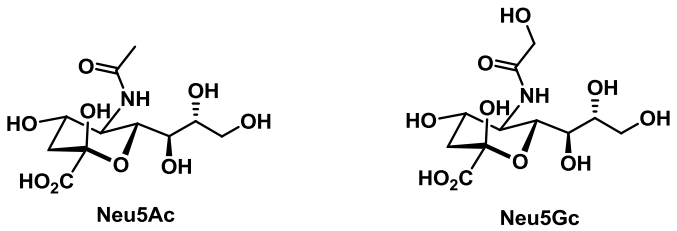


Figure 38 : Structure des acides *N*-acétylneuraminique et *N*-glycolylneuraminique.

Un dysfonctionnement de la sialine induit deux maladies infantiles rares causées par des mutations du gène SLC17A5: la maladie de stockage d'acide sialique (ISSD) et la maladie de Salla.[131, 132] L'ISSD est une maladie dont l'espérance de vie est inférieur à deux ans, provoquée par des délétions, des insertions diverses et des mutations (faux-sens et non-sens) au niveau du gène. La maladie de Salla est une maladie neurologique, associée presque exclusivement à la mutation R39C (faux-sens), qui suit un processus pathologique progressif mais non létal. L'accumulation d'acide sialique libre dans les cellules des patients est une des caractéristiques de ces deux maladies pour lesquelles il n'existe pas de traitement efficace. Les mutations faux-sens associées à l'ISSD inhibent l'export d'acides sialiques,[127] tandis que la mutation de faux-sens R39C (maladie de Salla) conduit à une sialine mutée qui conserve partiellement le transport d'acide sialique mais altère l'adressage des sialines vers les lysosomes, probablement en raison d'un mauvais repliement partiel de la protéine. Des molécules permettant de corriger ce default de repliement, appelées molécules chaperonnes[133] pourraient offrir

une approche thérapeutique potentielle de la maladie de Salla en corrigeant le mauvais acheminement vers le lysosome de la sialine.

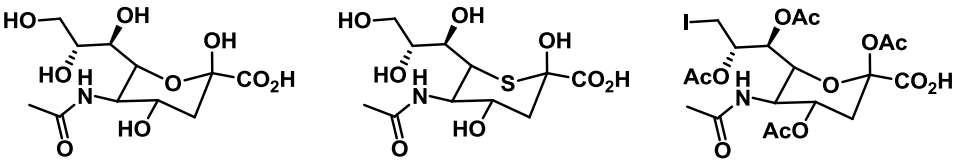
IV.3.b Résultats préliminaires

L'étude d'inhibiteurs de la sialine a débuté par une analyse biologique d'analogues « strict » d'acide sialique. De nombreuses modifications chimiques ont été réalisées par l'équipe de Pr Brossmer, en conservant le squelette des substrats naturels (Figure 39).

Figure 39 : Modifications réalisées autour du squelette de l'acide sialique.

Ainsi, une quarantaine d'analogues d'acide sialiques a été synthétisée et évaluée biologiquement en collaboration avec l'équipe du Dr Gasnier (UMR8192).

L'analyse de ces nombreux composés a permis d'identifier un composé, le 9-iodo-Neu5Ac, ayant une affinité 20 fois supérieur pour la sialine que le principal substrat naturel, le Neu5Ac (40 µM contre 820 µM pour le Neu5Ac). Le 9-iodo-Neu5Ac per-acétylés est un dérivé du Neu5Ac qui a été acétylés sur tous les alcools secondaires et dont l'alcool primaire (position 9) a été substitué par un atome d'iode (Figure 40).



Neu5Ac — IC_{50} = 820 ± 91 µM (n=24)

6-thio-Neu5Ac — IC_{50} = 129 ± 80 µM (n=3)

9-iodo-Neu5Ac per-acétylé — IC_{50} = 40 ± 6.5 µM (n=11)

Figure 40 : Représentation des deux meilleurs analogues synthétiques de l'acide sialique.

Une étude récente menée au laboratoire a permis de valider un modèle 3D par homologie de la sialine humaine.[134] En effet, ce modèle 3D est basé sur la structure cristallographique du transporteur de glycérol-3-phosphate d'E. coli (GlpT), qui présente une homologie de séquence faible (18% d'identité de séquence d'acides aminés) avec la sialine humaine. Il était donc indispensable de tester expérimentalement ce modèle afin de prédire la poche de fixation du substrat. Pour ce faire, l'acide sialique et le 9-iodo-Neu5Ac per-acétylés ont été « dockés » dans les deux conformations principales de la sialine (ouverte vers le cytoplasme et ouverte vers lysosome). Différents résidus n'interagissant qu'avec le composé 9-iodo et non avec le substrat ont été identifiés et mutés validant le site d'interaction au sein de ce transporteur. En effet l'activité de la sialine mutée vis-à-vis de son substrat naturel n'est pas modifiée alors que l'activité du composé 9-iodo est directement impactée par ces mutations (Figure 41). Plus précisément l'évaluation des mutants F50Y/F410Y et F50A/F410A prédits par le modèle 3D pour respectivement abolir ou conserver l'activité de notre inhibiteur.

Figure 41 : Approche de mutagenèse utilisée pour valider le modèle 3D de la sialine.

Les mesures de transport de Neu5Ac réalisées sur ces mutants en utilisant des concentrations croissantes d'analogues synthétiques ont confirmé que les mutations F50Y/F410Y altèrent la reconnaissance de celui-ci (en diminuant son pouvoir inhibiteur) tandis que les mutations F50A/F410A ne changent pas l'effet inhibiteur de ces composés. Dans les deux cas le transport de Neu5Ac est préservé. Grâce à ces deux mutants le site de liaison de l'acide sialique sur la sialine a pu être défini et le modèle 3D de la sialine a été validé (Figure 42).

2

Figure 42 : Modèle 3D de la sialine basé sur la structure cristallographique du transporteur GlpT.

Ces expériences ont permis d'identifier deux résidus d'acides aminés important pour la reconnaissance des inhibiteurs avec la sialine, les phénylalanines 50 et 410, appartenant respectivement au domaine transmembranaire 1 et 10. Elles ont également permis d'ouvrir la voie à la découverte de nouveaux inhibiteurs en réalisant un criblage virtuel à haut débit (vHTS). Le modèle (forme ouverte vers le cytosol) a été utilisé pour cribler par vHTS la base de données ZINC, composés disponibles dans le commerce, de manière à augmenter la probabilité d'identifier non seulement des inhibiteurs mais aussi des substrats potentiels. Le premier composé à avoir été testé, est un composé pseudopeptidique (N1, Figure 43) qui inhibe le transport de Neu5Ac avec une CI_{50} 50 fois supérieure (CI_{50} = 22µM) à celle du Neu5Ac (Km ~ 1 mM).[134] Sa capacité à agir de manière compétitive avec le NEu5Ac a également été confirmée ce qui nous a conduit à poursuivre les tests biochimiques sur les différents « hits » identifiés lors du ciblage. Ces différents composés sont, comme N1, structurellement très différents des acides sialiques, et plusieurs parmi eux se sont révélés être de bons inhibiteurs lors d'expériences de transport biochimique (Figure 43).

A l'aide de ce criblage virtuel, nous avons donc identifiés neuf ligands potentiels, différents de la structure des acides sialiques, avec un taux de succès virtuel-réel > 50%. Pour valider les différentes touches obtenues, nous avons déterminé son mode d'inhibition, sur la touche (N1). Celle-ci agit de manière compétitive démontrant bien que cette touche interagit en compétition avec le substrat naturel, confirmant que ces touches pourraient être de potentiels substrats de la sialine. Certains composés ont une affinité pour la sialine de l'ordre de la dizaine du µM (données non publiées), dont N8 (Fmoc-Lys(Cbz)-OH) qui est le composé possédant la meilleure affinité avec une CI_{50} = 17 µM. Ces études permettent d'envisager la conception d'inhibiteurs encore plus affins, permettant le développement de molécules chaperonnes en tant qu'outils pharmacologique pour corriger le défaut d'acheminement de la sialine retrouvé dans les différentes pathologies présentées. L'utilisation de molécules fluorescentes sélectives de la sialine permettrait de lever les dernières zones controversées autour de ce transporteur et permettrait d'envisager la mise en place de tests d'activité biologique par fluorescence plus facile à mettre en place.

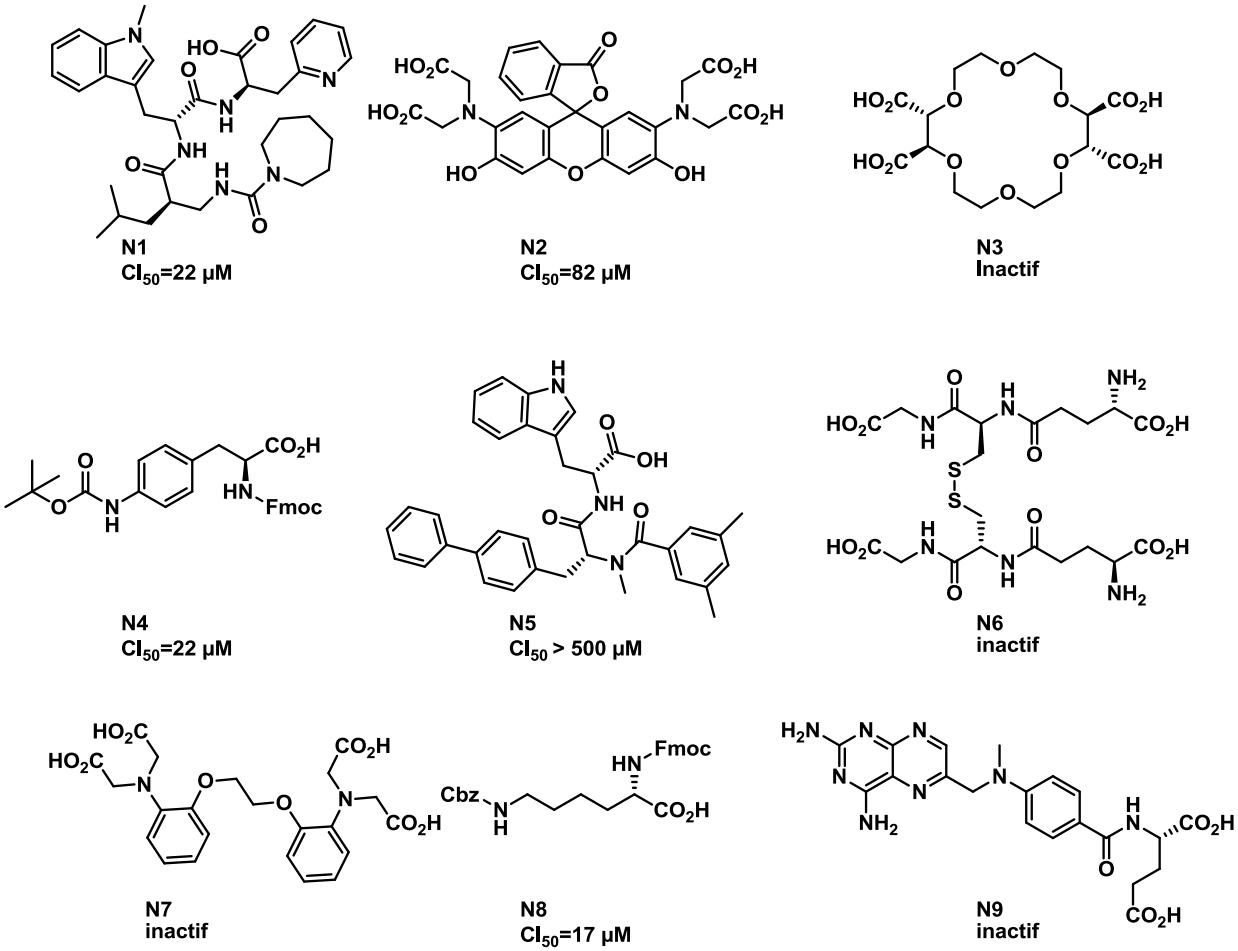


Figure 43 : Hits identifiés, N1-9, lors du criblage virtuel sur le modèle par homologie de la sialine.

Les différents transporteurs, que nous venons de présenter, sont ubiquitaires et assurent des fonctions variées et indispensables dans très nombreux processus biologiques. De nombreuses questions restent encore à étudier, tant au niveau structural que mécanistique. Leurs implications dans la métabolisation de différents médicaments et leurs implications pathologiques (avéré ou non) en font des cibles de choix pour des études approfondies. Une problématique importante restant à étudier est le suivi et la compréhension du mécanisme de transport lysosomale et vésiculaire. Une perturbation dans ces mécanismes conduit à d'important troubles pathologiques (ex : la maladie de Salah, d'Alzheimer, de Parkinson…). Comme nous l'avons laissé sous-entendre dans le chapitre précédent, nous avons décidé d'utiliser la fluorescence dans le but de caractériser les différents mécanismes de transports biologiques présentés ci-dessus. Les études menées sur VMAT2, décrites lors des études des transporteurs par fluorescence, sont représentatives du travail que nous souhaitons appliquer aux transporteurs choisis. Ces transporteurs possédant leurs propres problématiques, il faudra, en comparaison avec l'étude mené sur VMAT2, prendre en compte les différentes propriétés biochimiques de ces transporteurs, telles que l'affinité (Km de l'ordre du µM pour VMAT contre mM pour les autres transporteurs SLC17), la sélectivité ainsi que la nature du caractère aromatique du substrat.

V. Approche chimique

Notre objectif est de concevoir des faux substrats fluorescents ou faux neurotransmetteurs fluorescents (FFSs et FFNs). Ce type de composés permettrait d'étudier et d'apporter une contribution à l'élucidation des mécanismes biologiques de ces transporteurs. Ils pourront être utilisés pour suivre l'activité de transport in-vivo ou pour développer des tests d'activité par fluorescence permettant un criblage de molécules d'intérêt facilité. Nous allons à présent détailler la stratégie chimique envisagée pour la synthèse des FFNs et FFSs. Nous expliquerons le choix des fluorophores qui seront incorporées aux molécules finales, puis leurs sites d'incorporations choisis et enfin le choix des pharmacomodulations réalisés au cours de cette étude.

Choix des fluorophores :

Beaucoup de ces fluorophores sont aujourd'hui disponibles commercialement et de très nombreuses voies de synthèse permettent l'obtention de fluorophores d'intérêts (Figure 44).[135]

Figure 44 : Principaux fluorophores classés en fonction de leurs brillances et de leurs longueurs d'onde d'excitation. [136]

Le choix des fluorophores à synthétiser et à intégrer aux structures que nous venons de présenter, sera orienté principalement par leurs propriétés de fluorescence, leurs facilités d'accès et leurs tailles. Notre objectif sera donc la synthèse de fluorophores possédant des propriétés adaptées, notamment un ε (coefficient d'extinction molaire) élevé et un ΦF proche de 1. Les $\lambda_{ex/em}$ doivent être en adéquation avec les tests effectués, pour éviter que les mesures de fluorescence risquent d'être biaisées par la fluorescence naturelle de certains acides aminés naturels ou protéines (autofluorescence). D'où l'importance de développer des fluorophores avec des λ_{ex} supérieurs à 300 nm. De même il faut également que le ΔS (déplacement de Stoke) soit le plus grand possible afin de ne pas avoir de recouvrement entre le spectre d'excitation et d'émission, ce qui fausserait les résultats de fluorescence (par réabsorption des photons émis). Le $t_{1/2}$ doit être en adéquation avec le processus étudié. Dans notre cas, le temps de demi-vie est moins important car on regardera l'accumulation de ces FFNs/FFSs au niveau vésiculaire ou cellulaire.

Le choix des fluorophores pour le développement de FFNs et FFSs devra également s'adapter aux problématiques de nos cibles telles que la taille des molécules synthétisées. En effet, des études de modélisation réalisées préalablement sur VNUT et sur la sialine, ont permis de déterminer la sphère de coordination des différents substrats naturels qui apparaît assez petite. Ainsi, afin de pouvoir être transportées les molécules développées ne devront pas être trop volumineuses pour ne pas bloquer/inhiber le transporteur. Nous ne pourrons donc pas utiliser des espaceurs trop grand et nous utiliserons des petits fluorophores. Les analogues d'ATP fluorescents[137] ou d'acides sialiques fluorescents[103] déjà existants ne seront donc pas utilisables dans le cadre de cette étude (Figure 45).

Figure 45 : Analogues fluorescents d'ATP (Fluorescein-12-ATP) et d'acide sialique (CMP-3''-F-Sia).

Parmi le choix important de fluorophores possibles nous nous sommes limités à différentes familles de fluorophores à 3 cycles aromatiques maximum, pour répondre à la problématique de la taille introduite

précédemment. Nous nous sommes intéressés à différentes familles de fluorophores, nous permettant ainsi de couvrir une large gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission (Figure 46) pour nous adapter aux différents tests biologiques par fluorescence.

Cette banque de fluorophores pourra être utilisée sur les deux transporteurs sélectionnés et devra donc être facilement fonctionnalisable afin d'y greffer facilement des synthons d'intérêt tels que des sucres, des acides aminés ou d'autres molécules d'intérêt permettant aux composés finaux synthétisés d'interagir de manière sélective avec les transporteurs choisis. Ces synthons seront introduits de différentes manières : couplages peptidiques, substitution nucléophiles, formation de liaisons éther, ester, carbamate….

Le remplacement des motifs aromatiques par des fluorophores sur les ligands connus, nous fournira dans un premier temps des informations sur l'impact de ce remplacement pour l'activité et la sélectivité vis-à-vis de leurs transporteurs. Dans un second temps, nous effectuerons également certaines modification structurale autour de ces synthons d'intérêt dans le cadre d'études plus conventionnelles, telles que l'étude relationnelle entre la structure et l'activité ou encore la détermination de la structure minimale active.

Figure 46 : Représentation des longueurs d'onde d'émission de différentes familles de fluorophores sélectionnées : A/ motif éthéno, B/ motif coumarine, C/ motif nitrobenzofurazane, D/ motif quinolinone, E/ motif xanthène, F/ Le motif resorufine

Site d'incorporation de fluorophores :

Nous avons alors analysé et sélectionné les substrats naturels ou inhibiteurs (le cas échéant) des transporteurs choisis afin d'observer les différents sites d'incorporations potentiels de motif fluorescent. La nécessité de ne pas trop se démarquer des structures, pour conserver l'affinité et la sélectivité de celles-ci, nous nous sommes orientés vers le remplacement de motifs aromatique, déjà présent sur celles-ci, par des fluorophores.

Il apparaitrait d'après les substrats connus (ATP, GTP, ITP…) que la partie aromatique (ici des bases nucléiques) est peu dicriminatoire pour la reconnaissance et que son remplacement par des fluorophores ne devrait pas modifié son activité vis-à-vis de VNUT. En revanche, la partie ribose-triphosphate, conservée chez l'ensemble des substrats et possède 4 charges négatives à pH physiologique et apparait comme essentiel pour le transport. Ainsi nous conserverons, dans un premier temps, la partie triphosphate et le ribose en faisant varier la nature des fluorophores (Figure 47).

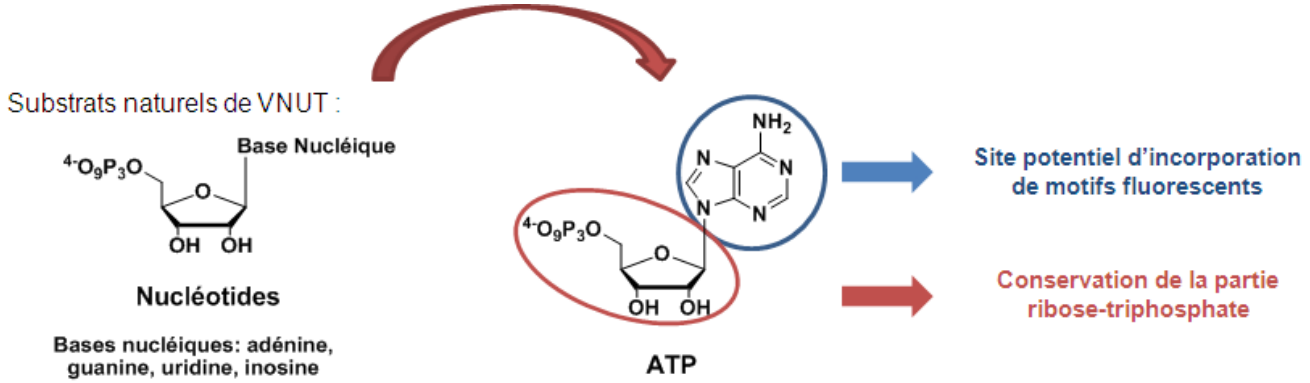


Figure 47 : Approche envisagée pour la conception de FFNs de VNUT.

La conception de FFSs pour l'étude de la sialine ne pourra pas se réaliser par analogie avec ces substrats naturels, comme a été le cas pour la conception de FFN de VNUT. En effet, les substrats naturels sont des

acides sialiques (précédemment présentés) ne possédant aucun motif aromatique pouvant être remplacé par un fluorophore. Cependant des études préliminaires réalisées au sein du laboratoire, présentées auparavant, ont permis d'identifier plusieurs inhibiteurs compétitifs. Ces inhibiteurs, de part leur mode d'inhibition, pourraient s'avérer être des substrats potentiels de la sialine. Il est intéressant de noter que plusieurs de ces ligands ont un motif aromatique, notamment phényle, pyridinyle, indolyle ou fluorenyle. Nous avons sélectionné le composé **N8**, qui offre de nombreuses possibilités de modifications et différents sites possibles d'incorporations de motifs fluorescents (Figure 48).

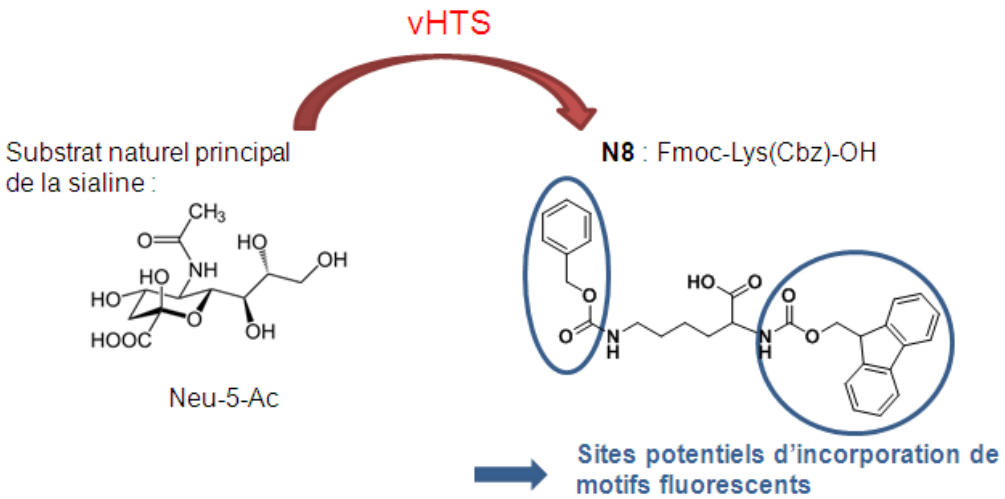


Figure 48 : Approche envisagée pour la conception de FFSs de la sialine.

Lors de la synthèse de ces FFSs de la sialine nous devrons prendre soin de conserver la fonction acide carboxylique (carboxylate à pH physiologique) qui apparaît dans les structures de tous les substrats connus et semble essentiel à la reconnaissance. Après avoir sélectionné les structures sur lesquelles nous allons travailler, nous allons expliquer le choix des fluorophores utilisés pour cette étude.

Pharmacomodulation de la partie ribose-triphosphate pour l'étude de VNUT :

Pour l'étude de VNUT nous conserverons la partie triphosphate et effectuerons des modifications autour de la partie ribose allant jusqu'à même envisager son remplacement par d'autres motifs (Figure 49). Ces modifications nous permettront d'analyser l'importance de ce ribose pour la reconnaissance et l'activité vis-à-vis de ces transporteurs.

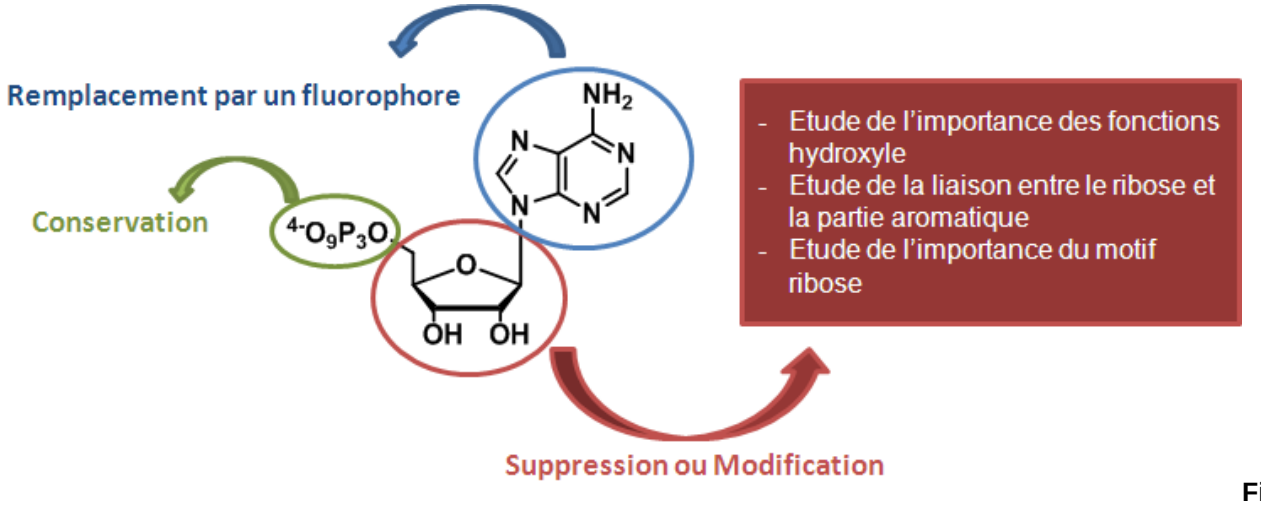


Figure 49 : Modifications envisagées autour de la structure de l'ATP

Pharmacomodulation de la touche N8 pour l'étude de la sialine :

Pour l'étude de la sialine, nous utiliserons comme modèle de ligand, la touche **N8** issue du vHTS présenté précédemment. Cette lysine protégée offre de nombreuses possibilités de modifications. Nous étudierons l'importance de la nature de l'acide aminé, de sa stéréochimie et de la taille sur l'influence de sa reconnaissance et de son activité vis-à-vis de la sialine (inhibiteurs ou substrat) (Figure 50).

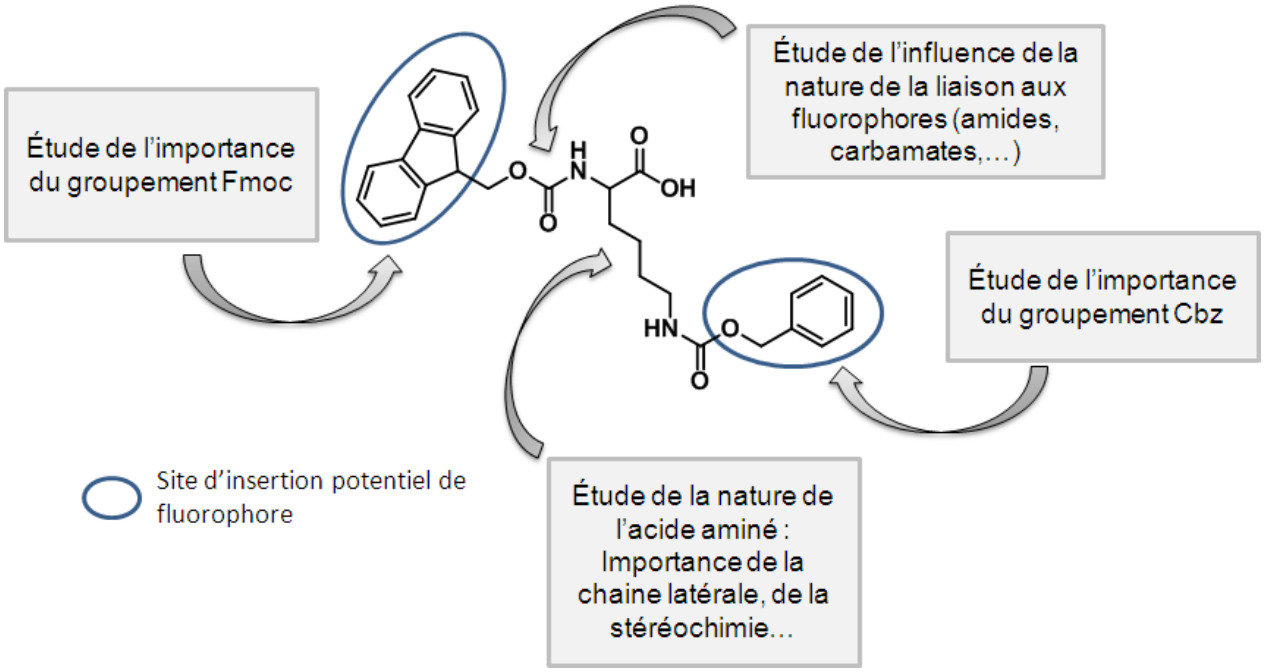


Figure 50 Modifications envisagées autour de la structure de N8, issus du vHTS.

Les molécules finales synthétisées devront répondre à plusieurs autres critères. Elles devront être stables à pH acide, en effet les compartiments intravésiculaire et intralysosomal ont des pH acide, de l'ordre de 5. Les molécules synthétisées devront également pouvoir passer les membranes, nous nous limiterons donc à de petites molécules ayant des capacités perméantes. Ces molécules devront bien sûr être fluorescentes avec les meilleures propriétés possibles. Les propriétés photo-physiques des produits finaux seront évaluées. L'étude de ces propriétés de fluorescence nous permettra de mettre en avant l'importance de la position et de la nature

des substituants présent sur les fluorophores ainsi que l'effet de l'introduction des synthons d'intérêts sur les paramètres de fluorescence. Nous pourrons ainsi déterminer les fluorophores les plus adaptés à des études biologiques par fluorescence pour chacune des cibles.

Nous réaliserons l'étude biologique de ces composés lors de tests que nous mettrons en place ou en collaboration lorsqu'ils sont déjà disponibles. Les différents tests biologiques réalisés nous permettront d'orienter nos synthèses et de déterminer le champ d'action de nos molécules, en tant qu'inhibiteur, substrats voire molécules chaperonnes.

Partie théorique

Chapitre 3 : Développement de molécules fluorescentes

L'objectif de cette thèse est la conception de neurotransmetteurs/substrats fluorescents (FFN/FFS) afin d'étudier différentes cibles par des techniques d'imagerie par fluorescence. Ce chapitre détaillera la synthèse de différentes molécules possédant des propriétés de fluorescence variées permettant de nous adapter aux conditions d'expérimentations dans le cadre, entre autre, d'études physiologiques ou cellulaires. Nos molécules d'intérêts seront fonctionnalisées par les fluorophores synthétisés.

VI. Synthèse de fluorophores

Dans cette partie nous allons développer la synthèse de nombreux fluorophores qui seront ensuite fonctionnalisés et/ou couplés à des molécules d'intérêts biologiques dans le cadre de tests d'inhibitions, de substrats ou encore de chaperons pharmacologiques. Nous aborderons la synthèse de motif éthéno de coumarines, de quinoléines et quinolinones, de dérivé du xanthène et de résorufine. Ces fluorophores substitués par des fonctions électrophile ou nucléophile permettent de varier également les méthodes de couplages entre fluorophores et synthons d'intérêt. Ces fonctions électrophiles ou nucléophiles seront soit portées directement sur la structure aromatique du fluorophores, soit introduites par l'intermédiaire d'un espaceur (Figure 51). Les différentes fonctionnalisations ou protections envisagées dans le cadre des futurs couplages seront décrites dans les sous-parties correspondantes.

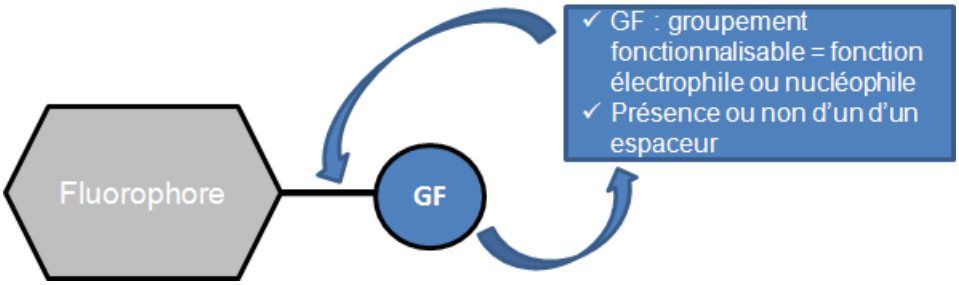


Figure 51 : Représentation générale des fluorophores synthétisés

VI.1 Motif étheno-adénine

Les motifs éthéno-nucléotide (et notamment l'éthéno-adénine : εAde) (Schéma 2) sont des sondes fluorescentes précieuses dans le cadre de l'analyse structurelle de l'ADN, de l'ARNt et de l'étude de certaines forme de cancers.[138] La formation de ce motif éthéno, implique une très faible modification structurale, ce qui a également permis l'étude de récepteurs, d'enzymes et d'interactions entre le substrat et sa cible…[139-141]

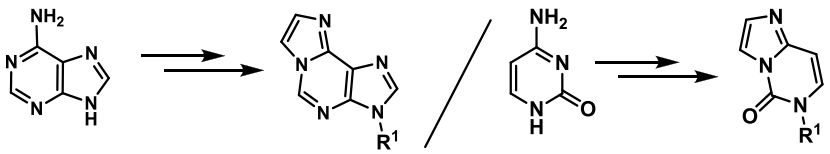


Schéma 2 : Formation de l'ϵ-adénine à partir du motif adénine /Formation de l'ϵ-cytosine à partir du motif cytosine

Ce motif est facile d'accès à partir de l'adénine par simple cyclisation avec du chloroacétaldéhyde. L'étheno-adénine présente un rendement quantique élevée (0.60) mais un temps de demi-vie assez long (26 ns) et des λex/λem de 310/415 nm. Ses propriétés n'en font pas un fluorophore de référence, notamment pour une évaluation physiologique qui utilise un appareillage d'excitation débutant à 300 nm. Cependant, ce motif facilement accessible permettra de vérifier certains critères de relation structure activité. De plus, l'étheno-ATP a déjà fait l'objet d'une étude qui a démontré que cette molécule pouvait être transportée à l'intérieur de lyposomes.[142, 143]

VI.1.a Synthèse

. Le cycle éthéno n'est pas stable à pH acide (≤ 2) [144] et il a été décrit que l'adénine fonctionnaliser en *N*-9 par addition de Michaël pouvait subir une rétro-addition de Michaël en milieu basique.[145] De plus, dans la littérature les rendements décrits pour la formation du cycle éthéno sont de l'ordre de 50%. Nous avons donc décidé d'effectuer cette cyclocondensation en dernière étape de nos synthèses. Les composés éthéno souhaités sont obtenus à partir des dérivés d'adénine déjà fonctionnalisés en *N*-9 par différents substituants. Ces dérivés d'adénine sont obtenus par l'alkylation de l'adénine par des linker suivant une addition de michaël ou par des dérivés du ribose (ouverture d'époxyde) (Schéma 3)

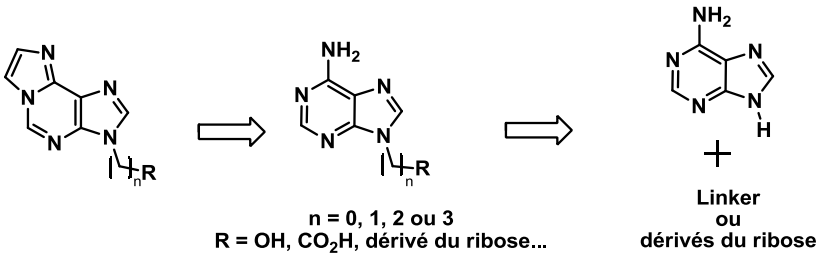


Schéma 3 : Rétrosynthèse de dérivés éthéno

Ainsi nous débuterons par décrire les fonctionnalisations effectuées sur le motif adénine avant d'aborder la formation du cycle étheno.

VI.1.b Fonctionnalisation : Alkylation de l'adénine en *N*-9

Dans le cadre de notre étude nous avons souhaité introduire différentes chaines alkyles (avec n=2 ou 3) possédant une fonction hydroxyle ou acide carboxylique sur la position *N*-9 de l'adénine. L'introduction de chaines alkyles substituées par différents groupement va permettre la fonctionnalisation de ces composés par des molécules d'intérêts et de déterminerl'importance du motif ribose vis-à-vis du transporteur. Nous aborderons également l'introduction d'un dérivé du ribose sur la position *N*-9 de l'adénine.

➢ *Alkylation en N-9 par une chaine portant une fonction électrophile (acide carboxylique)*

Cette étude a débuté par l'introduction d'une chaine alkyle, en *N*-9 de l'adénine, portant un groupement ester (pouvant être hydrolysé) et acide carboxylique. Nous avons choisi une méthode décrite dans la littérature qui se déroule sous micro-ondes sans solvant. L'addition de Michaël de l'adénine par l'acrylate d'éthyle et de *n*-butyle a été réalisée en présence de DABCO et d'une quantité catalytique de TBAB (absorbant de micro-ondes)[146] avec de bons rendements (50 à 72%).[147] L'alkylation du motif adénine par l'acrylate d'acide n'ayant jamais été décrit, nous avons utilisé l'acrylate d'éthyle, qui par la suite est hydrolysé pour former le dérivé acide désiré, **3**. L'addition de Michaël sur l'adénine avec l'acrylate d'éthyle, a conduit au composé **1** avec un rendement de 78%, légèrement supérieur à celui décrit.[147] L'hydrolyse de l'ester éthylique conduit au composé **3** avec un rendement de 60%. En suivant le même protocole d'addition nous avons élargi cette voie de synthèse sur deux autres acrylates (*tert*-butyle et acide), qui n'avait pas été décrit dans la littérature. L'acrylate de *tert*-butyle a été introduit (**2**) puis hydrolysé en présence de TFA pour conduire au composé **3** avec un rendement global de 62%. L'addition avec l'acrylate d'acide a conduit directement au composé **3** avec un bon rendement de 72%, en évitant une étape de déprotection (Schéma 4).

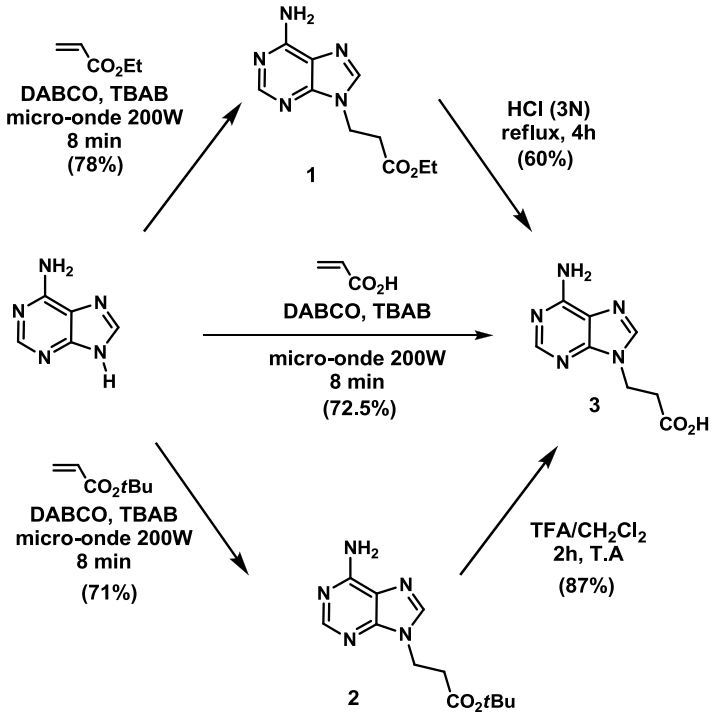
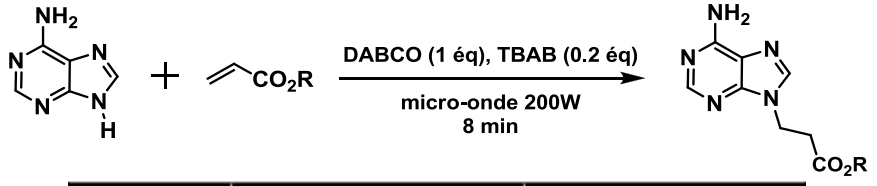


Schéma 4 : Synthèse de d'adénines alkylés à partir de différents acrylates

Dans ces conditions, nous avons constaté que l'alkylation par différents accepteurs de Michaël (acrylate d'éthyle, de tert-butyle ou d'acide) réalisée à partir de 15 mmol d'adénine conduit aux produits avec de bons rendements alors qu'à partir de faibles quantités (≤ 1.5 mmol d'adénine) les rendements chutent fortement (≤ 25%). Ceci est dû notamment à la mauvaise homogénéisation du milieu. En effet lors de l'emploi de faibles quantités, l'acrylate jouant le rôle de solvant de la réaction ne permet pas la solubilisation totale et l'homogénéisation de tous les réactifs (1.5 mmol d'acrylate d'acide correspond à 154 µL) (Tableau 2).

Tableau 2 : Addition de Michaël sous micro-ondes sur différents acrylates.



R	Rdt (1.5 mmol)	Rdt (15 mmol)
Et	26%	78%
*t*Bu	17%	71%
H	22%	72%

Au cours de cette étude les conditions ont été optimisées, notamment les quantités employées ou encore le temps de réaction. Les résultats obtenus nous ont conduits à étendre cette étude à d'autres motifs afin de pouvoir généraliser cette méthode d'alkylation aux aza-hétérocycles, tels que les indoles ou les Bis-indolylmaléimides (BIM). Cette étude qui a conduit à l'optimisation de méthode d'addition de michaël par micro-onde sur des aza-hétérocycle et a fait l'objet d'une publication voir **Annexe 1.**[144]

➢ *Alkylation en N-9 par une chaine portant une fonction nucléophile (alcool)*

Afin de disposer d'une diversité de groupements fonctionnalisables, nous avons effectué la réduction de l'ester éthylique sur le composé **1**, en présence de $LiAlH_4$, afin d'obtenir le composé **4** possédant une fonction alcool primaire. Nous avons également réalisé l'ouverture du carbonate d'éthyle par l'adénine en présence d'une quantité catalytique de NaOH pour obtenir le composé **5** (Schéma 5).

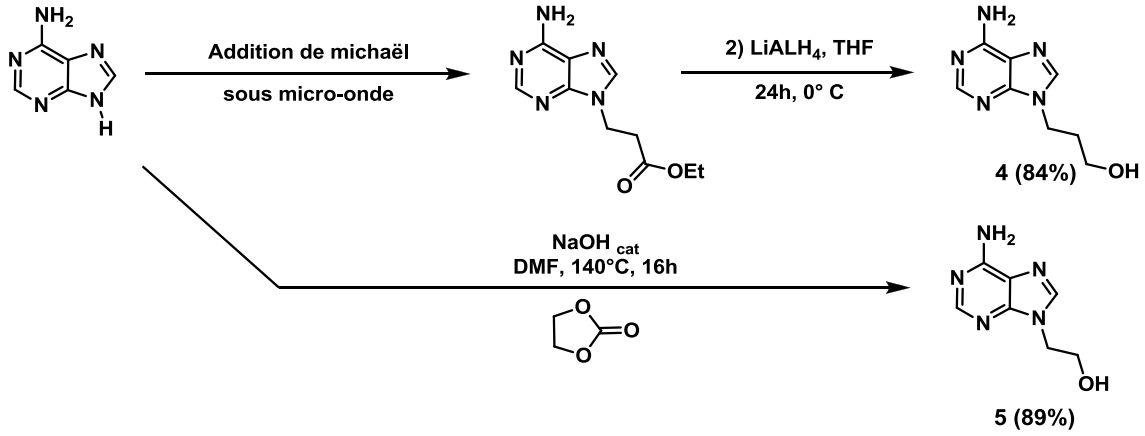


Schéma 5 : Synthèse des composés 4 et 5.

Nous avons ainsi synthétisé deux dérivés d'adénine portant une chaine alkyle (de longueur différente) substituée par une fonction hydroxyle élargissant ainsi le mode de fonctionnalisation ultérieur de ce type de composé.

➢ *Alkylation en N-9 par un dérivé du ribose (D-Glucitol)*

Dans le cadre de l'étude de l'importance du motif ribose sur l'activité vis-à-vis du transporteur, nous avons inséré un dérivé du ribose sur la position *N*-9 de l'aénine. Nous avons choisit le bis-époxyde (L-*ido*) disponible

au sein du laboratoire qui permet après ouverture de l'époxyde de couduire à un dérivé du D-glucitol.[148] La réaction tandem d'alkylation et *O*-cyclisation du bis-époxyde enantiomériquement pur de symétrie C_2 (dérivé du D-mannitol par l'adénine conduit à un *C*-nucléoside. La déprotection des *O*-benzyle est ensuite effectué en présence de BCl_3 pour conduire au produit **6** avec un rendement de 52% (Schéma 6).

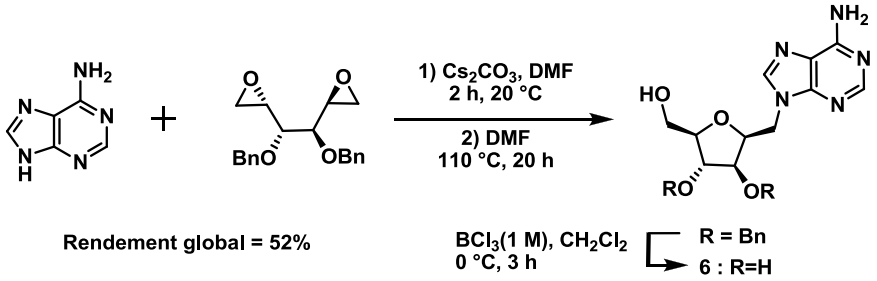


Schéma 6 : Synthèse du 9-D-glucitol-adénine, 6.

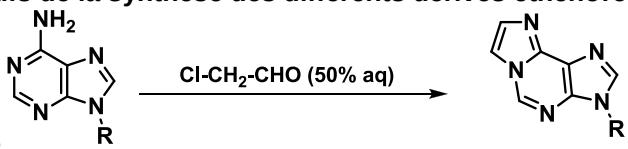
Tous les dérivés d'adénine alkylés sont ensuite rendus fluorescents par formation du cycle étheno que nous allons détailler.

VI.1.c Formation du cycle éthéno

La formation du cycle éthéno, en présence de chloroacétaldéhyde, s'effectue classiquement à pH = 4-4.5 dans différentes conditions de solvants et de température.[149-152] L'une des voies les plus utilisées, pour former ce motif, se déroule à 45° C, dans une solution d'acétate de sodium 1N, jouant le rôle de tampon afin de maintenir le pH dans la gamme désirée (4-4.5).[149, 150] Afin d'augmenter les rendements, nous avons choisi de réaliser ces synthèses dans une solution aqueuse de chloroacétaldéhyde (2 M) en ajustant le pH à 4.5 sur une période de 24 h à l'aide d'une solution de soude (1 M), afin d'améliorer nos rendements (

Tableau 3).[152]

Tableau 3 : Récapitulatifs de la synthèse des différents dérivés éthénorevoir les chaine latérales



R	Conditions	Rdts (%)	entrée
H	AcONa, 45 °C, 48h pH = 4.5	42	7
$(CH_2)_2CO_2Et$		75	8
$(CH_2)_2CO_2{}^tBu$		41	9
$(CH_2)_2CO_2H$		52	10
$(CH_2)_2OH$		52	11
$(CH_2)_3OH$	H_2O/NaOH, 35 °C, 24h pH = 4.5	78	12
D-glucitol		79	13
ribose		64	14
2-désoxyribose		95	15

L'optimisation de cette synthèse nous a permis d'établir une méthode reproductible avec de bons rendements (64-95%) et facile à mettre en œuvre. Le mécanisme de la formation du cycle éthéno a été étudié très récemment à partir d'un dérivé amino-triazine en présence du chloro acétaldéhyde à 120 °C dans le DMSO (Schéma 7).[153]

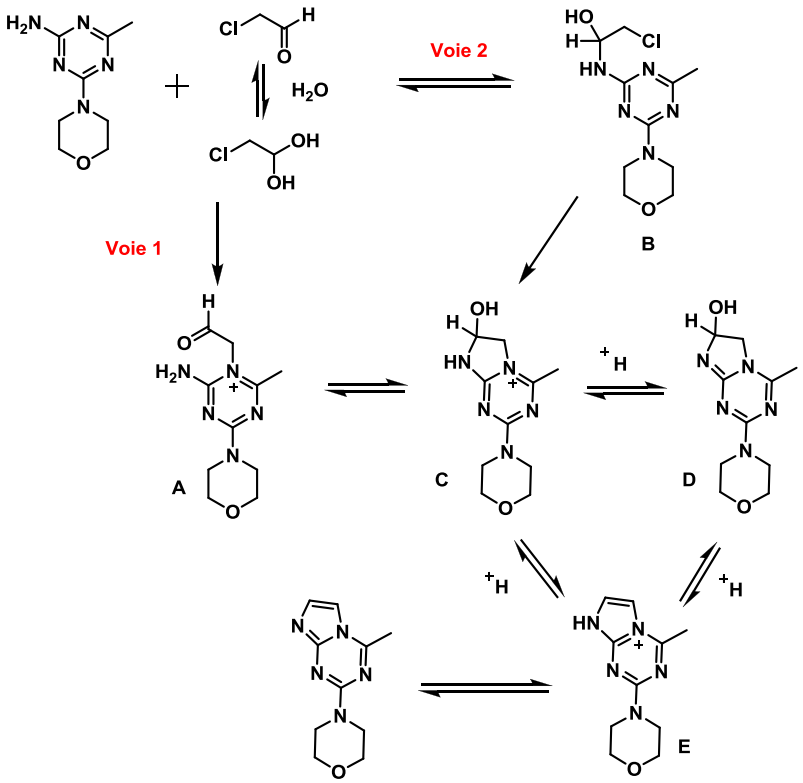


Schéma 7 : Mécanisme possible pour la cyclocondensation conduisant au motif éthéno [153]

Les auteurs ont mis en évidence la présence des composés A, C, D et E par une étude de spectrométrie RMN, notamment NOESY (voie 1). La présence du composé B n'a pu être mis en évidence, néanmoins il ne

peut être exclu que le produit B une fois formé par la voie 2 subisse une substitution nucléophile intramoléculaire très rapide, conduisant à C. Toutefois, les hémiaminals (C et D) ont pu être observées par RMN malgrè leurs caractères assez instables.

VI.1.d Bilan

Nous avons synthétisé de nombreux dérivés de l'adénine fluorescents possédant un linker, un ribose ou des dérivés ribosyliques sur sa position *N*-9. Comme décrit précédemment les propriétés physicochimiques de ces composés n'en font pas des composés de choix pour des études par fluorescence. Néanmoins, Il est possible de limiter le phénomène d'autofluorescence qui pourrait géner nos tests et il est possible de modifier la tricycle éthéno pour lui apporter de meilleures propriétés de fluorescence. Ces composés pourront nous fournir des informations sur la reconnaissance de ce tricycle par VNUT, l'importance du sucre (et de ses fonctions hydroxyles) et son possible remplacement par différents linker (plus ou moins grand).

VI.2 Coumarine

Ce motif très connu présente l'intérêt d'avoir été très largement étudié (Figure 52). De multiples voies de synthèses permettent l'obtention d'une grande variété de coumarines avec des groupements fonctionnalisable à différentes positions. De plus, on retrouve la structure coumarinique dans une multitude de principes actifs, tels que les antibiotiques, les antiplaquétaires, antihyperglycémie…).[154, 155] Nous assistons également ces dernières années à une explosion dans l'exploitation des coumarines dans le domaine de la photochimie en particulier pour des composés « cagés . »[156-158]

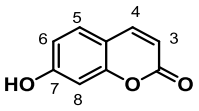


Figure 52 : Structure et nomenclature de l'umbelliférone (7-hydroxycoumarine)

La substitution par un hétéroatome (en général oxygène ou azote) sur la position 7 du motif coumarinique confère à ces molécules des propriétés d'absorption dans le proche UV. De plus, les propriétés spectrales et chimiques (pKa, solubilité…) peuvent être modifiées en fonction du choix des substituants introduits sur les différentes positions. La facilité de synthèse, de purification et la multitude de composés décrits possédant des groupements facilement fonctionnalisable (principalement sur les positions 3, 4, 6 et 7), en font un fluorophore de choix pour démarrer cette étude.

- *Méthodes de synthèses des coumarines ;*

Une large variété de méthodes a été utilisée pour la synthèse de coumarine, on peut par exemple noter les réactions classiques effectuées en milieu acide : Pechmann,[5, 159] Perkin,[160] de Reformatsky,[161] de Wittig,[162] ou en milieu basique, tel que la méthode Knoevenagel ou de Baker.[163] La méthode de Pechmann s'est détachée et

a été plus particulièrement optimisée. Nous allons détailler brièvement l'intérêt et les avantages de cette dernière.

Condensation de Pechmann[5, 159] :

La condensation de Pechmann s'effectue à partir de résorcinol (ou ses dérivés) et de β-céto-ester, catalysée par des acides de Brønsted ou des acides de Lewis (Schéma 8). Les acides de Brønsted sont utilisés lorsque les stabilités et les réactivités des réactifs le permettent (résistants au milieu acide fort), alors que les acides de Lewis représentent une alternative intéressante dans des cas plus précis. En effet, l'utilisation d'un acide fort de Brønsted peut induire une forte diminution de la réactivité du nucléophile par protonation d'un ou plusieurs substituants du résorcinol. Ces acides peuvent s'avérer être également très réactifs vis-à-vis de groupements protecteurs et de certaines fonctions présentent sur les réactifs. Cependant, l'un des grands avantages de ce protocole réside dans la simplicité de la purification finale, qui est une précipitation par ajout de glace. L'utilisation d'acide de Lewis s'avère plus universelle et plus respectueuse des différentes fonctions et groupements protecteurs présents sur les réactifs, cependant des étapes supplémentaires lors du traitement sont nécessaires, le coût de ces catalyseurs peut également être un frein à leur généralisation.

L'acide sulfurique est l'acide de Brønsted le plus souvent utilisé,[5, 164, 165] lors de la formation de coumarine (Schéma 8). Les acides de Lewis, tels que $ZnCl_2$[166], l'$AlCl_3$[159] $BiCl_3$[167], ou encore le $Ti(iOPr)_4$,[168] sont préférés lorsque les substituants sont plus sensibles, ou lorsqu'ils empêchent la réaction principale.

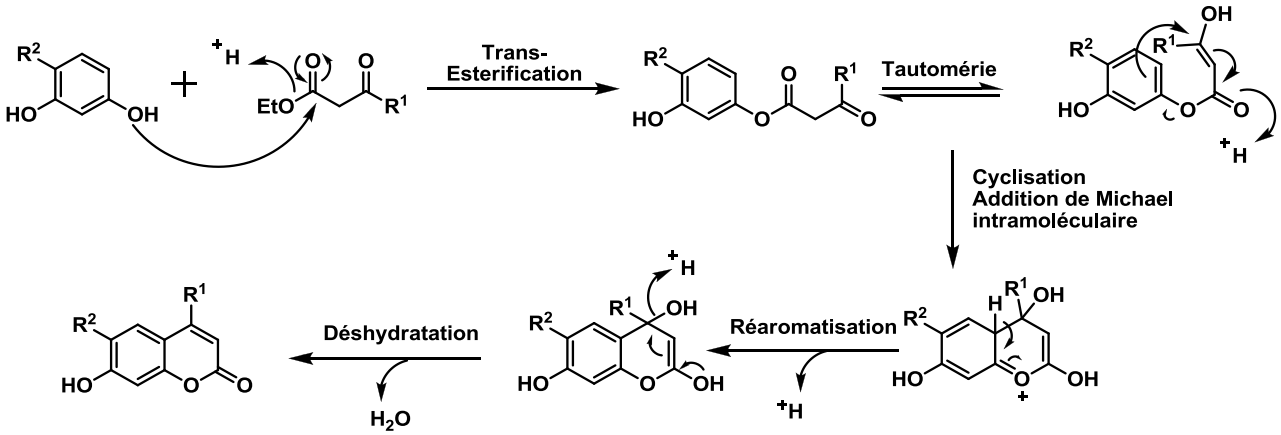


Schéma 8 : Mécanisme de la condensation de Pechmann en milieu acide fort.

Cette méthode présente plusieurs avantages :

La cyclisation est régiospécifique, du fait de l'encombrement stérique de la position ortho/ortho (des deux hydroxyles) qui limite l'étape de cyclisation sur cette position et conduit à la cyclisation sur la position ortho/para. D'autre part, elle permet de pouvoir fonctionnaliser, soit directement, soit a posteriori l'ensemble des positions du motif coumarine : la substitution de la position 4 dépend du choix du groupement R^1 de l'électrophile (Schéma 8, R^1) et la substitution de la position 6 dépend du choix du groupement R^2 sur le résorcinol (Schéma 8, R^2). Les coumarine substituées en 5 et 8 sont le plus généralement obtenues en présence d'acide de Lewis.[169] Enfin, la position 3 peut être fonctionnalisée après formation du motif coumarine par l'introduction d'un atome d'iode.[168]

Cette voie de synthèse permet d'obtenir une large gamme de coumarines substituées avec, en général, de très bons rendements (variable en fonction des substituants présents sur les réactifs). La méthode de

Pechmann apparait comme une méthode de choix, par la facilité d'accès et la diversité des réactifs commerciaux disponibles, les méthodes simplifiées de purification et la possibilité de fonctionnaliser facilement toutes les positions. Nous avons donc utilisé cette méthode lors de la synthèse de coumarines substituées. Afin de réaliser le couplage de ces coumarines avec nos synthons d'intérêts, des groupements facilement fonctionnalisables ont été introduits sur la position 4 (Figure 53).

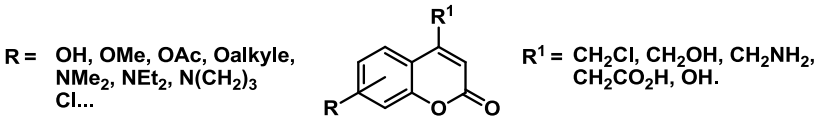


Figure 53 : Coumarines synthétisées substituées en position 4

Ces groupements permettront d'envisager une grande variété de voie de couplage, des estérifications, des éthérifications, des substitutions électrophiles et nucléophiles.

VI.2.a Synthèse par la méthode de Pechmann (catalysée par Acide de Brønsted)

La synthèse des coumarines **16** et **17** (4-méthyl-7-hydroxycoumarine et 4-(chlorométhyl)-7-hydroxy-coumarine), catalysée par l'acide sulfurique concentré, a déjà été décrite.[164] Cette méthode permet d'obtenir les coumarines par simple précipitation dans de l'eau glacée suivi d'une filtration. Dans ces conditions, les rendements obtenus n'ayant pas été satisfaisants (comparé à ceux publié > à 90%), nous avons utilisé de l'acide sulfurique à 70% ou 80%, favorisant la précipitation de la coumarine, **16**. Le précipité est ensuite rincée à l'EtOH afin d'éliminer les traces de réactifs restants et évitant une trop grande perte de produit par des lavages à l'eau. Ce mode opératoire a permis d'obtenir les coumarines **16** et **17**, à partir du résorcinol et d'acétoacétate d'éthyle (ou 4-chloroacétoacétate) avec des rendements quasi-aquantitatifs (96%) (Schéma 9).

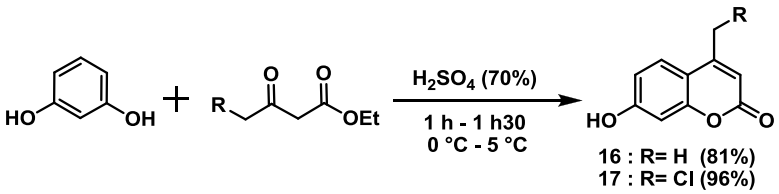


Schéma 9: Synthèse des composés 16 et 17.

.Nous avons ensuite synthétisé des coumarines dont les propriétés de fluorescence sont pH-dépendantes.[5, 165] L'addition du 4-chloro résorcinol sur du diméthyl 3-oxopentanedioate dans l'acide sulfurique 80%, à 0° C, conduit à un intermédiaire sous forme d'ester méthylique, qui est saponifié en présence de soude (1 M) dans du méthanol, conduisant à la coumarine **18** avec un rendement de 46% (Schéma 10). Ces conditions appliquées au chloro-acétoacétate d'éthyle conduisent à la coumarine **19** avec un rendement faible de 7%, dû à des problèmes de solubilité et de dégradation au cours de la purification et à. Néanmoins la quantité de produit obtenue étant suffisante pour la suite des synthèses, cette réaction n'a pas été optimisée.

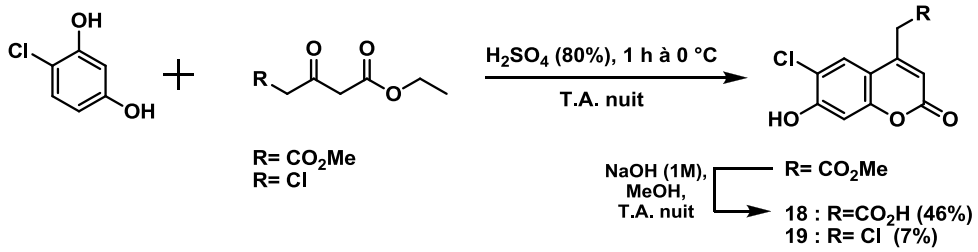


Schéma 10 : Synthèse de 6-chlorocoumarines, 18 et 19.

Les différentes 7-hydroxycoumarines synthétisées devraient possèder des propriétés de fluorescence similaires, néanmoins elles permettront d'insérer de différentes manières les molécules d'intérêts. Afin de limiter certaines réactions secondaires possibles lors des étapes postérieures et de modifier les propriétés physico-chimiques de ces composés finaux, nous avons également protégé la fonction hydroxyle en positions 7 des composé **17** et **18**.

La méthylation de l'hydroxyle en position 7 du composé **17** par du diméthylsulfate en présence de carbonate de potassium dans l'acétone a conduit à la méthoxycoumarine, **20** avec un rendement quasi-quantitatif.[170] L'acétylation du composé **18** en présence d'anhydride acétique et d'éther de trifluorure de bore conduit à **21** avec un rendement de 44% (Schéma 11).[171]

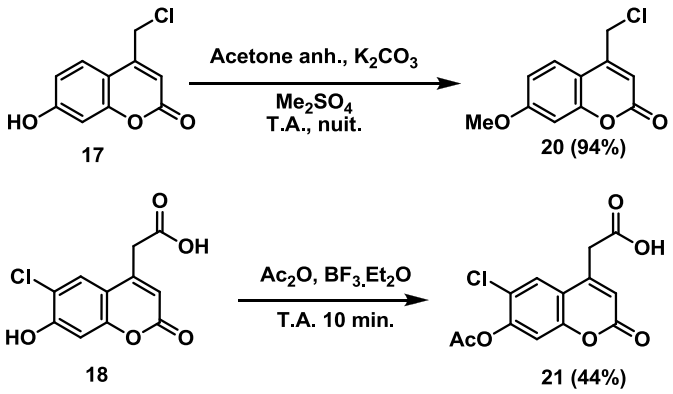


Schéma 11: Synthèse des coumarine protégé, 20 et 21.

L'utilisation de la méthode de Pechmann en catalyse d'acide de Brønsted a conduit majoritairement à de très bons rendements avec une méthode de purification rapide et efficace. Nous nous sommes ensuite tournés vers la synthèse de dérivés de la 7-aminocoumarine, connus pour avoir de bonnes propriétés de fluorescence et nous permettant de réalisés des études de relation structures-activités sur nos cibles.

VI.2.b Synthèse par la méthode de Pechmann (Acide de Lewis)

L'utilisation d'acide de Brønsted ne peut s'appliquer en présence d'un atome d'azote protonable sur le motif phénolique dans l'acide sulfurique. La protonation de l'azote conduit à une diminution de la réactivité du motif phénolique et rend la réaction de formation du motif coumarinique quasi-impossible. La condensation de Pechmann n'est donc réalisable qu'en présence d'acide de Lewis. Cet acide favorise la trans-estérification ainsi que la seconde étape de condensation de Friedel et Craft. De nombreux acides de Lewis ($ZnCl_2$, $AlCl_3$, $Ti(iOPr)_4$…), ont été utilisés pour la synthèse de coumarine. Cependant, il est indispensable pour nos

synthèses d'opter pour un acide de Lewis très oxophile et n'interagissant pas (ou peu) avec les fonctions amines pour ne pas diminuer la nucléophilie du cycle lors de l'étape de cyclisation. Le tétra-isopropoxyde de titane est connu pour possèder ces propriétés et pour être utilisé dans des réactions de trans-estérification, il apparait alors comme un bon candidat.[172] Récemment, un analogue, le chlorure de triisopropoxyde de titane a été décrit pour améliorer les rendements de ces réactions.[168] Cela peut s'expliquer par la plus grande acidité de Lewis du chlorure de triisopropoxyde de titane qui possède une fonction chloré plus facilement échangeable lors de l'activation des fonctions hydroxyles. Nous avons choisi de reproduire ces conditions expérimentales, et effectivement l'utilisation de cet acide de Lewis a permis l'obtention de nombreux composés.

En nous appuyant sur cette étude nous avons synthétisé les composés **22, 23, 24** et **25** avec des rendements similaires à ceux de la publication.[168] Cette réaction a été extrapolée pour la synthèse des coumarines **26** et **27.** Nous avons choisi dans un premier temps la 8-hydroxyjulolidine comme réactif de départ, motif présent dans la structure du FFN511 et qui une confère de très bonnes propriétés de fluorescence. La coumarine **22** a été obtenue, avec un rendement de 66%, par condensation de la 8-hydroxyjulolidine et de l'3-oxopentanedioate dans du toluène au reflux, en présence de chlorure de triisopropoxyde de titane, suivi de la saponification de l'ester obtenu par une solution de soude dans du MeOH (Schéma 12). Ces conditions appliquées *m*-diméthylaminophénol et *m*-diéthylaminophénol, conduisent aux composés **23** et **24** avec des rendements corrects sur deux étapes (35-40%) (Schéma 12). La baisse de rendement observée lors de la formation de ces deux coumarines (par rapport à la coumarine **22**) peut s'expliquer par la différence de pKa entre le motif anthracène et les motifs *N*-diméthyle et *N*-diéthyle (qui ont un pKa voisin de la fonction acide) ce qui a conduit à la perte de produits lors de la purification par précipitation en milieu acide.

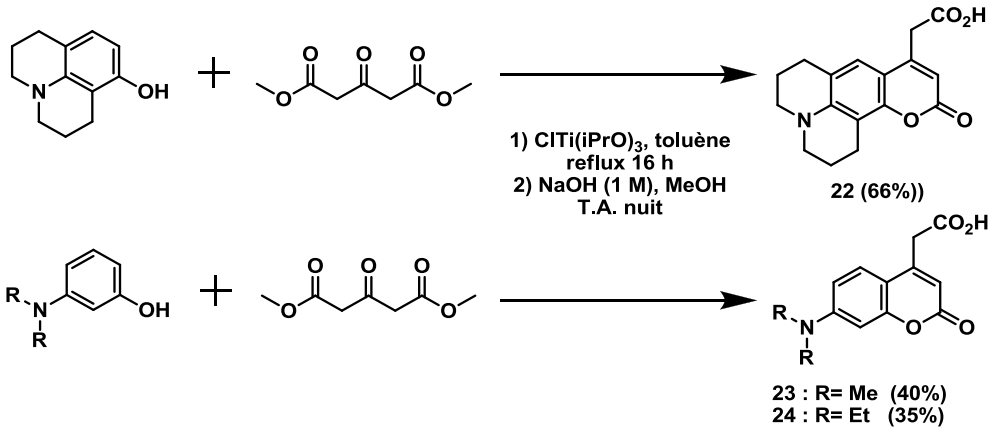


Schéma 12 : Synthèse de dérivés de 7-aminocoumarines, 22, 23 et 24, via la condensation de Pechmann catalysé par acide de Lewis.

En suivant ce mode opératoire, nous avons synthétisé les analogues chlorométhylènes de ces composés en utilisant comme électrophile le chloro-acétoacétate d'éthyle (composés **25, 26 et 27**).[173] L'accès aux composés **26** et **27** par cette voie n'est pas encore décrit dans la littérature et nous avons obtenu des rendements assez similaires à ceux observés pour la synthèse du composé **25**. (Schéma 13)

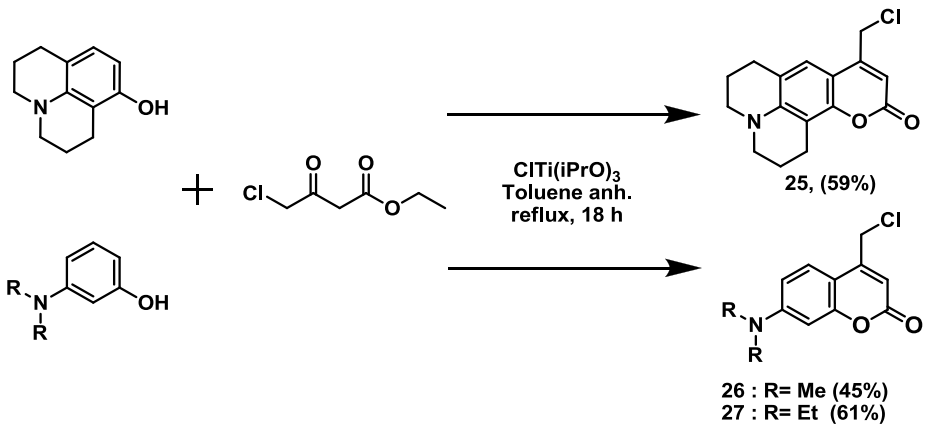


Schéma 13: Synthèse de dérivés de 7-aminocoumarines, 25, 26 et 27, via la condensation de Pechmann catalysé par acide de Lewis.

Une autre méthode de formation de dérivés de 7-aminocoumarine est l'utilisation d'un électrophile activé par de très bons groupements partants Cette voie de synthèse permet l'obtention du composé **28** en une seule étape à partir d'un dérivé malonate et de 8-hydroxyjulolidine.[174] On synthétise tout d'abord le bis(2,4,6-trichlorophenyl)malonate, malonate « original » utilisé depuis quelques années pour la formation de dérivé 4-hydroxycoumarine. Il possède deux bons groupements partants (trichlorophényle) qui favorisent la première étape de trans-estérification et la seconde étape de condensation, lors de l'addition de la 8-hydroxyjulolidine sur ce malonate. Le composé **28** a été obtenu avec un rendement similaire à celui publiés (Schéma 14).[174]

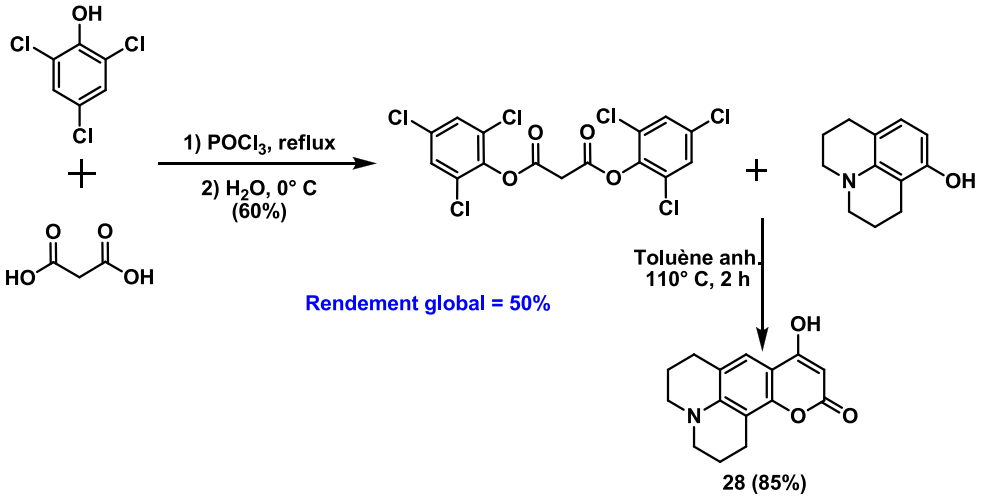


Schéma 14: Synthèse de dérivé de la 7-amino4-hydroxycoumarine, 28, nécessitant l'obtention préalable du bis(2,4,6-trichlorophenyl) malonate.

Pour les synthèses des dérivés de la 7-aminocoumarine, l'emploi d'acide de Lewis a été nécessaire. La fonction amine tertiaire présente sur ces différents composés a nécessité la modification du mode de purification. En effet, une voie classique de purification des coumarines est une précipitation dans la glace. En catalyse acide fort, il suffit en général de diluer dans un grand volume d'eau glacée pour faire précipiter les coumarines. Pour plus de pureté nous avons effectué plusieurs précipitations dans l'EtOH afin d'éliminer les réactifs phénoliques employés. L'utilisation d'acide de Lewis ($ClTi(iPrO)_3$) pour la synthèse de dérivés 7-aminocoumariniques impose une hydrolyse en fin de réaction, ce qui génère en contrepartie de l'acide chlorhydrique. Pour éviter une trop grande perte de produit la phase aqueuse est d'abord neutralisée (pH = 8)

afin de déprotoner les amines tertiaires (possédant des pKa voisin de 6) avant d'effectuer différentes extractions. Après évaporation de la phase organique, les produits sont récupérés par précipitation dans de l'eau glacée (à pH légèrement basique). Néanmoins l'utilisation d'acide de Lewis a permis la synthèse de motifs coumariniques portant des substituants variés. Nous avons ensuite réalisé des modifications autour des motifs coumariniques synthétisés.

VI.2.c Fonctionnalisation des coumarines en 4 et 7

Certains des dérivés coumariniques synthétisés ont été fonctionnalisés par introduction de fonctions nucléophile, de type amine et alcool primaire. Nous avons également introduit par éthérification ou substitution nucléophile des chaines alkyles portant un alcool primaire. Ces fonctionnalisations permettront ainsi d'élargir les voies d'accès aux molécules finales désirées et d'étendre notre étude relation structure-activité.

Ainsi à partir de la 4-(chlorométhyl)-7-hydroxycoumarine, **17**, nous avons synthétisé plusieurs composés (**29** à **32**). Nous avons tout d'abord, formé la 4-(aminométhyl)-7-hydroxycoumarine par substitution du chlore en présence d'un très large excès d'ammoniaque concentré au reflux, ce qui permet d'orienter la réaction vers la substitution du chlore (Schéma 15). Cette synthèse[175] a permis l'obtention du composé **29** avec un rendement de 94%.

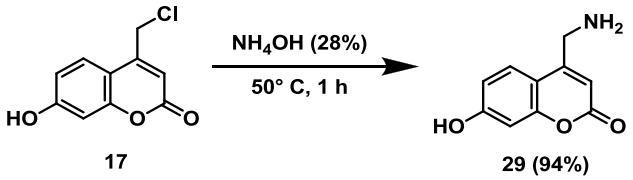


Schéma 15: Synthèse de la 4-(aminométhyl)-7-hydroxycoumarin, 29.

Nous avons ensuite effectué la synthèse de la 4-[(2-hydroxyethylamino)méthyl)]-7-hydroxycoumarine, **30** en deux étapes, en protégeant dans un premier temps la fonction hydroxyle en 7 (par acétylation) puis en couplant l'éthanolamine à l'aide d'une base (Et_3N).[176] Mais l'étape de substitution du chlore a entrainé la déprotection de la fonction phénolique, ce qui a conduit à un mélange de sous-produits sans former le produit **30**. Nous avons alors opté pour une voie de synthèse avec une base moins forte ($NaHCO_3$), dans le MeOH (Schéma 16).[177, 178]

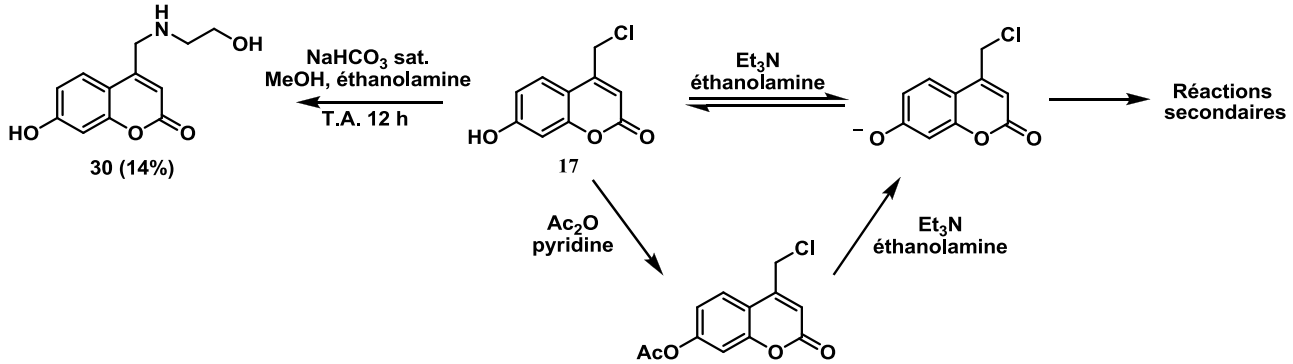


Schéma 16: Synthèse de la coumarine 30.

Cette méthode offre l'avantage d'éviter les étapes de protection/déprotection. Par cette voie de synthèse, nous avons obtenu **30** avec un rendement de 14% et nous avons récupéré le produit de départ n'ayant pas réagi pouvant être directement réengagé dans une nouvelle réaction. Au vue de la quantité suffisante de produit récupéré nous n'avons pas optimisé cette synthèse.

Le composé **17** a également permis la synthèse du composé **32** : 4-(hydroxyméthyl)-7-hydroxycoumarine en passant par l'intermédiaire **31**. Ce produit a été obtenu en extrapolant une méthode utiliser sur des dérivés de 7-aminocoumarine.[156] La chloro-coumarine est placé dans du DMF en présence de sel d'acétate de potassium et d'une quantité catalytique de TBAB (tetrabutylammonium bromide). Après une nuit à T.A., nous obtenons le produit de substitution du chlore par un acétate avec un rendement de 64%. Ce produit est ensuite « déprotégé », à l'aide de K_2CO_3 dans du méthanol, afin d'obtenir le composé **32** avec un rendement global de 32% (sur deux étapes).

En parallèle, nous avons réalisé une autre voie de synthèse pour l'obtention de ce dérivé. Cette méthode,[179] plus simple à mettre en œuvre, a permis l'obtention de la 4-(hydroxyméthyl)-7-hydroxycoumarine avec un rendement de 69%, par simple substitution du chlore par de l'eau portée au reflux (Schéma 17). On remarque que la substitution du chlore par l'ion acétate qui se déroule à T.A. présente une meilleur réactivité que celle dans l'eau qui a besoin d'être réalisée au reflux. Ces réactions de substitutions ne s'effectuent pas en milieu basique fort (type LiOH ou NaOH) pour éviter les réactions parasites, tel que la polymérisation de la coumarine.

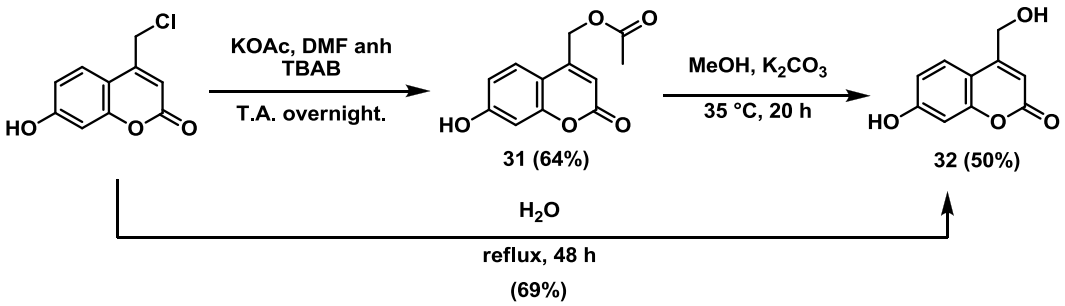


Schéma 17: Synthèse de la 4-(hydroxyméthyl)-7-hydroxycoumarine

Nous avons reproduit cette seconde voie de synthèse en tentant de substituer le chlore du dérivé 7-aminocoumarine **3115** par une fonction hydroxyle. Cette synthèse dans l'eau au reflux n'a pas permis d'obtenir les composés désirés (récupération du produit de départ et de produits de dégradations). Nous avons alors initié la seconde voie d'accès à ces composés, à savoir la substitution par un acétate qui est ensuite hydrolysé.[156] Ce protocole a été réalisé sur le composé **3115**, et a permis l'obtention du composé **3127**, avec un meilleur rendement que celui observé sur le dérivé 7-hydroxy. Mais l'hydrolyse de la fonction acétate n'a pas encore été réalisée (Schéma 18).

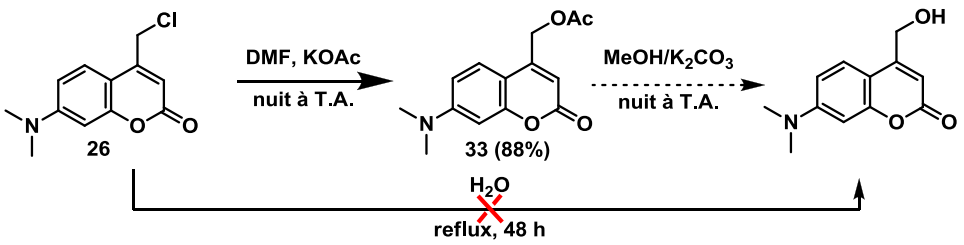


Schéma 18 : Voie de synthèse de la 7-diméthylamino-4-(hydroxyméthyl)coumarine

Enfin pour conclure la fonctionnalisation de ces motifs coumariniques nous avons éthérifié la position 7-hydroxycoumarine non-substitué (commerciale) et de la 4-méthyl-7-hydroxycoumarine avec du carbonate d'éthyle en milieu basique.[180] Nous avons obtenu les produits désirés éthérifiés, **34-a** et **35-a,** portant une fonction éthanol sur la position 7-hydroxy et nous avons observé la formation de produits secondaires diéthérifiés, **34-b** et **35-b**, qui pourront également être utilisés lors de la conception de molécules d'intérêt (Schéma 19). Ces dérivés pourront nous offrir de nouvelles possibilités de fonctionnalisations avec une plus grande liberté de mouvement (comparé à la fonction phénolique).

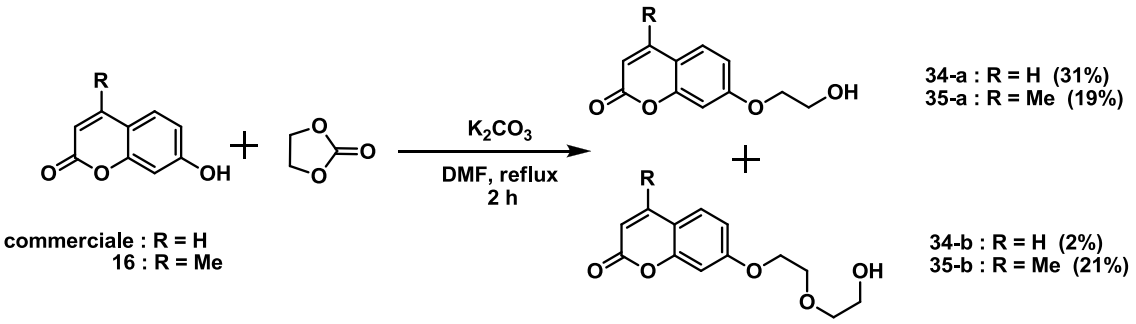


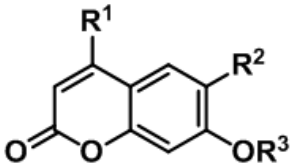
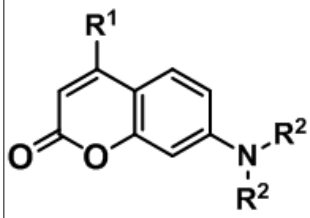
Schéma 19 : Synthèse de dérivés éthanoliques de la 7-hydroxycoumarine, 34-a, 35-a, 34-b et 35-b.

Ces étapes de fonctionnalisation de la position 4 effectuées sur les dérivés de la 7-hydroxycoumarine pourront être envisagées sur les dérivés 7-aminocoumarine.

VI.2.d Bilan :

De nombreuses coumarines ont été obtenues via la condensation de Pechmann par catalyse d'acide de Brønsted ou acide de Lewis, nous a permis d'obtenir un grand nombre de composés possédant différentes fonctions qui nous offriront plusieurs voies d'accès à nos molécules finales. Les différentes voies de synthèses utilisées nous ont permis d'obtenir une grande quantité de dérivés de coumarines avec des substituants différents et des propriétés physicochimiques différentes (pKa, solubilité, longueurs d'onde…) qui sont résumé dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Récapitulatif de l'ensemble des dérivés coumariniques synthétisés

Structure	entrée	R^1	R^2	R^3	Rdt global
	**16**	CH_3	H	H	81%
	17	CH_2Cl	H	H	96%
	20	CH_2Cl	H	Me	90%
	30	$CH_2NH(CH_2)_2OH$	H	H	13%
	29	CH_2NH_2	H	H	90%
	32	CH_2OH	H	H	66%
	31	CH_2OAc	H	H	84%
	Com.	CH_2CO_2H	H	H	-
	18	CH_2CO_2H	Cl	H	46%
	21	CH_2CO_2H	Cl	Ac	20%
	19	CH_2Cl	Cl	H	7%
	34-a	H	H	$(CH_2)_2OH$	31%
	34-b	H	H	$(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$	2%
	35-a	CH_3	H	$(CH_2)_2OH$	15%
	35-b	CH_3	H	$(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$	17%
	**22**	CH_2CO_2H	$(CH_2)_3$	-	66%
	28	OH	$(CH_2)_3$	-	50%
	25	Cl	$(CH_2)_3$	-	59%
	23	CH_2CO_2H	Me	-	81%
	24	CH_2CO_2H	Et	-	96%
	26	CH_2Cl	Me	-	45%
	27	CH_2Cl	Et	-	61%
	33	CH_2OAc	Me	-	39%

VI.3 Quinoléine/Quinolinone

Ces deux motifs présentent un grand intérêt de par les nombreuses variations structurales possibles induisant en fonctions des substituants une modulation de leurs propriétés physico-chimique. Le motif quinolinone possède des propriétés de fluorescence assez proche de celles des coumarines. Le motif quinoléine a également été très étudié et présente une grande variabilité de ses propriétés de fluorescence et de solvatation en fonction des substituants.[181] Ces fluorophores (Figure 54) sont de bons outils pour la bio-imagerie, ils sont utilisés principalement en tant que sondes fluorescentes[182-184] et plus récemment en tant que cages (à l'instar des coumarines).[185-187]

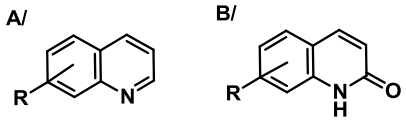


Figure 54: A/ squelette du motif quinoléine, B/ squelette du motif quinolinone

La synthèse de ces deux motifs substitués a été largement étudiée dans la littérature avec divers mécanismes et stratégies: Conrad-Limpach-Knorr,[188, 189] Skraub- Doebner-Von Miller,[190, 191] Frielaender,[192, 193] médiation d'halogène[194], catalyse au cuivre[195] ou encore par agents de transfert de phase.[191, 196] Ces divers protocoles ont permis de développer un grand nombre de composés quinoléines et quinolinones portant de nombreux substituants différents.

VI.3.a Motif quinoléine

VI.3.a.i Généralités :

Nous décrirons uniquement la méthode de Skraub-Doebner-Von Miller qui est la voie d'accès aux quinoléines la plus répandue. Cette méthode utilise des conditions un peu plus douces que Conrad-Limpach-Knorr (développé par la suite) mais les rendements sont généralement moins bons et les modes opératoires fastidieux. Néanmoins cette méthode permet l'obtention de nombreuses quinoléines substituées en fonction du choix des réactifs (Schéma 20).[181] Cette réaction s'effectue en présence d'une catalyse acide, de cétone α-β-insaturée et d'une aniline.[190, 191] Le mécanisme est encore débattu dans la littérature mais le passage par une imine lors de la première étape semble aujourd'hui s'imposer {Denmark, 2006;Laras, 2012}. L'addition de Michaël d'une seconde aniline permet la cyclisation, suivie de la réaromatisation avec libération d'aniline. L'aromatisation complète de la molécule est la force motrice permettant l'oxydation in-situ en dernière étape (Schéma 20).

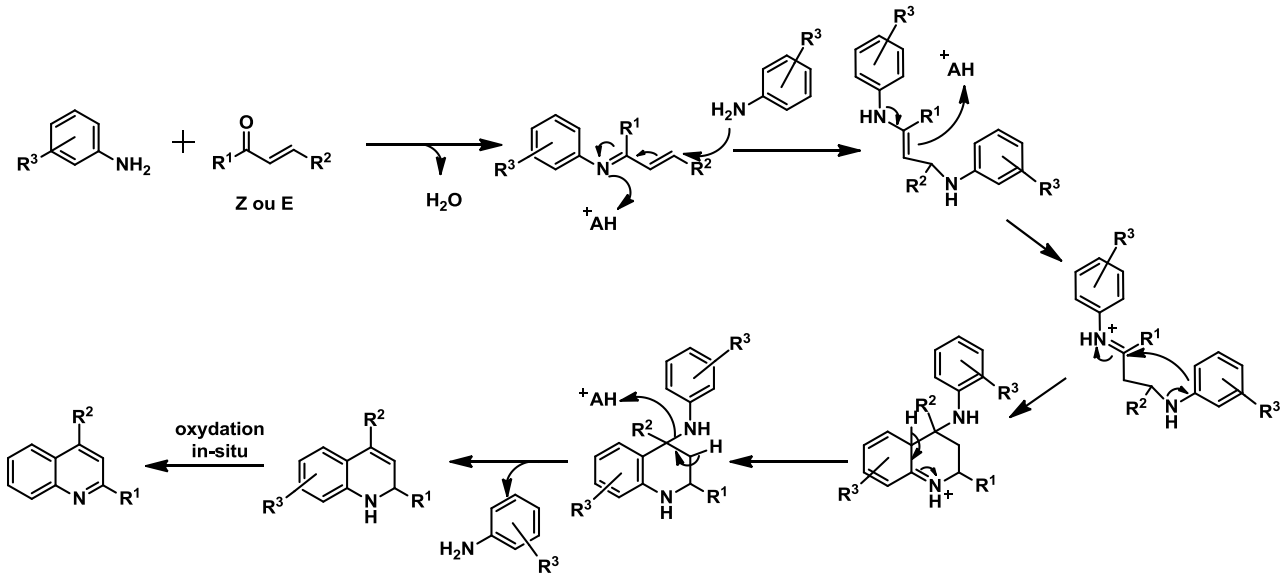


Schéma 20 : Mécanisme de la réaction de Doebner-Miller

VI.3.a.ii Synthèse :

Au sein du laboratoire plusieurs quinoléines 2,4 diester ont été synthétisées[181] suivant cette méthode et/ou encore par agent de transfert de phase. La cétone α,β-insaturée substituée par des groupements d'intérêt a été préparée par diestérification, suivie de la bromation puis élimination de HBr en milieu basique. Ces trois étapes conduisent au composé souhaité avec un rendement de 80%, précurseur des quinoléines selon 2 méthodes différentes (Schéma 21). La méthode A, utilise un acide fort (TFA) au reflux. La méthode B est un peu moins conventionnelle et s'effectue dans un mélange H_2O/CH_2Cl_2 à chaud (80 C) en présence d'un agent de transfert de phase comme le sodium dodecylsulfate (SDS), en milieu très acide (acide phosphomolybdique).

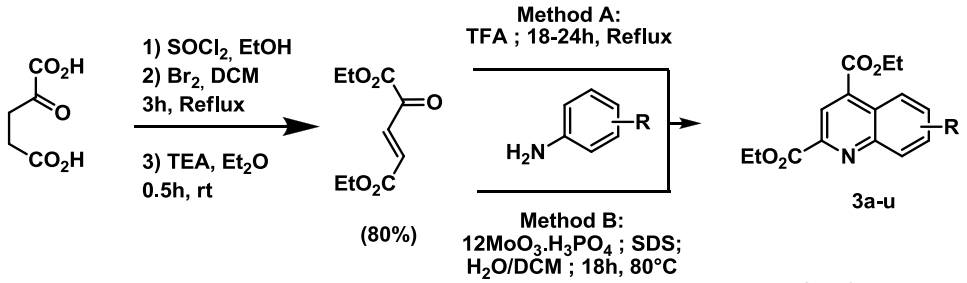
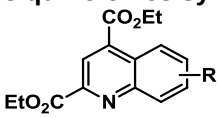


Schéma 21 : Préparation de différentes quinoléines diester.[181 176] [176]

La formation de ces quinoléines à partir de cette cétone α,β-insaturée et de différentes anilines a été optimisée pour conduire à de meilleurs rendements que ceux proposés dans la littérature.[197, 198] L'étape de condensation est très dépendante de la position des substituants présents sur l'aniline. En effet, la présence de substituants en position meta de l'aniline défavorise l'étape de cyclisation par la méthode A (Skraub-Doebner-Von Miller), alors que la méthode B (agents de transfert de phase) conduit à de meilleurs rendements pour les quinoléines substituées en positions 7. De façon surprenante, les substituants électrodonneurs ou électroattracteurs n'ont que peu d'effet sur les rendements (Tableau 5 :).

Tableau 5 : Structure et Récapitulatif des quinoléines synthétisées à partir des méthodes A et B.



R	Rendement (%)		R	Rendement (%)	
	Méthode A	Méthode B		Méthode A	Méthode B
H	47	11	6-OH	13	34
6-Me	55	32	7-OH	8	20
7-Me	20	48	8-OH	30	10
6-NH_2	-	5	6-OMe	39	28
6-$NHCOCF_3$	8	-	7-OMe	21	33
6-NHMe	15	-	8-OMe	46	13
6-$N(Me)_2$	25	-	8-OBn	30	1
7-$N(Me)_2$	23	-	5-Me ; 8-OH	60	-
6-$N(Et)_2$	15	-	5-Me ; 8-OBoc	23	-
6-NO_2	33	-	6-CO_2H	32	-
7-NO_2	-	-			

Il est ensuite possible de mono ou di-déprotégé les esters éthyliques de ces composés en utilisant de manière classique de la soude dans du THF. Ces composés seront ainsi facilement fonctionnalisables par des molécules d'intérêt pour les cibles choisies. De plus une étude a montré que certains de ces composés présentent une réponse à l'excitation biphotonique, ce qui permet de déplacer les longueurs d'émission dans une zone de grand intérêt pour la bio-imagerie (700-1000 nm).

En complément de ce travail, nous nous sommes intéressés à la synthèse de dérivés quinolinones présentant des propriétés physico-chimiques différentes permettant ainsi d'étendre la gamme de composés fluorescents disponibles.

VI.3.b Motif quinolinone

VI.3.b.i Généralités :

La méthode de Conrad-Limpach-Knorr est l'une des voies d'accès aux quinolinones ; elle permet d'obtenir des 4-quinolinones sous contrôle cinétique et des 2-quinolinones sous contrôle thermodynamique.[189, 199, 200] Cette réaction s'effectue à partir de dérivés d'aniline et de β-cétoester en catalyse acide. A température ambiante, l'aniline réagit avec le carbonyle le plus réactif (cétone) pour conduire au β-énamino ester qui se cyclise à 250 °C pour former la 4-hydroxyquinoléine, en équilibre avec la 4-quinolinone (produit cinétique) (Schéma 22, A). Si on effectue cette réaction en condition thermodynamique (chauffage de la solution avant ajout du β-cétoester), l'aniline va s'additionner sur l'ester, formant une liaison β –cétoamide qui se cyclise et se déshydrate conduisant à la 2-quinolinone attendue, en équilibre avec la 2-hydroxyquinoléine (produit thermodynamique)(Schéma 22

Schéma 22 B)

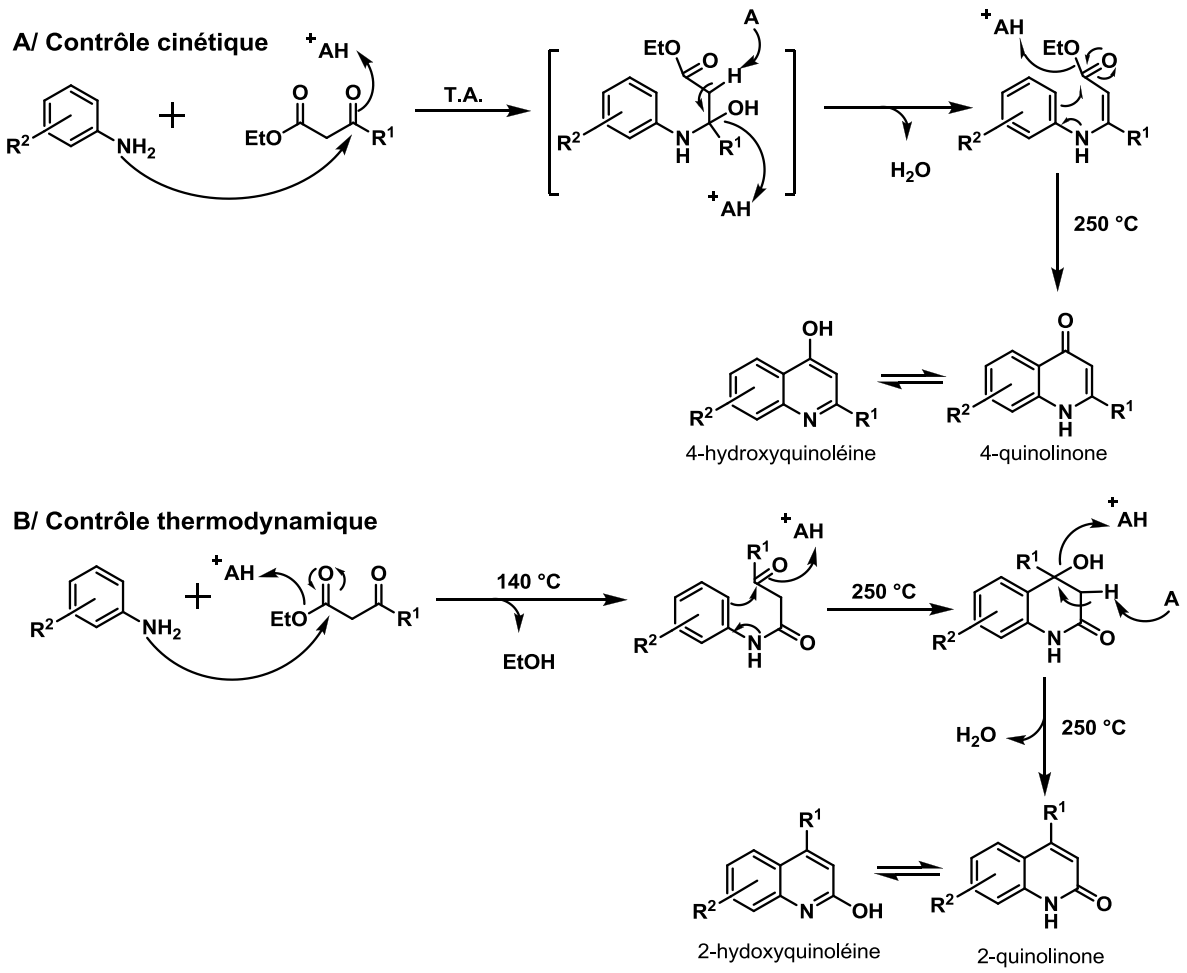


Schéma 22 : A/ Mécanisme de la synthèse de la 4-hydroxyquinoléine B/ Mécanisme de la synthèse de la 2-quinolinone.

Cette voie d'accès permet l'obtention de ces deux motifs avec de très bons rendements. Il est possible de fonctionnaliser ces motifs en utilisant des anilines ou β-cétoesters substitués. A l'instar des coumarines décrites précédemment, cette méthode n'est pas compatible avec toutes les anilines et β-cétoesters car les conditions réactionnelles sont drastiques: chauffage à reflux en milieu acide. D'autres méthodes utilisant des conditions plus douces ont donc été décrites afin de s'adapter à tous les types de réactifs.

La réaction de Schotten-Baumann est l'une de ces méthodes, à partir d'un intermédiaire cinnamanilides et de dérivés d'anilines conduit à un intermédiaire qui se cyclise suivant un mécanisme de Friedel et Craft en présence d'acide de Lewis ($AlCl_3$) (Schéma 23). Ces motifs quinolinones peuvent être modifiés par introduction d'un chlore sur la position 2 (en présence de $POCl_3$) conduisant à des 2-chloro-quinoléines pouvant à leur tour être fonctionnalisée sur cette position chloré.[201]

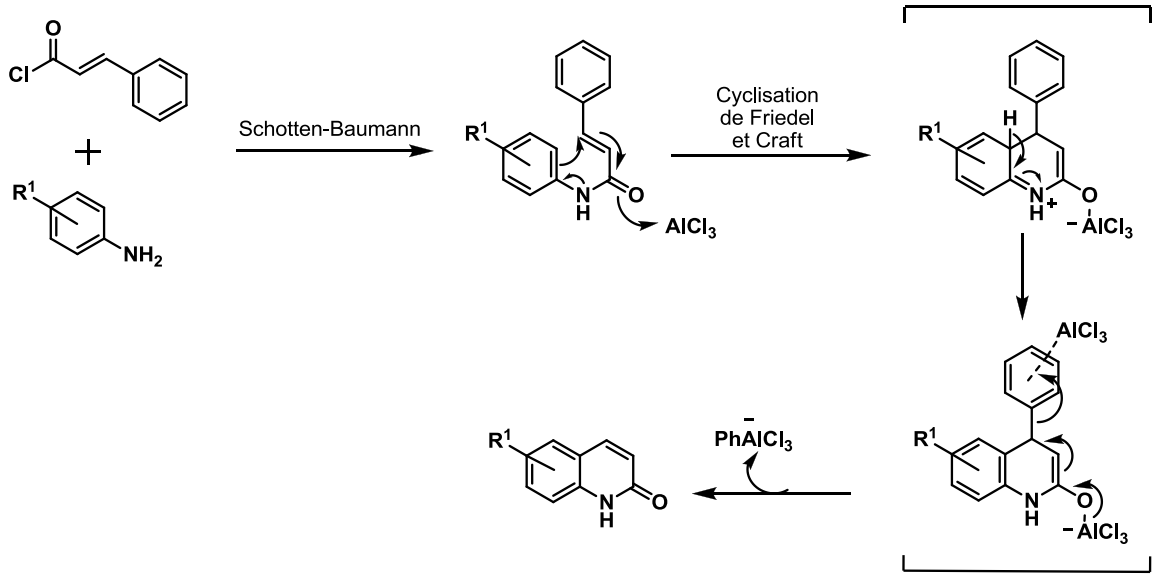


Schéma 23 : Mécanisme de synthèse de 2-hydroxyquinolinone substitué en présence d'acide de Lewis.

Ce type de modification pourrait nous permettre d'élargir facilement notre gamme de fluorophores et d'envisager de nouvelles voies d'accès à la fonctionnalisation des synthons d'intérêts par des quinolinones.

VI.3.b.ii *Synthèse :*

Afin d'obtenir des 6- ou 7-hydroxyquinolinones, nous avons utilisé les deux voies d'accès présentées ci-dessus. Dans le cas de la synthèse de la 4-méthyl-7-hydroxyquinolinone, **37** nous avons employé la méthode de Conrad-Limpach-Knorr tandis que pour la synthèse de la 6-hydroxyquinolinone, **39**, nous avons eu recours à la méthode utilisant des acides de Lewis.

La 4-méthyl-7-hydroxyquinolinone, **37**, offre deux possibiltés de couplage sur la position 7-hydroxy et/ou sur l'azote intracyclique. En vue d'effectuer cette synthèse il est nécessaire de travailler à partir d'un amino-phénol protégé. En effet, les conditions de Conrad-Limpach-Knorr sont similaires au condition de Pechmann utilisée pour la formation de coumarine.[168] Il y aurait donc compétition entre la formation d'une 7-aminocoumarine et 7-hydroxyquinolinone (Schéma 24).

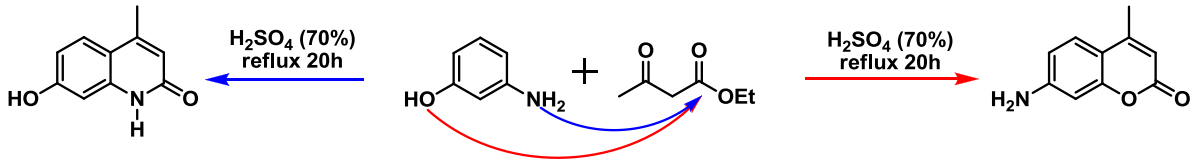


Schéma 24 : Possible compétition entre formation de coumarine ou de quinolinone en présence d'acide de Brønsted.

Nous avons donc utilisé comme réactif la méthoxyaniline permettant d'obtenir la 7-méthoxy-4-méthyl-quinolinone, **36**.[202] Ce dérivé ensuite déprotégé en présence d'acide bromhydrique dans l'AcOH au reflux pendant 5 jours, pour obtenir le composé souhaité, **37**, 7-hydroxy-4-méthyle-quinolinone. Le rendement global de ces deux étapes est satisfaisant (47%) (Schéma 25). La 6-hydroxyquinolinone pourrait être obtenue dans les mêmes conditions avec des rendements équivalents.[202] La limitation de l'utilisation des acides de Brønsted dans les mécanismes de cyclisation visant à obtenir des hétérocycles aromatique a été soulignée lors de la

synthèse des coumarines dans les conditions de Pechmann. De façon similaire, nous avons souhaité évaluer la pertinence de l'utilisation des acides de Lewis pour la synthèse de quinolinone.

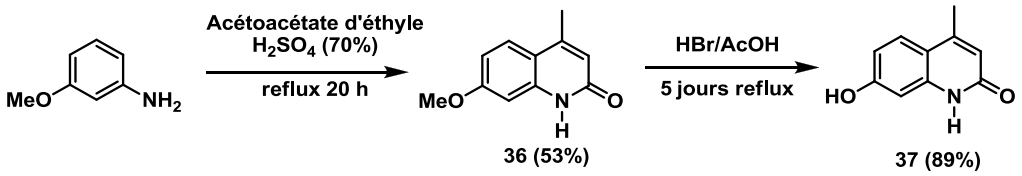


Schéma 25 : Voie d'accès à la 4-méthyl-7-hydroxyquinolinone, 37.

Nous avons ensuite souhaité faire varier la position de l'hydroxyle en synthétisant la 6-hydroxyquinolinone dans le cadre de notre étude RSA. Pour obtenir ce composé nous avons utilisé la voie d'accès utilisant un acide de Lewis ($AlCl_3$). Au préalable, la réaction de Schotten-Baumann à partir de la 4-méthoxyaniline et de chlorure de cinnamoyle permet d'obtenir l'intermédiaire cinnamanilides **38,** avec un très bon rendement.

Cet intermédiaire subit ensuite une cyclisation de Friedel et Craft[203] qui inclut une déarylation assistée par le trichlorure d'aluminium[204] (Schéma 26). Le trichlorure d'aluminium placé en excès (6éq.) permet également de déméthyler le phénol en position 6. Cette fonction est fortement polarisée par le trichlorure d'aluminium, ce qui conduit au départ de chlorure de méthylène qui après ajout d'eau forme du méthanol et du trioxyde d'aluminium, libérant ainsi le phénol en position 6 et conduisant au composé **39** avec un rendement de 40%.

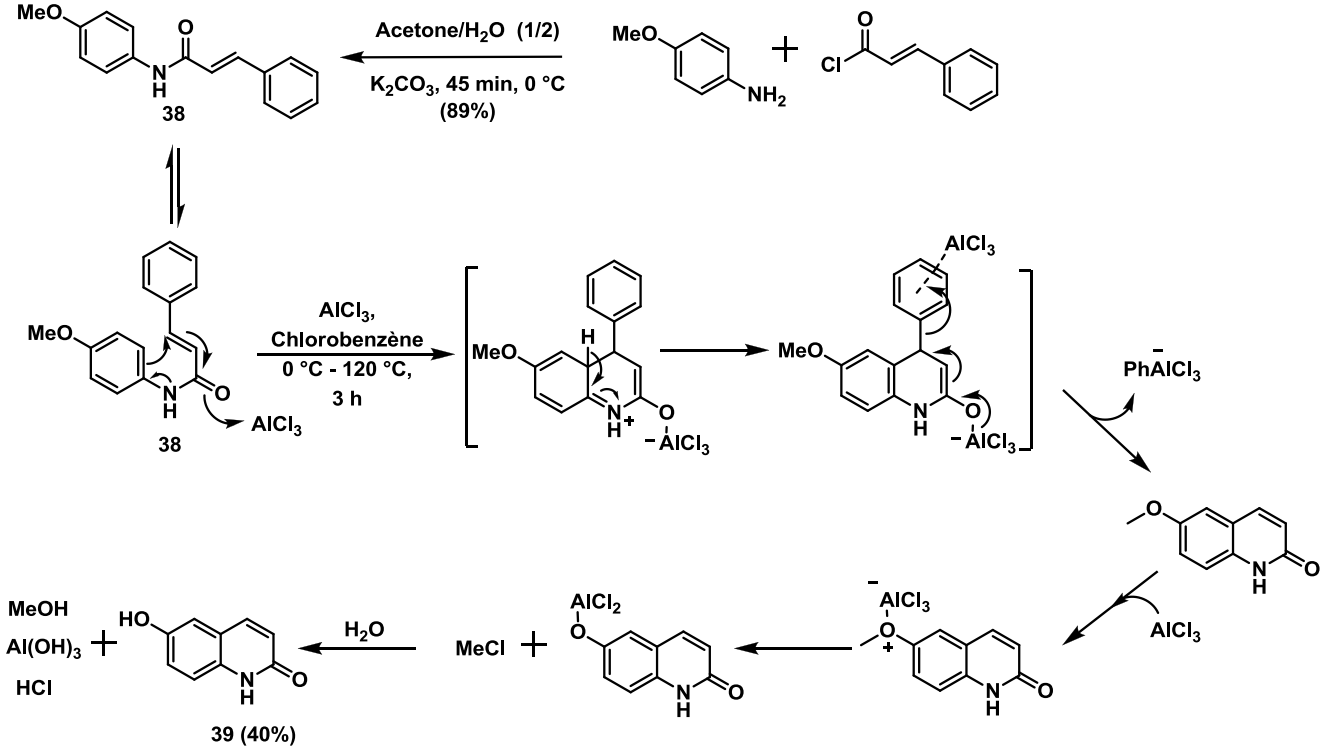


Schéma 26: Cyclisation de Friedel et Craft et déméthylation à partir de l'intermédiaire cinnamanilide, en présence de trichlorure d'aluminium[205, 206]

Ces deux quinolinones, **37** et **39**, offrent deux sites potentiels de couplage des synthons d'intérêts : la position 6-/7-hydroxy et l'azote intracyclique. Afin de pouvoir fonctionnaliser l'azote intracyclique, plus facilement (en évitant de possible réaction secondaire avec l'hydroxyle), nous avons protégé le phénol du composé **37**, en acétoxy. Cette réaction s'effectue au reflux, dans l'acide acétique en présence d'anhydride acétique conduisant au composé **40** avec un rendement de 52% (Schéma 27).

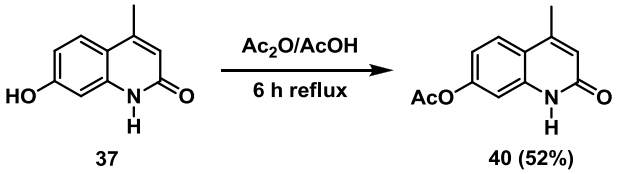


Schéma 27 : Synthèse du composé 2065

Les dérivés précédemment synthétisés pourront être utilisés tels quels en tant que nucléophile pour des O- ou N-alkylation. Des essais préliminaires d'alkylation en conditions classiques, avec du carbonate d'éthyle en milieu basique sur le dérivé commerciale 4-hydroxyquinolinone ont montré une plus grande réactivité de la position 4-hydroxy (Schéma 28). Cette réaction a conduit au composé **41** possédant un groupement alcool primaire en bout de chaine alkyle, qui en comparaison au phénol, offre une « certaine flexibilité » (plus grande liberté de mouvement).

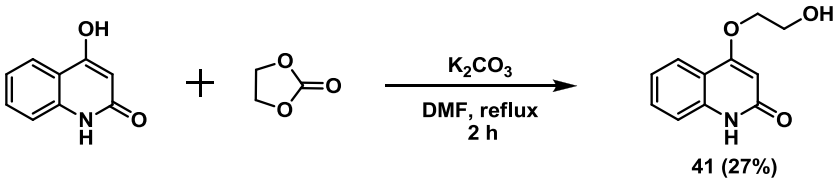


Schéma 28 : Synthèse de la quinolinone, 41.

Les dérivés 6- ou 7-hydroxyquinolinone pourront jouer le rôle de nucléophile lors de réaction de *O*-alkylation ultérieure, en revanche, la *N*-alkylation des quinolinone s'effectuera à partir de composé dont l'hydroxyle sera protégé (ex : **40**).

VI.3.c Bilan :

Au cours de cette étude des voies d'accès ont été mises au point pour la synthèse de motifs quinoléiques ainsi que pour la synthèse de motifs quinolinones. Nous avons notamment comparé deux méthodes d'obtention de motifs quinolinones en présence d'acide de Brønsted ou d'acide de Lewis. La synthèse des motifs quinolinones s'effectue à partir des mêmes réactifs que lors de la synthèse des motifs coumariniques. Il serait intéressant de varier ce réactif (ex : utilisation du 4-chloroacétoacétate d'éthyle) afin de pouvoir étendre la fonctionnalisation de ces motifs quinolinones en position 4, comme cela a été le cas pour la synthèse des différents motifs coumariniques. Les positions 5, 6, 7 et 8 pourraient également être substituées avec des groupements variés, à partir d'anilines substituées, comme nous l'avons vu précédemment, lors du travail effectué au sein du laboratoire dans le cadre de la synthèse de dérivés quinoléiques. Les motifs quinolinones pourraient également être modifiés par l'introduction d'un chlore sur la position 2, en présence de $POCl_3$. Les 2-chloro-quinoléines ainsi obtenues pourront être engagées dans des réactions de substitution du chlore permettant ainsi le couplage via cette position.[201] Cette modification pourrait nous permettre d'élargir facilement notre gamme de fluorophores et d'envisager de nouvelles voies d'accès à des quinolinones fonctionnalisées par des synthons d'intérêts.

Suite à ces travaux, une mini-chimiothèque de quinolinones pourrait être rapidement obtenue et permettre ainsi d'étendre la gamme de composés fluorescents disponibles pour être couplés à des synthons d'intérêts.

VI.4 Nitrobenzofurazane (NBZ)

Le nitro-benzofurazane commence à trouver son essor en imagerie biologique. En effet, lorsqu'il est couplé à des principes actifs il peut être utilisé pour étudier la biodisponibilité et la distribution cellulaire des principes actifs mais également pour caractériser des récepteurs ou transporteurs, pour localiser certaines lignées cancéreuses…[207-209] Il a également été utilisé afin d'étudier les transporteurs GLUTs[96, 97] et est donc parfaitement adapté à notre étude. Ses caractéristiques de fluorescence sont parfaitement adaptées à une étude physiologique et biologique, ce qui fait de ce composé un outil de choix dans le cadre de notre étude.

Ce fluorophore est disponible commercialement sous forme de 7-chloro-4-nitro-benzofurazane (NBZ-Cl) offrant la possibilité directe de fonctionnaliser ce motif par substitution nucléophile. Néanmoins, dans la littérature seule des substitutions par des amines primaires ou secondaires ont été décrites.[96, 97] On retrouve également une étude comparative de substitution par un ammonium ou un hydroxylate.[210] Nous avons décidé de nous servir de ces quelques exemples pour fonctionnaliser le NBZ-Cl.

Le 7-amino-4-nitrobenzofurazane, **42**, est obtenu à partir du NBZ-Cl, dans du MeOH en présence d'ammoniaque à 28%, à T.A., avec un rendement de 70%. La substitution par un ion hydroxylate est réalisée dans une solution saturée de carbonate de sodium et conduit au composé **43** avec un rendement de 52% (Schéma 29).[210]

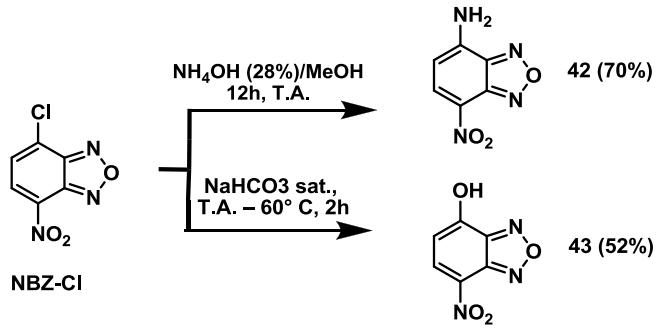


Schéma 29 : Synthèse du 7-amino-NBZ, 42 et du 7-hydroxy-NBZ, 43

La fragilité (sensibilité à la lumière et à l'air) et la forte polarité de ces composés, nécessitent une plus grande précaution lors de l'emploi de méthode classique de purification par chromatographie sur silice. La substitution du chlore par l'éthanolamine est ensuite réalisée suivant le même protocole de SN_{Ar} que lors de la substitution du chlore de la coumarine **17**.[177, 178] Le composé **44** a été obtenu avec un rendement de 30% (Schéma 30) et pourra ensuite être directement fonctionnalisé sur son alcool primaire.

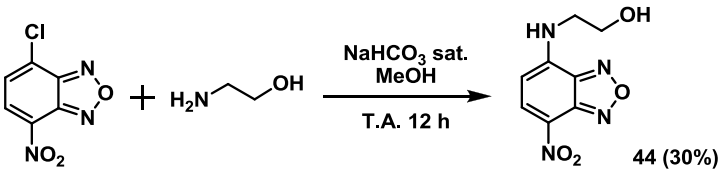


Schéma 30: Synthèse de la 4-éthanolamine-7-nitrobenzofurazane, 44.

VI.5 Résorufine

Ce motif appartenant à la famille des phénoxazine présente des propriétés de fluorescence intéressantes, notamment car ses maxima de longueurs d'onde d'émission avoisinent 500-600nm en fonction des substituants. Les phénoxazines ont particulièrement été utilisés lors de l'étude de mécanismes oxydatifs. La résorufine (Figure 55) peut subir une réduction en milieu biologique (NADH) pour donner la dihydrorésorufine perdant ainsi ses propriétés de fluorescence, tout en pouvant être réoxydée par l'anion superoxide. Cette particularité a permis l'étude de multiples mécanismes biologiques, telle que l'étude du stress oxydant[211], l'étude du CYT P450[212] et certains dérivés sont aujourd'hui étudiés pour leur possible effet antioxydant.[213]

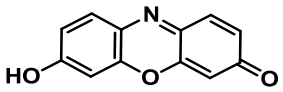


Figure 55: Structure de la résorufine.

Les phénoxazines ont aussi de nombreuses autres applications biologiques. Elles peuvent être couplées à différents composés d'intérêt pour être utilisés comme sondes fluorescentes sur les cibles étudiées (ADN, enzyme, récepteurs…)[214, 215] ou encore comme biosenseur de fonction thiol ou d'hydrogène sulfide.[216, 217] Aujourd'hui certains dérivés des phénoxazines sont même développés en tant qu'agent anti-malaria[218] ou comme agents antiprolifératifs tumorales.[219, 220]

Deux voies d'accès principales sont proposées dans la littérature utilisant des dérivés phénoliques et des dérivés nitro [221, 222] ou nitroso.[223, 224] Nous disposions au laboratoire de dérivé nitroso, nous avons donc opté pour les voies de synthèses partant de ces dérivés nitroso afin d'obtenir des dérivés de phénoxazines possédant des groupements fonctionnalisables. (Schéma 31)

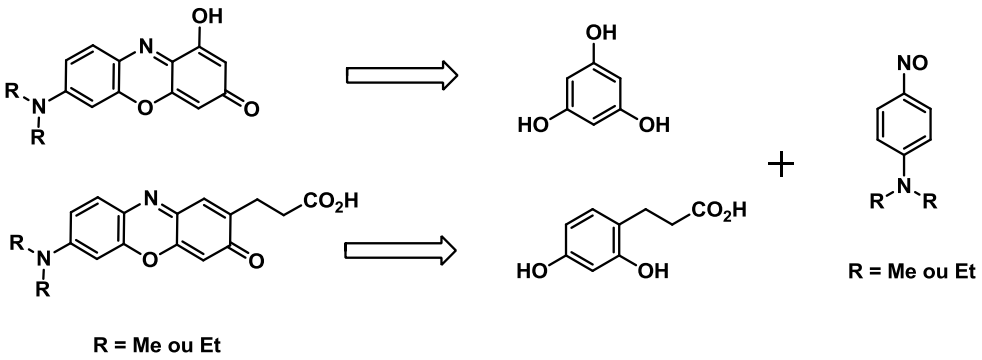
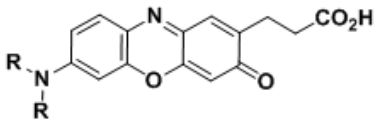
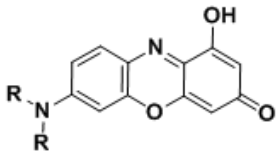


Schéma 31 : Rétrosynthèse de dérivés phénoxazines.

Lors de la synthèse de dérivés de résorufine, plusieurs conditions de réaction (temps, température, solvant…) ont été étudiées (Tableau 6).[215, 225] Les synthèses de tels composés s'effectuent généralement dans l'EtOH au reflux, en présence d'acide chlorhydrique. De nombreuses réactions secondaires se sont produites (multitudes de taches sur CCM) et de nombreux problèmes de purification des produits ce sont présentés notamment dus à une certaine fragilité de ces composés vis-à-vis de la lumière et de l'oxygène. Seules des traces de composés désirés ont été observées par spectrométrie de masse mais l'analyse de ces spectres n'a pas permis l'identification des produits secondaires.

Tableau 6 : Récapitulatif des essais de synthèses de résorufines substituées

Composés	R	Conditions	Rendements
	Me	EtOH, reflux, 16 h	-
	Me	EtOH/HCl, reflux, 2 h	traces
	Et	EtOH/HCl, reflux, 2 h	traces
	Et	EtOH/HCl , reflux, 16 h	traces
	Me	DMF/HCl, reflux, 5 h - 24 h	-
	Me	EtOH, reflux, 16 h	-
	Me	EtOH/HCl, reflux, 16 h	traces
	Et	EtOH/HCl, reflux, 16 h	traces
	Me	DMF/HCl, reflux, 5 h - 24 h	-

La synthèse de ces composés n'a pas été poursuivie, néanmoins la résorufine seul dérivé de phénoxazine accessible commercialement a été fonctionnalisée sur sa fonction hydroxyle, par des composés d'intérêt.

VI.6 Motif Xanthène (dérivé de la fluorescéine)

Ce composé, dérivé de la fluorescéine mais possédant un cycle aromatique en moins respecte notre critère de taille et commence tout juste à être étudié en fluorescence. Une étude a récemment mis en évidence ses propriétés intéressantes de fluorescence, notamment variable en fonction du pH et sa réactivité vis-à-vis de la lumière et en font un composé de choix dans l'élaboration de cages.[226] Aujourd'hui des dérivés de la fluorescéine sont utilisés comme agents de diagnostic en imagerie médicale.[227, 228] Le motif tricyclique de type xanthène de la fluorescéine possède intrinsèquement de très bonnes propriétés de fluorescence. Nous avons donc choisi le motif simplifié, la 6-hydroxy-3H-xanthen-3-one, comme « petites » molécules fluorescentes avec pour objectif final d'être transportées par nos cibles (Figure 56).

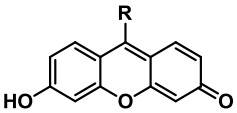


Figure 56: Structure du 6-hydroxy-3H-xanthen-3-one

VI.6.a Synthèse :

Nous avons synthétisé deux dérivés de ce motif xantène, l'un portant une fonction acide, le second une fonction hydroxyle, afin de pouvoir offrir plusieurs voies de fonctionnalisation de ces fluorophores lors de l'introduction des synthons d'intérêt.

- *Synthèse de la succinylfluorescéine :*

Nous avons débuté par la synthèse de la succinylfluorescéine, **45**, qui s'effectue au reflux de l'acide sulfurique en présence d'anhydride phtalique et de résorcinol (Schéma 32).

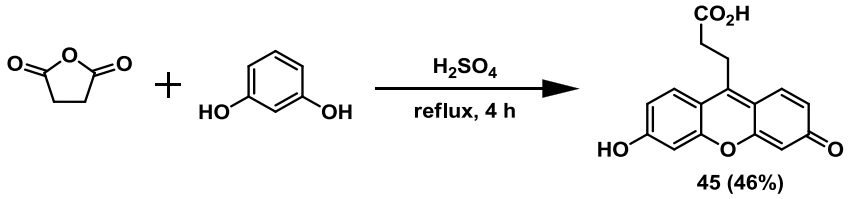


Schéma 32 : Synthèse de la succinylfluorescéine, 45.

Tout comme la fluorescéine, la succinylfluorescéine **45**, existe sous différentes formes tautomères en solution,[229] dont la proportion varie en fonction des solvants et du pH (Schéma 33).

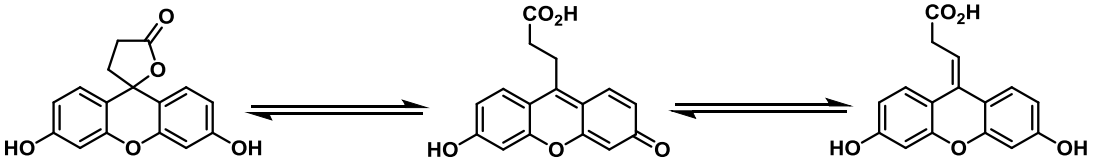


Schéma 33 : Représentation des différentes formes tautomères de la succinylfluorescéine.

Ces différents équilibres peuvent être néanmoins maitrisés par la fonctionnalisation ou la protection de l'acide carboxylique comme décrit dans les synthèses suivantes.

- *Synthèse de « l'hydroxyméthylfluorescéine »:*

Nous avons ensuite voulu synthétiser l'hydroxyméthyl-fluorescéine offrant de nouvelles possibilités de fonctionnalisation en conservant des propriétés intéressantes de fluorescences. Ce composé est obtenu par une suite réactionnelle, détaillé par la suite, avec l'acétophénone comme point départ (Schéma 34).

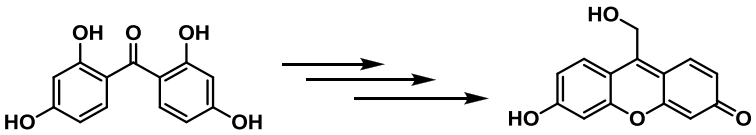


Schéma 34: Synthèse du motif xanthène substitué à partir de la dihydroxy acétophénone.

La synthèse débute par une première étape de cyclisation suivie d'une déshydratation effectuée sous pression (tube scellé) dans l'eau à 200° C.[230] Le produit **46** est récupéré par simple filtration, avec un rendement quantitatif. L'obtention d'un produit au caractère aromatique, délocalisé sur l'ensemble de la molécule constitue la force motrice de cette première étape et limite la formation de produits secondaires.

Les groupements phénoliques sont ensuite méthylés à l'aide de diméthyl sulfate pour conduire au composé diprotégé **47**. L'introduction d'un groupement méthylène sur la fonction cétone par une réaction de « Wittig »[231] en présence de triméthylaluminium a conduit au composé **48.** Une seule étape de purification est suffisante pour l'obtention de **48**. Le produit est obtenu avec un excellent rendement (88%) sur les 3 étapes (Schéma 35).

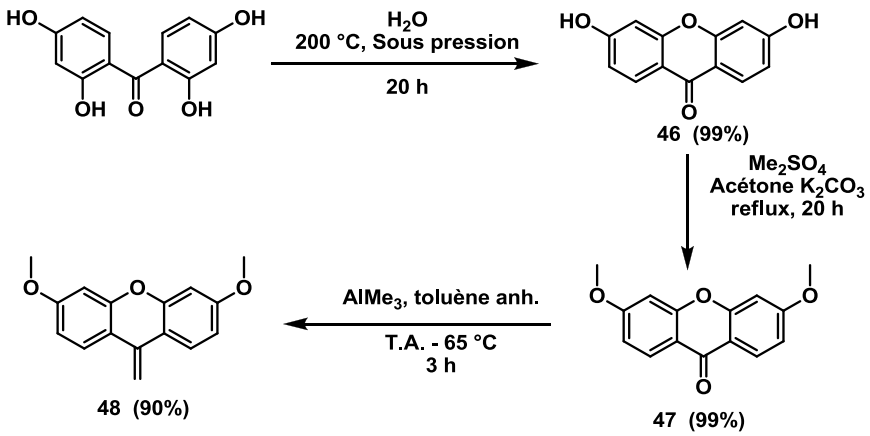


Schéma 35: Synthèse du 3,6-dimethoxy-9-methylene-9H-xanthene

L'hydroboration oxydative a conduit au composé **49** avec un rendement de 94% dont l'alcool en position benzylique est acétylé. Puis les deux fonctions phénoliques ont été libérées en présence de tribromure de bore, pour conduire aux composés **50** puis **51**. Lors de cette étape, nous avons obtenu un mélange du produit désiré **51** et du composé totalement déprotégé **52** (Schéma 36) en proportion 3 : 2. Les rendements des composés **51** et **52** sont respectivement de 36% et de 54 %. La déprotection de l'hydroxyle benzylique conduisant à **52** peut surement s'expliquer par la présence de traces d'eau en solution permettant l'hydrolyse de la fonction acétate.

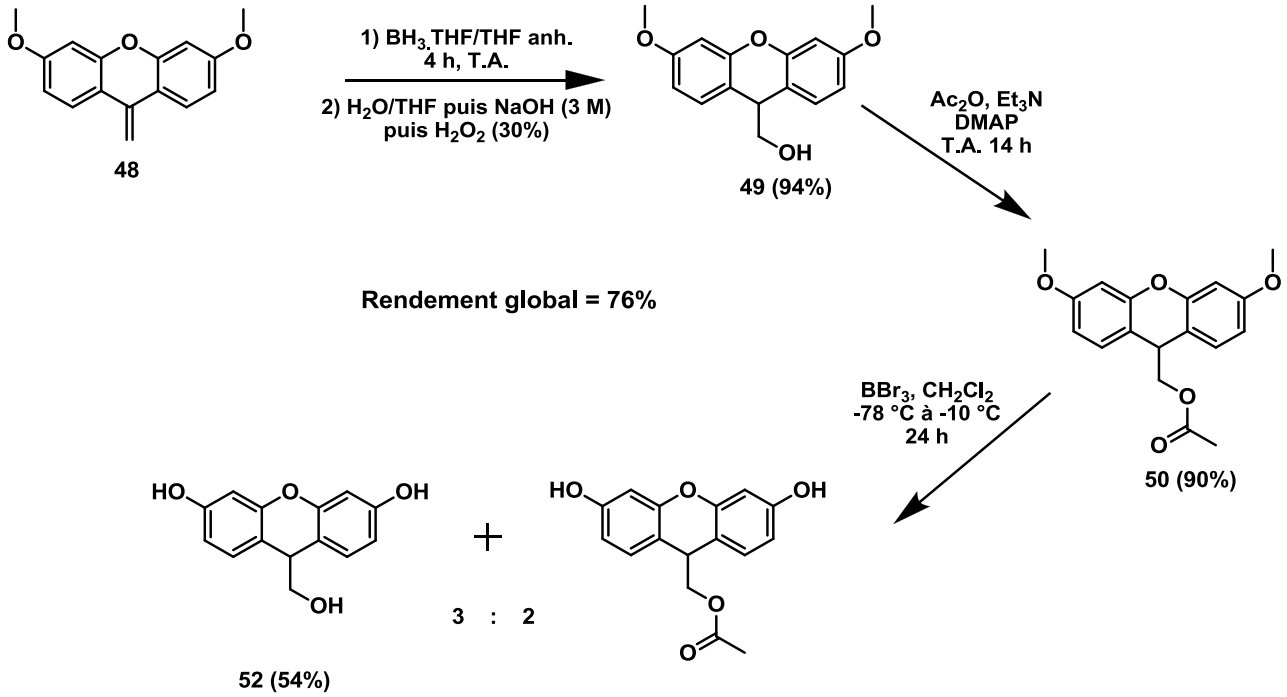


Schéma 36 : Synthèse conduisant aux composés 51 et 52

Les composés **51** et **52** ne sont que légèrement fluorescents alors que leurs analogues oxydés présentent de très bonnes propriétés de fluorescence. L'oxydation du composé **51** a été réalisée en présence de DDQ et forme après traitement, un complexe avec notre composé (**53**) (Schéma 37). La présence de ce complexe DDP (dihydroxydicyanophénol) et (6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)méthyle acétate a été vérifié en masse. Nous avons tenté plusieurs purifications (cristallisation/recristallisation dans différents solvants, purification sur divers supports…) afin d'éliminer la DDP sans succès. En effet, ce complexe est décrit comme étant très sensible à la lumière et les différents essais ont conduit à une importante perte de produit.

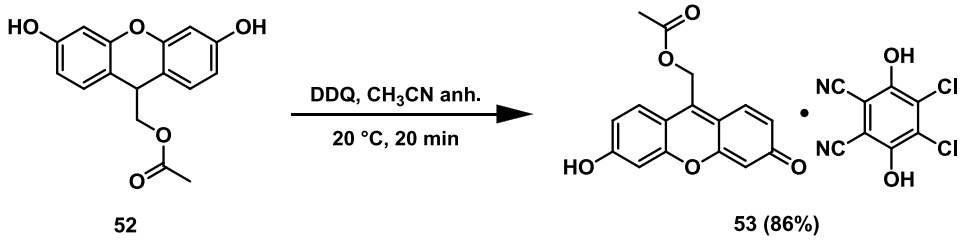


Schéma 37 : Synthèse du complexe DDP et (6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)méthyl acetate, 53.

Nous avons observé deux formes tautomères (de **45** et de **53**), en fonction des solvants deutérés utilisés (Figure 57). [226]

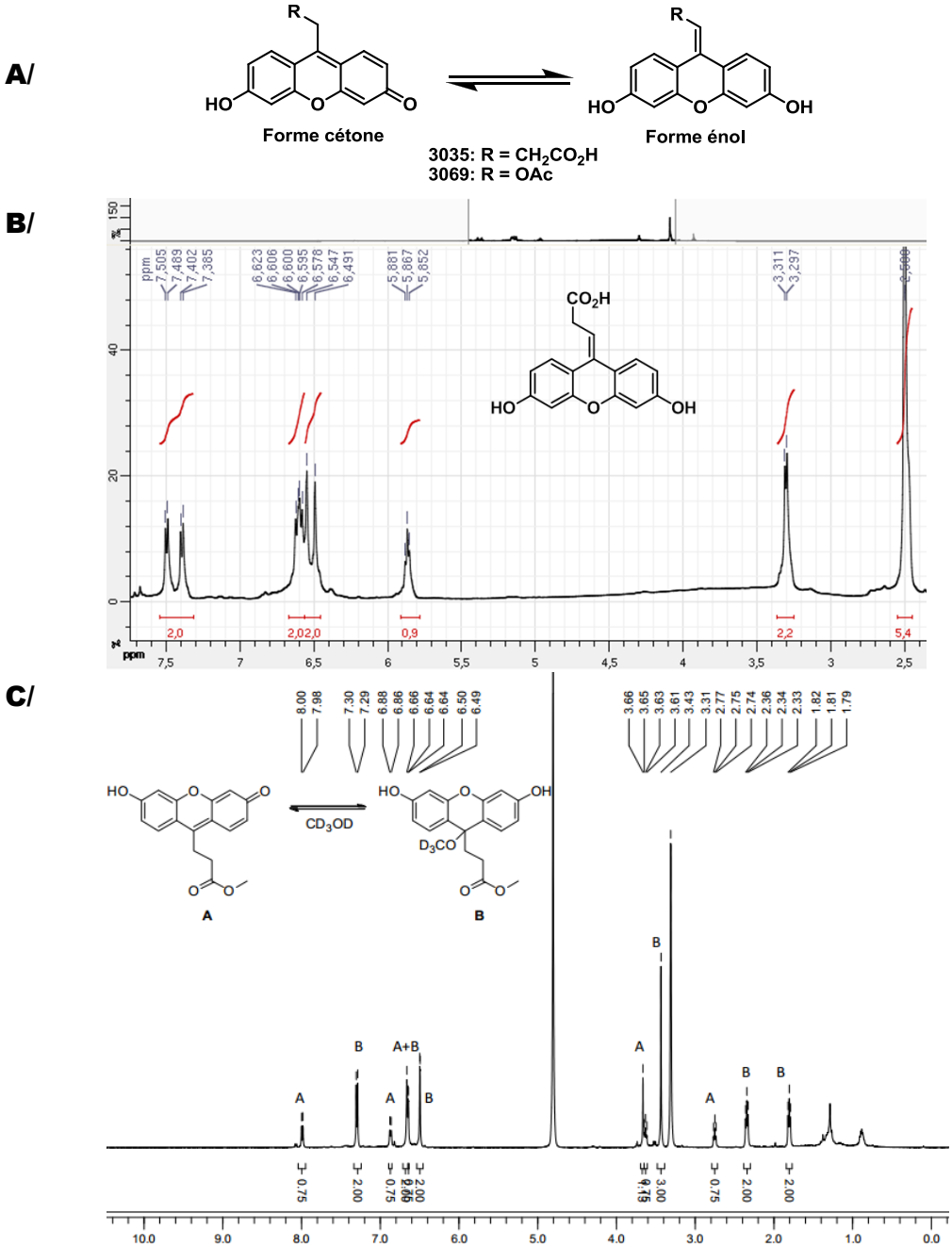


Figure 57 : A/ Equilibre existant en RMN entre la forme céto-énolique des dérivés de xanthènes oxydés. B/ Spectre du composé 45 dans du DMSO (forme énol). C/ Spectre du composé 53 dans du CD3OD (forme cétone en équilibre avec l'adduit méthanolique)[226]

En effet, dans le méthanol, la forme cétone est prépondérante, tandis qu'avec un solvant polaire aprotique, tel que le DMSO la forme énol est largement majoritaire, comme le montre les analyses RMN. Les spectres RMN réalisés dans le DMSO n'ont permis d'observer que la forme énol. Dans la littérature une analyse d'un dérivé de ce motif (méthyl ester) montre que dans le MeOH (solvant « nucléophile » polaire et protique) la forme cétone était prépondérante en présence d'un dérivé résultant de l'addition du CD_3OD en position 9

L'objectif initial était de fonctionnaliser cette molécule sur son alcool primaire. Nous avons donc essayé de déprotéger l'acétoxy en position benzylique de ce complexe via différents modes opératoires. La première tentative a été réalisée dans des conditions assez dures en utilisant du KOH dans l'EtOH au reflux. Le produit souhaité n'a pas été isolé, nous avons alors employé des conditions plus douces en utilisant de la Et_3N dans du MeOH [232], sans succès. La dernière tentative a été réalisée dans des conditions très douces. En effet nous avons tenté de déprotéger en présence de K_2CO_3 dans du MeOH[233] (Schéma 38). Le produit désiré a été observé en RMN mais celui-ci s'est dégradé lors de la purification sur colonne chromatographique de silice.

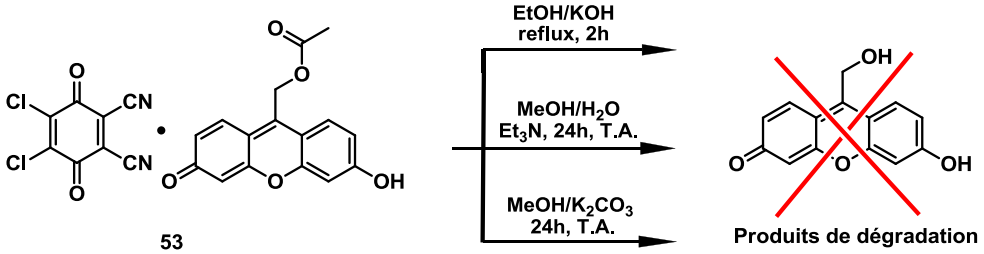


Schéma 38 : Essais de déprotection de la fonction acétate du (6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)methyl acetate

Au vu de ces résultats nous avons décidé de fonctionnaliser les dérivés de type xanthène directement à partir de son précurseur diprotégé, **49,** (3,6-Dimethoxy-9H-xanthen-9-yl)méthanol ou du composé triol, **52** (3,6-Dihydroxy-9H-xanthen-9-yl)méthanol, afin d'effectuer l'étape délicate d'oxydation après la fonctionnalisation. Le produit final en complexe ou purifié (si cela est possible) pourrait être testé directement.

VI.6.b Bilan

La succinylfluorescéine, **45**, a été obtenue facilement et permettra d'opposer une fonction électrophile (acide carboxylique) à nos synthons d'intérêt lors des couplages. Le complexe **53** est obtenu en 7 étapes à un rendement global excellent de 57%. Il reste cependant difficilement utilisable tel quel et nous avons donc travaillé à la fonctionnalisation de ces dérivés à partir de deux de ses précurseurs : Le composé **49**, analogue protégé et non-oxydé et le produit **52**, non protégé. Ces deux composés portant une fonction hydroxyle permettront d'envisager une d'autres voies de couplages.

VI.7 Conclusion

Une large gamme de composés fluorescents a été synthétisée avec plus ou moins de réussite. La synthèse (et le cas échéant la fonctionnalisation) des fluorophores avait pour but d'obtenir des fluorophores facilement fonctionnalisable. Ainsi, des groupements nucléophiles (hydroxyle, amine…) ou des groupements nucléofuges et sites électrophiles (halogènes, acide carboxylique…) ont été introduits sur ces fluorophores. Ces composés

pourront ainsi, être couplés à des composés ayant un intérêt biologique, par différentes méthodes (couplage peptidique, SN, SE_{Ar}…).

Dans un premier temps nous décrirons la fonctionnalisation de ces fluorophores par le ribose (ou des dérivés) qui seront par la suite phosphorylés afin d'être évalués sur le transporteur vésiculaire de nucléotide (VNUT).

Dans un second temps, nous aborderons le couplage entre des fluorophores et des acides aminés modifiés s'étant révélés être de bons inhibiteurs du transporteur d'acide sialique (Sialine). Nous analyserons ensuite les propriétés de fluorescence et es activités biologiques des différentes molécules finales synthétisées afin de valider ou non la possibilité du développement de FFS/FFS sur ces deux cibles.

VII. Synthèses de FFNs potentiels de VNUT

Les fluorophores synthétisés précédemment, seront couplés au ribose ou à des dérivés d'intérêts biologiques, suivants différentes méthodes décrites dans ce sous-chapitre. Ce sous-chapitre sera consacré aux couplages réalisés dans le but de concevoir des FFNs de VNUT. La synthèse se déroule en trois étapes, la première étape est la synthèse du le ribose activé et la seconde étape est son couplage avec les fluorophores décrits précédemment. Ce couplage sera réalisé sur la position anomérique du ribose afin de conserver l'alcool primaire en 5'. Enfin, dans une 3ième étapesd, ces dérivés nucléosidiques seront phosphorylés dans le but de développer des dérivés nucléotidiques fluorescents, pour le développement de FFN de VNUT.

VII.1 Préparation de ribose modifié

Le couplage entre fluorophores et ribose a été envisagé selon deux voies d'accès, la première utilise le motif ribose comme électrophile (« ribose activé » sous forme de trichloroacétimidate), la seconde emploiera le motif ribose comme nucléophile (sous forme d'aminoribose). Nous décrirons ensuite, les couplages envisagés à partir des riboses tétra- et tri-acétylés. Avant d'aborder ces étapes de couplage, nous développerons la synthèse du ribose activé et de l'aminoribose.

VII.1.a Synthèse du « ribose activé »

Notre objectif est de synthétiser, par plusieurs voies de protection/activation, un motif ribosylique possédant un bon site électrophile sur le carbone anomérique (activation de l'hyddroxyle anomérique). Un grand nombre de fluorophores synthétique ou commerciaux possèdent une fonction phénol. Nous utiliserons donc cette fonction nucléophile lors des couplages, permettant ainsi de pouvoir généraliser ces couplages à la grande motifs précédemment décrits (Schéma 39).

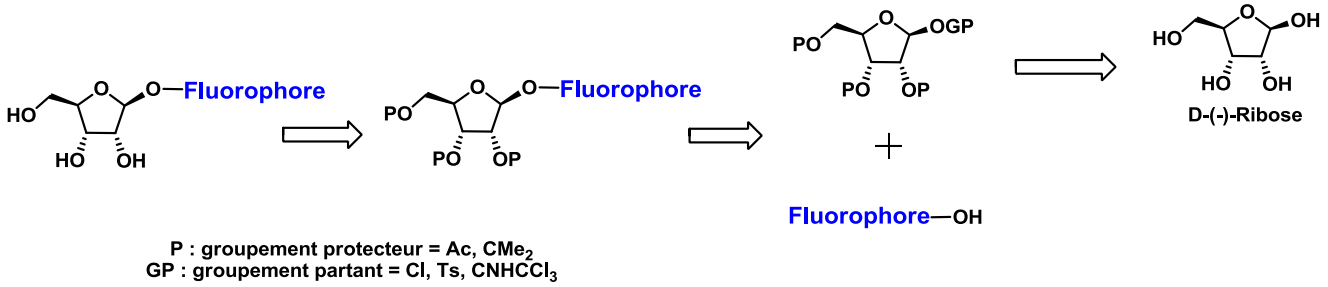


Schéma 39 : Schéma général de la synthése des « Fluo-*O*-Ribose »

Plusieurs voies de synthèse permettant de protéger sélectivement les différents alcools du sucre ont été décrites dans la littérature.[234-237] En revanche, la substitution de l'alcool anomérique du sucre par un motif phénolique a été beaucoup moins étudiée. Pour simplifier l'accès aux composés finaux nous avons envisagé une méthode de protection des quatre fonctions alcools avec le même groupement protecteur, avant de déprotéger sélectivement la position anomérique. Cette position a ensuite été activée de différentes manières afin de pouvoir envisager plusieurs méthodes de substitution qui seront détaillées par la suite.

➢ *Synthèse du ribose activable :*

Ainsi, cette étude a débuté par une méthode de protection du ribose, sous forme tétra-acétylé qui a été largement détaillée dans la littérature.[238, 239] Le composé **54** (1,2,3,5-tetra-O-acétyl-ß-D-ribofuranose) a été obtenu avec un rendement de 87%, à partir du D-(-)-ribose dans la pyridine anhydre en présence d'anhydride acétique et de DMAP.[238]Lors de la reproductibilité de cette synthèse, il a été préféré une méthode sans DMAP, permettant un traitement en fin de réaction plus rapide améliorant ainsi le rendement (95%) (Schéma 40).[239] Ces deux méthodes de synthèses conduisent à un mélange α/β.

Pour permettre l'activation de la position anomérique du sucre, il est nécessaire de déprotéger sélectivement l'alcool en position anomérique. Une déprotection sélective est importante pour éviter la formation de sous-produits de déprotection (di- tri voir tetra- déprotégé) ce qui entrainerait une purification longue et fastidieuse. Différentes voies d'accès à ce type de composé sont décrites dans la littérature à partir du ribose tétra-acétylé.[240] Nous avons choisi une méthode élaborée, en 2006, qui consiste à introduire des sels d'acétate d'ammonium dans une solution de DMF anhydre contenant le composé tétra-acétylé (**54**) (Schéma 40).[241] En fin de réaction, une simple purification sur colonne de silice permet de séparer le produit de départ n'ayant pas réagi du composé (**55**).

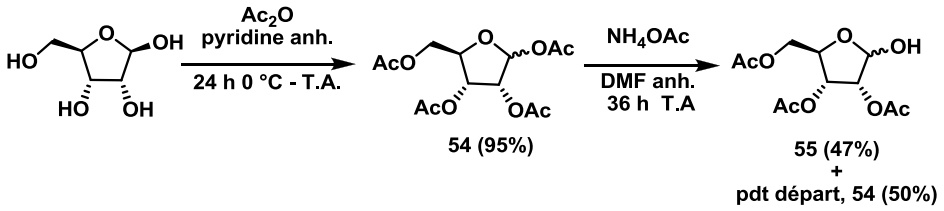


Schéma 40 : Synthèse du 2,3,5-tri-*O*-acetyl-α/ß-D-ribofuranose, 55.

Le composé **55** s'isomérise facilement et rapidement en solution, par ouverture du ce cycle furanose qui peut ensuite se recycliser selon deux voies conduisant à un mélange d'anomère α et β (Schéma 41). Néanmoins lors de la cyclisation, l'attaque de l'alcool sur l'adéhyde par-dessous le plan (flèche bleu, Schéma 41) est fortement défavorisée par la présence du groupement acétate en 2'. L'encombrement stérique imposé par le groupement acétate favorise donc la formation du composé α (flèche rouge, Schéma 41).

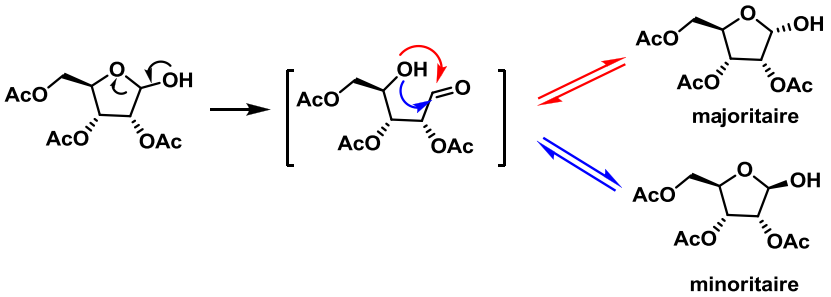


Schéma 41 : Isomérisation du motif tri-acétylés du motif riofuranose.

L'analyse RMN du proton, montre que l'on obtient majoritairement la forme α (9:1), avec un déplacement chimique caractéristique du proton anomérique α (H-1') à environ 4.5-4.6 ppm. En effet lorsque nous avons la forme β du ribose acétylé en position 2', nous observons par RMN du proton, un déblindage du déplacement chimique du proton H-1' (autour de 5.5 ppm). Ce résultat a été étudié sur une des conformations les plus stable

de chaque anomère (stabilisé par liaison hydrogène), obtenu, après avoir effectué une minimisation (Chem 3D) (Figure 58).

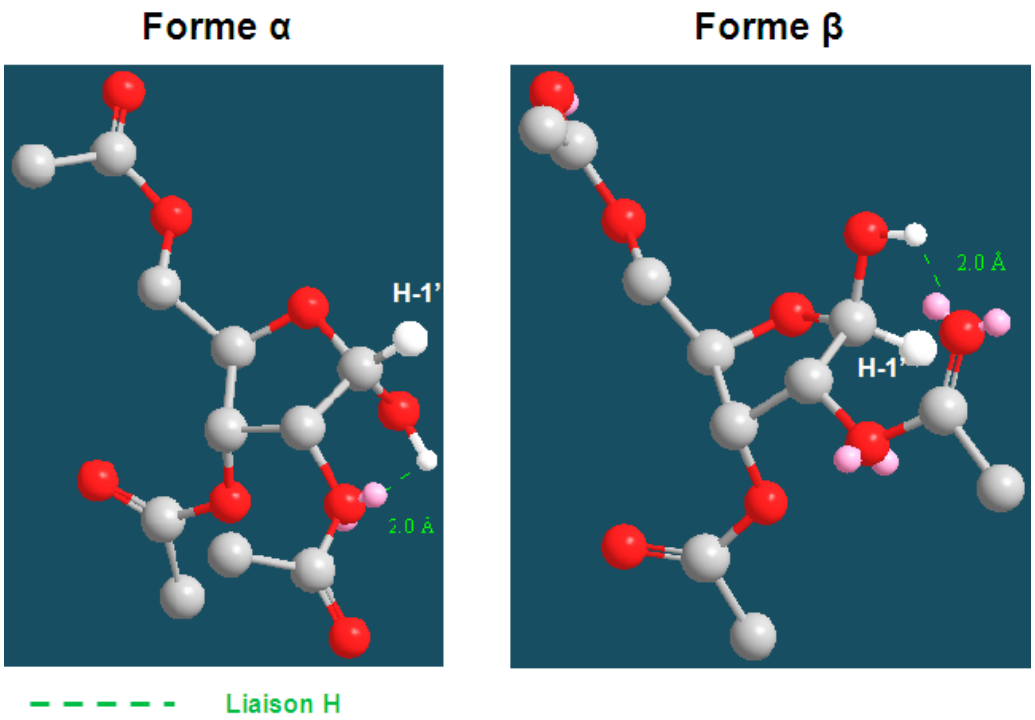


Figure 58 : Représentation de la forme α et β du ribose triacétylé, en 3D.

L'anomère α et l'anomère β sont stabilisées par liaison H entre l'hydroxyle en 1' et l'acétate en 2', respectivement par formation d'un pseudo-cycle à 5 et d'un pseudo-cycle 7. Dans le cas de l'anomère β cette forme stabilisée place le proton H-1' dans le cône d'anisotropie du carbonyle induisant une différence significative de son déplacement chimique en RMN du proton. Cet effet nous permet de séparer les deux signaux du proton H-1' et ainsi de pouvoir quantifier la proportion de chaque anomère.

➢ *Méthode d'activation de la position anomérique sous forme de chlorure ou tosylate :*

Afin de pouvoir coupler les différents fluorophores avec le ribose nous avons ensuite activé la position anomérique. Le couplage devant être reproduit un certain nombre de fois, nous avons exploré différentes voies d'activation, sous forme d'halogénure,[239, 242, 243] de tosylate[244] ou encore de trichloroacétimidate[245], afin de pouvoir déterminer la méthode à employer.

L'activation de la position anomérique a été envisagée sous forme d'halogénure.[239, 242] Cette activation s'effectue à partir du composé **55**, en présence de triphosgène et de pyridine dans du THF au reflux[243], conduisant au composé **55-a** (Schéma 42).

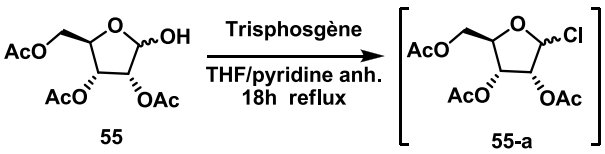


Schéma 42 : Synthèse du 1-chloro-2,3,5-Tri-O-acetyl-ß-D-ribofuranose.

Nous avons ensuite, évaporée la solution puis effectué une extraction rapide avant d'engager ce produit lors de l'étape de couplage. Nous n'avons pas réussi à obtenir de produit de couplage par cette voie, sûrement dû à la présence de trace d'eau pendant le traitement effectué après l'activation sous forme de chlorure. En effet, ce composé est en équilibre entre deux formes et en présence d'eau, celui-ci est fortement déplacé en faveur du produit de départ (Schéma 43).

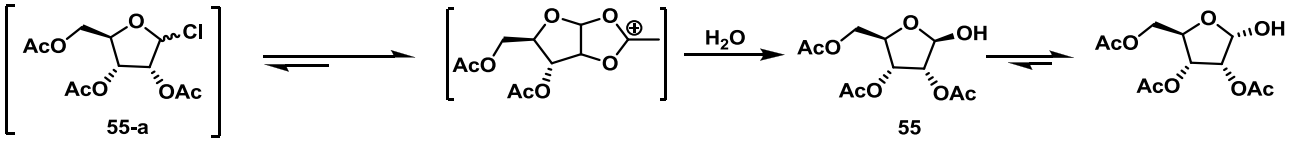


Schéma 43 : Dégradation du sucre chloré vers la forme hydroxy, 55.

Ce composé étant assez instable et ne pouvant être conservé dans le temps, nous avons activé le composé **55** sous forme de tosyle, conduisant au composé **55-b** (Schéma 44).[244] La tosylation du triacétyle ribose a été suivie par CCM, ce qui nous a révélé qu'une nuit de réaction était nécessaire à l'apparition d'un nouveau produit. Pour nous prémunir de l'équilibre possible pouvant s'établir en présence d'eau, nous avons enchainé avec l'étape de couplage sans traitement intermédiaire (Schéma 49). L'étape de couplage sera développée par la suite, néanmoins celle-ci n'ayant pas conduit au produit attendu, nous avons poursuivi nos essais d'activation de la position anomérique.

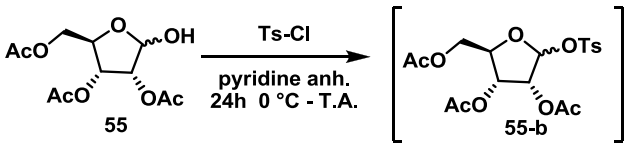


Schéma 44 : Synthèse du 1-tosyl-2,3,5-tri-O-acétyl-ß-D-ribofuranose, 55-b.

Nous nous sommes finalement tournés vers une méthode d'activation permettant d'obtenir un dérivé activé du ribose sous forme trichloroacétimidate pouvant être purifié et conservé à 4 °C. Cela nous offre une quantité de matériel suffisante pour tenter de nombreux couplages avec les différents fluorophores synthétisés.

- *Méthode d'activation de la position anomérique sous forme de trichloroacétimidate :*

La synthèse du 2,3,5-tri-O-acétyl-α-D-ribofuranosyl trichloroacétimidate (**56**) est décrite à partir du ribose tétra-acétylé, **54**, qui est mono-déprotégé, en présence de méthanolate de sodium dans du THF anhydre (Schéma 45). Après avoir neutralisé le méthanolate de sodium, la solution est évaporée et le brut est engagé dans la seconde étape d'activation. L'alcool anomérique est « activé » sous forme de trichloroacétimidate par ajout dans le milieu de trichloroacétonitrile en présence de K_2CO_3 (Schéma 45).[240] Cette synthèse a été réalisée à plusieurs reprises, avec un rendement maximal de 19%. Aucune trace du composé intermédiaire, **55** n'a été retrouvée lors de la purification de cette réaction.

Cet intermédiaire est très réactif vis-à-vis du trichloro acétonitrile et est consommé entièrement lors de l'ajout de celui-ci. De plus, lors de la purification les rapports frontaux du composé tétra-acétylé (**54**) et du produit désiré (**56**) sont proches ce qui rend plus difficile la purification de ces deux composés.

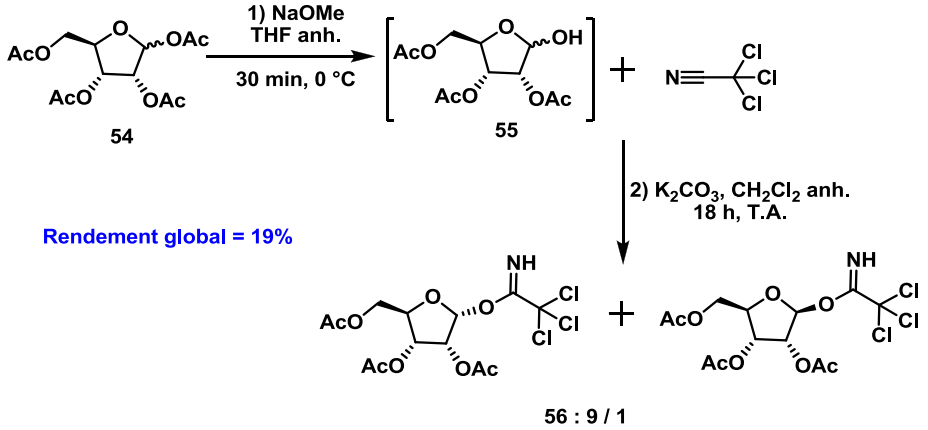


Schéma 45 : Synthèse du 2,3,5-tri-O-acetyl-α-D-ribofuranosyl trichloro-acétamidate.

Ayant obtenu précédemment le composé **55**, avec un meilleur rendement de mono-déprotection (47%) (Schéma 40), nous avons décidé de séparer en deux étapes bien distinctes cette synthèse, avec une purification intermédiaire du composé **55**. La seconde étape étant quasi quantitative le rendement global atteint 45% (Schéma 46), avec une purification beaucoup plus simple entre les composés **55** et **56**, ceux-ci ayant des rapports frontaux bien différents (0.2 pour 0.6 dans C/AE : 6/4). Ainsi nous avons pu augmenter les quantités employées, afin de constituer une quantité importante de « ribose activé », **56**.[240]

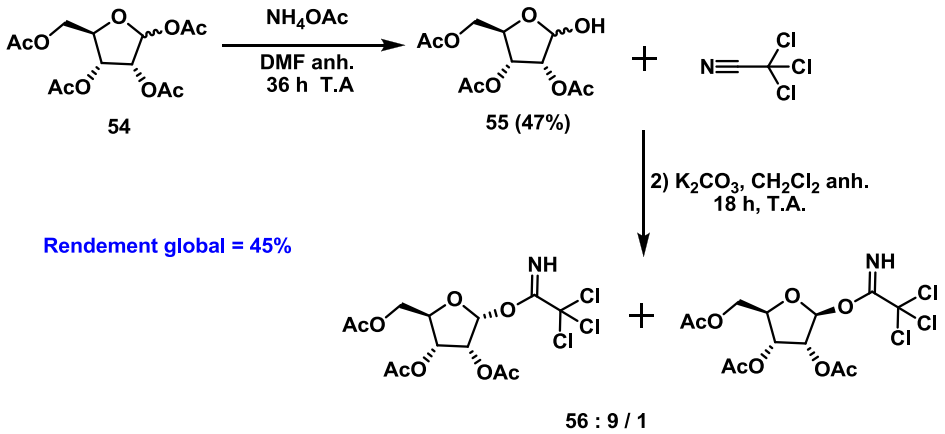


Schéma 46 : Optimisation de la synthèse du 2,3,5-tri-O-acétyl-α-D-ribofuranosyl trichloro-acétamidate.

Ces deux voies de synthèses conduisent au composé **56**, avec un très bon excès diastéréomérique de 9/1 en faveur de la forme α. Il est donc compréhensible que l'on obtienne ce ribose trichloroacétimidate, **56**, dans les mêmes proportions que l'intermédiaire hydroxy ribose, **55**, en considérant que la réaction d'isomérisation est plus lente que la réaction de substituion nucléophile.[240, 246]

Lors de la synthèse du composé **56**, nous avons synthétisé différents intermédiaire, sur lesquels nous avons réalisé différents des essais de couplage (détaillé par la suite). Le ribose activé synthétisé offre plusieurs avantages, tels que la facilité de purification et la possibilité de conservation à froid. De plus l'obtention en fin de synthèse de la forme majoritaire α nous permet d'envisager des réactions de couplages possédant une certaine stéréosélectivité. Afin d'élargir nos possibilités de couplage, nous avons ensuite souhaité introduire une fonction nucléophile sur le motif ribose.

VII.1.b Synthèse de ribosylamine

Nous avons synthétisé l'amino-ribose,[247] nous permettant d'envisager des substitutions nucléophiles sur des fluorophores halogénés ou des couplages peptidiques sur des fluorophores possédant des fonctions acide/ester, dans le but de pouvoir élargir les possibilités de couplages mais également de varier la structure des différents dérivés nucléosidiques fluorescents.

Pour cette synthèse, il est nécessaire de protéger de manières orthogonale les alcools 2' et 3' et les alcools en 1' et 5'. La protection sélective des hydroxyles 2' et 3' en *cis* a été largement détaillée dans la littérature et nous avons choisi de protéger ces deux fonctions sous forme d'isopropylidène avec deux méthodes conduisant, en général, à des rendements quantitatifs.[248-250]

La première est réalisée dans l'acide sulfurique concentré en présence d'acétone,[248-250] tandis que la seconde est effectuée dans le DMF en présence de 2,2-dimethoxypropane et d'acide *p*-toluenesulfonique.[251-253] Ces deux méthodes ont été reproduites plusieurs fois conduisant au composé **57** avec des rendements de 70 à 95%. L'alcool primaire et l'alcool anomérique (1' et 5') sont ensuite protégés sous forme d'acétate à l'aide d'anhydride acétique et de pyridine anhydre, afin d'obtenir le composé **58** avec un rendement de 94% (Schéma 47).[239, 247, 254] En purifiant l'intermédiaire **57**, avant de synthétiser le composé tétra-protégé **58**, le rendement global atteint 89%.

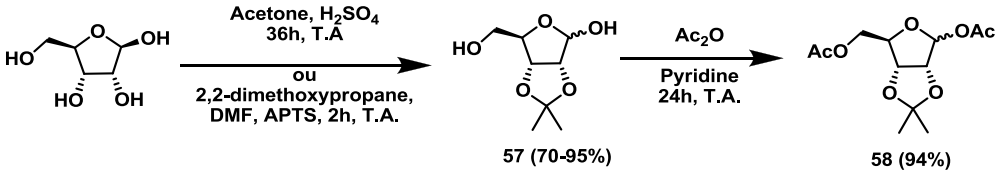


Schéma 47 : Protection croisés du D-(-)Ribose.

L'introduction d'une fonction azide sur la position anomérique puis la réduction de cette fonction conduit à l'amino-ribose protégé, **60** (Schéma 48).[247] Le mélange d'α/β 2,3-*O*-isopropyliden-D-ribofuranose 1,5 diacétate **58,** est dilué dans du dichlorométhane anhydre auquel on ajoute du tétrachlorure d'étain et d'azide de triméthylsilyle. En fin de réaction une extraction suivie d'une purification sur colonne permettent de récupérer le composé **59**. Le composé final est obtenu par simple hydrogénation de la fonction azide sous atmosphère d'hydrogène en présence de Pd/black conduisant au composé **60** avec un rendement quasi-quantitatif.

Le stéréochime du carbone anomérique du ribose (α ou β), peut être déterminée pour chaque intermédiaire. Ces épimères peuvent être séparés sur colonne chromatographique. Les synthèses conduisant à l'aminoribose à partir du composé **57** ne modifient pas la porportion en anomère α/β initiale (3/7).

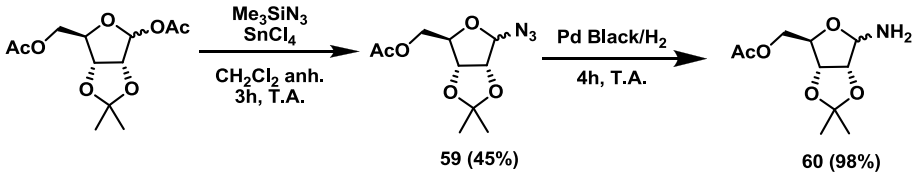


Schéma 48 : Synthèse de l'amino ribose, 60.

Nous avons détaillé la synthèse de deux dérivés du ribose ayant des réactivités différentes (électrophile et nucléophile) nous permettant d'envisager différentes voies d'accès à des dérivés nucléosidiques fluorescents.

VII.2 Couplages entre fluorophore et ribose

Nous débuterons ce sous-chapitre par les *O*-alkylation entre fluorophores et ribose “activé”, **56** avant d’aborder les tentatives de couplages à partir des différents intermédiaires du ribose synthétisé (**54** et **55**), pour terminer par les tentatives de couplage à partir de l’aminoribose, **60**. Les synthèses ayant des rendements faibles n’ont pas été optimisées si celles-ci ont conduit à l’obtention d’une quantité suffisante de produits. Celles-ci seront optimisées ultérieurement si les composés obtenus présentent un intérêt biologique.

VII.2.a A partir du ribose “activé”

Dans cette partie nous aborderons le couplage entre les sucres préparés précédemment et les fluorophores synthétisés, afin d’étudier l’importance de la partie aromatique des nucléosides, remplacée par des fluorophores, sur leurs reconnaissances par VNUT.

Les essais de couplages ont été menés en parallèle avec la synthèse des sucres, ce qui explique la synthèse de différents sucres activés par différents groupements partants (présenté précédemment) qui a conduit à l’obtention du ribose activé adéquate, **56**. Cette étude a pour but d’obtenir une réaction généralisable à la majorité des fluorophores synthétisés.

- *A partir du ribose tétra-acétylé, chloré ou tosylé:*

Plusieurs exemples de couplages entre un ribose tétra-acétylé et des entités « phénoliques » étaient décrites dans la littérature. Nous avons évalué la possibilité d’extrapoler ce type de couplage aux fluorophores. Ces réactions ont été décrites en présence de différents catalyseurs acides, comme le tétrachlorure d’étain[255], l’APTS,[256] ou encore l’éthérate de trifluorure de bore.[257-259]

Dans un premier temps nous avons utilisé comme fluorophores, la 7-hydroxycoumarine commerciale. A partir du ribose tétra-acétylés et de cette coumarine, nous avons réalisé la couplage en présence de $SnCl_4$, dans du dichlorométhane.[255] En fin de réaction nous avons récupéré les réactifs sans obtenir le produit souhaité. Cela était surement dû à la faible solubilité de la coumarine dans le dichlorométhane. Nous avons alors reproduit plusieurs fois cette réaction en ajoutant des solvants capable de solubiliser la coumarine (THF, CH_3CN), malgré nos efforts aucune condition employée n’a conduit à l’obtention du produit désiré. Ces résultats ont été identiques avec l’utilisation d’autres catalyseurs, acides de Brønsted et de Lewis, tels que l’acide *p*-toluène sulfonique (APTS) et l’ethérate de trifluorure de bore (Schéma 49).

Nous avons également synthétisé des sucres possédant de meilleurs groupements partants, sous forme de chlorure ou de tosylate. La faible stabilité de ces deux riboses, nous a conduits à réaliser l’étape de couplage juste après la fonctionnalisation de la position anomérique. L’hydroxycoumarine préalablement placé en milieu basique (Et_3N) est alors ajouté au milieu. Le couplage entre ces deux composés n’a pas conduit aux composés souhaités (Schéma 49). Comme précédemment la coumarine est récupérer par simple neutralisation du milieu basique tandis qu’on observe des produits de dégradation du ribose.

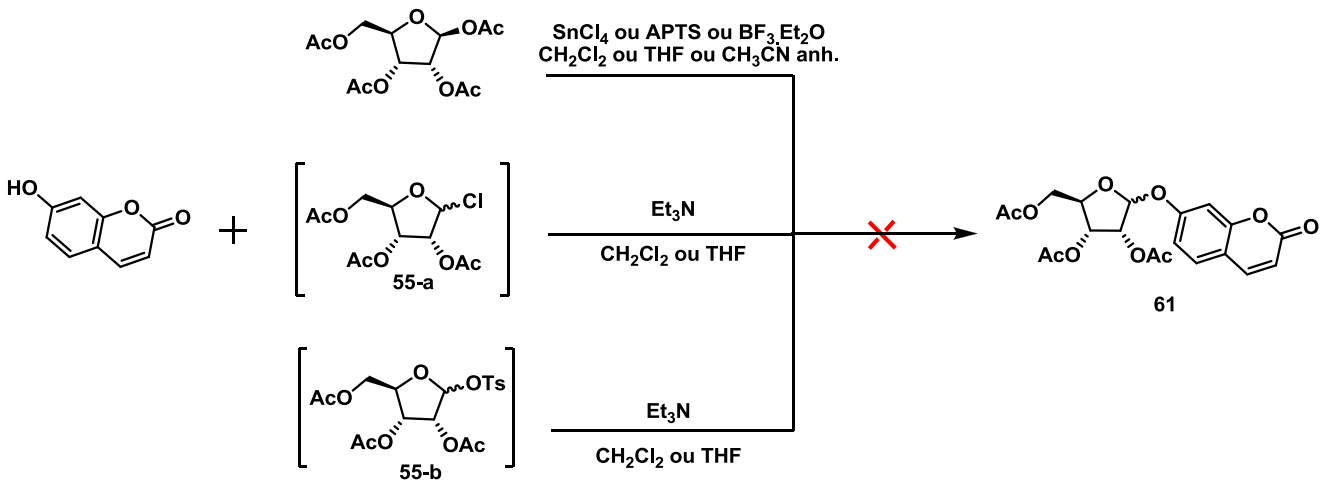


Schéma 49 : Essai de synthèse du composé 61.

➢ *A partir du ribose trichloroacetimidate :*

Plusieurs voies de couplage ont été décrites dans la littérature, à partir du ribose trichloroacétimidate.[210, 260-262] Le premier essai de cette méthode de synthèse, utilisant du $BF_3.Et_2O$, a conduit à l'obtention du produit désiré, **61**, avec un rendement de 5%. Ce résultat encourageant nous a poussés à optimiser cette réaction. Les premiers essais ont été menés en plaçant tous les réactifs dans le milieu réactionnel et en ajoutant ensuite lentement le $BF_3.Et_2O$ en quantité catalytique. Après plusieurs essais, nous avons conclu que le fluorophore devait être mis en présence du $BF_3.Et_2O$ (pré-activation) avant de rajouter le ribose activé dilué dans du dichlorométhane anhydre à froid. Le $BF_3.Et_2O$ va, de cette manière, activer le fluorophore-OH en exacerbant sa nucléophilie, favorisant ainsi la substitution nucléophile du groupement trichloroacétimidate, lors de l'ajout du sucre activé. L'emploi d'une quantité catalytique de $BF_3.Et_2O$ a conduit à un rendement de 20%, ce qui n'était pas suffisant pour extrapoler cette méthode à tous nos fluorophores. En augmentant la quantité de $BF_3.Et_2O$ (1.1 éq) et en contrôlant minutieusement la température de la solution contenant le ribose activé (0-5 °C) additionné, nous avons finalement obtenu un rendement de 89%. Lors de l'ajout du ribose activé à froid, nous avons observé l'apparition d'une couleur jaune localement au niveau de l'addition du sucre, avant que la solution ne redevienne blanche. A la fin de l'ajout du sucre la solution devient totalement limpide, marquant la fin de la réaction. Cette méthode de couplage a également été employée avec la 7-hydroxy-4-methylcoumarine pour conduire au composé **62** avec un rendement de 83% (Schéma 50). Les résultats obtenus nous ont conduits à reproduire ces conditions optimales sur les différents fluorophores synthétisés.

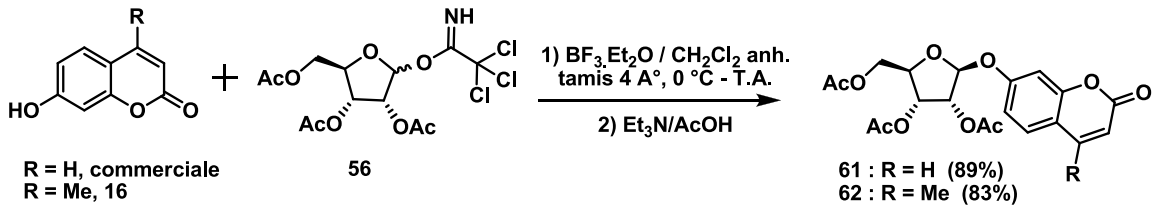


Schéma 50 : Synthèse des composés 62 et 63.

Nous n'avons récupéré que la forme fluo-β-ribose et n'avons jamais observé la forme fluo-α-ribose. Deux mécanismes étaient envisageables pour cette réaction, une SN1 par stabilisation du carbocation par assistance

anchimérique et une SN2 après activation préalable du fluorophore par le $BF_3.Et_2O$ (Schéma 51).[263] Ces deux mécanismes permettent d'expliquer la diastéréosélectivité de la réaction.

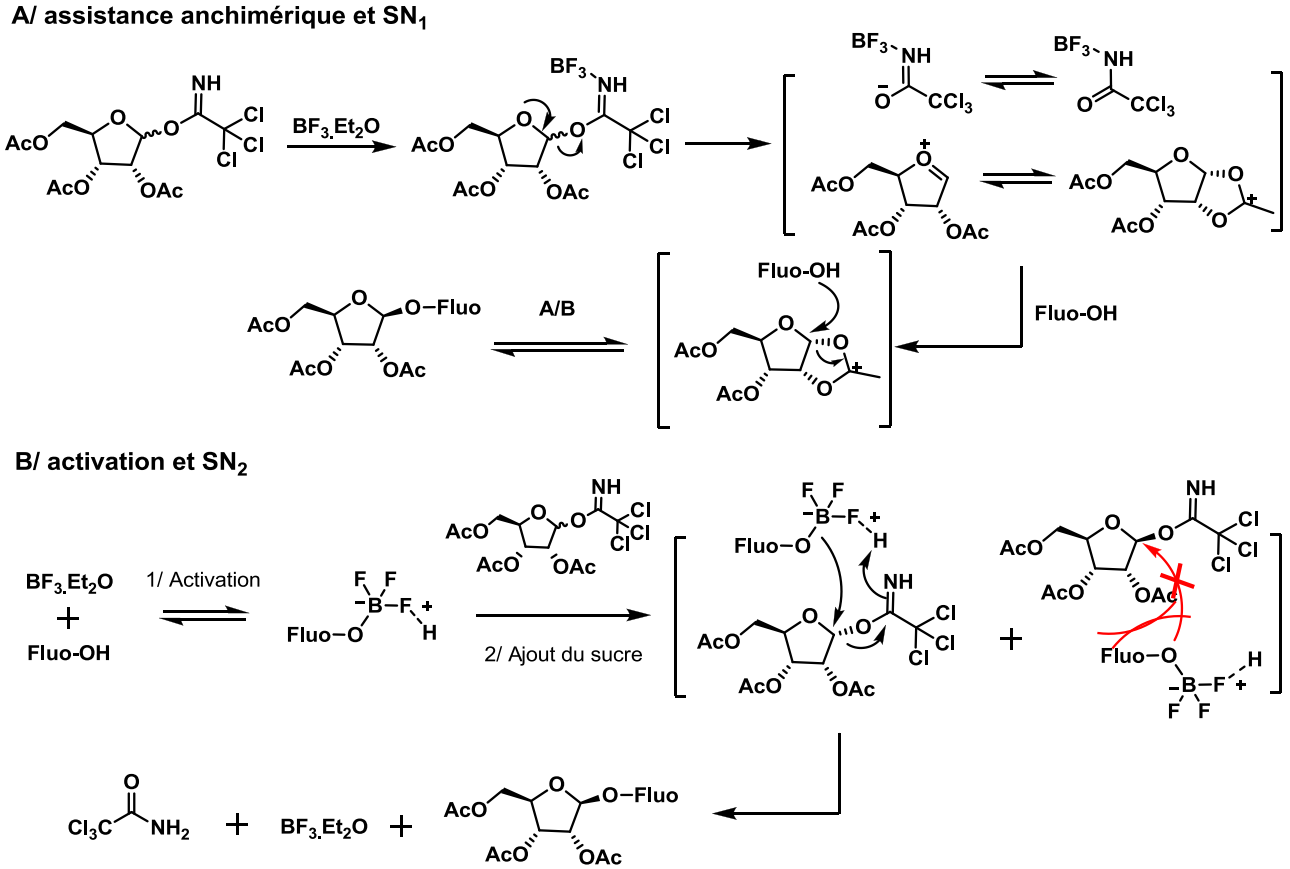
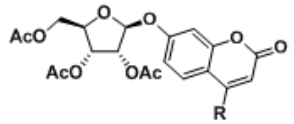
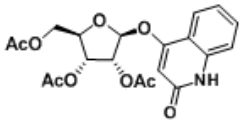
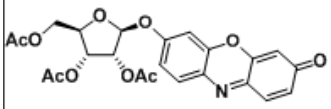
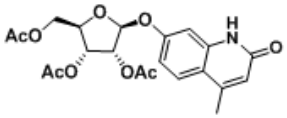
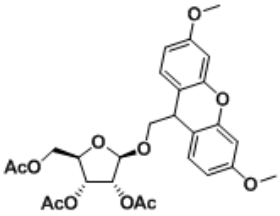
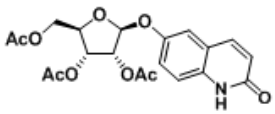


Schéma 51 : Mécanisme proposés pour la réaction de couplage entre le fluorophore-OH et le ribose « activé ». A/ passage par une SN_1 avec stabilisation du carbocation via une assistance anchimérique B/ Passage par une SN_2 après activation du fluorophore-OH.[263]

Les différentes conditions employées, qui ont permis d'obtenir le produit **61**, penchent plus en faveur d'un mécanisme de type SN_2. En effet, le passage par un mécanisme de type SN_1 impose le passage par un carbocation, qui est le plus souvent réalisé dans un solvant polaire protique (pour aider à sa stabilité) et ce mécanisme n'est pas en accord avec l'ordre d'introduction de nos composés dans cette réaction. Au contraire, le passage par un mécanisme de type SN_2, est impacté par la force du nucléophile, la gêne stérique et conduit à une réaction diastéréosélective. La pré-activation du fluorophore (améliorant sa nucléophilie) avant l'ajout du ribose activé ainsi qu'un excès diastéréomérique de 100% (dû à l'encombrement stérique imposé par les acétates) laisse apparaître que cette réaction passerait par un mécanisme de type SN_2. Cette diastéréosélectivité vers la forme « Fluo-β-ribose » avec des rendements de l'ordre de 90%, est en accord avec le ratio ribose-α/β-trichloroacétimidate 9 : 1, obtenu précédemment, la réaction de type SN_2 étant impossible sur la forme ribose-β-trichloroacétamidate.

Cette voie de couplage a été reproduite sur différents fluorophores, commerciaux ou synthétiques, avec des rendements variables dus à la différence de nucléophilie des hydroxyles du fluorophore utilisé (Tableau 7). La faible solubilité de la résorufine explique le faible rendement obtenu lors de la synthèse du composé **65**. La synthèse des composés **66** et **67** a été réalisée avec un lot différent de $BF_3.Et_2O$ conduisant à des rendements faibles, de respectivement 20 et 16%.

Tableau 7 : Récapitulatif des couplages entre flurorophores et protégés.

Structures	Entrée	Rdts	Structures	Entrée	Rdts
	**62, R=CH_3**	89%		**63**	82%
	61, R=H	83%			
	**65**	35%		**66**	20%
	**64**	69%		**67**	16%

L'objectif final de ces synthèses est d'obtenir des composés tri-phosphorylés sur l'alcool primaire (5'), afin d'obtenir des analogues de l'ATP qui seront ensuite testés sur le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT). Il est donc nécessaire de déprotéger le motif ribose. Hormis des méthodes enzymatiques, il n'est pas répertorié dans la littérature de méthodes chimiques de déprotection sélective de l'alcool primaire en 5' à partir de composés tri-acétylés. Nous avons donc préféré axer nos synthèses de tri-phosphorylation sur des méthodes de phosphorylation sélective des alcools primaires décrites dans la littérature.[264, 265] De ce fait, il n'est pas nécessaire de mono-déprotéger sélectivement l'alcool primaire (5').

- *Déprotection des « Fluo-ribose triacétylé » :*

Nous avons décidé de réaliser différentes méthodes de déprotection en parallèle, afin de déterminer la méthode optimale à employer sur les composés synthétisés précédemment.

Pour déprotéger ces composés tri-acétylés, nous avons d'abord envisagé la déprotection à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 28%, dans le MeOH.[255] Cette réaction se déroule à température ambiante pendant 48h. Après une lente évaporation, les composés **68** et **69** sont récupérés par précipitation dans l'EtOH. Nous obtenons ces composés avec respectivement 61% et 32% de rendements (Schéma 52). Nous avons choisi de réaliser deux différentes méthodes sur le composé **62** afin de comparer les différents rendements obtenus. Une de ces méthodes utilise des conditions douces, en présence de K_2CO_3, dans un mélange MeOH/THF/H_2O. Cette méthode, nous a permis d'obtenir le composé **69** avec un rendement de 52%.

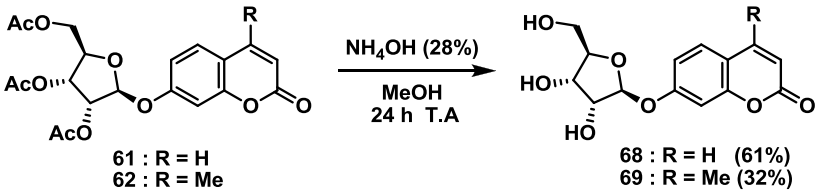
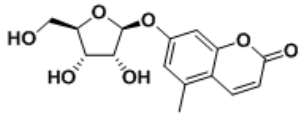
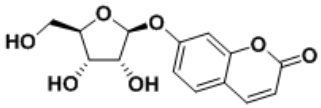
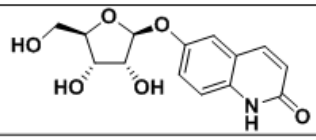
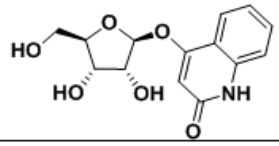
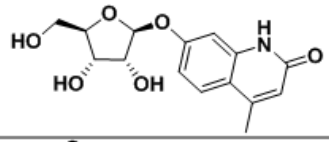
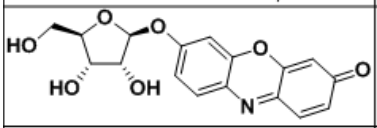
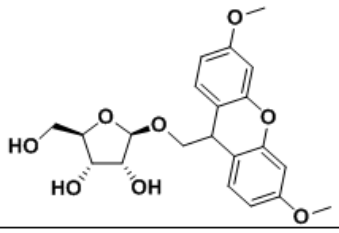


Schéma 52 : Déprotection des composés 61 et 62 conduisant aux composés 68 et 69.

Une autre voie de déprotection, en présence de triéthylamine dans un mélange MeOH/H_2O, a été réalisée.[266-268] Cette dernière voie de déprotection a permis d'obtenir le composé **69** avec un rendement de 70%. Nous avons appliqué ces conditions sur tous les composés tri-acétylés conduisant aux composés déprotégés avec de bons rendements (65-90%) (Tableau 8).

Tableau 8 : Récapitulatif des voies d'accès aux composés déprotégés

Fluorophores	Entrées	Conditions	Rdts
	69	NH_4OH (28%), MeOH, 24h, T.A	32%
		K_2CO_3, MeOH/THF/H_2O, 24h, T.A	52%
		Et_3N, MeOH/H_2O, 18h, T.A	70%
	68	NH_4OH (28%), MeOH, 24h, T.A	60%
		Et_3N, MeOH/H_2O, 18h, T.A	82%
	70	Et_3N, MeOH/H_2O, 18h, T.A	74%
	71		65%
	72		68%
	73		72%
	74		90%

➢ *Cas particulier du composé **74** :*

Le composé, **74**, ne possède pas encore de propriétés de fluorescence. En effet, nous n'avions pas réussi à déprotéger le composé fluorescent **53** (Schéma 38), nous avons alors réalisés l'étape de couplage au ribose sur l'intermédiaire **49**, conduisant au composé **74**. Afin de rendre ce composé fluorescent il doit maintenant être

déprotégé (méthoxy du motif xanthène) puis oxydé. La déprotection du composé **64**, a été envisagée selon deux voies pour conduire au produit final fluorescent (Schéma 53)..

Ces deux voies n'ont pas permis l'obtention du composé souhaité. Le passage par la voie A, a conduit au composé **74**, sur lequel nous n'avons pour le moment pas réussi à déprotéger le xanthène. L'obtention de ce composé final est en cours d'optimisation au sein du laboratoire. Le passage par la voie A, a conduit au composé **74**, qui a été engagé dans des essais de déprotection classique de fonction méthoxy en présence de tribromure ou trichlorure de bore (BBr_3 ou BCl_3). Ces réactions de déprotections des méthoxy ont été réalisées sur le composé **64** sans conduire au produit désiré. Seuls des produits de dégradations ont été retrouvés lors de ces essais de déprotection. L'obtention de ce composé final est en cours d'optimisation au sein du laboratoire.

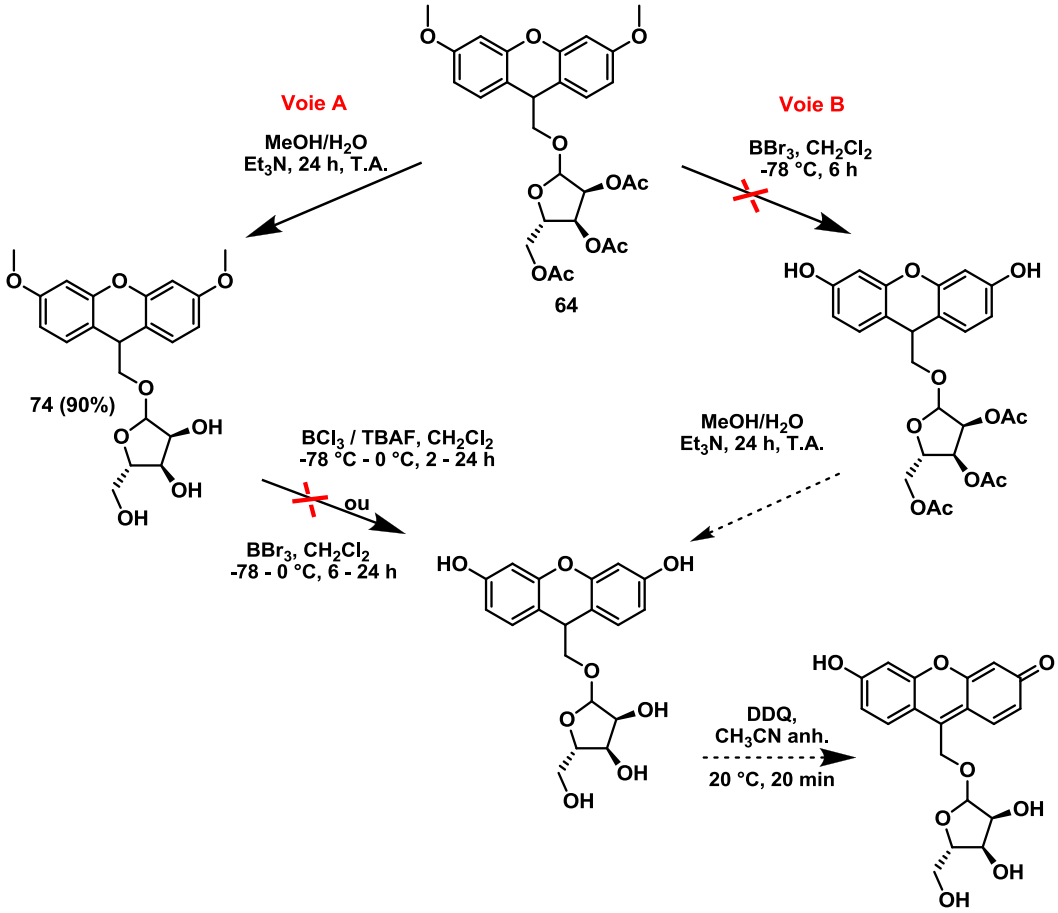


Schéma 53 : Différentes tentatives d'accès au dérivé fluorescéine-ribose déprotégé et oxydé.

Nous avons à l'aide du ribose « activé » et des différents fluorophores préalablement synthétisés obtenus plusieurs dérivés nucléosidiques fluorescents (« Fluo-β-ribose »). Ces composés pourront être engagés dans l'étape de tri-phosphorylation pour l'étude de VNUT. Pour développer d'autres analogues nucléosidiques fluorescents nous nous sommes ensuite intéressés à des méthodes de couplages à partir de l'aminoriobose.

VII.2.b A partir de l'aminoribose :

L'aminoribose a été synthétisé afin d'offrir de nouvelles perspectives de synthèse de composés « fluo-ribose ». En effet, ce type de composé possédant une fonction nucléophile, permet d'envisager des couplages

peptidiques et des substitutions nucléophiles sur des fluorophores halogénés, permettant de ne pas introduire le ribose directement sur des fonctions aromatiques des fluorophores.

Pour le moment, ce travail est à un stade précoce et seules des tentatives de couplage peptidique ont été réalisées. Deux fluorophores, **22** et la coumarine-4-acide benzoïque (commerciale), ont été engagés dans ce type de synthèses avec l'aminoribose. La première tentative de couplage a été réalisée en passant par un chlorure d'acide suivant une méthode classique d'activation par du chlorure de thionyle avant d'incorporer l'aminoribose à la solution (Schéma 54). Cette synthèse n'a pas conduit au produit désiré, surement dû à la forte réactivité du chlorure d'acide qui à pu conduire à des réactions parasites pour lesquelles nous n'avons pas identifié les produits.

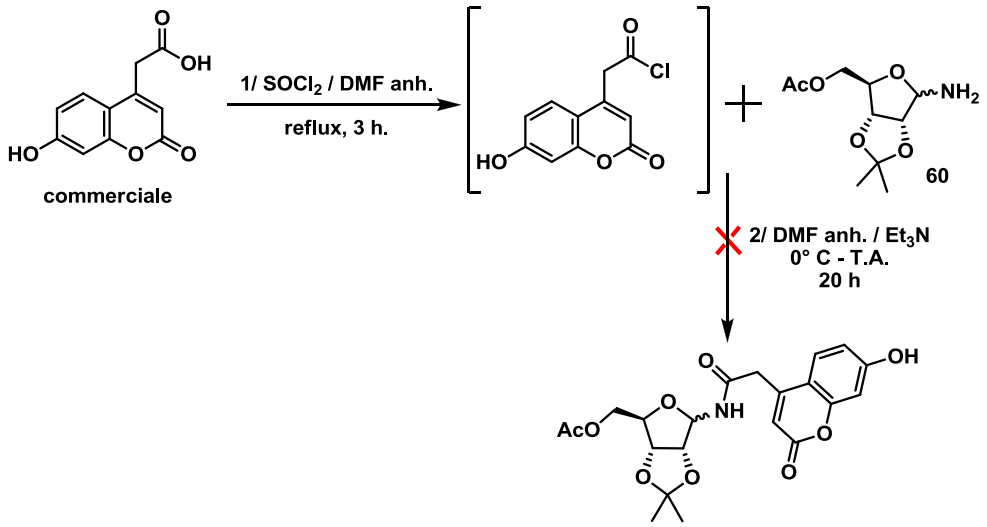


Schéma 54 : Essai de couplage entre aminoribose et un fluorophore par activation sous forme de chlorure d'acide.

Nous avons donc envisagé une autre méthode de couplage, en présence d'HBTU (agent de couplage) en milieu basique (Schéma 55). Cette voie de couplage n'a pas conduit au produit souhaité.

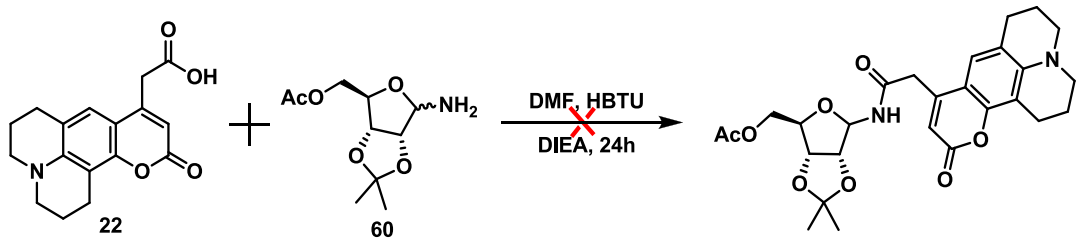


Schéma 55 : Essai de couplage entre l'aminoribose 60 et la coumarine 22 par activation de l'acide à l'aide d'HBTU.

Les conditions de couplages seront misent au point prochainement et étendues aux différents fluorophores synthétisés possédant une fonction acide carboxylique. Il serait également intéressant de tenter des réactions de substitutions nucléophiles, à l'aide de cet aminoribose sur les fluorophores halogénés.

VII.2.c A partir d'autres motifs fluorescents :

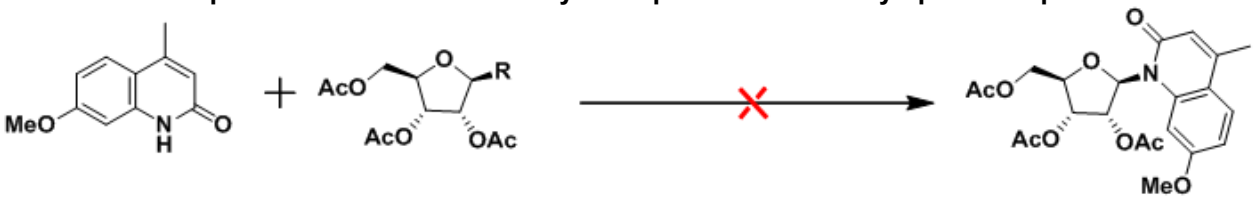
En parallèle, de la synthèse de ces différents composés « Fluo-ribose », nous avons essayé différentes autres voies d'accès à des analogues de nucléosides fluorescents. Nous avons envisagé des couplages sur l'azote intracyclique de quinolinones. Ce type de structure permettrait de se rapprocher un peu plus de la structure de l'ATP en conservant la liaison *N*-ribosyle. Ce type de liaison permettrait aussi de rigidifier la structure de la molécule en comparaison avec les composés possédant un axe de rotation autour de la liaison *O*-ribose.

Nous avons également envisagé différentes voies d'accès à des dérivés de nitrobenzofurazanes couplé au ribose (NBZ-ribose).

- *N-alkylation des quinolinones*

Dans un premier temps nous avons essayé de mettre au point une méthode reproductible de couplage du ribose sur l'azote intracyclique des motifs quinolinones. Pour ce faire nous sommes partie de la quinolinone **36** protéger sous forme 7-méthoxy afin de limiter de possibles réactions secondaires. De nombreuses voies d'alkylations d'azotes intracycliques sont décrites dans la littérature. Plus particulièrement des méthodes d'alkylation de bases nucléiques par le ribose (ou dérivés) conduisant à des analogues nucléosidiques ayant de nombreuses applications, telles que des anti-cancéreux ou antiviraux.[269, 270] Néanmoins l'alkylation des quinolinone par des motifs ribosyliques n'a pas été reportée dans la littérature, nous avons alors tenté plusieurs de méthodes décrites (Tableau 9).[271, 272]

Tableau 9 : Récapitulatif des tentatives d'alkylation par un motif ribosylique de la quinolinone 2056.



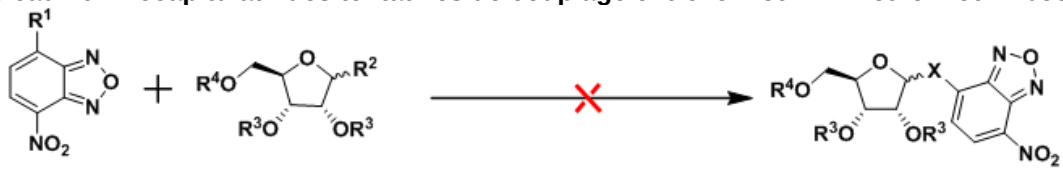
R	Conditions
OAc	1/CH_3CN, BSA ou BSTFA, 2 h, T.A. 2/TMSOTF, 3 h – 24 h, T.A.
	CH_2Cl_2, TMSOTF, 2 h – 24 h, T.A - reflux
	CH_3CN, $SnCl_4$, 6 h -24 h, T.A.
$OCNHCCl_3$	CH_2Cl_2, $BF_3.Et_2O$, 2 h - 24 h, 0 °C – T.A.
$OCNHCCl_3$	DMF, K_2CO_3, 4 h, reflux

Ces synthèses n'ont pas conduit au produit désiré. Ce type de synthèses est en cours d'optimisation au sein du laboratoire. La voie d'accès la plus probante pour le moment est l'utilisation de TMS-OTf en tant qu'agent sillylant de l'oxygène (de la fonction aminoénol) permettant d'améliorer la nucléophilie de l'azote intracyclique.

- *Nitrobenzofurazane (NBZ)*

Nous avons ensuite souhaité incorporer le motif ribosylique sur le NBZ-Cl ou ses dérivés (synthétisés précédemment). Nous avons utilisé différents dérivés du ribose, possédant des fonctions nucléophiles ou des sites électrophiles et le NBZ-Cl ou ses dérivés synthétiques (**42** et **43**). L'incorporation d'un ribose sur ce fluorophore n'ayant pas été décrit dans la littérature nous avons extrapolé diverses méthodes décrites.[72, 177, 178, 273] (Tableau 10).

Tableau 10 : Récapitulatif des tentatives de couplage entre le motif NBZ et le motif ribose.



R^1	R^2	R^3	R^4	Conditions
Cl	OH	H	H	EtOH, $InCl_3$, M.W. 100W, 5 min – 1 h, 60 °C – 90 °C
Cl	OH	OAc	OAc	Dioxane, Na_2CO_3, 6 h – 24 h, T.A. - reflux
Cl	NH_2	CMe_2	OAc	DMF, Et_3N, 2 h – 24 h, T.A. – 90 °C
Cl	NH_2	CMe_2	OAc	BuOH, Et_3N, 18 h, T.A.
NH_2	$OCNHCCl_3$	OAc	OAc	CH_2Cl_2, $BF_3.Et_2O$, 2 h - 8 h, 0 °C – T.A.
NH_2	OH	OAc	OAc	EtOH, NH_4Cl, 2 h – 24 h, T.A. - reflux
OH	$OCNHCCl_3$	OAc	OAc	CH_2Cl_2, $BF_3.Et_2O$, 2 h - 8 h, 0 °C – T.A.

Des tentatives de substitution nucléophile du chlore ont été réalisées sur le produit commercial, le NBZ-Cl à partir de ribose et d'aminoribose. Après plusieurs échecs, nous avons alors envisagé de partir d'analogues de NBZ synthétisés, **42** et **43,** portant une fonction amine ou alcool afin de réaliser une substitution nucléophile sur le carbone anomérique du ribose en présence de $BF_3.Et_2O$ comme décrit auparavant. Malgré ces nombreuses tentatives, les produits désirés n'ont pas été obtenus et la mise au point de ce couplage se poursuit au laboratoire.

VII.3 Conclusion

Au cours de ce travail de synthèse de dérivés nucléosidiques fluorescents, nous avons pu obtenir différents analogues nucléosidiques fluorescents qui ont été obtenus uniquement à partir du ribose activé sous forme de trichloroacétimidate. Ces composés nous permettront d'évaluer l'importance du cycle aromatique, lors des tests biologiques, des nucléotides (après phosphorylation) sur leur transport par, VNUT, en le remplaçant par des fuorophores. Nous pourront également évaluer l'importance de la partie ribose en modifiant celui-ci, par suppression de fonction hydroxyle (désoxyribose) ou en allongeant l'espacement entre base nucléique ou fluorophore et le ribose, comme cela a été réalisé sur les motifs éthéno (Figure 59)

Ce travail devra être complété par la finalisation du couplage entre le ribose et l'azote intracyclique de quinolinone ou sur le NBZ. Nous pourrons également envisager d'optimiser les voies de synthèses utilisant l'aminoribose, en mettant au point une méthode de couplage peptidique avec nos fluorophores portant une fonction acide carboxylique. Cet aminoribose pourra aussi être employé en tant que nucléophile lors de

substitution nucléophile d'halogène porté par différents fluorophores synthétisés. Ces travaux qui sont en cours de réalisation au sein du laboratoire.

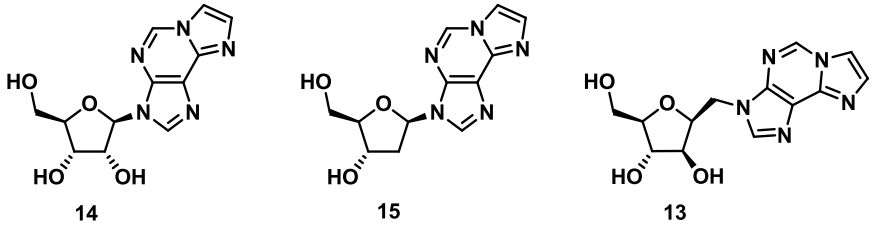


Figure 59 : Structure de l'ε-adénosine, 14, de l'ε-2'-déoxyadénosine, 16 et de l'ε-D-glucitol, 13.

Pour l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotide (VNUT), il est indispensable d'introduire une fonction triphosphate, qui apparaît essentielle à la reconnaissance, sur ces composés. Nous allons discuter ci-dessous des différents essais de tri-phosphorylation réalisés.

VIII. Phosphorylation

Comme nous le présenterons ultérieurement, les études préliminaires sur VNUT montrent que la partie sucre triphosphate semble essentiel à une bonne reconnaissance du substrat pour son transporteur. En effet tous les composés, jusqu'à alors identifiés, sont des nucléosides triphosphate (GTP, ITP, UTP…)[274], il apparaît donc indispensable de triphosphoryler nos composés pour conserver la reconnaissance de nos composés pour VNUT. Nous avons donc débuté la phosphorylation des composés « Fluo-ribose ». Nous avons également réalisé la phosphorylation des composés « Fluo-linker », amputé de la partie ribose, afin d'étudier l'importance du sucre dans la reconnaissance de nos composés avec VNUT.

Dans cette partie nous présenterons brièvement la méthode de triphosphorylation sélectionnhée, avant de discuter de son application sur les composés précédemment synthétisés.

VIII.1 Introduction:

Les nucléosides triphosphates (NTP) et déoxy-nucléoside triphosphates (dNTP) sont principalement utilisé lors de la synthèse d'acides nucléiques (ADN/ARN) et sont impliqués dans un nombre incalculable de processus biologiques : réplication d'ADN, transcription d'ARN, transmission du signal purinergique, neurotransmission…[275-277] La synthèse d'analogues triphosphates est aujourd'hui un enjeu d'importance dans le cadre de l'étude de ces mécanismes et de leurs implications dans différentes pathologies. Les analogues de NTP restent néanmoins difficiles d'accès chimiquement, de par les méthodes contraignantes de synthèse, de purification et de caractérisation.

Les synthèses que nous décrirons par la suite, requièrent des conditions anhydres strictes, difficiles à mettre en œuvre notamment pour les réactifs de phosphorylation utilisés qui sont généralement très hygroscopiques. La présence de plusieurs fonctions alcools (ex : ribose) entraine également de nombreuses réactions secondaires qui compliquent d'avantage la purification de ces produits.

La purification de ces dérivés de NTP, est délicate de par la fragilité de la fonction triphosphate à pH acide et à des températures > à 40°C. Ces contraintes peuvent néanmoins être atténuées par l'utilisation de contre-ions appropriés (tributylammonium, sodium ou encore lithium). La purification reste tout de même délicate en raison de la partie triphosphate multichargée et nécessite souvent plusieurs étapes de purification sur des matrices moins conventionnel: colonne (ou HPLC préparative) phase inverse, résine échangeuse d'anions…

Les voies d'accès à ces composés ont été très étudiées ces dernières années[278-282] néanmoins assez peu de synthèses semblent généralisables à un panel de dérivés nucléosidiques. Parmi les nombreuses voies d'accès chimique développées nous nous sommes intéressés aux synthèses « one-pot », telles que la méthode de Poulter,[264, 265] la méthode d'Yoshikawa-Ludwig[283] ou encore la méthode d'Eckstein-Ludwig.[284] D'autres méthodes passant par des intermédiaires monophosphates, ont été décrites,[285, 286] ces méthodes semblent plus sélective des nucléotides et requièrent une étape supplémentaire de purification du monophosphate. Il existe également des méthodes de triphosphorylation enzymatiques,[287-289] mais elles ne sont applicables uniquement qu'aux composés nucléotidiques stricts.

Nous nous sommes focalisés sur la méthode d'Yoshikawa-Ludwig qui semble la moins sélective vis-à-vis du réactif à phosphoryler et la plus simple à mettre en œuvre.

➢ *Méthode d'Yoshikawa-Ludwig :*

Cette méthode très utilisée aujourd'hui emploie du trichlorure de phosphoryle (POCl3). La mise au point de cette synthèse par l'équipe du Dr Yoshikawa[290]a permis d'obtenir une meilleur sélectivité des alcools primaire en 5' en utilisant, en supplément, du trialkyle phosphate (généralement triméthyl phosphate). L'utilisation du trialkyle phosphate permet une meilleure homogénéisation de la solution et augmente l'encombrement stérique autour du $POCl_3$ facilitant la sélectivité des alcools primaire en empêchant ainsi des réactions secondaires de phosphorylation sur les alcools secondaire (2' et 3'). Cette méthode mise au point dans un premier temps afin de générer des composés mono-phosphorylés, a ensuite été étendue par l'équipe du Dr Ludwig à la synthèse de dérivés tri-phosphorylés.[283] Après addition du $POCl_3$ sur l'alcool primaire, l'utilisation de bis-(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate et de tributylamine a conduit à l'obtention de nucléosides triphosphates après un traitement aqueux (Schéma 56).

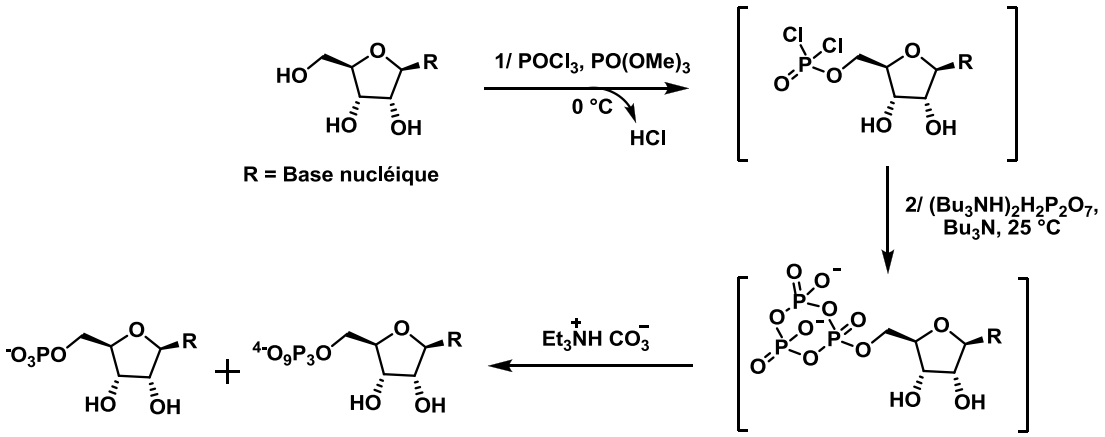


Schéma 56 : Synthèse de dérivés ribose triphosphates à partir de la méthode de Yoshikawa-Ludwig[283]

Cette voie de synthèse a été largement utilisée pour des analogues nucléosidiques peu sensibles au milieu acide fort (l'HCl libéré in-situ). Cette méthode a également été adaptée à différents dérivés nucléosidiques en ajoutant au milieu réactionnel des bases agissant comme « pompe à protons », telles que la lutidine ou un dérivé appelé «proton sponge® », permettant ainsi de contrôler l'acidité du milieu.[291, 292]

VIII.2 Synthèses

Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode d'Yoshikawa-Ludwig, qui est assez sélective des alcools primaire, ce qui permet de réaliser cette synthèse sur des « Fluo-linker » portant un alcool primaire et également sur les « Fluo-ribose » complètement déprotégés, évitant ainsi deux étapes de purification des composés triphosphate qui est longue et fastidieuse. En effet, la difficulté majeure de l'utilisation de cette voie est la purification et plus particulièrement la séparation entre le composé monophosphate et triphosphate (Colonne échangeuse de cations puis HPLC préparative). Un grand avantage de cette méthode est aussi de ne pas former de composé diphosphate. La séparation d'un mélange mono- di- et triphosphate étant particulièrement complexe.

Cette synthèse a tout d'abord été envisagée sur des composés « fluo-linker », **30** et **11** que nous possédions en grande quantité ce qui nous a permis de mettre au point cette réaction de tri-phosphorylation en suivant la méthode d'Yoshikawa-Ludwig (Schéma 57).

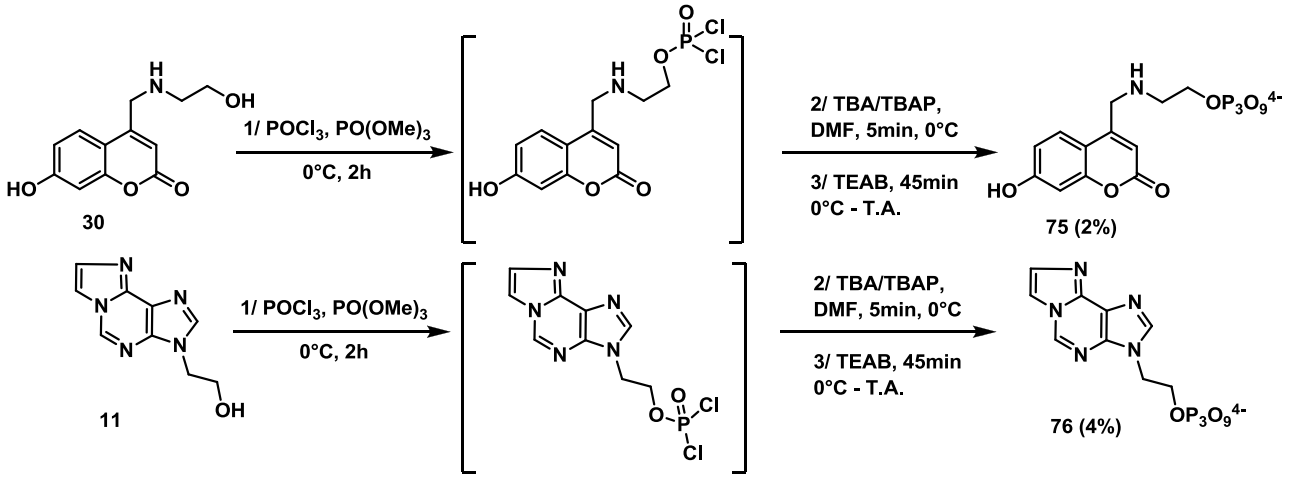


Schéma 57 : Synthèse de composés tri-phosphorylés, 2119 et 2125, par la méthode d'Yoshikawa-Ludwig

Nous avons dû respecter des conditions strictement anhydres, les solvants et réactifs ($POCl_3$ et $PO(OMe)_3$) sont distillés le jour même et les solides placés à sécher sous vide 24 h avant la réaction. De plus, les produits obtenus doivent être traités et manipulés avec précaution pour éviter la dégradation du composé triphosphorylé en composé mono-phosphorylé « plus stable ».Nous avons observé en fin de réaction, un mélange de produit mono-phosphorylé (produit majoritaire) et de produit tri-phosphorylés, qui ont été séparés par passage sur une colonne échangeuse d'anions (DEAE-A25) puis par HPLC-préparative (C-18). La multiplication des étapes de purification ainsi que la fragilité des composés triphosphorylés induisent des rendements finaux très faibles (2-4%). Les conditions de purifications ont été mises au point et optimisées pour permettre l'obtention des produits triphosphorylés.

Le passage sur la colonne échangeuse d'anions s'effectue sur une période de 4 h avec un gradient d'élution allant de 0.01 M à 0.5 M de tampon TEAB (triéthyl ammonium bicarbonate). La purification sur colonne échangeuse d'anions permet de séparer les composés mono- et tri-phosphorylés du reste des composants de la réaction. La séparation des composés monophosphorylé et triphosphorylé est ensuite réalisée par HPLC préparative (colonne C-18). Plusieurs solvants d'élutions ont été essayés, dans un premier temps un tampon phosphate (KH_2PO_4/K_2HPO_4) et de l'acétonitrile ont été employés mais malgré une séparation assez efficace le produit est récupéré avec une quantité non-négligeable de sel de potassium-phosphate nécessitant une nouvelle étape de purification (colonne échangeuse de cation) afin d'éliminer les phosphates du tampon. Dans un second temps nous avons utilisé un tampon TEAA (triéthylammonium acétate) et de l'acétonitrile. Après de nombreux essais de gradient, des conditions adéquates ont été trouvées et ont même permis d'observer la séparation de composés monophosphate et triphosphate. De plus, l'utilisation de ce tampon supprime l'étape de purification sur colonne échangeuse de cations. En effet, le TEAA se volatilise au lyophylisateur et l'on récupère le produit sous forme de sels de tri-éthyl ammonium qui n'interfèreront pas avec nos tests biologiques.

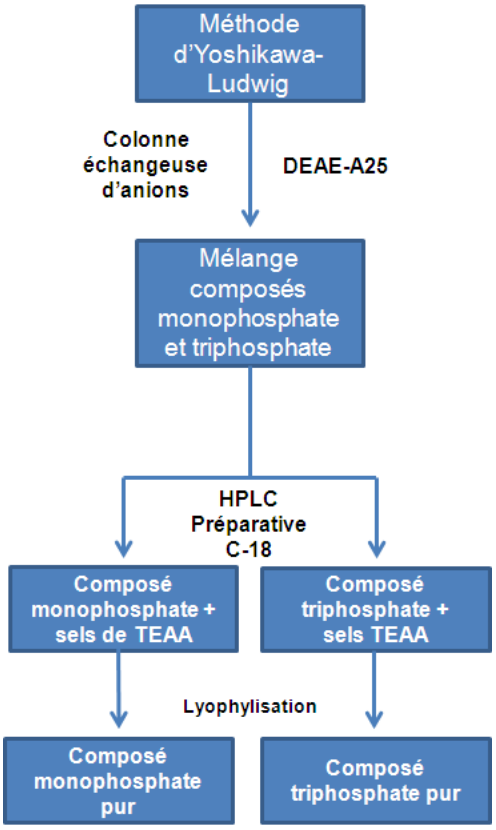
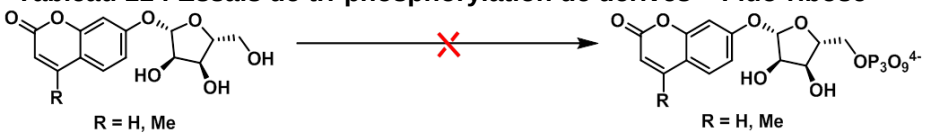


Figure 60 : Méthode de séparation des composés monophosphate et triphosphate.

Après avoir mis au point les conditions de purification sur les composés **75** et **76**, nous nous sommes tournés vers la phosphorylation de nos composés « Fluo-ribose ». Nous avons réalisé ces essais sur les composés que nous possédions en plus grosse quantité, **68** et **69**. Malgré des essais préalable de cette réaction nous nous sommes heurtés à des problèmes de solubilité qui nous ont conduits alors à varier le temps et la température (augmentation de température = amélioration de la solubilité mais dégradation des produits formés) mais également en introduisant lors de la première étape de faible quantité de solvant pouvant aider à la solubilisation (DMF, DMSO, CH_3CN) (Tableau 11).

Tableau 11 : Essais de tri-phosphorylation de dérivés « Fluo-ribose »



Température	Conditions	Temps
-15 °C	$PO(OMe)_3$, $POCl_3$	2 -16 h
0 °C	$PO(OMe)_3$, $POCl_3$, DMF	2 – 24 h
0 °C – 40 °C	$PO(OMe)_3$, $POCl_3$, DMSO	2 – 24 h
0 °C – 60 °C	$PO(OMe)_3$, $POCl_3$, CH_3CN	2 – 24 h

Pour pallier ce problème de solubilité nous avons envisagé de déprotéger sélectivement l'alcool primaire. Nous espérons qu'en conservant deux fonction protégées sous forme d'acétate nous observerons une amélioration de la solubilité des composés dans le triméthylphosphate. De plus dans le cas contraire nous

pourrions envisager une autre voie de phosphorylation passant par des intermédiaires mono-phosphorylé et limiterait les réactions secondaire/parasites en conservant les hydrocyles 2' et 3' protégés.

➢ *Déprotection sélective de l'hydroxyle 5' :*

Les seules méthodes décrites dans la littérature et adaptables à nos composés sont des méthodes enzymatiques.[293] Nous avons choisi d'utiliser la lipase : *candida cylindracea*, qui était disponible au laboratoire et qui présentait dans la littérature une bonne adaptabilité de substrats. L'activité maximale de l'enzyme est à pH = 7 et à 37 °C. Les premiers essais réalisés à 37 °C dans un tampon phosphate avec un 1/10 de DMF (aidant à la solubilisation et ne dégradant pas l'enzyme) ont conduit à un mélange de produits déprotégés avec le composé souhaité minoritaire. Nous avons constaté, en faisant varier de temps de réaction, que les composés mono-déprotégés sur l'alcool primaire étaient de meilleurs substrats pour l'enzyme conduisant majoritairement à un mélange de produit déprotégé. Nous avons alors tenté de diminuer la température en allant jusqu'au seuil minimal d'activité de l'enzyme, soit 25 °C (Schéma 58).

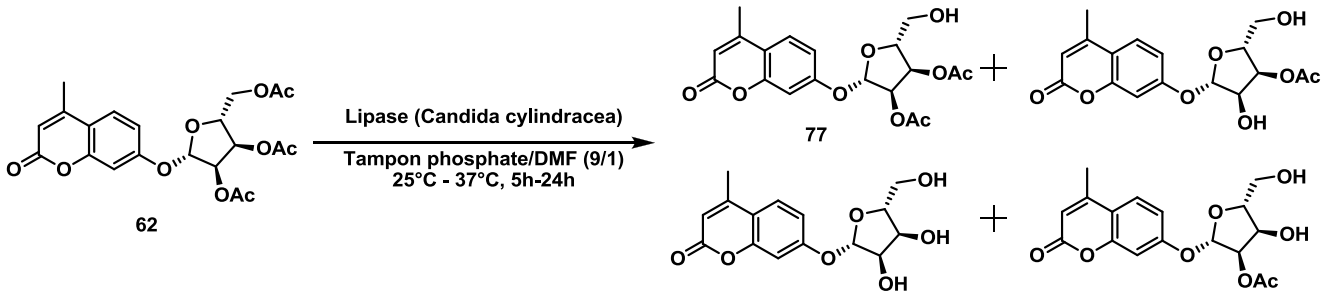


Schéma 58 : Essais enzymatiques de mono-déprotection de composés « Fluo-ribose » tri-acétylés.

Le composé mono-déprotégé n'a pu être obtenu majoritairement malgré les différentes conditions employées (5 h à 24 h, 25 °C à 37 °C) nous n'avons pas obtenu majoritairement. Néanmoins malgré une séparation difficile, nous avons pu isoler le composé mono-déprotégé souhaité, **77,** avec un rendement de 15%. Le manque de temps n'a pas permis d'aller au bout de cette synthèse, pour laquelle il serait intéressant d'étudier l'effet de cette mono-déprotection sur l'amélioration de la solubilité. Il faudra ensuite, après phosphorylation, déprotégé les fonctions acétates restantes (2' et 3'). Cette déprotection pourra être envisagée à la suite de la phosphorylation, en one-pot, en abaissant le pH de la solution tampon final à l'aide triéthylamine suivant le protocole utilisé lors de la déprotection des composés tri-acétylés (Schéma 59). Ceci permettrait de réduire le nombre de purification de composés triphosphorylés.

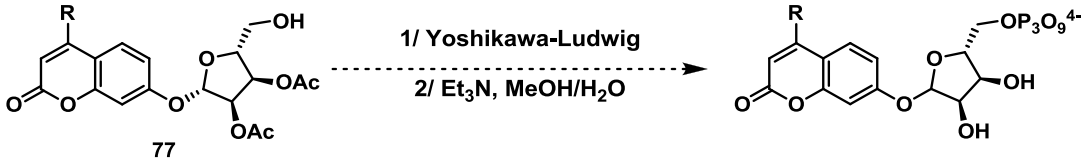


Schéma 59 : Méthode envisagée de triphosphorylation et de déprotection du ribose en one-pot.

VIII.3 Conclusion

Nous avons observé une adaptabilité de la méthode d'Yoshikawa-Ludwig, qui a permis de tri-phosphoryler deux composés s'éloignant fortement de dérivés nucléosidiques (**75 e**t **76**). La triphosphorymation de ces composés a permis de mettre au point un protocole de purification et de séparation des composés mnophosphorylé et triphosphorylés. Au contraire, la méthode d'Yoshikawa-Ludwig appliquée à des dérivés, plus proche au niveau structural des nucléosides n'a pas conduit aux composés triphosphorylés souhaités, majoritairement en raison de problèmes de solubilité des composés « Fluo-ribose ». Nous avons alors utilisé une méthode de mono-déprotection enzymatique sélective des hydroxyles en 5' des dérivés du ribose. Il sera intéressant d'évaluer l'effet de cette mono-déprotection sur l'étape de triphosphorylation. Celle-ci devant encore être finalisée pour obtenir des produits triphosphorylés permettant une étude plus approfondie de VNUT.

IX. Synthèses de FFS potentiels de la sialine.

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction les acides sialiques forment une famille d'une quarantaine de composés, possédant un Km de l'ordre du mM pour la sialine. Ces acides sialiques ne possédant pas de motif aromatique, il était difficile d'envisager l'incorporation de fluorophores sans modifier l'affinité et/ou la sélectivité pour la sialine. Des travaux préliminaires ont permis d'identifier la Fmoc-Lys(Cbz)-OH, **N8**, comme ligand potentiel avec une CI_{50}=17 µM. Cette touche a servi de point de départ à l'élaboration de nouveaux ligands fluorescents de la sialine.

Dans ce chapitre nous détaillerons les synthèses réalisées dans le but d'identifier la structure minimale active (SMA) sur la sialine et de pouvoir effectuer des études de relations entre la structure et l'activité (RSA). Cette étude consistera à identifier les différents groupements et fonctions indispensable pour conserver une activité sur la sialine par le biais de différentes études autour de la nature de l'acide aminé de la touche, **N8**. Nous effectuerons également des modifications sur différents acides aminés d'intérêts biologiques afin d'élargir la gamme de composés testés pour réduire la taille de cette touche. Ainsi nous minimiserons de plus en plus la taille des acides aminés et fonctions présentent sur la touche, afin d'améliorer la possiblité d'obtenir des substrats fluorescents (FFSs). Les fluorophores synthétisés précédemment, seront ensuite couplés à la lysine et d'autres dérivés d'acide aminés, sur des positions sélectionnées. Différentes méthodes de couplage seront décrites dans ce sous-chapitre (Figure 61).

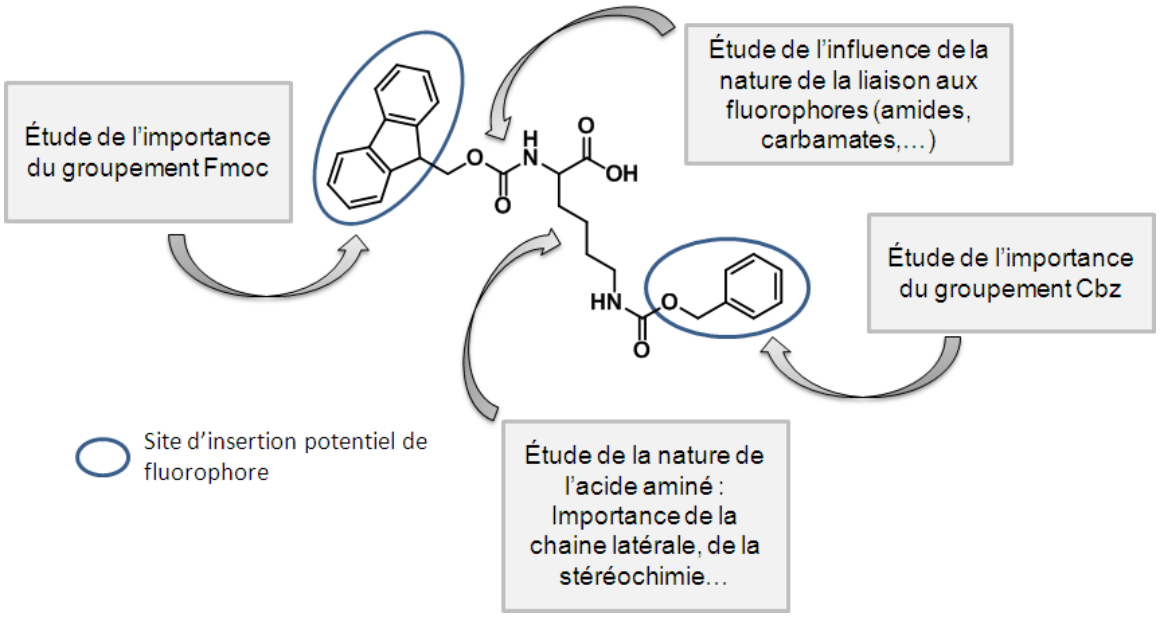


Figure 61 : Modification envisagée sur la Fmoc-Lys(Cbz)-OH pour des études SMA et RSA

Toutes ces synthèses ont été réalisées à partir d'acide aminés naturels, de série L. Les synthèses effectuées (protection, hydrolyse d'ester ou couplage) sont décrites comme n'ayant que peu de chance de racémiser le carbone asymétrique. Nous n'attacherons donc pas d'attention particulière à la stéréochimie des produits finaux lors de ce travail préliminaire sur la sialine. De plus, nous conserverons tout au long de cette étude une fonction acide carboxylique. La sialine étant un transporteur d'anion, nous n'avons pas souhaité modifier la charge globale des molécules synthétisés. Nous conserverons donc une fonction acide carboxylique (carboxylate au pH physiologique), présent sur tous les substrats naturels de la sialine.

Ces synthèses auront également pour objectif d'améliorer les CI_{50} dans le cadre d'études d'inhibition qui pourront être étendues à des tests de transports dans le cadre de la conception de FFSs. Ce travail a été réalisé en parallèle avec les tests biologiques qui seront détaillés dans le chapitre concerné.

IX.1 Etude de SMA et RSA autour de la touche N8

Dans ce sous-chapitre, nous allons détailler le travail effectué sur différents acide aminés afin d'étudier les modifications envisageables : des chaines latérales, de la stéréochimie ou encore de l'importance des groupements protecteurs de ces acide aminés sur l'activité de ces composés. Des premiers tests biologiques ont été réalisés sur une banque de dérivés d'acides aminés commerciaux protégés sur l'amine proximale par un groupement Fmoc. Les synthèses que nous avons réalisées permettront également d'élargir la gamme de dérivés d'acide aminés protégés par un groupement Fmoc disponible au laboratoire.

IX.1.a Importance de la chaine latérale/nature des acides aminés

Nous avons dans un premier temps réalisé la synthèse de la lysine « di-Fmoc » (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH). Nous avons utilisé la Fmoc-Lys(Boc)-OH que nous avons déprotégé en présence de TFA dans du dichlorométhane conduisant à l'intermédiaire Fmoc-Lys-OH qui est ensuite reprotégé avec le groupement Fmoc sur sa partie distale. Cette protection s'effectue de manière classique, en milieu basique (Na_2CO_3) dans du THF en présence de Fmoc-Cl. Le composé **78** a été obtenu avec un rendement de 46% (Schéma 60). Pour répondre à nos problématiques, nous avons ensuite étendue cette protection à d'autres acides aminés.

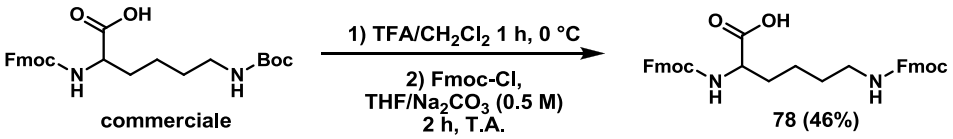


Schéma 60 : Synthèse de la Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, 78.

Ainsi, dans un second temps nous avons réalisé différents essais de protection, par le groupement Fmoc, de l'amine proximale de divers acides aminés (Glutamate, Leucine, et Cystéine). Les protections de ces différents acides aminés ont toutes été réalisées à partir de Fmoc-Cl en faisant varier le milieu réactionnel pour étudier les meilleures conditions de protections. La Cys(Sbz)-OH a été protégée en présence de chlorure de triméthylsilyle (TMS-Cl) dans de l'acétonitrile, en milieu basique (DIEA)[294](Schéma 61). Cette méthode a permis d'obtenir la Fmoc-Cys(SBz)-OH, **79**, avec un rendement de 29% non-satisfaisant pour une simple étape de protection, nous n'avons donc pas reproduit ces conditions de protection. Nous avons réalisé la protection de l'amine du Glu(OMe)-OH, en utilisant comme précédemment du Fmoc-Cl, en milieu basique plus doux (Na_2CO_3) dans du THF. Le composé **80**, obtenu avec un rendement de 65%, sera évalué tel quel et pourra également être utilisé lors de réactions de couplages sur une de ses deux fonctions acides carboxyliques. Toujours afin d'évaluer l'importance du groupement Fmoc mais également de pouvoir évaluer l'importance du carbone asymétrique nous avons reproduit ces condition sur la DL-Leucine (mélange racémique) conduisant à la Fmoc-DL-Leu-OH, **81**, avec un rendement de 85%, en remplaçant le THF par du dioxane. L'utilisation de dioxane a permis d'améliorer la solubilité des réactifs et ainsi le rendement de la réaction.

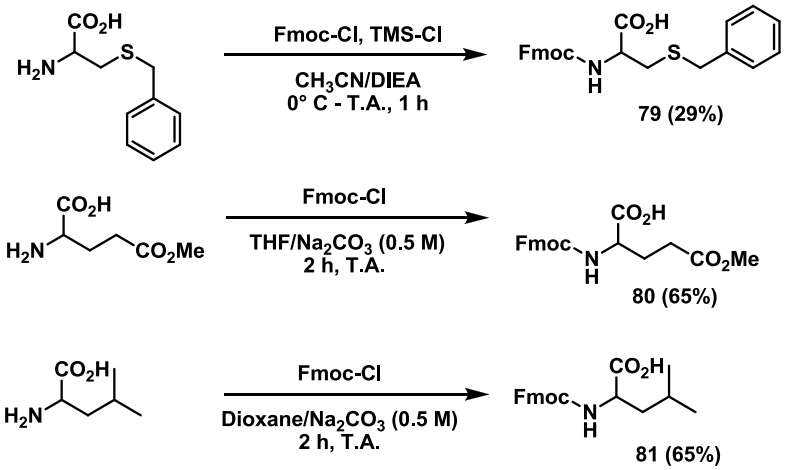


Schéma 61 : Synthèse des composés 79, 80 et 81.

Ces différents composés synthétisés et les différents Fmoc-acides aminés disponibles au laboratoire, permettront d'évaluer les différents groupements chimiques d'importance pour avoir une bonne activité sur la sialine. Par exemple, la Fmoc-DL-Leu offrira une comparaison entre l'activité de la Fmoc-L-Leu et de son mélange racémique. Ces composés nous ont également permis d'orienter les synthèses réalisées dans le cadre d'une étude de relation structure activité, détaillé par la suite.

Ainsi, nous avons sélectionnés à l'aide de résultats préliminaires, 3 acides aminés (Lys, Cys, Glu) qui se sont révélés intéressant à la fois pour leur bonnes activités sur la sialine et pour leurs structures sur lesquelles il sera facilement envisageable d'effectuer des modifications chimiques, telles que l'insertion de fluorophores. Le composé **80**, Fmoc-Glu(OMe)-OH, pourra être engagé directement dans des réactions de couplage avec un fluorophore. Nous allons maintenant détailler brièvement la préparation de la lysine et de la cystéine permettant d'envisager l'insertion de motif fluorescent.

IX.1.b Préparation de 2 acides aminés d'intérêt pour un couplage ultérieure :

Comme nous venons de le mentionner, nous avons sélectionné trois différents acides aminés, pour leurs activités intéressantes et leurs fonctions réactives. Dans un premier temps nous avons réalisé la synthèse du dérivé **82**, afin de pouvoir introduire des groupements fluorescents sur la partie distale de la lysine protégée. Nous sommes partis de la Fmoc-Lys(Boc)-OH que nous avons d'abord estérifiée (sous forme d'ester méthylique, évitant ainsi des réactions parasites lors des futurs étapes) puis réalisé l'hydrolyse du groupement Boc. L'estérification réalisée au reflux du MeOH en présence de $SOCl_2$ a permis d'obtenir directement le produit estérifié et déprotégé, **82,** en une seule étape avec un rendement quantitatif (Schéma 62).

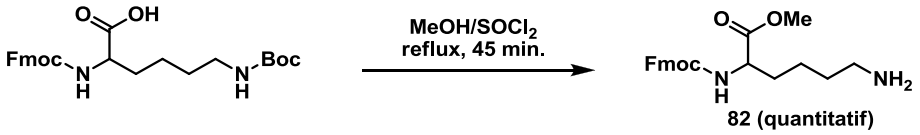


Schéma 62 : Synthèse de la Fmoc-Lys-OMe, 82.

Ce composé a ensuite été employé pour des couplages peptidiques ou des essais de substitution sur la partie distale de la lysine. Nous nous sommes ensuite intéressés à la cystéine. Nous avons déprotégé de la Fmoc-Cys(Trt)-OH disponible au laboratoire, afin d'obtenir la Fmoc-Cys-OH possédant ainsi sa fonction thiol

libre disponible pour être engagée dans une réaction de couplage.Cette réaction de déprotection s'effectue d'abord dans un mélange TFA/DCM à 0 °C pendant 1 h, puis est ajouté du triéthyl silane utilisé en tant que « scavenger » pour piéger le groupement triphényle libéré. Le produit désiré, **83**, avec un rendement quasi-quantitatif (Schéma 63)

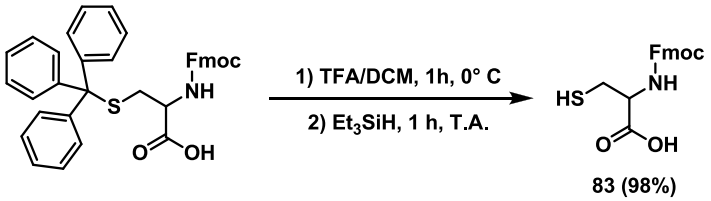


Schéma 63 : Déprotection de la Fmoc-Cys(Trt)-OH conduisant au composé 83, Fmoc-Cys-OH

Le travail effectué sur ces trois acides aminés, nous permettent d'envisager de multiples voies de couplages sur les fluorophores synthétisés précédemment. Ainsi ont été envisagées des synthèses conduisant à la formation de liaison amide, thioester et de liaison carbamate entre le fluorophore et l'acide aminé. Nous présenterons également les composés obtenus par simple substitutions nucléophiles de la fonction halogénée de différents fluorophores synthétisés précédemment. Ces différentes voies d'accès à nos composés finaux sont décrites ci-dessous.

IX.2 Insertion de motifs fluorescents sur les acides aminés

Nous avons ensuite voulu évaluer la possibilité de remplacer les motifs aromatiques (Fmoc et Cbz) présents sur la touche, Fmoc-Lys(Cbz)-OH, par les fluorophores précédemment décrits. Comme nous l'avons explicité dans le chapitre relatif à la synthèse des fluorophores, nous avons introduit différentes fonctions (amines, alcools, acides carboxyliques, halogènes…) permettant d'offrir plusieurs possibilités pour fonctionnaliser les synthons d'intérêts

Nous détaillerons dans ce sous-chapitre les différentes voies envisagées pour le couplage. Ce travail donnera de nombreux points de comparaison pour une étude de relation de structure activité.

IX.2.a Couplage par formation d'une liaison amide et thio-ester

Dans la littérature, de très nombreuses voies d'accès pour la formation de liaison amide (peptidique) ont été décrites [295] Plusieurs voies permettant le couplage entre les différents fluorophores et les synthons d'intérêts biologiques (dérivés d'acides aminés) ont donc été envisagées.Dans un premier temps, l'acide carboxylique a été activé sous forme de chlorure d'acide, en présence de $SOCl_2$. Après activation de l'acide carboxylique de l'acide 4-acétic- 7-hydroxycoumarine commercial, la lysine protégé (Lys(Cbz)-OMe) commerciale, est ajouté in-situ en présence d'une base (Et_3N) afin de substituer le chlorure par l'acide aminé d'intérêt (

Schéma 64). Le produit résultant du couplage n'a pas été observé sûrement dû à des réactions secondaires (polymérisation de la coumarine) se produisant lors de l'ajout de base.

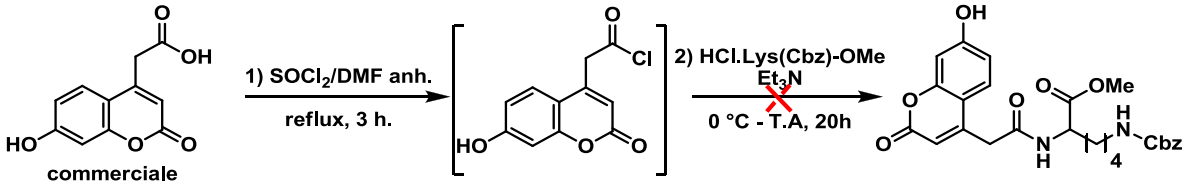


Schéma 64 : Essais de couplages entre l'acide 4-acetic-7-hydroxycoumarine et la Lys(Cbz) -OMe

Nous avons ensuite envisagé une méthode classique de couplage très utilisée au sein du laboratoire, utilisant comme agents de couplages l'HOBt, l'EDC.CI et une quantité catalytique de DMAP pour activer l'acide. Après activation de la fonction acide, en milieu basique, la lysine sous forme d'ester méthylique possédant une fonction amine libre est ajouté in-situ. Plusieurs essais ont été réalisés dans ces conditions, avec différents fluorophores, néanmoins aucun des composés désirés n'a été observé (Schéma 65). Nous avons alors exploité d'autres voies d'accès à ces composés.

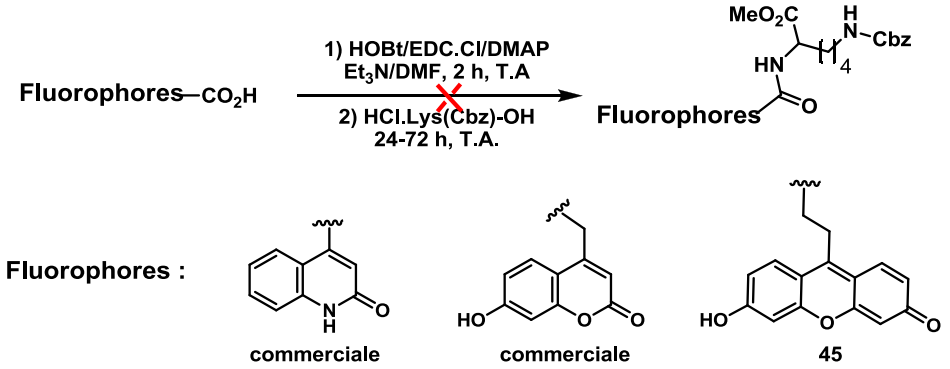


Schéma 65 : Essais de couplages entre différents fluorophores et la Cbz-Lys-OMe

Nous nous sommes alors appuyés sur une méthode décrite en 2005[296] utilisant comme agent de couplage du TBTU et de l'HOBt (deux agents activateurs de l'acide carboxylique). Nous avons légèrement modifié cette méthode en remplaçant le TBTU par de l'HBTU, dont la seule différence est le contre-ion opposé à l'ammonium, respectivement le tetrafluoroborate et l'hexafluorophosphate. Cette méthode se déroule en deux étapes comme un grand nombre de réactions de couplage, une activation de la fonction acide puis l'ajout de l'amine libre. Cette voie d'accès a permis, après déprotection de l'ester par une solution de LiOH (0.5 M, 2 éq) dans un mélange H_2O/THF (1/1), d'obtenir nos premiers composés « Fluo-Lys », **84** et **85** (Schéma 66).

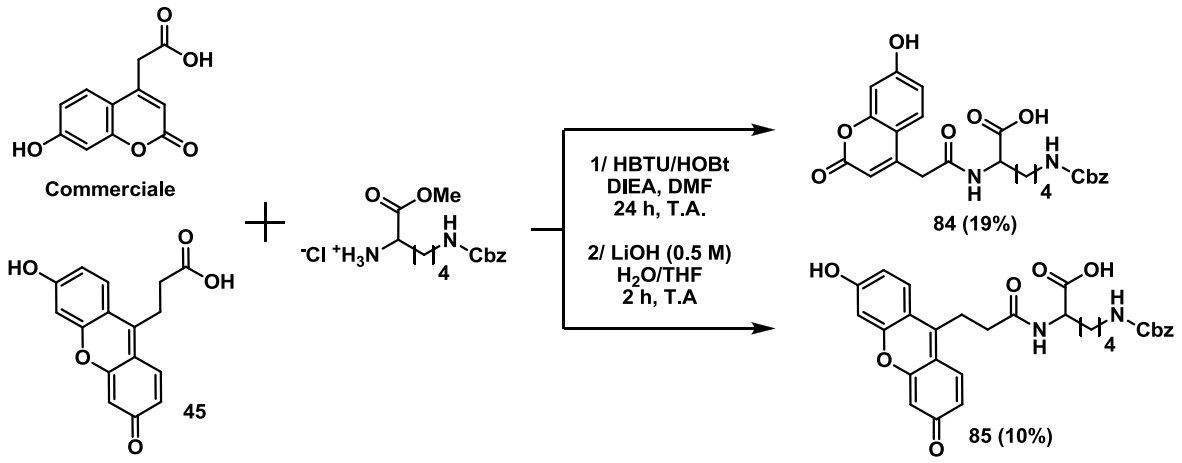


Schéma 66 : Synthèse des composés « Fluo-Lys », 84 et 85.

Cette méthode requiert uniquement une extraction intermédiaire, entre les deux étapes afin d'éliminer les agents de couplage avant l'hydrolyse de l'ester. Les faibles rendements obtenus par cette voie de couplage nous ont conduit à utiliser une autre voie méthode de couplage qui présente plusieurs avantages : elle se réalise sans HOBt en présence uniquement d'HBTU comme agents de couplage, dans le dichlorométhane (évitant ainsi le DMF) et ne nécessite pas d'ajout en deux temps des réactifs.[297] La réaction débute lors de l'ajout de DIEA (observation de la solubilisation des produits, permet d'ajuster les quantités de DIEA à introduire) par déprotonation de l'acide, permettant ainsi son activation par l'HBTU qui est ensuite substitué par l'amine libre formant la fonction amide désirée. L'HBTU est en équilibre sous deux formes, en solution. Le carboxylate substitue dans un premier temps le groupement uronium, qui une fois sous forme d'ester subit une trans-estérification de la part du groupement benzoxytriazole. Une aminolyse se produit enfin via l'amine primaire présente dans le milieu (Schéma 67).

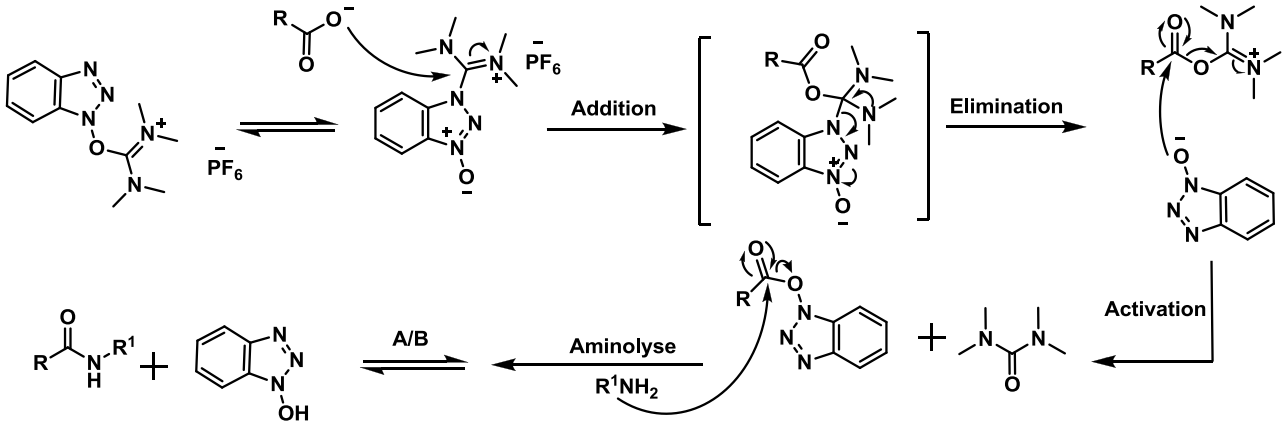
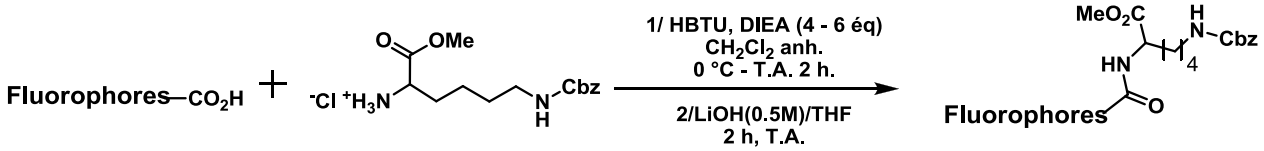
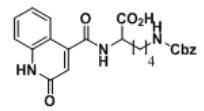
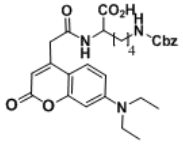
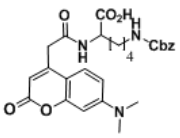
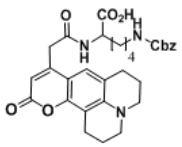


Schéma 67 : Mécanisme de couplage peptidique par activation en présence d'HBTU

Nous avons utilisé cette voie de couplage, suivie de l'hydrolyse de l'ester méthylique, pour obtenir les composés **86, 87, 88** et **89** avec de meilleurs rendements globaux comparés à la méthode décrite précédemment (Tableau 12). Ces différents composés nous permettrons une étude de relation structure activité autour des motifs fluorescents et du rôle de leurs substituants sur leur activité.

Tableau 12 : Récapitulatif de la synthèse des composés « Fluo-Lys », 86, 87, 88 et 89.



Structures	Entrée	Rdts	Structures	Entrée	Rdts
	**86**	43%		**88**	46%
	**87**	50%		**89**	12%

Nous n'avons pas observé de différence de réactivité entre le couplage sur un acide quinolinoïque ou un acide acétylcoumarinique porté par des motifs coumarinique ou quinoléique. En revanche, la synthèse du composé à **89** a conduit à un rendement de 12%. En effet, ces conditions appliquées au fluorophore **22** ont conduit au produit désiré **90** en mélange avec un produit de dégradation identifié comme le produit de décarboxylation de **22** conduisant à la 4-méthyl-7-anthracènecoumarine (récupéré lors de la purification final). Cette réaction de dégradation est due à la forte électro-attractivité du motif anthracènecoumarine qui, une fois l'acide activé, favorise la décarboxylation par rapport à l'aminolyse. Les tentatives de déprotection réalisées sur cette intermédiaire **90** ont également conduit à des produits de dégradation (non-identifiés). Néanmoins, en abaissant la température à 0 °C et en ajustant le nombre d'équivalent de LiOH (0.75 éq) nous avons obtenu le produit 89, avec un faible rendement, s'expliquant par les réactions parasites possibles et le défaut de LiOH (Schéma 68).

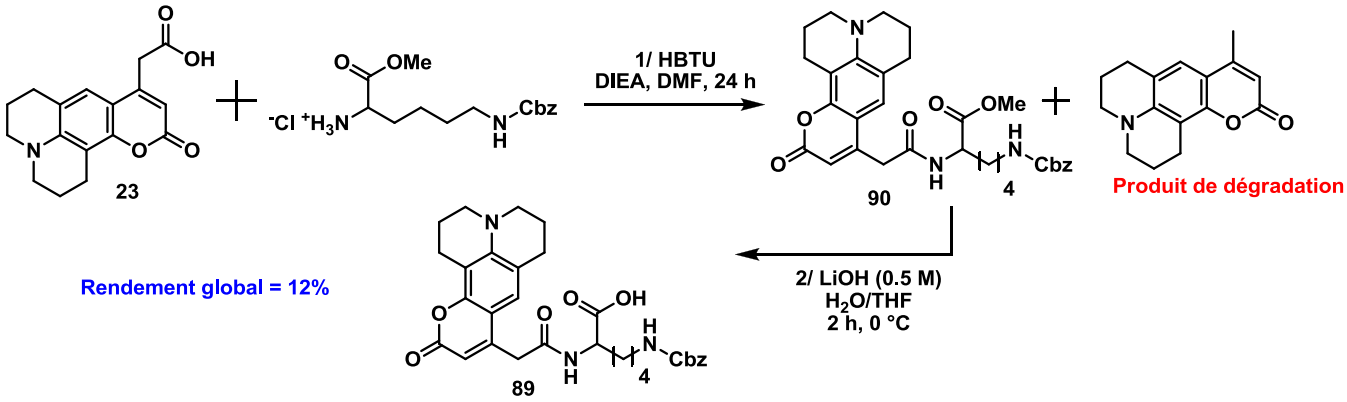


Schéma 68 : Synthèse du composé « Fluo-Lys », 89.

En suivant le même protocole nous avons réalisé le couplage de l'acide 4-acétic-7-diméthylaminocoumarine, **23**, avec la Fmoc-Lys-OMe, **82**, synthétisé précédemment, suivi de la déprotection classique en présence de LiOH (Schéma 69). La formation de ce composé nous permettra de comparer les données des résultats biologiques entre un couplage sur la partie distale de la lysine et un couplage sur la partie proximale

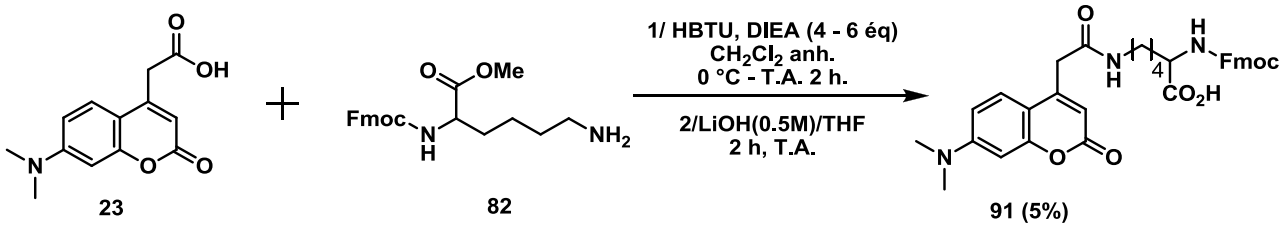


Schéma 69 : Synthèse de la Fmoc-Lys(4-méthylcarbonyl-(7-diméthylaminocoumarine))-OH, 91

Nous avons ensuite utilisé les dérivés d'acides aminés synthétisés auparavant. Nous avons effectué des tentatives de couplage sur les acides aminés, le Fmoc-Glu(OMe)-OH ou la Fmoc-Cys-OH. Le glutamate possédant deux fonctions acides carboxyliques, il est possible d'envisager le couplage sur une d'elle (l'autre devant être protégée) en utilisant des fluorophore portant des fonctions amine (ex : **29**). Nous avons dans un premier temps reproduit les conditions de couplage décrites précédemment, en utilisant comme agent de

couplage uniquement l'HBTU afin d'obtenir Fmoc-Glu(OMe)-4-méthylamido-7-hydroxycoumarine (Schéma 70). Cette synthèse n'a pas conduit au composé désiré.

Nous avons également envisagé la synthèse d'un composé « Fluo-Cys », nous permettant d'obtenir une liaison thioester entre le fluorophore et la cystéine (Schéma 70). Nous avons pour cette synthèse utilisée une voie de couplage similaire mais se déroulant en deux étapes dans l'acétate d'éthyle. Nous avons utilisé le composé **21** pour ce couplage protégé sous forme d'acétoxy en position 7 de la coumarine afin d'éviter de possibles réactions secondaires. Le produit désiré a été observé sur CCM et par analyse de spectrométrie de masse du brut de réaction Néanmoins le produit n'a pu être isolé, celui-ci s'étant dégradé lors de la purification sur colonne de silice, nous n'avons récupéré que des produits de dégradation.

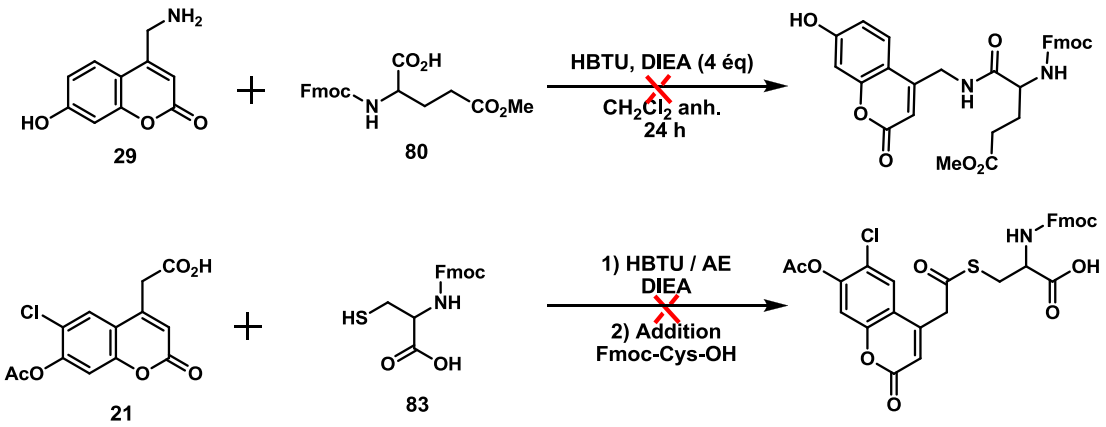


Schéma 70 : Essai de synthèse du Fmoc-Glu(OMe)-4-méthylamido-7-hydroxycoumarine et du composé Fmoc-Cys(4-méthylthioester-6-chloro-7-acétoxycoumarine)-OH par formation d'une liaison thioester

Pour compléter la gamme de composés « Fluo-acide aminés » à tester et pour permettre d'étendre notre étude RSA nous avons ensuite envisagé d'autres méthodes d'accès à ces composés finaux.

IX.2.b Couplage par liaison carbamate

Une grande série de fluorophore possédant une fonction alcool primaire a été précédemment synthétisée. Afin de pouvoir incorporer nos molécules d'intérêts sur les « Fluo-OH » nous nous sommes basés sur une méthodologie permettant l'obtention de molécules couplées par liaison carbamate. [298] Le composé **32**, dont la synthèse a été décrite précédemment, est dans un premier temps couplé au carbodiimidazole (CDI). Cet intermédiaire formé in-situ et observable (apparition d'un précipité) est dans un second temps mis en présence de la Lys(Cbz)-OMe et de base (DIEA) afin de substituer l'imidazole par le dérivé de lysine, conduisant au produit de couplage protégé sous forme d'ester méthylique. Le brut obtenu est déprotégé suivant les mêmes conditions que celle décrites précédemment et permet d'obtenir le composé **92** avec un rendement global de 20% (Schéma 71).

Cette synthèse pourra être étendue à tous les composés fluorescents qui ont été fonctionnalisés par un « bras » alkyl possédant un alcool primaire en bout de chaine. (ex : **34-a, 35-a**…).

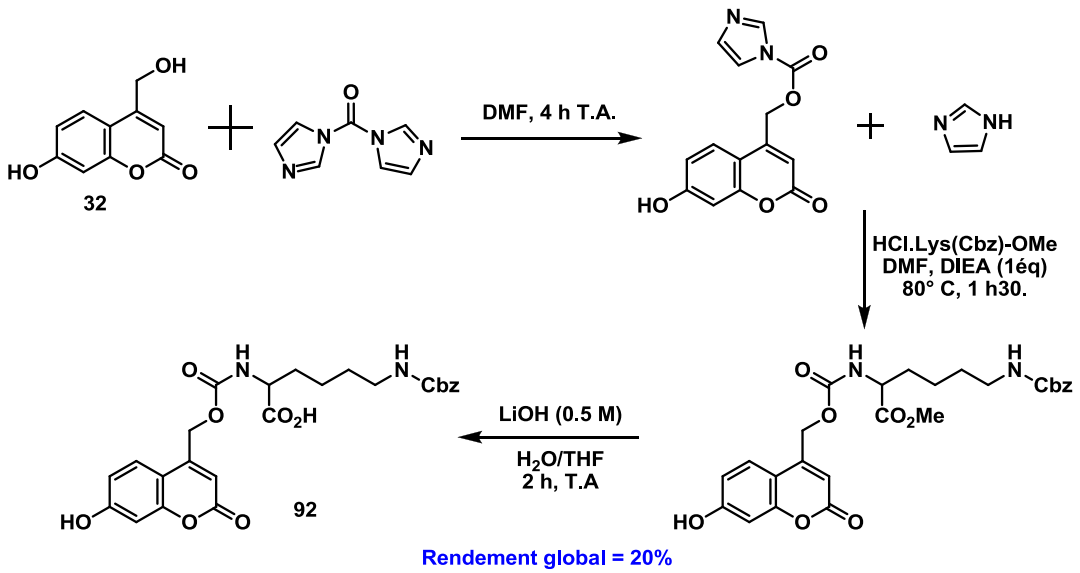


Schéma 71 : Synthèse de la 7-hydroxycoumarine-4-méthylcarbamate-Lys(Cbz)-OH, 92

Nous avons ensuite travaillé à partir des fluorophores chlorés synthétisés précédemment dans le cadre de les substitués par différentes fonctions (acide carboxylique, amine, thiol) présentent sur les acides aminés d'intérêts.

IX.2.c *N*-alkylation d'acides aminés par substitution Nucléophile

Nous allons décrire la possibilité d'insertion de motifs fluorescents sur les dérivés d'acides aminés, à partir des coumarines chlorés, dont les synthèses ont été décrites précédemment. Ces substitutions nucléophiles du chlore seront réalisées via différents dérivés d'acides aminés portant différentes fonctions (amine, acide et thiol). Plusieurs substitutions ont été réalisées en parallèle, sur la 4-chlorométhyl-7-hydroxycoumarine (**17**). La plus courante et la plus étudiée dans la littérature est la substitution du chlore par une amine primaire.[164] Nous avons tenté cette synthèse en présence de base (DIEA) à 80 °C, dans la DMF anhydre à partir du composé **82**. Nous avons également envisagé une réaction de substitution du chlore par une fonction acide carboxylique formant ainsi un ester, à partir du composé **80.**[299] Enfin la dernière réaction réalisée a été la substitution du chlore par un thiol, dans du THF anhydre en milieu basique [300] pour conduire au composé **93** (Schéma 72).

. Les réactions de substitutions du chlore par une amine ou un carboxylate n'ont pas conduit aux produits désirés. Des réactions parasites, des températures trop élevées ou des conditions basiques mal ajustées ont sûrement biaisées la réaction principale. Pour ces deux réactions des fluorophores protégés sur leur position phénolique, tels que les coumarines **20** ou **21**, permettraient de limiter de possibles réactions parasites. Pour la substitution du chlore par une amine il faudra également reproduire ces conditions à plus faible température en ajustant les quantités de DIEA à introduire dans le milieu.

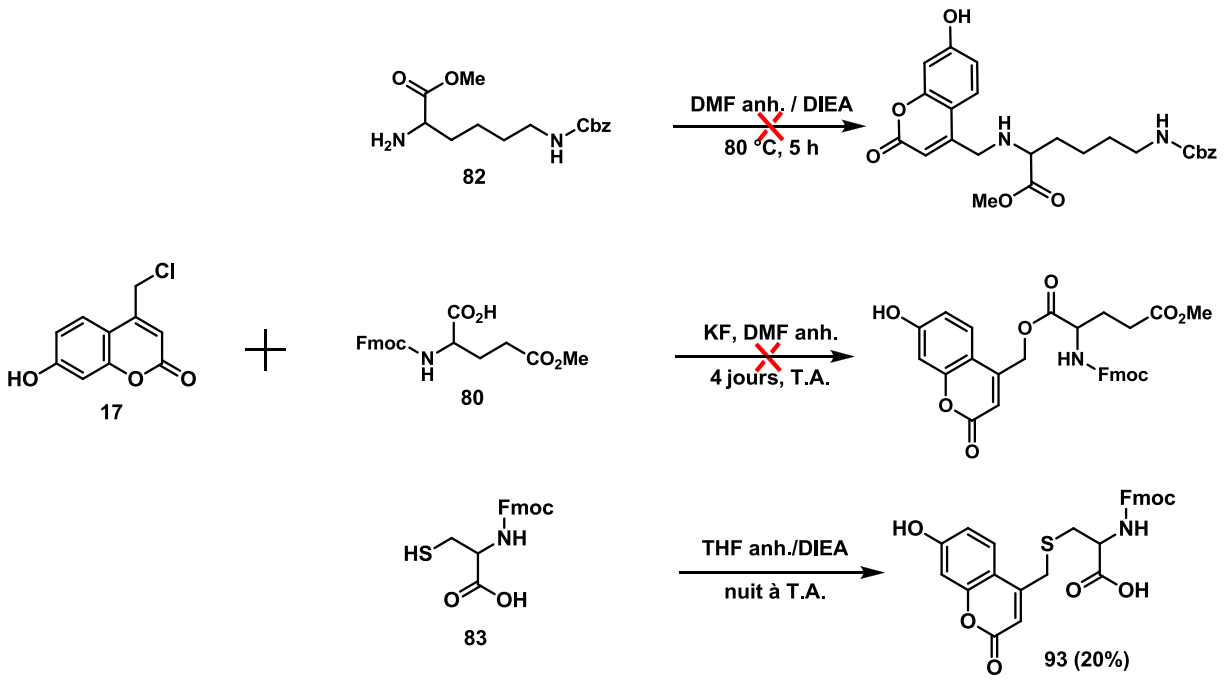


Schéma 72 : Substitution de la fonction chloré du composé 17 par différents groupements nucléophiles.

La réaction de substitution du chlore par un thiol a conduit au produit désiré avec un rendement encourageant de 20%. Nous avons alors reproduit cette substitution nucléophile sur les chlorocoumarines **19** et **20**, conduisant aux composés **94** et **95** avec respectivement des rendements de 60% et de 45% (Schéma 73).

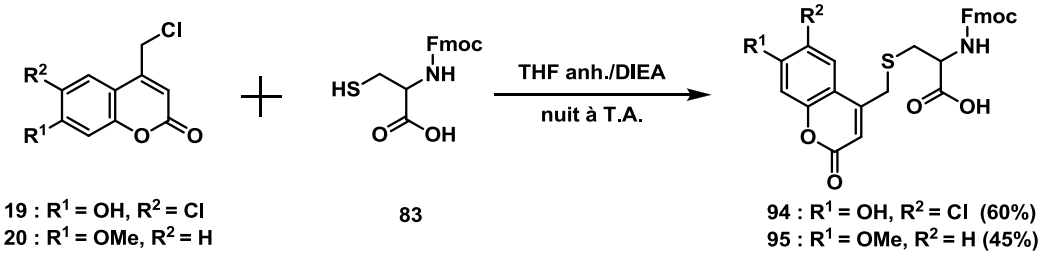


Schéma 73 : Synthèse des « Cys-coumarines », 94 et 95.

Le composé **94** permettra de réaliser des études de pH autour de notre cible. En effet, ce type de fluorophore (6-chloro-7-hydroxy) possède une très bonne fluorescence à un pH supérieur à 6.5 comparé à sa fluorescence, presque éteinte, à pH acide.

Nous avons également utilisé ces conditions sur les dérivés diméthyl- et diéthyl-amino coumarines, **26** et **27**, en remplaçant le THF anhydre par du DMF anhydre afin d'améliorer la solubilité des fluorophores. Nous avons observé lors de la caractérisation des composés obtenus, la déprotection de l'amine de la Cystéine, conduisant aux composés **96** et **97**. Ces synthèses pourront être optimisées en diminuant, par exemple, le temps de réaction afin de limiter cette déprotection. Nous pourrons reprotéger les produits obtenus à partir de Fmoc-Cl dans les conditions décrites précédemment (Schéma 74).

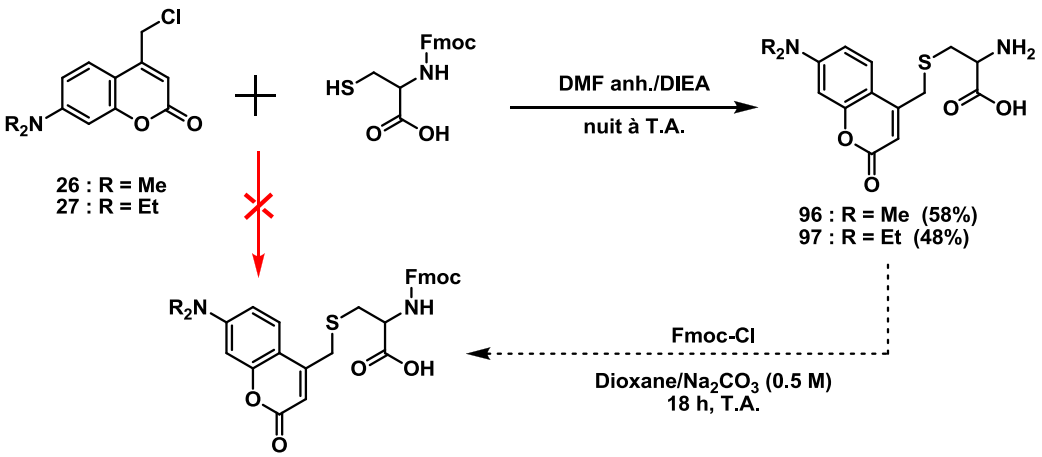


Schéma 74 : Synthèses de dérivés coumariniques couplés à la Cys, 96 et 97.

L'insertion de ces dérivés d'acides aminés par substitution nucléophile de nos fluorophores chlorés apparait comme une voie d'accès rapide et simple à mettre en place. Les substitutions nucléophiles par des fonctions amine primaire et carboxylate seront également une bonne voie d'accès à des molécules d'intérêts et seront réalisées. Il sera également intéressant de réaliser cette substitution nucléophile sur le fluorophore NBZ-Cl qui possède de bonne propriété de fluorescence.

IX.2.d Autres dérivés :

Cette série a été étendue à un dérivé coumarinique présent au laboratoire (**MPB75**) [301] portant sur sa position benzylique un groupement amino-acide que nous avons protégé par le groupement Fmoc, dans des conditions classiques de protection de l'amine par Fmoc avec un rendement de 25% (Schéma 75).

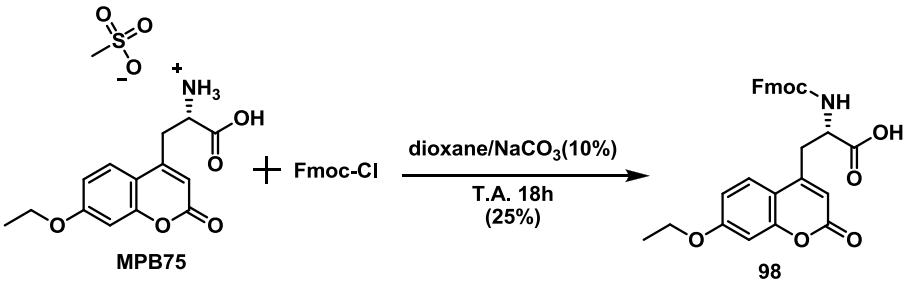


Schéma 75 : Synthèse du composé 98.

Ce type de composé porte uniquement une fonction amino-acide, ne possédant pas de chaine latérale, et se démarque de ce fait des précédents acides aminés étudiés. Ce composé nous permettra d'affiner les études autour de la structure minimale active.

Pour conclure cette étude nous avons synthétisé une coumarine ne présentant aucun acide aminé et possédant uniquement une protection Fmoc sur l'hydroxy benzylique, **99**. L'importance du groupement Fmoc dans les interactions avec notre cible ainsi que l'importance de la présence d'un acide aminé pourront ainsi être affinées. Pour accéder au composé **101** nous avons utilisé la dihydroxycoumarine, **32**. L'introduction du groupement Fmoc sur un alcool étant plus difficile et nécessitant des conditions drastiques comparé à la protection d'une amine, il est indispensable de protéger préalablement l'hydroxyle en position 7. Cette protection est réalisée avec du MOM-Cl (chloro-méthyl éther de méthyle) qui a été choisi pour sa sélectivité des

fonctions phénoles et pour sa déprotection aisée (en milieu CH_2Cl_2/TFA). Le groupement Fmoc est ensuite inséré sur l'alcool benzylique, du composé **99**, en présence d'un large excès de base (solvant : pyridine anhydre) conduisant à **100**, avec un rendement de 34% (Schéma 76).[302] Une fois purifié celui-ci est déprotégé, pour libérer la fonction phénol et obtenir le produit désiré, **101**.

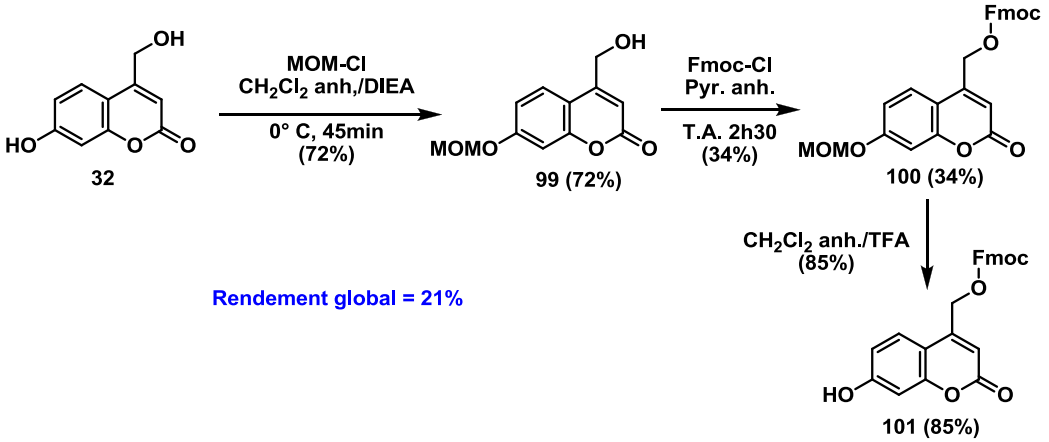


Schéma 76 : Synthèse de la Fmoc-coumarine, 101.

L'analyse biochimique de ces composés ainsi que les résultats obtenus lors des tests effectués sur les nombreux acides aminés protégés seront discutés plus en détail dans la partie biologie.

IX.3 Conclusion

Pour répondre à nos objectifs, nous avons réalisé la synthèse d'une vingtaine de composés permettant de réaliser l'ébauche d'une étude sur la structure minimale active et sur la relation structure activité vis-à-vis de notre cible. Au cours de ces synthèses nous avons modifié la taille, la nature et les protections des acides aminés insérés sur les fluorophores. Nous avons également synthétisé quelques composés se démarquant plus ou moins de la structure des acides aminés afin de déterminer l'importance de la présence d'un acide aminé sur l'influence de l'activité de ces composés sur la sialine. Nous avons également fait varier la nature des fluorophores et de leurs substituants afin d'analyser les conséquences de ces changements sur l'activité mais également sur les propriétés de fluorescence de ces composés. Cette série nous permettra de répondre à plusieurs problématiques et de pouvoir orienter de manière efficace les futures synthèses réalisées au sein du laboratoire. Nous analyserons les propriétés de fluorescence des composés synthétisés puis nous analyserons dans la partie biologique les différentes informations tirés des tests sur ces différents composés.

Chapitre 4 : Mesures des propriétés de fluorescence

X. Propriétés de fluorescence des composés

Dans ce chapitre nous détaillerons les propriétés de fluorescence des composés synthétisés pour l'étude sur VNUT et la sialine. Plusieurs paramètres apparaissent comme important, tels que le coefficient d'extinction molaire (ε), qui doit être le plus élevé possible et un rendement quantique (ΦF) élevé, proche de 1. En effet, la faible concentration des composés fluorescents utilisée lors des tests biologiques (en général 10^{-5} à 10^{-6} M) ne permettra pas ou très peu l'observation de la fluorescence si ceux-ci ont une faible probabilité d'absorption des photons reçus (faible ε) et une faible probabilité de réémission de photons absorbés par rapport aux photons reçus (faible ΦF).Les $\lambda_{ex/em}$ doivent être en adéquation avec les tests effectués. Si la longueur d'onde d'excitation est trop faible (≤300nm), les mesures de fluorescence risquent d'être biaisées par la fluorescence naturelle de certains acides aminés naturels ou de protéines (autofluorescence). De même il faut également que le ΔS (déplacement de Stoke) soit le plus grand possible afin de ne pas avoir de recouvrement entre le spectre d'excitation et d'émission, ce qui fausserait les résultats de fluorescence par réabsorption des photons.

Ces paramètres ont été mesurés et analysés. D'autres paramètres classiques, tels que le $t_{1/2}$ semble être des paramètres « moins importants » dans notre cas, car l'observation de l'accumulation de ces molécules fluorescentes (FFNs/FFSs) au niveau vésiculaire ou cellulaire est lente. En revanche, lors d'études de suivi en temps réel ce type de paramètre est très important.

Plusieurs autres paramètres, tels qu'une analyse en fonction du pH et des solvants ou encore une analyse de l'effet d'une excitation bi- ou multiphotonique pourront être réalisés sur les composés présentant un fort intérêt biologique. Nous allons décrire le calcul des paramètres avant de nous tourner vers l'analyse des propriétés des différentes familles de fluorophores utilisées.

X.1 Calculs des propriétés de fluorescence

Les propriétés photo-physiques des composés finaux ont été obtenues par différentes mesures réalisées sur plaque 96 puits Greiner et Nonchuk à l'aide d'un spectrofluorimètre Tecan (Safire). Ces mesures ont été effectuées en solution dans l'éthanol à 25 °C.

- *Longueurs d'onde et déplacement de Stokes*

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été mesurées en réalisant des spectres d'absorption, permettant de déterminer la longueur d'onde maximale d'émission. Celle-ci permet ensuite de définir la longueur d'onde maximale d'excitation. Le déplacement de Stokes (cm^{-1}) correspond à la différence de vecteurs (Δv) entre les maxima d'absorption et d'émission. Cette valeur peut être ramenée à la différence des inverses des longueurs d'onde d'absorption et d'émission (Équation 2). On corrige ensuite d'un facteur 10^7 pour ramener ces valeurs en cm^{-1}.

Équation 2 : Calcul du déplacement de Stokes ($\Delta\bar{\nu}$)

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = 1/\lambda_A - 1/\lambda_F$$

Nous rappelons que plus le recouvrement entre le spectre d'absorption et d'excitation est faible, plus la probabilité de réabsorption des photons émis est faible

➢ *Rendement quantique*

Le rendement quantique de fluorescence (Φ_F, sans unité, compris entre 0 et 1) correspond à la probabilité d'émission d'un photon après absorption d'un photon par la molécule. Le rendement quantique des différents composés finaux a été calculé en utilisant, comme référence, la quinine bisulfate dihydrate, qui absorbe à 310 nm et émet à 456 nm pour un rendement quantique de fluorescence Φ_F = 0.546 dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 M.[8] A l'aide de cette référence, on calcule via l'Équation 3 le rendement quantique.

Équation 3 : Calcul du rendement quantique de fluorescence

$$\Phi Comp = \Phi rèf + \left(\frac{DOref}{DOcomp}\right) + \left(\frac{Acomp}{Aréf}\right) + \left(\frac{\eta réf}{\eta comp}\right)$$

Le terme « ref » renvoie au composé de référence (ici la quinine bisulfate dihydrate), Φ correspond au rendement quantique de fluorescence, DO symbolise la densité optique de la référence et du composé étudié à la longueur d'onde d'excitation, ***A*** représente l'aire des courbes d'émission de la référence et du composé étudié. Enfin Les rendements quantiques sont corrigés en fonction de l'indice de réfraction (η) des solvants utilisés lors des mesures (ici, l'acide sulfurique 0.5 M pour la référence et l'éthanol pour les ligands étudiés).

➢ *Coefficient d'extinction molaire :*

Le coefficient d'extinction molaire correspond à la probabilité d'absorption de photons à une longueur d'onde d'excitation fixée. On calcule ce coefficient en se plaçant à la longueur d'onde maximum d'absorption, en réalisant ensuite des mesures d'absorbance à différentes concentrations. La loi de Beer-Lambert (Équation 4) n'est pas applicable lorsque l'on atteint un plateau (saturation) pour des concentrations trop élevé. Il convient de se placer sur la partie linéaire de la courbe. Avec l qui correspond à la hauteur de la surface traversée par le faisceau lumineux et qui varie en fonction du matériel utilisé (0.65 cm^{-1} dans notre cas).

Équation 4 : Loi de Beer-Lambert

$$A = \varepsilon . l . C$$

On trace ensuite sur la partie linéaire de la courbe de tendance : y = ax+b. Cette courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration (y en fonction de x), le coefficient directeur de la courbe (a) représente donc le facteur ε.l avec b correspondant à l'ordonnée à l'origine (voisin de 0, pour que les calculs soient valables) (Figure 62).

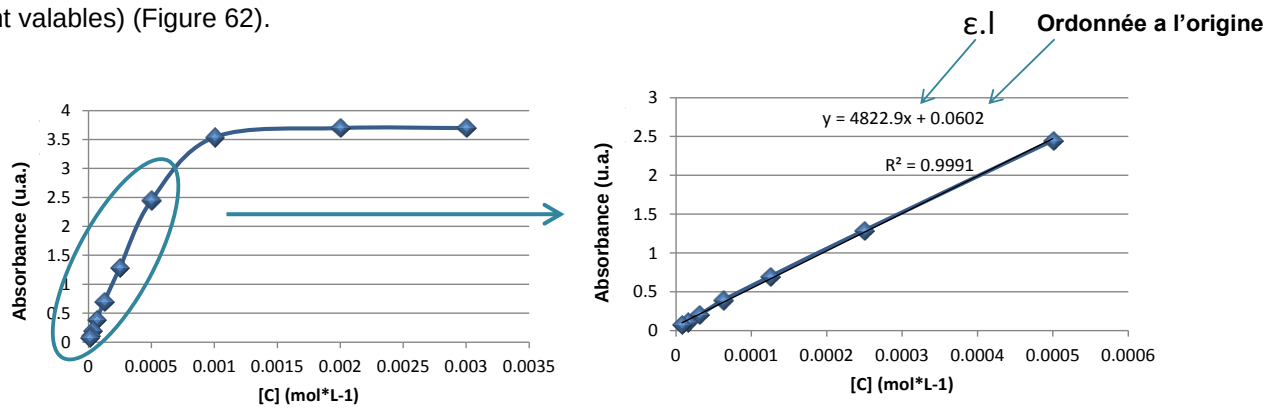


Figure 62 : Exemple de détermination du coefficient d'extinction molaire.

Le coefficient de détermination d'une courbe (R^2) est compris entre 0 et 1. Ce coefficient permet de juger de l'ajustement des points entre deux variables. Plus celui-ci est proche de 1 plus l'incertitude des données est faibles. Ainsi dans notre cas nous avons validé nos données lorsque R^2 était compris entre 0.999 et 1, dans le cas contraire de nouvelles mesures étaient effectuées.

- *Diagramme de Jablonski :*

Certains composés que nous allons étudier possèdent une seconde longueur d'onde d'excitation, qui provient des différentes transitions possibles entre les niveaux énergétiques S_1-S_0 lors du retour à l'état fondamental des molécules excitées, conduisant au phénomène de fluorescence. D'après le diagramme de Jablonski, il existe différents états vibrationnels pour chaque niveau énergétique induisant plusieurs possibilité transitions S_1-S_0 plus ou moins favorisées en fonction de leur énergie et de l'environnement (Figure 63).[8]

Figure 63 : Représentation de différentes transitions possibles entre S_1-S_0

Il est donc possible qu'une transition énergétique favorisée conduise à une seconde longueur d'onde d'excitation qui peut être plus ou moins proche de la première. La plupart du temps cet effet est négligeable et non observable, mais il arrive que ce phénomène soit plus marqué comme sur cet exemple où les deux longueurs d'onde sont séparées d'environ 125 nm.

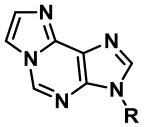
X.2 Résultats

A l'aide de ces méthodes nous avons déterminé les propriétés de fluorescence des composés finaux synthétisés précédemment. L'analyse de ces différentes propriétés de fluorescence nous permettrons de déterminer les fluorophores les plus adaptés dans le cadre de futures études physiologiques par fluorescence. Nous allons revenir sur les différentes familles de fluorophores qui ont été sélectionnées pour cette étude et analyser l'effet des différentes modifications apportées.

X.2.a Motif éthéno

Il était intéressant d'évaluer l'influence des différents groupements portés par l'azote *N*-3. Nous avons étudié les propriétés de fluorescence du cyle éthéno non-alkylés puis analysé l'influence de l'alkylation de la position NH du motif éthéno (Tableau 13).

Tableau 13 : Propriétés de fluorescence des dérivés éthéno et leurs propriétés de fluorescences.



Composés	R	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
7	H	295	399	8836	0,161	1,34E+04
10	$CH_2CH_2CO_2H$	295	399	8836	0,14	9,80E+03
14	Ribose	295	399	8836	0,105	5,65E+03
13	D-Glucitol	295	399	8836	0,0541	3,86E+03
15	Désoxyribose	295	399	8836	0,0463	7,67E+03

L'alkylation de ce motif éthéno par une chaîne alkyle portant un acide carboxylique, **10**, ne modifie que légérement les propriétés de fluorescence de ce tricycle, contrairement à l'introduction de ribose ou de dérivés (**13, 14** et **15**) qui font chuter le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire. En revanche, on n'observe aucune modification des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Les propriétés de fluorescence du motif éthéno ne sont pas en adéquation avec le développement de test par fluorescence. En effet, la longueur d'onde d'excitation maximum se situe à 295 nm et donc dans la même zone d'excitation que les molécules biologiques naturellement fluorescentes (tryptophane, tyrosine). Néanmoins, l'introduction de substituant sur le cycle éthéno permet de déplacer légèrement ces longueurs d'onde.

X.2.b Motif coumarine

Nous allons étudier les effets sur les propriétés de fluorescence des différentes modifications réalisées sur les positions 4 et 7 de ce motif.

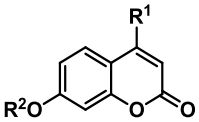
X.2.b.i Modification de la position 7 :

Afin d'obtenir des informations cohérentes nous ne comparerons, entre eux, que les composés ayant le même substituant sur la position 4. Nous allons étudier dans un premier temps les différences entre les dérivés de 7-hydroxycoumarines et de 7-alkoxycoumarines avant de nous intéresser aux différences entre les dérivés hydroxy- et amino-coumarine.

- *Hydroxy Vs. alkoxycoumarine*

Les structures les plus simples disponibles dans le commerce, les 7-hydroxy- et 7-méthoxycoumarines, nous fournissent les premières informations de l'alkylation de l'hydroxyle en position 7 (Tableau 14).

Tableau 14 : Propriétés de fluorescence des dérivés de 7-hydroxycoumarine



Composés	R^1	R^2	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
commercial	H	H	324	392	5354	0,16	1,85E+04
commercial	H	Me	321	384	5111	0,054	//
93	CH_2S-R'	H	328	399	5425	0,0922	5,96E+03
95	CH_2S-R'	Me	324	396	5612	0,0428	8,57E+03
34-a	H	CH_2CH_2OH	320	392	5740	0,0325	1,25E+04
35-a	Me	CH_2CH_2OH	318	388	5673	0,0308	1,29E+04
68	H	Ribose	316	384	5604	0,0295	4,77E+03
69	Me	Ribose	315	386	5839	0,0261	7,40E+03

En comparant les deux dérivés de coumarines commerciaux et les composés synthétiques **34-a** et **68,** on observe que l'alkylation de l'hydroxyle en position 7 conduit à un léger effet hypsochrome, qui correspond à une diminution des longueurs d'onde d'excitation et d'émission et donc un déplacement vers le bleu (vers l'UV) de celles-ci. La différence du déplacement de Stokes est négligeable, en revanche, on observe une forte diminution du rendement quantique. Ces différences observées sur ces dérivés sont similaires avec les mesures réalisées sur les composés **93** et **95**. De manière générale l'akylation de l'hydroxyle en position 7 conduit à une forte diminution du rendement quantique, à un faible effet hypsochrome et à une augmentation du coefficient d'extinction molaire.

On observe également une différence des propriétés de fluorescence en fonction des alkyles introduits. L'allongement de la chaîne alkyle portant des fonctions polaires, tel que sur les composés **34-a** et **68** alkylés respectivement par une chaine éthanol et un ribose, conduit à une diminution du rendement quantique et à de très légère variations des longueurs d'onde d'émission et d'excitation.

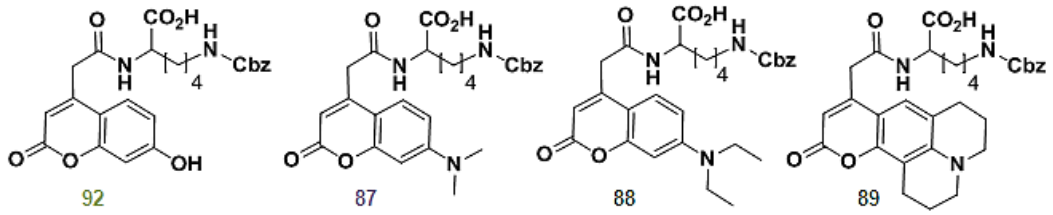
Un léger effet électronique inductif donneur (méthyle en position 4), n'a que très peu d'influence sur les longueurs d'onde d'excitation et d'émission et conduit à une faible augmentation du coefficient d'extinction molaire (**34-a**/**35-a** et **68**/**69**).

Toutes les coumarines alkoxy synthétisées possèdent des rendements quantiques de fluorescence inférieure à 0.05 (hormis l'éthoxycoumarine, **98**) ce qui n'en fait pas des fluorophores adaptées à des études physiologiques par fluorescence. La fluorescence de ce type de composé est dite éteinte. Comme nous l'avons observé les effets de l'alkylation en position 4 (méthyl par rapport à un hydrogène) sont négligeables sur les propriétés de fluorescence, contrairement à l'alkylation de l'hydroxyle en position 7.

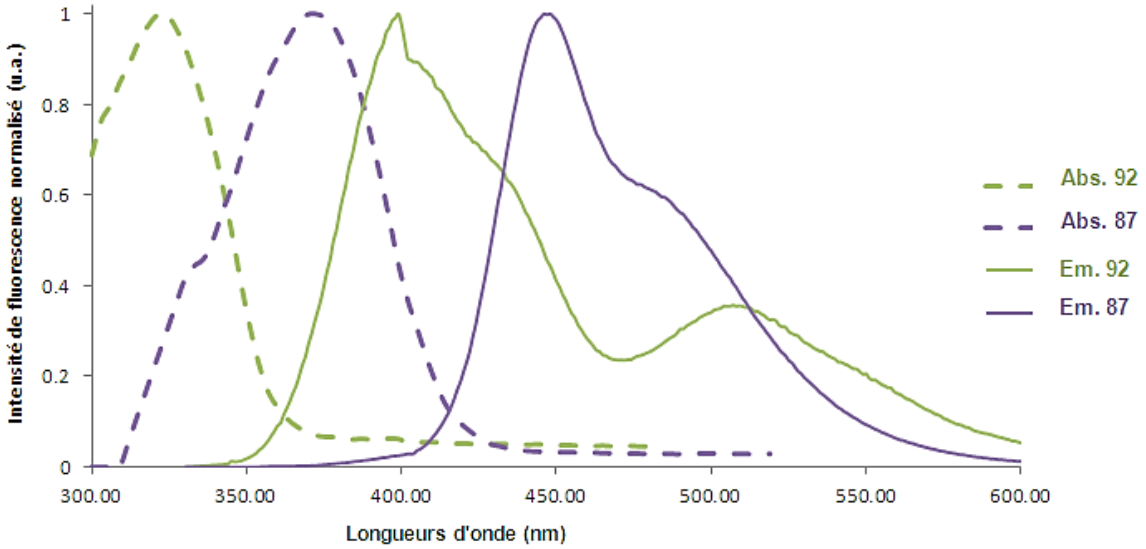
- *7-hydroxycoumarine Vs. 7-aminocoumarine*

Nous allons comparer dans un premier temps, les propriétés de fluorescence de 7-hydroxy et 7-amino coumarine avant d'analyser l'influence des différents groupements amino introduits. Les dérivés de 7-amino coumarine sont connus pour possèder de bonnes propriétés de fluorescence, ce que nous avons pu vérifier au cours de ce travail. En effet, en comparant deux composés possédant exactement le même groupement en position 4, tel que **87** et **92**, il est possible d'observer les grandes différences de fluorescence entre hydroxycoumarine et aminocoumarine (Tableau 15).

Tableau 15 : Représentation des spectres d'excitation et d'émission des composés 87, 88, 89 et 92.



Composés	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
92	324	399	5802	0,0904	9,88E+03
87	373	448	4488	0,714	1,68E+04
88	379	446	3964	0,749	1,86E+04
89	395	487	4783	0,736	8,87E+03



En comparant les spectres de fluorescence des composés, **87** et **92**, on observe un effet bathochrome lors du remplacement du groupement hydroxyle en position 7 par un groupement diméthylamino. Le déplacement de Stokes diminue nettement, néanmoins comme on peut l'observer sur le graphique, il y a un très faible recouvrement entre le spectre d'excitation et d'émission du composé **87**. Le très faible recouvrement ne ne devrait pas permettre aux photons émis d'être réabsorbés par la molécule ce qui limitera la perte de fluorescence liée à ce phénomène. Le dérivé 7-diméthylaminocoumarine, possède également un rendement quantique 8 fois supérieur à celui de l'hydroxycoumarine, ainsi qu'un ε presque doublé.

Afin, d'étudier l'influence des chaines alkyles portés par l'amine en position 7 de la coumarine sur ses propriétés de fluorescence, nous avons comparé les dérivés diméthyl-, diéthyl- et anthracéne-aminocoumarine, **87**, **88** et **89**. On observe des propriétés spectrales assez similaires entre les composés N-diméthyl et N-diéthyl, toutefois il est important de noter la faible augmentation du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire lorsque l'on allonge d'un carbone la chaine alkyle porté par l'amine en position 7. Encore une fois la diminution du déplacement de Stokes n'affectera pas l'intensité de fluorescence du fait du faible recouvrement entre le spectre d'excitation et celui d'émission. En revanche, lorsque l'on compare ces deux composés avec celui possédant un motif anthracène, **89**. On observe un effet hypsochrome non négligeable, avec une augmentation de 20nm de la longueur d'onde d'excitation et de 40 nm de la longueur d'onde d'émission. Le rendement quantique de ce composé est proche de ceux observés pour les 2 autres aminocoumarines, en revanche, on observe une forte diminution du coefficient d'extinction molaire. Cette diminution peut sûrement

s'expliquer par la substitution sur les positions 6 et 8 de la coumarine par les chaines alhyl du groupement anthracène qui conduirait à modification de la planéité de la structure.

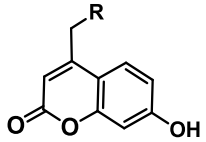
X.2.b.ii Etude de la position 4 :

Pour étudier cette position, il conviendra, comme dans le cas de l'étude de la position 7, de comparer des composés possédant des groupements identiques sur la position 7. Nous avons vu précédemment que la présence d'un groupement méthyle, ayant un effet électronique légèrement mésomère donneur, en position 4 (à la place d'un hydrogène) n'avait que très peu d'influence sur la fluorescence des coumarines, **93** et **95**. Cette analyse permettra la comparaison des propriétés de fluorescence entre des dérivés portant différents groupements sur la position 4 et permettra également l'analyse de l'influence des différentes méthodes de couplages (peptidique, substitution nucléophile…) qui ont été réalisés sur ce motif coumarinique.

Comme nous l'avons observé dans l'étude de la position 7 des coumarines, la substitution, par différents groupements, directement sur le motif coumarine fait énormément varier ses propriétés de fluorescence. Pour nous prémunir de ces changements, en général indésirables nous avons introduit nos synthons d'intérêt en position benzylique. Les groupements introduits, sont tous inductifs attracteurs, mais leurs effets électroniques sur les propriétés de fluorescence sont limités du fait de la position benzylique de ces substituants. Deux motifs coumariniques ont été plus particulièrement étudiés pour observer l'influence de substituion sur la position 4, les dérivés de 7-hydroxycoumarine et les dérivés de 7-diméthylaminocoumarine. Dans les deux cas, nous avons pris comme référence le dérivé commercial de ces coumarines substitué en position 4 par un méthyle, légèrement inductif donneur et induisant une légère augmentation du coefficient d'extinction molaire. Ainsi 7 dérivés de la 7-hydroxycoumarine ont pu être comparés à sa référence (Tableau 16).

Le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire diminuent comparé à la référence (possédant un groupement inductif donneur). Seules les longueurs d'onde d'émission sont toutes légèrement déplacées vers le rouge (effet bathochrome) ce qui permet d'augmenter légèrement le déplacement de Stokes. Le paramètre de fluorescence le plus impacté par l'effet inductif attracteur de ces groupements est le coefficient d'extinction molaire qui ont été classés par ordre de décroissance dans le tableau. Ainsi on peut définir un ordre d'électroatractivité des différents groupements en position benzylique en fonction des ε mesurés : OR >Cl>NH-R>SR. Ces données semblent être en adéquation avec les électronégativités des différents atomes : O (3.44)>Cl(3.16)>N(3.04)>S(2.58). Plus le groupement est électronégatif plus le ε est haut. Néanmoins, ces résultats sont à nuancer pour les composés **101** et **93**, dont les porpriétés de fluorescences semblent également impactées par la présence du groupement Fmoc.

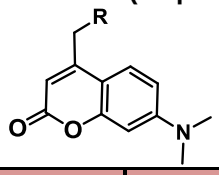
Tableau 16 : Propriétés de fluorescence de dérivés, en position 4, de la 7-hydroxycoumarine.



Composé	R	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
Commerciale	H	324	392	5354	0.16	1.85E+04
32	OH	320	396	5997	0.113	1.70E+04
84	OCO_2-Lys(Cbz)-OH	324	395	5548	0.12	1.12E+04
17	Cl	328	399	5425	0.134	1.06E+04
92	CONH-Lys(Cbz)-OH	324	399	5802	0.0904	9.88E+03
30	NH-$(CH_2)_2$-OH	321	399	6090	0.123	7.67E+03
93	S-Fmoc-Cys-OH	328	399	5425	0.0922	5.96E+03
101	OCO_2-Fmoc	324	399	5802	0.134	4.76E+03

Nous avons étudiée, dans un second temps, les dérivés de 7-diméthylaminocoumarine. Comme précédemment les propriétés de fluorescence ont été comparées avec la référence possédant un méthyle en position 4 (Tableau 17).

Tableau 17 : Propriétés de fluorescence de dérivés (en position 4) de la 7-diméthylaminocoumarine.



Composés	R	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
Commerciale	H	377	448	4204	0,65	2,43E+04
23	CO_2H	373	443	4236	0,677	2,33E+04
91	CONH-Fmoc-Lys-OH	373	447	4438	0,599	1,76E+04
87	CONH-Lys(Cbz)-OH	373	443	4236	0,714	1,68E+04
26	Cl	380	451	4143	0,664	1,47E+04
96	S-Cys-OH	380	451	4143	0,592	1,44E+04

Contrairement aux dérivés de 7-hydroxycoumarine choisis les variations de rendements quantiques sont moins importantes. Hormis le composé **23**, les coefficients d'extinction molaire diminue de manière importante en remplaçant un groupement possédant un effet inductif donneur par des groupements possédant des groupements inductifs attracteurs (comme pour les dérivés de 7-hydroxycoumarine). Contrairement aux observations précédantes, il est difficile de corréler electronégativité et ε (Composés **96** et 7-diméthylaminocoumarine).

En comparant les composés **87** et **91**, substitués en position benzylique par une lysine on peut observer l'effet du groupement protecteur de la lysine présent sur la position 4. La présence du groupement Fmoc, **91**, fait diminuer le rendement quantique et augmenter le coefficient d'extinction molaire par rapport au composé portant un groupement Cbz, **87**. De manière logique, sur le composé **91**, la probabilité d'absorption de photon reçu (ε) est augmenté, tandis que la probabilité de réémission (Φ_F) diminue car le groupement Fmoc (plus volumineux) peut absorber des photons qui ne seront pas réemis dans la même zone que ceux absorbés par la coumarine d'où l'observation d'une diminution du rendement quantique (photons émis/photons absorbé).

De manière générale on peut conclure que l'introduction d'un groupement inductif attracteur en postion 4-benzylique des coumarines diminue de manière assez importante le coefficient d'extinction molaire. L'impact de

ces groupements sur les propriétés de fluorescence varie en fonction des coumarines utilisées. Néanmoins le groupement thioéther agit de la manière sur les différents dérivés de coumarine, en diminuant de manière non négligeable le rendement quantique et le coefficient d'extinction moalire ainsi qu'en ayant un effet hypsochrome sur les longueurs d'onde.

- *Bilan*

Grâce à ces nombreuses coumarines synthétisées nous avons pu mettre en évidence différents facteurs influençants les propriétés de fluorescence. Ainsi, nous avons pu déterminer les substituants en position 7 (hydroxy, alkoxy, aminoalkyle…) conduisant aux meilleures propriétés de fluorescence, en l'occurrence le diéthylamino. Nous avons également pu évaluer l'influence de la position et de la nature des différentes liaisons des synthons d'intérêts sur les fluorophores. Il apparaît que le couplage en position benzylique, conduit à la plus faible variation des propriétés de fluorescence et qui se révèle donc être le plus adéquate à l'élaboration de molécules d'intérêt.

X.2.c Motif quinolinone

Dans ce sous-chapitre nous étudierons l'influence de l'introduction du ribose ou d'acide aminé sur ces différentes quinolinones ainsi que la position sur lesquelles ces motifs ont été introduits.

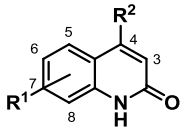
- *Influence du ribose en positions 4, 6 et 7 :*

Dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotide nous avons introduit un motif ribose pour synthétiser des mimes de nucléotides fluorescents. Comme cela a été le cas sur les coumarines, on remarque qu'une alkylation (par ce ribose) sur les différentes positions phénoliques des quinolinones modifie les propriétés de fluorescence de ces fluorophores (Tableau 18).

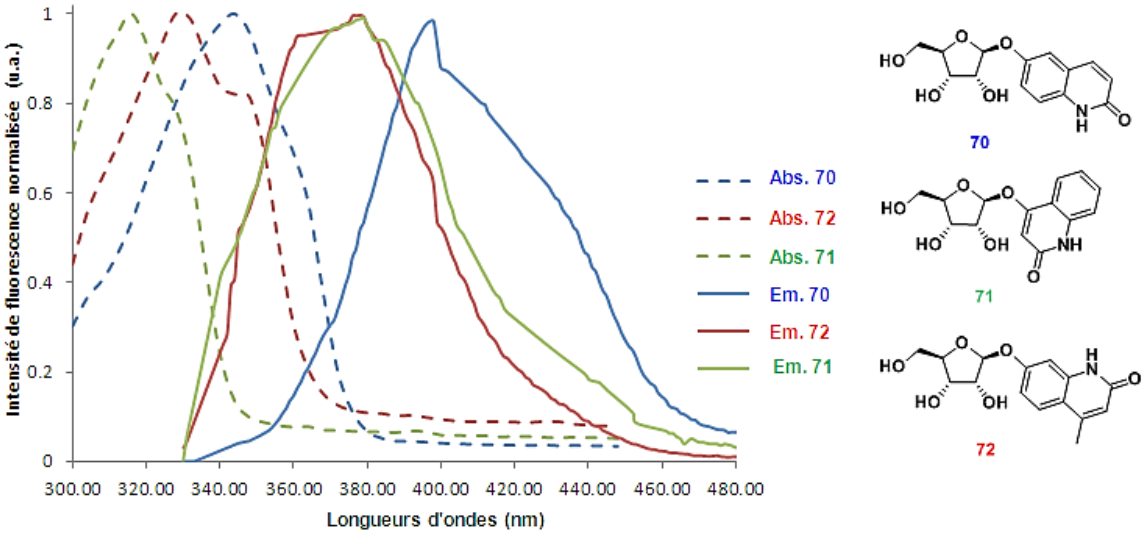
L'alkylation par un ribose de l'hydroxyle des quinolinones **37** et **39**, a peu d'effet sur le coefficient d'extinction molaire mais conduit à une forte diminution du rendement quantique et un effet hypsochrome, particulièrement sur le composé **70**.

A l'aide des différentes quinoléines couplées au motif ribose nous pouvons comparer l'influence de la position du ribose, position 7, 6 ou 4, **70**, **71** et **72**. L'influence, sur le rendement quantique et le coefficient d'extinction molaire est négligeable, tandis que l'influence sur les longueurs d'onde d'absorption et d'émission est notable. La comparaison des spectres d'émission des trois composés montre un effet bathochrome pour la quinolinone substitué en position 6- (**70**) comparé aux quinolinones substituées en position 4 et 7 (**71** et **72**). On peut également noter une différence de déplacement de Stokes entre ces trois molécules, néanmoins le composé **72** est le seul qui possède un recouvrement non-négligeable entre le spectre d'absorption et le spectre d'émission, diminuant ainsi l'intensité de fluorescence.

Tableau 18 : Structures et propriétés de fluorescences de différentes quinolinone alkylés ou non.

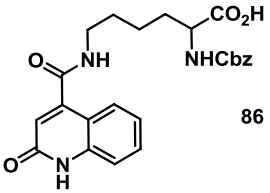


Composés	R^1	R^2	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
39	6-OH	H	355	417	4188	0,0467	7,06E+03
70	6-ribose	H	344	399	4007	0,0099	8,33E+03
37	7-OH	Me	328	379	4103	0,0435	9,27E+03
72	7-ribose	Me	321	379	4767	0,0157	7,94E+03
71	H	ribose	316	380	5330	0,0224	9,00E+03



On retrouve les mêmes conclusions si l'on compare la quinolinone **86**, sur laquelle a été introduit, par couplage peptidique, une lysine sur la position 4-caroxylique acide (Tableau 19).

Tableau 19 : Propriétés de fluorescence de la 4-carboxyquinolinone acide et du composé 86.



Composés	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
4-acid quinolinone (comm)	330	441	7627	0,12	1,24E+04
86	332	434	7079	0,0101	1,67E+04

L'augmentation du coefficient d'extinction molaire peut être expliquée par la présence sur le composé couplé d'un autre cycle aromatique (Cbz) ce qui fait augmenter la probabilité d'absorption des photons reçus mais ce qui implique également une diminution du rendement quantique.

Les propriétés de fluorescence des composés non couplés n'étant déjà pas optimalles pour une utilisation biologique leurs dérivés alkylés ou couplés seront difficilement utilisables pour la conception et la réalisation de tests par fluorescence. Néanmoins nous avons évalué d'autres paramètres pour déterminer l'influence de la position de ce couplage sur les propriétés de fluorescence.

➢ *Bilan*

A l'instar des coumarines l'alkylation de la position phénolique en directe des quinolinones fait chuter leurs propriétés de fluorescence. Nous avons également observé que toutes les quinolinones synthétisées possèdent des rendements quantiques trop faibles pour être adaptables à des tests biologiques. Pour palier ces mauvaises propriétés de fluorescence il faudrait développer, comme pour les coumarines, des quinolinones pouvant être fonctionnalisées par des molécules d'intérêt via un espaceur (par exemple méthylénique). Il sera également intéressant d'utiliser les différents motifs quinoléiques présent au laboratoire qui sont polyfonctionnalisés et devraient donc être moins influencés par l'insertion, sur ces motifs, de molécules d'intérêts. Ces quinoléines possèdent des propriétés de fluorescence correctes mais la possibilité d'exciter ces molécule par deux photons, pourrait être un atout non-négligeable lors de tests biologiques par fluorescence.[181]

X.2.d Motif résorufine

La résorufine (Figure 64) possède de bonnes propriétés de fluorescence, avec un rendement quantique voisin de 0.6 et un coefficient d'extinction molaire important (78000 cm-1).[303]

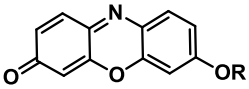


Figure 64 : Structure générale de la résorufine

En revanche, ce composé a un très faible déplacement de Stokes dû aux valeurs très proches des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ce problème peut néanmoins être contourné car la résorufine possède une seconde longueur d'excitation à 493 nm qui permet d'obtenir un déplacement de Stokes bien meilleur (de l'ordre de 3500 cm-1) avec un faible recouvrement de spectre. Nous avons comparé ces données avec le composé **73** alkylé sur la position phénolique par un ribose (Tableau 20).

Tableau 20 : Propriétés de fluorescence de la résorufine commerciale et du composé 73.

Composés	R	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
commercial	H	578	593	438	≈ 0.6	7,80E+04
73	Ribose	572	587	447	0,177	1,94E+04

Comme pour l'étude de fluorescence relative aux coumarines, l'alkylation sur la position phénolique conduit à une forte diminution du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire. En revanche le composé **73**, conserve des propriétés de fluorescence pouvant être adaptées aux exigences de tests par fluorescence.

X.2.e Motif xanthène

Nous avons poursuivi avec l'analyse des propriétés de fluorescence du motif xanthène (Figure 65). Nous avons analysé l'influence du couplage d'une lysine protégée sur la succinylfluorescéine. Comme nous l'avons présenté précédemment la succinylfluorescéine, composé **45**, possède différentes formes tautomères en solution, dans lesquelles l'acide carboxylique est impliqué.

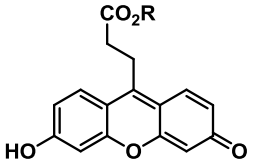


Figure 65 : Structure générale du xanthène étudié

L'observation des propriétés de fluorescence calculées nous indique que ce couplage n'a que peu d'influence sur les longueurs d'onde d'excitation et d'émission (donc du déplacement de Stokes) (Tableau 21).

Tableau 21 : Propriétés de fluorescence du composé 45 et du composé 85.

Composés	R	λabs (nm)	λem (nm)	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
45	H	455	512	2447	0,361	1,04E+04
85	Lys(Cbz)-OH	455	516	2598	0,243	5,14E+03

En revanche, on observe une baisse du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire, plus élevée que celle observée lors du couplage de la lysine sur les coumarines, nous pouvons imputer une partie de cette diminution à l'inhibition d'une partie de la tautomérie de ces motifs qui est impossible après le couplage (Schéma 77).

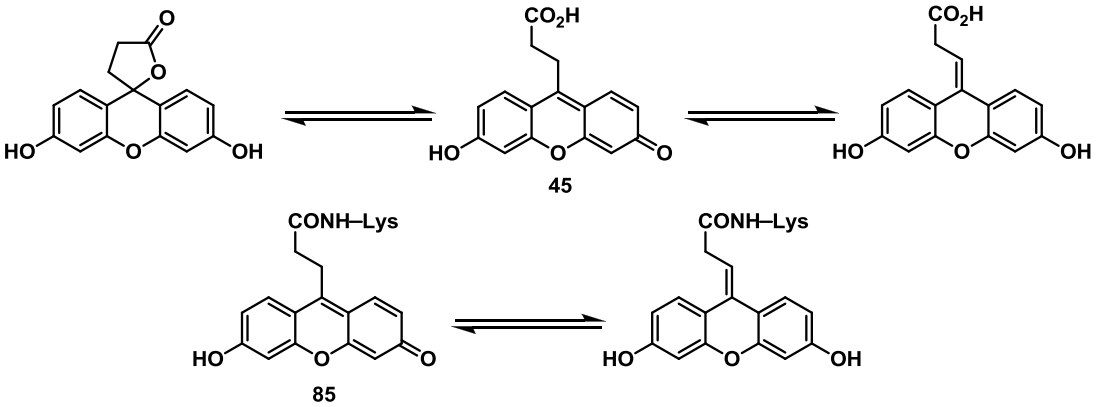


Schéma 77 : Représentation des différentes formes tautomères pour les composés 45 et 85.

X.3 Conclusion

L'objectif de la synthèse de ces différentes familles de fluorophores était avant tout de couvrir une large gamme de longueurs d'onde d'excitation et d'émission afin de pouvoir nous adapter aux différentes analyses biologiques par fluorescence. En fonction du matériel utilisé (cellules, granules, lysosomes reconstitués…), il sera plus ou moins important de possèder des longueurs d'onde d'excitation et d'émission élevées pour limiter les phénomènes parasites d'autofluorescence du matériel biologique. Grâce aux différentes familles de fluorophores utilisées nous couvrons aujourd'hui une grande partie de la gamme de fluorescence (Figure 66).

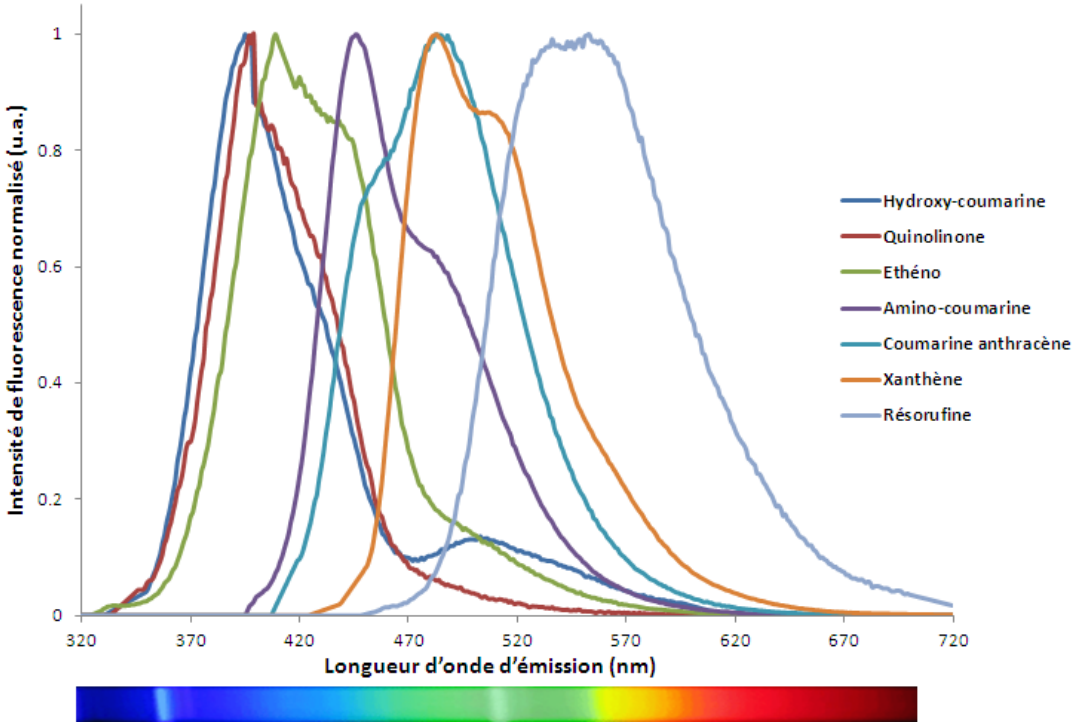


Figure 66 : Représentation des longueurs d'onde d'émission caractéristiques de chaque famille de fluorophores étudiés.

Un fluorophore est caractérisé par un bon rendement quantique (de préférence > 0.5) et un coefficient d'extinction molaire élevé (de préférence > 10000 cm^{-1}). Le couplage de synthons (ici un ribose dans la majorité des cas) en positions phénoliques des différentes familles conduit très généralement à une forte diminution du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire, il sera donc nécessaire dans le cas des composés « Fluo-ribose » d'envisager d'autres positon pour l'insertion du ribose, qui pourrait se faire suivant le même cheminement que celui appliqué pour la synthèse des composés « Fluo-acide aminé » pour lesquels nous avons introduit l'acide aminé d'intérêt par couplage en position benzylique des fluorophores (dans la majorité des cas), évitant ainsi de grandes variations des propriétés de fluorescence.

De nombreuses modifications ont été réalisées et ont permi finalement d'obtenir des composés ayant des propriétés de fluorescence très intéressantes, en particulier pour les dérivés aminocoumarines. Ceux-ci possèdent un rendement quantique compris entre 0.6 et 0.75 et un coefficient d'extinction molaire > à 10000 cm^{1}. La resorufine et le xanthène possède également de bonnes propriétés physicochimiques, en ravanche moins de modifications structurales, permettant d'améliorer les propriétés de fluorescence ou d'envisager d'autres méthodes de couplages, sont envisageables sur ces motifs. Il sera intéressant de poursuivre le travail effectué au sein du laboratoire sur les motifs quinolinone et quinoléique, en introduisant les synthons d'intérêts

sur la position 4 benzylique pour ne pas faire varier les propriétés de fluorescence et en faisant varier les substituants en position 7 pour améliorer ces propriétés (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

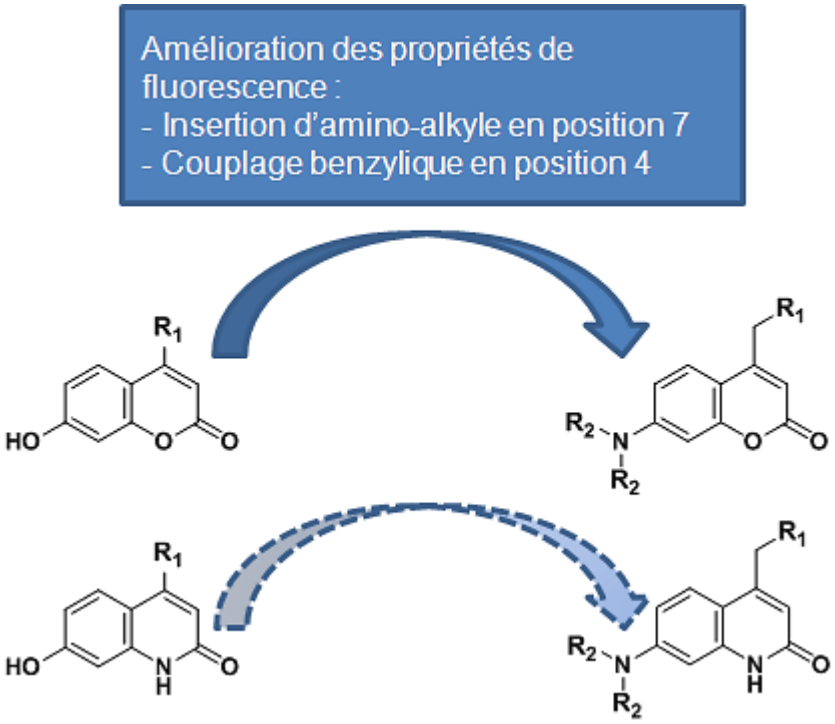


Figure 67 : Perspective d'amélioration des propriétés de fluorescences du motif quinolinone.

Il sera également intéressant de poursuivre le développement de sondes fluorescentes dépendantes du pH et de réaliser des mesures de fluorescence en fonction du pH pour permettre le développement de tests biologiques par fluorescence et dépendant du pH. Cette caractéristique pourrait dans notre cas prendre tout son sens, car il existe de grande différence de pH entre les 2 milieux entourant les transporteurs étudiés. Le développement de sondes fluorescentes ayant une fluorescence éteinte en milieux acide et normale en milieu physiologique (ou inversement) permettrait d'effectuer des tests rapides et faciles de mesures d'inhibition et surtout de transport par mesure directe de la fluorescence.

Certains composés ont des propriétés de fluorescence inadaptées à des tests biologiques par fluorescence, néanmoins les nouvelles méthodes d'imagerie par fluorescence et plus particulièrement les méthodes utilisant des excitations bi/multiphotoniques permettent de corriger ce paramètre. De plus, ces composés permettront de valider le concept de l'introduction de molécules fluorescentes pour la conception de FFS ou FFN. Ces composés permettront également de réaliser des études plus conventionnelles, telles que la détermination de la structure minimale active par des études de relation entre la structure et l'activité. Ces différentes analyses biologiques seront discutées par la suite.

Chapitre 5 : Evaluations biologiques

Nous avons réalisé la synthèse de composés fluorescents afin étudier et d'apporter une contribution à l'élucidation des mécanismes biologiques des transporteurs appartenant aux SLC17, par le biais de faux substrats fluorescents ou faux neurotransmetteurs fluorescents (FFN). Ces molécules pourront permettre d'obtenir de plus amples informations sur ces protéines transmembranaires qui sont difficilement isolables, purifiables et cristallisables. Le développement de molécules très affines pourrait aider à la cocristalisation de ces protéines et donc permettre une étude des interactions moléculaires clés dans le mécanisme de transport qui n'est pas élucidé à ce jour.

Dans le cadre de cette étude nous souhaitons obtenir des substrats de transporteurs afin de pouvoir suivre en temps réel le cheminement et les mécanismes ou l'activité de transport de ces molécules. Des tests de transport étant plus difficile à mettre en œuvre que des tests d'inhibition nous avons débuté notre étude biologiques par des mesures d'inhibition qui nous fournirons des informations importantes, telles que l'affinité des composés pour la cible étudiée. Les tests biologiques sont réalisés par mesure de transport (recapture) de substrat radiomarqué ou fluorescent. Le pourcentage de transport résiduel des substrats est déterminé et permet de calculer des CI_{50}. Néanmoins, des tests d'inhibition sur les transporteurs ne permettent pas de définir si les molécules testés sont substrats. En effet, les molécules peuvent remplacer les substrats naturels (meilleur affinité) et être transportées à leur place inhibant ainsi la recapture de substrat naturel ou simplement se fixer et empêcher le fonctionnement du transporteur.

Une fois ces mesures d'inhibitions réalisées nous pourrons pour les meilleurs composés réaliser des tests de transport. Si ces composés sont bien transportés nous pourrons réaliser par la suite des tests physiologiques plus complexes par mesure de fluorescence ou envisager de développer des tests biologiques par fluorescence à l'aide de ces FFS/FFN (Figure 68).

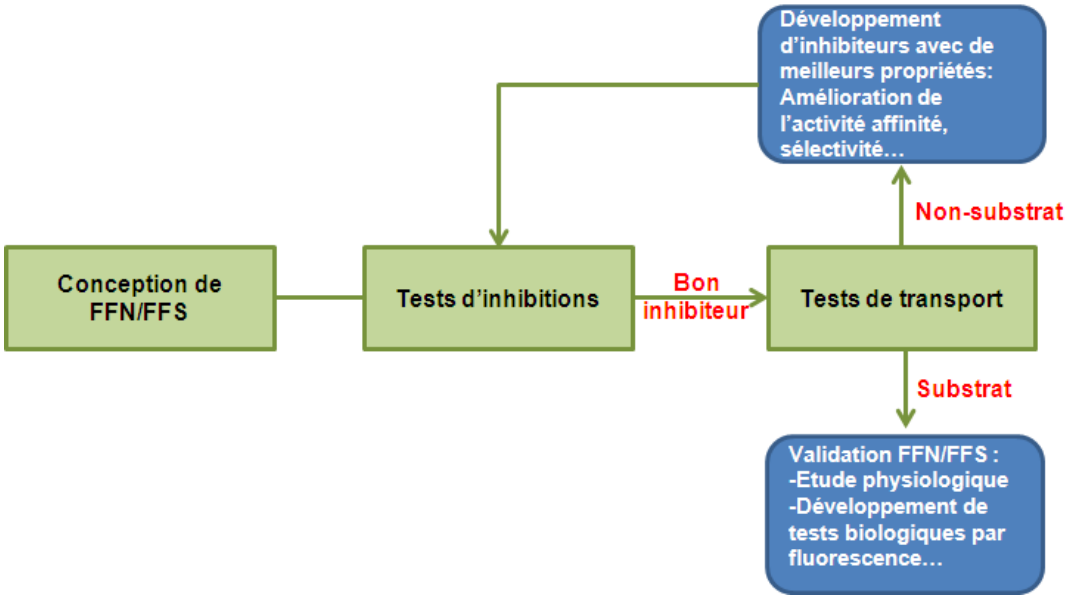


Figure 68 : Stratégie biologique appliquée aux potentiel FFN/FFS

Dans le cas où ces composés ne seraient pas transportés, il sera possible d'envisager à partir de ces structures le développement de meilleurs inhibiteurs par modification chimiques qui pourront être employés à des fins diverses.

L'affinité des composés pourra être déterminée par la relation de Cheng-Pursoff. Elle permet corréler les CI_{50} obtenues avec le K_i, ce qui nous permettra d'évaluer l'affinité des composés testés pour leurs cibles (Équation 5).

Équation 5 : Equation de Cheng-Pursoff

$$Ki = \frac{CI50}{1 + [S]/Km}$$

Le Ki est la constante d'affinité de l'inhibiteur pour sa cible, la CI_{50} est la concentration inhibitrice nécessaire pour réduire de 50% l'activité de la cible, [S] est la concentration du substrat et le K_m est la constante d'affinité du substrat naturel pour sa cible.

Nous discuterons, dans ce chapitre, des tests d'inhibition réalisées (mesure de recapture de substrats marqués) et des résultats obtenus sur les différents transporteurs étudiés, VNUT et la Sialine.

XI. Le transporteur vésiculaire de nucléotides : VNUT

VNUT a été identifié et caractérisé très récemment[95] sur des protéoliposome reconstitués. Les seules informations disponibles sur ce transporteur sont sa dépendance au ΔpH (intervention de V-ATPase) et au potentiel de membrane (ΔΨ), instauré principalement par les concentrations en ions inorganiques, K^+ et Cl^-, qui seraient indispensables pour une recapture efficace des nucléotides dans les vésicules pré-synaptiques. Ces études n'ayant été effectuées que sur des protéoliposomes reconstitués qui diffèrent des conditions physiologiques, ces résultats devront être confirmés. Le développement de nouveaux outils pharmacologiques fluorescents permettrait d'étendre les tests biochimiques sur VNUT à d'autres matériaux biologiques permettant ainsi de valider ou non ces données. Cela permettrait également d'évaluer VNUT en tant que cible thérapeutique.

Différents tests biochimiques ont été mis en place dans le cadre de l'étude de cette protéine. Trois matériaux pour réaliser ces tests sont aujourd'hui utilisés dans la littérature : les protéoliposomes reconstitués, les granules de chromaffine et les vésicules isolés de cerveau (synaptosomes).

Les protéolyposomes reconstitués ont permis l'identification et la caractérisation de VNUT.[95] Néanmoins, cette méthode s'éloigne de la « réalité » physiologique car il s'agit de créer des protéoliposomes ne contenant que les protéines souhaitées, éliminant de ce fait, de nombreux facteurs biologiques. De plus, devant la difficulté de mise en œuvre de cette méthode seule une autre équipe dans le monde a été en mesure de reproduire la reconstitution de protéoliposomes.

Les synaptosomes sont des vésicules isolées directement à partir du cortex et de l''hyppocampe de cerveau de souris. Les granules de chromaffines sont également des vésicules isolées mais sont extraite à partir de glande surrénales de bœuf. Ces deux matériaux sont assez similaires et ont déjà été utilisés dans différentes études qui ont permis de mettre en évidence un transport d'ATP, sans avoir pu identifier un transport exclusivement VNUT-dépendant. Nous avons décidé d'utiliser ces matériaux qui sont plus faciles d'accès et se rapprochent plus de la réalité physiologique en possédant à leur surface les nombreuses protéines présentent physiologiquement (Figure 69)

Figure 69 : Représentation simplifiée d'une vésicule isolée.[304]

XI.1 Mise en place des tests biologiques

Nous allons détailler les différents tests que nous avons mis au point par mesure de recapture d'ATP radiomarqué ou par mesure d'ATP fluorescent (ε-ATP). Les tests biologiques ont été mis en place par nos soins en collaboration avec l'équipe du Dr. Bruno Gasnier (UMR 8192, Université Paris Descartes). Ces tests sont réalisés sur deux types de matériel biologique : des granules de chromaffines de glandes surrénales de bœufs et des vésicules isolées de cerveau de rat.[305] Ces deux types de matériaux sont assez similaires et présentent à leurs surfaces de multiples protéines dont différents transporteurs parmi lesquels VNUT, VGLUT et VMAT.[304] L'intégrité du matériel biologique choisi a été confirmée par mesure de recapture de monoamine tritiée

(sérotonine tritiée) ou fluorescentes (FFN511) par VMAT2, qui sont des tests couramment utilisés par nos collaborateurs

XI.1.a Tests d'inhibition

➢ *Mise en place des tests radioactifs d'inhibitions*

Dans un premier temps nous avons réalisé des mesures de recapture d'ATP, en présence d'un marqueur radioactif (l'α^{33}P-ATP ou α^{33}P-GTP). Ce test permettra de mesurer l'inhibition de nos composés en quantifiant par radioactivité la recapture d'ATP ou de GTP marqué (Figure 68).

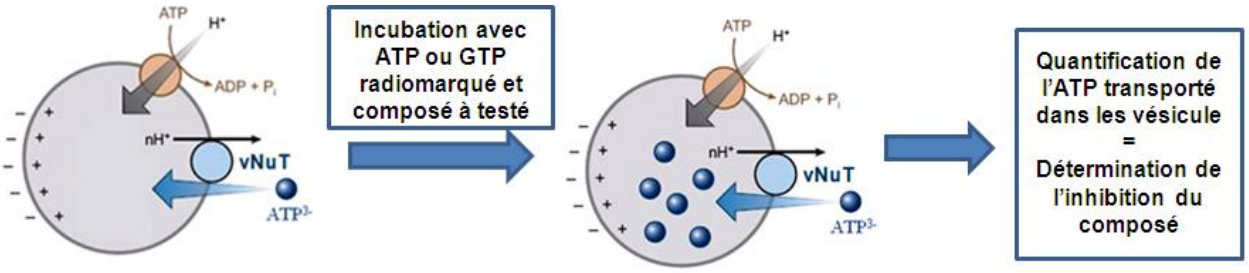


Figure 68 : Determination de l'inhibition par mesure de racpature de substrats marqués.

L'ATP étant une molécule ubiquitaire possédant de très nombreux sites d'interaction possibles (phosphatase, récepteur, kinase…), nous avons observé lors des premiers essais un bruit de fond très important, dû aux nombreux sites de fixation de l'ATP. Nous avons alors essayé de réduire ce bruit de fond important :

- La pompe V-ATPase, qui est un site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP, est indispensable au transport de nucléotides par instauration d'un gradient de protons Nous avons essayé de nous affranchir du gradient de pH en utilisant de la valinomycine, qui va servir de système de remplacement de la pompe V-ATPase qui instaure un gradient de proton. En effet, la valinomycine permet de créer des pores dans la membrane des granules, ce qui facilite et accélère la mise en place du gradient électrochimique, en imitant un système de pompe à potassium. L'utilisation de la valinomycine a permis d'améliorer la sensibilité de la détection des nucléotides radiomarqués mais cela n'était pas suffisant.
- Nous avons réalisés de nouvelles mesures en ajoutant au milieu de l'ADP, qui va limiter l'action des sites d'hydrolyse de l'ATP (par rétrocontrôle négatif) et qui est un substrat de VNUT.
- Nous avons également augmenté la proportion d'ATP par rapport au $MgSO_4$ présent dans le milieu jusqu'à 6/1 (généralement 2/1). L'ion magnésium va permettre une meilleure stabilisation de la partie triphosphate. On utilise du $MgSO_4$ et non du $MgCl_2$, car comme nous l'avons mentionné précédemment les ions chlorure agissent sur le gradient électrochimique qui a une grande influence sur VNUT.
- Enfin nous avons ajouté un système régénérateur d'ATP, limitant ainsi une trop grande perte d'ATP radiomarqué par les nombreuses hydrolases présentent dans le milieu.

De nombreux essais ont permis de limiter ces interférences et le bruit de fond. Néanmoins, malgré nos efforts nous n'avons pas pu mettre en évidence un transport reproductible de l'ATP à l'intérieur des granules par mesure de radioactivité.

Nous avons observé lors des essais réalisés le grand bruit de fond sur les granules généré par la présence de nombreux site de fixation de l'ATP. Nous avons alors envisagé de réaliser ces tests directement par mesure de fluorescence pour nous affranchir de la présence d'ATP en utilisant un analogue d'ATP fluorescent commercial : l'étheno-ATP)

- *Mise au point du test biologique par fluorescence*

Lors de la mise au point de ces tests, nous utiliserons en parallèle les deux types de matériels biologiques (granules et vésicules synaptiques) décrits auparavant, afin d'accentuer la validité de ce test par mesure de fluorescence.

Dans la littérature, il a été établi par des tests radioactifs que l'étheno-ATP était transporté à l'intérieur de matériel biologique similaire[143] alors même que VNUT n'avait pas été caractérisé. Il serait intéressant de pouvoir démontrer à l'aide de ce test que ce transport se fait bien via VNUT. L'étheno-ATP semblait donc un composé de choix pour mesurer la recapture de substrat fluorescent via VNUT. Pour nous affranchir de la présence d'ATP il convenait au préalable de vérifier que l'éthéno-ATP permettait d'activer la V-ATPase. Des travaux préliminaires ont donc été réalisés dans ce sens en utilisant le FFN511 comme substrat de VMAT2 qui est également dépendant de la pompe V-ATPase. Ainsi des tests de recapture de FFN511 par VMAT2 à l'intérieur des vésicules (ou synaptosomes) ont été réalisés et mesurés par fluorescence à la λem maximale du FFN511 qui correspond à 505 nm (avec une λex = 405 nm). Nous avons normalisé les valeurs de fluorescence obtenues pour les vésicules synaptiques et pour les granules de chromaffine afin de mieux visualiser et comparer les résultats obtenus. En effet, il nous était difficile de quantifier précisément la population de granules ou de vésicules synaptiques présente dans le matériel biologique utilisé, ce qui induisait des différences de mesures de fluorescence en fonction du matériel biologique utilisé. La recapture de FFN511 a été mesurée en présence d'ATP (témoin positif), seul (témoin négatif), d'ATP + DIDS (témoin négatif) et d'éthéno-ATP, sur les deux types de matériel biologique (Figure 69). En présence d'ATP on observe bien le transport du FFN511, comparé aux tests réalisés en présence FFN511 seul. Ces expériences avec uniquement du FFN511 nous permettent également d'observer le bruit de fond qui est dus aux liaisons non-spécifiques du FFN511 sur le matériel biologique. Pour confirmer que ce bruit de fond provenait bien de liaisons non-spécifiques nous avons réalisé d'autres expériences en présence d'ATP et d'acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS), qui est un inhibiteur des canaux anioniques, sans lesquels le chlore n'est plus transporté dans les vésicules, ce qui inhibe le gradient de potentiel, empêchant ainsi le transport de substrats. Ceci confirme qu'en présence d'ATP la recapture du FFN511 à l'intérieur des vésicules se fait bien via VMAT. Une fois ces témoins positif et négatif validés, nous avons reproduit ces expériences en présence de FFN511 et d'étheno-ATP. On observe une accumulation de FFN511 à l'intérieur des vésicules légèrement inférieure aux mesures observées avec de l'ATP. Ces différences sont plus nettes lorsque l'on utilise des vésicules reconstituées comparé aux synaptosomes pour lesquels ces différences sont presque négligeables. Malgré ces légères différences, dues sûrement à une moins bonne reconnaissance de l'étheno-ATP par la V-ATPase comparé à son substrat naturel (ATP), nous avons pu mettre en évidence que l'étheno-ATP permettait bien d'activer la V-ATPase. Une fois

cette hypothèse validée et après avoir démontré qu'il était possible de mesurer la recapture de substrat fluorescent, nous avons souhaité étudier le transport et l'accumulation de l'étheno-ATP dans les vésicules via le transporteur vésiculaire de nucléotides.

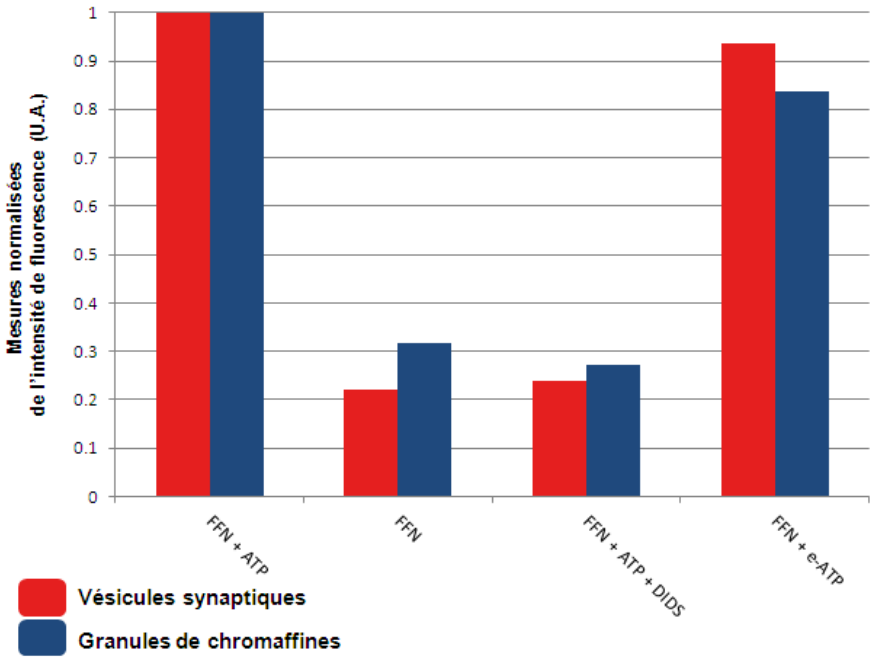


Figure 69 : Mesure de fluorescence du FFN511 via VMAT, en présence d'ATP, d'étheno-ATP et de DIDS. (*λem = 505 nm*) sur vésicules synaptiques et granules.

➢ *Résultats des tests*

Nous avons débuté le test avec de faible concentration en étheno-ATP et en présence d'ATP. Mais la compétition entre le transport d'ATP et d'étheno-ATP ne nous a pas permis d'obtenir des résultats concluants. Nous avons alors employé uniquement de l'étheno-ATP et avons déterminé la concentration adéquate pour les mesures en fluorescence, 5 mM équivalente à celle physiologique de l'ATP. Des tests réalisés en présence d'étheno-ATP et de DIDS nous ont servis de témoins négatisf et nous ont permis d'observer la recapture de l'étheno-ATP à l'intérieur des granules et des vésicules (Figure 70).

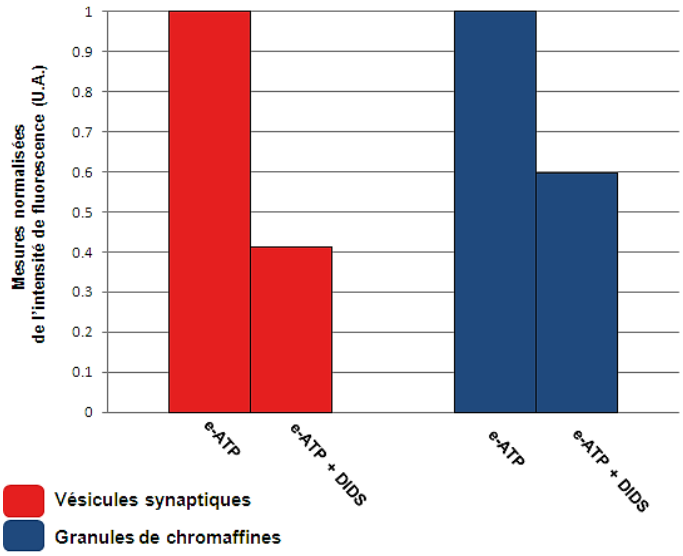


Figure 70 : Mesure du transport de l'éthéno-ATP par fluorescence (λem = 405 nm), en présence et en absence de DIDS.

A l'aide de ces premiers résultats nous avons confirmé que l'observation par fluorescence de la recapture de l'étheno-ATP était possible. Néanmoins on observe un bruit de fond plus important que lors des mesures de recapture de FFN511 réalisées précédemment. Il apparaît, d'après ces tests, que les synaptosomes (vésicules isolés à partir de cerveau de rat) semblent être un matériel biologique plus adéquat que les vésicules reconstituées, présentant moins de sites d'interactions secondaires pour l'étheno-ATP. En effet, le bruit de fond résiduel sur les synaptosomes est d'environ 40% contre 60% sur les vésicules reconstituées.

Ce test pourra être optimisé par la suite par ajout de valinomycine, d'ADP ou encore d'un système régénérateur d'ATP (système de phosphorylation) afin de diminuer les interactions secondaires possibles ou de régénérer l'éthéno-ATP consommé in-situ par la V-ATPase, comme cela a été réalisé lors des tests effectué par mesure de la recapture de substrats radioactifs.

Une fois optimisé, ce test pourrait permettre de déterminer l'affinité pour VNUT des différents composés fluorescents synthétisés en observant par fluorescence totale (aux longueurs d'onde de l'étheno-ATP et du composé testé) la quantité d'éthéno-ATP ou du composé d'intérêt accumulé dans la vésicule. Ainsi ce test pourra également nous permettre de déterminer si nos composés sont substrats (accumulés dans la vésicule) ou inhibiteurs (diminution de la recapture d'étheno-ATP). Ce type de test n'ayant pas d'équivalence dans la littérature, il sera indispensable d'effectuer de multiples mesures de recapture afin de confirmer chaque observation.

XI.2 Conclusion

Malgré ces premiers résultats encourageants, montrant que l'étheno ATP est capable d'activer la V-ATPase et qu'il apparaît être le premier FFN de VNUT, la finalisation de la mise au point de ce test n'a pas été réalisée. En effet, nous nous sommes heurtés à des difficultés au cours des synthèses visant à phosphoryler les différents dérivés nucléosidiques fluorescents mais également les concentrations importantes d'éthéno-ATP nécessaire à ce test (ayant un coût élevé), ainsi que les problèmes issus du matériel biologique utilisé : dégradation potentiel du matériel biologique (granules et vésicules) et de VNUT au cours du temps, présence

possible dans le milieu de nucléotidases (entrainant une faible reproductibililté) ne nous ont pas permis de finaliser la mise au point de ce test. Néanmoins la reprise des synthèses de phosphorylation qui sont en cours de développement pourrait relancer ce projet.

Afin de valoriser les dérivés nucléosidiques fluorescents (non-phosphorylés) synthétisés au cours de cette thèse, nous avons évalué ces composés sur les CNTs/ENTs qui interviennent dans le transport nucléosidique au niveau cellulaire et synaptique. Nous allons introduire brièvement les CNTs/ENTs avant de discuter des résultats obtenus.

XI.3 Valorisation des dérivés nucléosidiques : étude sur CNT/ENT

Devant les difficultés rencontrées tant sur le plan synthétique que sur le plan biologique, nous avons choisi, dans un premier temps, de valoriser les composés dérivé nucléosidiques fluorescent synthétisé. L'étude des transporteurs nucléosidiques ENT et CNT, qui interviennent tous deux dans le recyclage de nucléosides en nucléotides au niveau du système purinergique (ex : l'adénosine et dans sa régénération en AMP puis ATP, Figure 36). Dans une problématique similaire à celle développée pour la sialine et VNUT, nous avons souhaité évaluer nos composés, d'abord en tant qu'inhibiteurs puis comme substrats fluorescents. Des tests d'inhibition sur ces transporteurs ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Pastor-Anglada (Université de Barcelone, « Institute of Biomedicine and Oncology Programme, National Biomedical Research Institute of Liver and Gastrointestinal Diseases (CIBER EHD) ») qui est à l'origine de très nombreuses études concernant ces transporteurs.[306-309] Après une brève introduction sur la nature, la pharmacologie et l'intérêt de ces transporteurs, nous nous intéresserons aux tests d'inhibition réalisés sur cellules présentant ces différentes familles de transporteurs.

XI.3.a Généralités

Ces deux familles de transporteurs appartiennent à la superfamille MFS regroupant de très nombreux transporteurs. Elles appartiennent plus précisément à la famille des SLC (« solute carrier », présenté dans l'introduction), dans laquelle les « concentrative nucleoside transporters » (CNTs) forment la sous-famille des SLC28 et les « equilibrium nucleoside transporters » (ENTs) forment la sous-famille SLC29. Il existe trois sous-types de CNTs (CNT1-3) qui sont des co-transporteurs de nucléosides et de cations (ions sodium ou protons) [310] et qui comme leurs noms l'indiquent permettent l'accumulation de nucléoside au niveau cytosolique (intra-cellulaire). Quatre sous-types d'ENTs (ENT1-4) ont été décrit jusqu'alors et sont définis comme des transporteurs passifs de nucléoside (sans besoin d'énergie extérieur) qui ont pour rôle d'équilibrer les concentrations nucléosidiques cellulaires.

Ces différents sous-types sont tous présents au niveau des membranes plasmiques. Certains sous-types sont retrouvés au niveau des membranes mitochondriales (ENT1 et 3), lysosomales/endosomales (ENT3) ou encore nucléaire (ENT2). On retrouve les CNTs sur de nombreux types de tissus et même dans le cerveau (CNT2)(

Figure 71).[311]

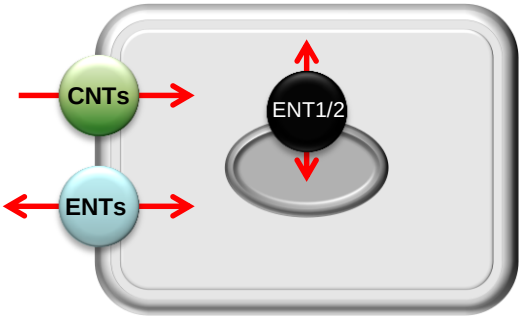


Figure 71 : Représentation schématique du transport de nucléoside au niveau cellulaire via les CNTs et ENTs.

Aujourd'hui il n'est pas entièrement compris pourquoi de nombreux types cellulaires possèdent à leurs surfaces les différentes familles d'ENTs et de CNTs. En effet, les différents sous-types de cette famille ont des sélectivités vis à vis de substrats assez similaires, pourtant certaines cellules possèdent les 3 sous-types de CNT et les quatre sous-types d'ENT. Le développement de composés fluorescents (substrats ou inhibiteurs) sélectifs des différents sous-types permettrait une étude de ces mécanismes facilitée.

Ces deux familles jouent un rôle clé dans l'absorption cellulaire de nucléosides qui vont agir sur la signalisation et la régulation de nombreux processus physiologiques. L'adénosine, par exemple, est un métabolite essentiel dans la conception d'acide nucléique (base de l'ADN) ou encore en tant que précurseur d'ATP (indispensable fournisseur d'énergie). De plus l'adénosine joue un très grand rôle dans la signalisation cellulaire par le biais de ces récepteurs (A1, A2A, A2B et A3) et régule un grand nombre de processus biologiques et physiologiques, tels que la régulation du rythme cardiaque, du sommeil, de l'angiogénèse ou encore la régulation des fonctions immunitaires.[312, 313] Un dysfonctionnement de la machinerie conduit à de nombreuses pathologies, telles que les inflammations ou certaines maladies neuro-dégénératives (ex : Parkinson).[314] Le développement d'inhibiteurs ou de régulateurs de ces transporteurs apparait donc comme un enjeu important dans le cadre du de l'élaboration de nouveaux médicaments.

XI.3.b Implication physiologique et physiopathologique

Malgré ces nombreux rôles essentiels, ces transporteurs ne sont impliqués dans aucunes pathologies connues à ce jour (excepté pour une déficience en ENT3 qui entraine des maladies lié à un défaut au niveau du stockage lysosomale, « LSDs »). Néanmoins, ils présentent un grand intérêt pour leurs implications dans la perméabilité des médicaments « nucléosidiques » (essentiellement des bases purines et pyrimidines). De nombreux dérivés nucléosidiques sont présent sur le marché pour traiter les infections virales et pour le traitement de nombreuses formes de cancer.[315]

La « perméabilisation » des médicaments augmente leur métabolisation par les cellules et limite ainsi leurs indices thérapeutiques. De nombreuses études sur le développement d'inhibiteurs sélectifs de ces transporteurs (ENTs vs. CNTs), ont donc été réalisées. Le Nitrobenzylmercaptopurine ribonucléosidique (NBMPR), très affin (nM) et sélectif d'ENT1 (µM pour ENT2-4), est en essais cliniques en tant qu'antimétabolisant de différents médicaments nucléosidiques et non-nucléosidiques. D'autres inhibiteurs d'ENT1/2, moins sélectifs, tels que le diazelep ou le dipyrimadole, inhibent ces transporteurs en se liant à proximité de la cavité du transporteur, de la même manière que le NBMPR (Figure 72).[316]

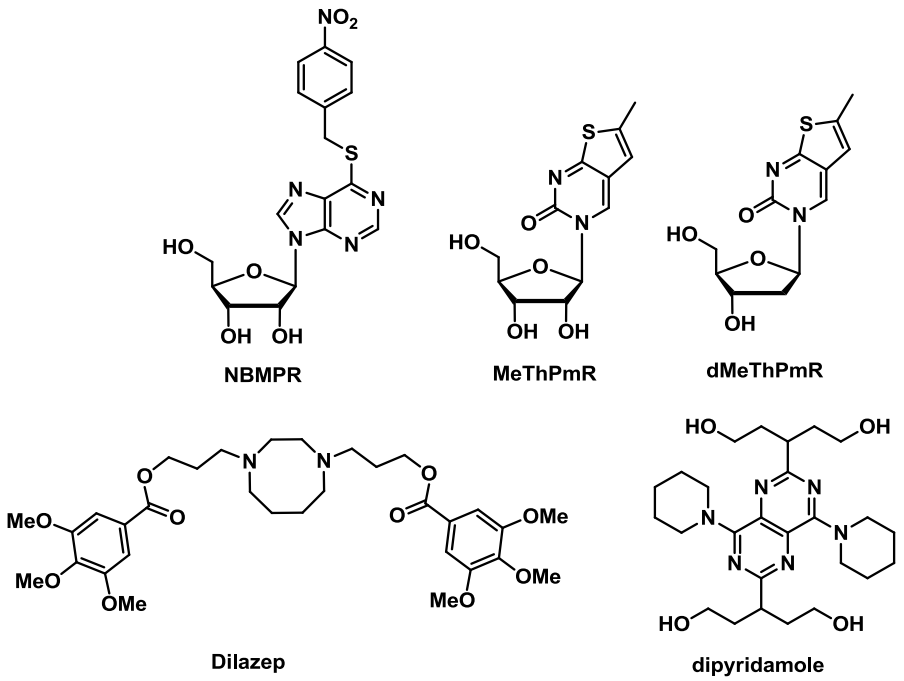


Figure 72 : Structures d'inhibiteurs sélectifs des ENTs ou CNTs

Ces différents inhibiteurs ont permis une étude plus approfondie des fonctions moléculaires, physiologiques et pharmacologiques des ENTs.[315, 317] Jusqu'à récemment il n'existait pas d'inhibiteurs puissant des CNTs outre des dérivés de phloridzine ou benzopyranone actif autour de la dizaine du µM. Des inhibiteurs sélectifs des CNT1 avec de très fortes affinités (nM) ont récemment été développés tels que dMeThPmR et MeThPmR (thiénopyrimidine ribo ou déoxyribonucléoside) et une étude récente a permis d'évaluer leur potentiel de protection contre des agents cytotoxiques tels que la gemcitabine.[318]

Le développement d'anti-métabolisant permettrait de diminuer les doses de principes actifs données au patient et ainsi de minimiser les possibles effets secondaires (en particulier dans le cas des traitements du cancer). Le développement d'outils pharmacologiques fluorescents sélectifs de ces différents sous-types contribuerait au développement de test cellulaire par fluorescence dans un contexte physiologique. Le développement de tels outils évierait l'emploi d'autres tests plus lourds utilisant des composés radiomarqués, comme mentionné précédemment.

XI.3.c Résultats préliminaires des tests biologiques

Les tests ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr Pastor-Anglada, sur des cellules HEK293 (cellules épithéliales rénales humaines) transfectées, en fonction du transporteur étudié, par hCNT1, hCNT2, hCNT3 (human concentrative nucléoside transporter) ou par deux sous-types de hENTs, hENt1 et hENT2 (human equilibrium nucleoside transporter). Les cellules HEK293 exprimant naturellement les 2 sous-types hENT1 et hENT2 il ne sera pas possible de les différentier lors des tests biologiques. Les valeurs d'inhibition sont calculées par mesure de la quantité de substrats naturels radiomarqués transporté dans la cellule (cytidine ou guanosine en fonction des sous-types étudiés), présent à la concentration de 1µM. Les résultats préliminaires obtenus, fournissent un % d'inhibition du transport du substrat naturel et ont été réalisés avec différents composés à une concentration de 500 µM (Tableau 22).

Tableau 22 : Mesures d'inhibitions sur les différents sous-types de hCNTs et sur les hENTs.

Composés	% inhibition			
	hCNT1	hCNT2	hCNT3	hENts
15	< 10	< 5	62	15 ± 7
14	-	38	-	79 ± 8
13	< 20	-	-	32 ± 12
68	37	-	-	37 ± 12
72	-	44	17	15 ± 7
73	30	18	-	9 ± 6
71*	49	52	70	1 ± 0.8
69 *	66	50	< 10	11 ± 6
70 *	42	-	-	5 ± 4

*** = Faible reproductibilité**
- = Pas d'effet observé

Les premières études d'inhibition réalisées ont permis de faire ressortir deux composés potentiellement intéressants, **14** et **15.** En effet le premier inhibe de manière assez sélective le transporteur humain hCNT3, tandis que le second est plus sélectif des transporteurs humains hENTs. Ces composés appartiennent à la famille des éthéno, respectivement l'éthéno désoxyadénosine et l'éthéno adénosine, qui sont de ce fait très proche structerellement de l'adénosine qui est un des substrats naturel de ces transporteurs. Les composés **71** et **69** ont montré une très forte inhibition de certains sous-types des hCNTs (à plus de 90%) avec peu d'effet sur les hENTs, néanmoins lors de la reproduction de ces tests (n=3) ces résultats n'ont été retrouvés que deux fois sur trois. Lors de la troisième réalisation de ces tests, les activités de ces composés ont chuté. De nouveaux tests sont en cours pour définir le réel potentiel inhibiteur de ces composés, il conviendra bien sûr d'abaisser les concentrations des composés et de réaliser des mesures à différentes concentrations afin de pouvoir calculer l'IC_{50} de ces composés.

Comme nous l'avons présenté précédemment l'intérêt de ce type de molécules serait le développement de tests d'activité sélectifs en fluorescence des différentes sous-familles CNT (SLC28) et ENT (SLC29) et de perméabilisation aux médicaments. Ce type d'outils fluorescents permettrait d'analyser quelle sous-familles (voir même quel sous-type) est impliqués dans la perméabilisation des différents agents actifs (présenté précédemment), conduisant à leur métabolisation plus rapide. Le développement de tels tests permettrait de déterminer de manière efficace la sous-famille ou le sous-type de transporteur impliqué dans ce phénomène et ainsi de pouvoir administrer en même temps que le principe actif un inhibiteur de ce sous-type, dans le but de pouvoir diminuer les doses de principes actifs administrés diminuant ainsi les possibles effets secondaires.

XII. La Sialine

Un dysfonctionnement de la sialine est impliqué dans deux maladies infantiles rares causées par des mutations du gène SLC17A5: la maladie de stockage d'acide sialique (ISSD) et la maladie de Salla.[131, 132] Trois objectifs s'offrent alors à nous : la conception de faux substrats fluorescents qui permettrait de mieux comprendre le mécanisme de transport des acides sialiques et son implication dans ces deux pathologies, on peut également envisager avec ce type de molécules le développement d'un test de transport d'acide sialique par fluorescence, limitant ainsi l'usage de molécules radiomarquées ou encore utiliser les meilleurs inhibiteurs trouvés en tant que molécules chaperonnes, qui sont des molécules très affines et qui aident au bon repliement de protéines [133](

Figure 73).

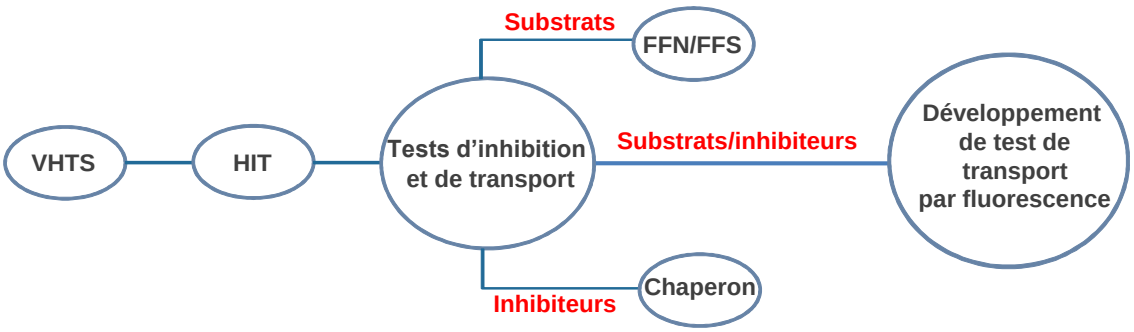


Figure 73 : Approche biologique envisagée pour étudier la sialine

Un mauvais repliement de la sialine conduit à un mauvais acheminement et/ou de sa dégradation, diminuant ainsi la quantité de sialine présente sur la membrane lysosomale. Le développement de molécules chaperonnes limiterait ce phénomène (impliqué dans ces deux pathologies), en se fixant de manière non permanente à la sialine et en l'aidant à ce replier correctement, offrant ainsi une approche thérapeutique potentielle.

Le développement de ces molécules a été basé sur un travail, en amont, de modélisation qui a permis d'identifier plusieurs « Hits » potentiels par criblage à haut débit de banques de molécules.

Dans ce sous-chapitre nous détaillerons, dans un premier temps, la sialine et ses caractéristiques puis nous décrirons les travaux préliminaires effectués sur cette cible avant d'aborder les résultats biologiques obtenus à partir de tests mis au point par nos collaborateurs.

XII.1 Présentation du test biologique

L'activité et différents paramètres de transport de la sialine ont été étudiés sur protéoliposomes reconstitués comme dans le cas de VNUT. Comme nous l'avons déjà mentionné ce type de matériel biologique s'éloigne des conditions physiologiques, nous n'utiliserons donc pas ce matériel.

Ce transporteur étant lysosomale la mise en place de tests d'inhibition est rendu compliquée par l'isolement et la manipulation de lysosome purifié Ce matériel est difficile d'accès, ce qui a poussé nos collaborateur (équipe du Dr Gasnier) a développé un test cellulaire plus facile à mettre œuvre (développé ci-dessous).[127] L'étude de la sialine a été grandement facilitée par la mise en place de ce test cellulaire de recapture d'acide

sialique marqué. En effet, ces tests nécessitent beaucoup moins de cellules et de temps que ceux réalisés sur des lysosomes purifiés et sont facilités par des mesures de recapture de substrats radiomarqués contrairement à des mesures d'efflus sur lysosomes. Ce test, réalisé sur cellules entières a été mis en place par l'équipe du Dr Gasnier (Laboratoire de Dynamique Membranaire et Maladies Neurologiques – UMR8192) et présente l'intérêt d'avoir grandement facilité l'accès à des tests d'inhibitions par dosage de l'activité de la sialine. La séquence responsable de l'acheminement des transporteurs vers le lysosome a été identifiée et mutée (Figure 74).[319]

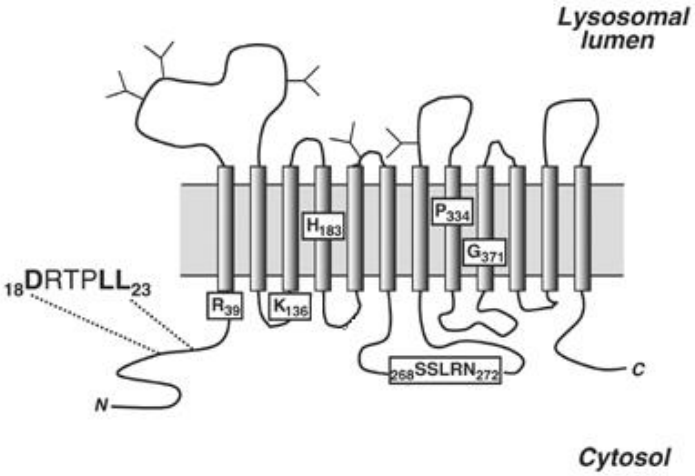


Figure 74 : Séquence responsable de l'adressage de la sialine au niveau lysosomal (DRTPLL) et représentation des différents acides aminés dont les mutations interviennent au niveau pathologique.

Le mutant résultant est très généralement mal acheminé et se retrouve à la membrane plasmique (au lieu du lysosome).[127] Cette mutation (L22G/L23G) n'affecte pas son rôle principal ni ses caractéristiques biochimiques, l'exportation des substrats du milieu extracellulaire vers le cytoplasme par un procédé équivalent à un efflux lysosomale. Il est donc indispensable, pour imiter au mieux les conditions du milieu lysosomale, d'acidifier le milieu extracellulaire (à l'aide d'un tampon à pH 5) pour permettre l'absorption à l'intérieur de la cellule de substrats. En effet, l'acidification du milieu est impérative pour imiter le rôle biologique de la pompe à proton V-ATPase, qui est indispensable pour le transport (Figure 75).

Figure 75 : Approche utilisée pour faciliter l'étude des transporteurs lysosomales. A/ Transport physiologique de substrat de la sialine. B/ Test d'inhibition mis en place par mutation conduisant à l'adressage de la sialine au niveau de la membrane plasmique.

Pour ce test, L'utilisation de Neu5Ac marqué radioactivement au tritium ([^{3}H]Neu5Ac), permet de mesurer précisément la quantité de [^{3}H]Neu5Ac absorbée dans les cellules après incubation dans différentes conditions. Ce test que nous allons décrire a permis d'élucider de nombreux paramètres essentiel pour une activité de transport optimale d'acide sialique. Notamment l'importance du gradient de pH (ΔpH). En effet, la sialine est un symporter d'acide sialique et de protons (1:1), il est donc nécessaire de maintenir le ΔpH à l'intérieur du lysosome, acidification assuré par la V-ATPase. Les concentrations en acides sialiques influent également sur son activité de transport (saturation à un Km supérieur à 0.24 mM) contrairement au potentiel de membrane (ΔΨ) qui n'aurait que peu d'influence. Néanmoins ces tests sortent d'un contexte physiologique stricte ce qui ne permettra pas de répondre à toutes les questions, notamment sur le transport d'autres substrats via la sialine (tel que le glutamate ou l'aspartate), qui est une question contreversée.[129, 130] Le développement de

substrats/inhibiteurs fluorescents (FFS) permettrait d'étudier dans un contexte plus physiologique et pathologique ce transport.

Ainsi, ce test peut être réalisé avec des composés d'intérêts permettant ainsi de définir leur pouvoir d'inhibition. De cette manière de nombreux composés ont été testés et leur CI_{50} déterminés.

XII.2 Résultats des tests biologiques

Les résultats préliminaires que nous avons détaillés précédemment, ont permis d'identifier plusieurs composés intéressants. Ces composés ont été obtenus chimiquements (dérivés d'acides sialiques) ou un criblage à haut débit (vHTS).

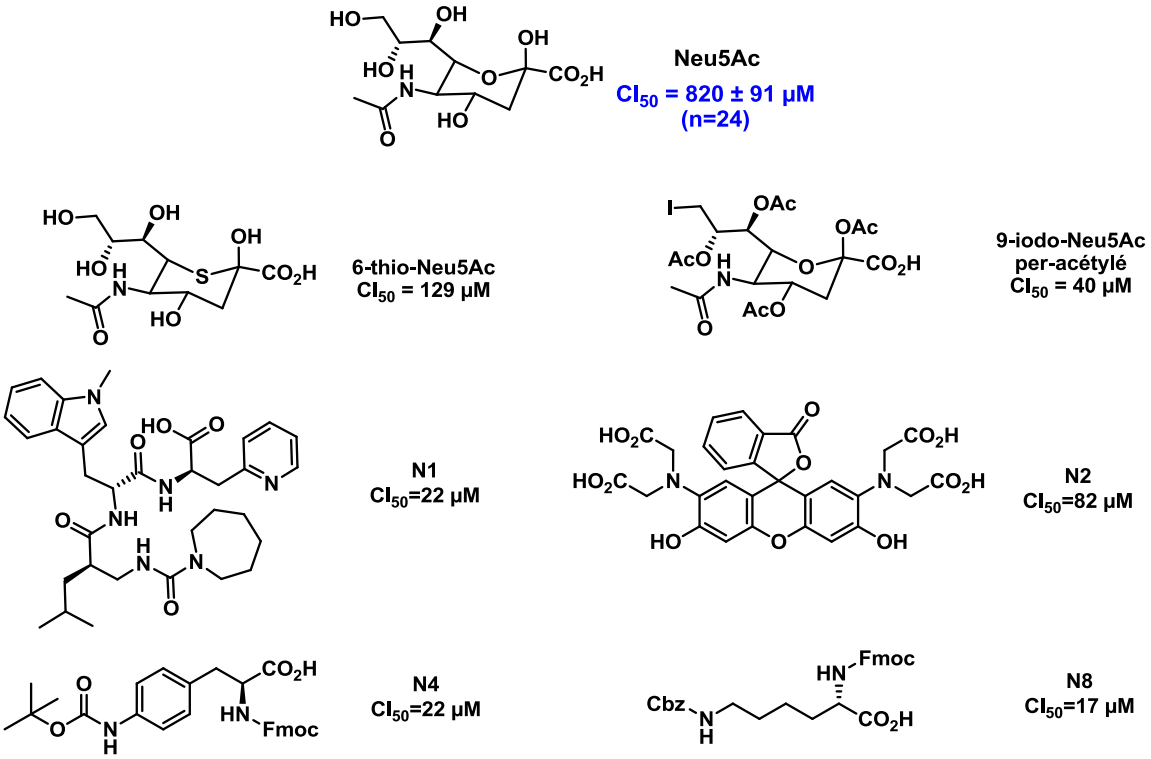


Figure 76 : Rappel des composés intéressants pour le développement d'inhibiteurs de la sialine.

Suite à ces résultats prélimaires nous avons sélectionné la touche **N8** et avons orienté nos synthèses pour déterminer la structure minimale active et pour étudier la relation entre la structure et l'activité sur la sialine des composés synthétisés.

Nous avons dans un premier temps étudié, à l'aide des résultats biologiques, les caractéristiques de la touche **N8**, telles que l'importance de sa chaîne latérale et de ses groupements protecteurs. Suite à ces premières conclusions nous avons défini les différents paramètres importants à une bonne activité, nous permettant de mieux orienter nos synthèses. Nous discuterons, dans un second temps des résultats biologiques obtenus sur les composés dont les paramètres ont été adaptés à ces caractéristiques.

XII.2.a Test d'inhibition

Ces tests ont été réalisés suivant le même principe que décrit ci-dessus, à différentes concentrations de composé testé (0.3, 3, 10, 30, 100 µM), ce qui nous a permis de déterminer les CI_{50} ces composés

➢ *Evaluation des principales caractéristiques de **N8***

Importance de la chaîne latérale :

Pour évaluer l'importance de la chaîne latérale de cette touche, nous avons criblé biologiquement une chimiothèque constituée d'acides aminés, commerciaux ou synthétiques, protégé par un motif fluorényle (Fmoc) sur la *N*-α (Tableau 23). De manière surprenante on observe que tous les acides aminés possédant un groupement Fmoc sur l'amine proximale sont des bons inhibiteurs de la sialine. Parmi ces acides aminés, même des acides aminés possédant une « petite » chaine latérale, telle que la leucine, ont une activité inhibitrice (CI_{50}=13.6 µM) meilleure que la touche issue du criblage virtuel (Fmoc-Lys(Cbz)-OH, CI_{50}=17µM). On peut également noter que l'on n'observe pas de différence significative de CI_{50} entre la Fmoc-Leu-OH et le mélange racémique, nous laissant penser que la stéréochimie du carbone asymétrique de l'acide aminé n'aurait que peu d'influence sur l'inhibition de la sialine.

Tous les composés possédant une CI_{50} < à 50 µM possèdent des groupements hydrophobes sur leurs chaines latérales, comme des chaines alkyles (leucine, proline), des cycles aromatiques (Phénylalanine, tyrosine) ou encore des groupements protecteurs de types *t*-butylique ou benzylique (cystéine, thréonine, asparagine…). La présence de groupements hydrophobes apparait importante pour l'activité des inhibiteurs sur la sialine, néanmoins cette propriété a des limites. En effet, le remplacement du groupement protecteur carboxybenzyl (Cbz) présent par l'amine distale de la touche par un second groupement Fmoc (composé **78**) fait chuter son activité inhibitrice avec une CI_{50} > 50 µM. La grande différence d'encombrement stérique entre le motif Cbz (1 cycle aromatique) et le motif fluorényle (3 cycles) pourrait limiter la reconnaissance de la lysine di-Fmoc (**78**) par la sialine. Cette « faible » activité est également retrouvée pour la Fmoc-Cys(SBz)-OH mais ce résultat reste à nuancer par la faible solubilité de ce composé dans le tampon.On trouve parmi ces composés la Fmoc-Cys-OH qui possède une fonction thiol libre sur sa chaine latérale. La forte nucléophilie du thiol qui pourrait interagir de manière directe (liaison covalente) ou de manière indirecte (interaction électrostatique…) avec le site actif de la sialine. Néanmoins des analogues de la cystéine protégée sur sa fonction thiol par des groupements hydrophobes et plus ou moins encombrants (*t*-butyle et *p*-méthoxybenzyl) conduisent à de meilleures CI_{50}.

Tableau 23 : Mesure de CI50 réalisée sur une chimiothèque d'acides aminés portant un motif fluorényle.

Composés	CI50 (µM)	± SD (µM)
N8	17,2	1,1
Fmoc-Cys-(SBz)-OH (**79**)	> 50	//
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (**78**)	> 50	//
Fmoc-Thr(tBu)-OH (comm.)	42	1,1
Fmoc-Cys-OH (**83**)	25.9*	11.6*
Fmoc-Cys(4MeOBz)-OH (comm.)	24,7	2,8
Fmoc-Tyr(tBu)-OH (comm.)	24.4*	1.3*

Fmoc-Phe-OH (comm.)	24	1,7
Fmoc-Cys(tBu)-OH (comm.)	19,2	5,6
Fmoc-Asp(OtBu)-OH (comm.)	18*	1.8*
Fmoc-Pro-OH, (comm.)	15.9*	1*
Fmoc-Leu-OH (comm.)	13,6	1,5
Fmoc-DL-Leu-OH, (**81**)	12.5*	1*
Fmoc-Glu(OMe)-OH (**80**)	11.5*	2,2

*** Mesure réalisés avec moins de quatre concentrations différentes.**

Le criblage de cette chimiothèque d'acides aminés protégés par un groupement fluorényle sur l'amine proximalle nous a permis d'envisager l'incorporation de motifs fluorescents. Nous avons donc ensuite étudié la possibilité et les conséquences de l'insertion de fluorophores en remplacement du groupement Fmoc, pour déterminer l'importance de ce groupement vis-à-vis de l'activité de la touche **N8** sur la sialine

Importance du groupement Fmoc-N-α :

Les premiers composés fluorescents synthétisés ont été réalisés en conservant la lysine, par analogie avec la touche issue du criblage virtuel. Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier le meilleur site d'incorporation des fluorophores (amine proximale ou distale). Comme nous venons de le voir, l'augmentation de la taille du groupement protecteur sur l'amine distale de la lysine conduit à une perte d'activité. Nous avons donc choisi, dans un premier temps, de remplacer le motif fluorényle par les fluorophores synthétisés limitant ainsi l'augmentation de la taille sur la partie distale et permettant également de vérifier l'importance de la présence d'un groupement fluorényle sur l'activité.

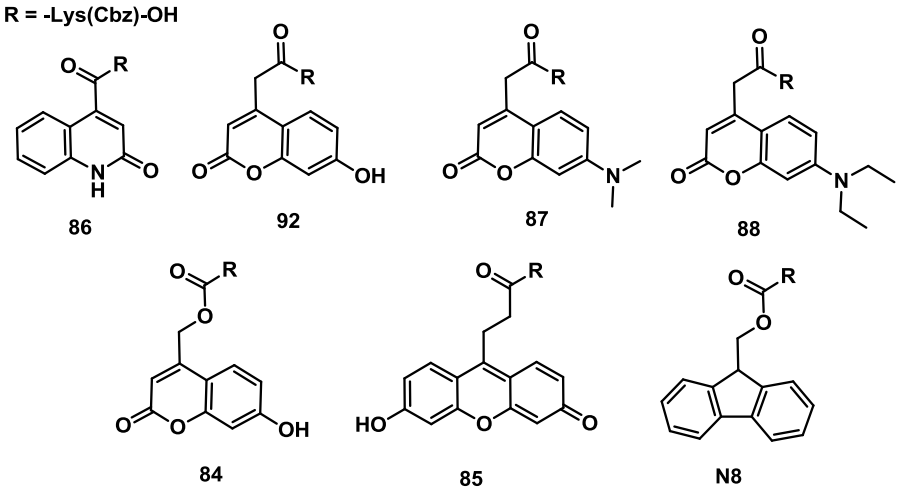
Nous avons débuté cette étude en conservant la liaison carbamate entre le fluorophore et la lysine comme cela est le cas sur la touche **N8**. Nous avons ensuite synthétisés différents composés, obtenus par couplage peptidique entre une fonction acide carboxylique présent sur le fluorophore et l'amine proximale de la lysine. Six composés possédant des motifs fluorescents variables en remplacement du groupement Fmoc ont alors été testés (Tableau 24).

Le remplacement du motif fluorényle par des fluorophores diminue l'inhibition de ces composés (augmentation des CI_{50}). Il apparait donc que le groupement Fmoc est important pour conserver une activité inhibitrice sur la sialine. Seuls les composés **84** et **85**, conservent une activité inhibitrice < à 50µM. Le motif fluorényle (sur **N8**) lié à la lysine par une liaison carbamate présente donc un espacement de 3 atomes entre le tricycle et l'amine proximale de la lysine, tout comme ces composés. Ces composés possèdent un motif fluorescent composés de 2 ou 3 cycles aromatiques plan. Le motif xanthène, présent sur le composé **85**, se rapproche le plus de la structure et de l'encombrement stérique du motif fluorényle, bien que celui-ci ne soit pas plan. On remarque également que le composé **86** ne possède pas de chainons entre la liaison peptidique et le fluorophore est quasiment inactif vis-à-vis de la sialine, contrairement aux composés **92, 87** et **88** qui ont une CI_{50} comprise en 50 et 100 µM.

Tableau 24 : Résultats biologiques et structures des composés Fluo-Lys(Cbz)-OH

Composés	CI50 (µM)	± SD (µM)
N8	17,2	1,1

86	> 100	//
92	> 50	//
87	> 50	//
88	> 50	//
85	45,0	1,6
84	41	4,8



Il apparait donc que l'espacement entre le groupement hydrophobe porté par l'amine distale (fluorényle ou fluorophore) soit un paramètre non négligeable pour la reconnaissance et l'activité de ces composés. Globalement, d'après ces études, on observe que le remplacement du groupement fluorényle (Fmoc) par un fluorophore, même lié par une liaison carbamate, **84**, ou de taille similaire (xanthène, **85**), fait chuter l'activité inhibitrice.

Au vu de ces résultats nous avons donc souhaité conserver le groupement Fmoc sur l'amine proximale en et les fluorophores sur la partie distale de la lysine ou sur la chaine latérale d'autres acides aminés. D'après les les résultats précédents résultats, nous avons sélectionné deux autres acides aminés, la cystéine et le glutamate. Ces acides aminés ayant des CI_{50} intéressantes peuvent être fonctionnalisés par un fluorophore sur leurs chaines latérales. A ce stade de l'étude seules la cystéine et la lysine ont été fonctionnalisées sur leurs chaines latérales par des fluorophores.

- *Etude de composés possédant un fluorophore sur la chaîne latérale*

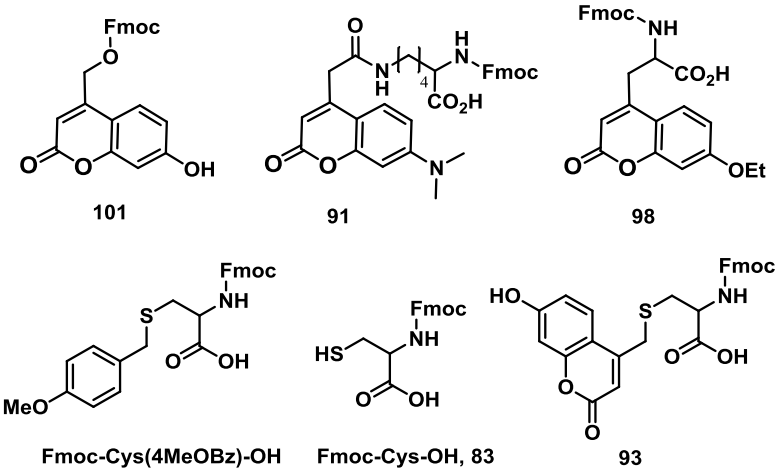
Nous avons alors synthétisé plusieurs composés conservant un groupement fluorényle. Pour valider la nécessité de conserver une fonction Fmoc amino-acide nous avons synthétisé le composé **101**, sur lequel nous avons introduit un groupement Fmoc sur une fonction hydroxyle en position benzylique d'une coumarine. Le composé **91** conserve la partie Fmoc acide aminé que nous pensons importante pour l'activité sur la sialine et est couplé sur l'amine distale d'une lysine. Nous avons synthétisé en parallèle d'autres analogues fluorescents en se démarquant de la lysine dans le but d'évaluer la possibilité de remplacement de cette lysine qui possède une « longue » chaine alkyle ($(CH_2)_4$) par des acides aminés plus petits. Pour ce faire nous avons choisi de travailler avec la cystéine qui possède déjà de bonnes activités inhibitrices sous forme protégée, telles que la

Fmoc-Cys(4MeOBz)-OH avec IC_{50} de 24.7 µM. Nous avons également évalué la Fmoc-Cys-OH, décrite précédemment, qui possède une IC_{50} du même ordre (25.9 µM). Ces données nous informent qu'il est possible d'introduire un groupement aromatique sur la fonction thiol de cette cystéine sans observer de variation significative de l'activité inhibitrice de ces composés. Le composé **93** a été synthétisé et possède un fluorophore introduit sur la fonction thiol, pour valider cette hypothèse. Enfin un dernier composé, **98**, a été testé. Ce composé possède une fonction Fmoc amino-acide, avec un fluorophore directement introduit, en position benzylique, sur le carbone asymétrique de cette fonction (Tableau 25).

Le composé **101** ne possède aucune fonction acide aminé, et donc pas de charge négative à pH physiologique, mais possède un groupement Fmoc en position benzylique. Ce composé a été synthétisé essentiellement pour valider le fait que ce n'est pas uniquement le groupement Fmoc qui est primordiale mais bien une fonction Fmoc acide aminé. La substitution du groupement Cbz par un fluorophore et la conservation de la partie Fmoc acide aminé sur la lysine (composé **91**) permettent de restaurer l'activité inhibitrice que l'on observait avec **N8**, nous confirmant l'importance du motif Fmoc acide aminé. Il sera intéressant par la suite de coupler par une liaison carbamate la Fmoc-Lysine à ces différents fluorophores afin d'améliorer les CI_{50} de ces composé en augmentant la taille de l'espacement entre cette Fmoc-lysine et les fluorophores. L'insertion d'un fluorophore sur la fonction thiol d'une Fmoc-cystéine nous a permis de gagner un log d'activité comparé au produit non-protégé, **83**, ou au dérivé commercial, Fmoc-Cys(4eOBz)-OH. Le composé **98** présente également une bonne CI_{50} égale à 8 µM, nous confirmant le grand degré de liberté envisageable au niveau des acides aminés employés et la possibilité d'introduire un fluorophore sans perte de l'activité.

Tableau 25 : Résultats biologiques et structures de différents composés Fmoc. (IC50 ± SD)

Composés	CI50 (µM)
N8	17,2 ± 1,1
101	> 100
91	18* ± 1.15*
Fmoc-Cys-OH (**83**)	25.9* ± 11.6*
Fmoc-Cys(4MeOBz)-OH (comm.)	24,7 ± 2,8
93	2,5 ± 1,3
98	8 ± 1,3



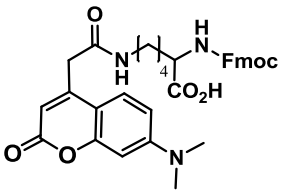
XII.2.b Conclusion

Les différentes mesures d'inhibition réalisées nous ont fourni un nombre important d'informations sur la SMA et la RSA. Ainsi nous avons pu déterminer que nature de l'acide aminé n'avait que peu d'influence sur les activités inhibitrices observées ce qui nous a permis d'envisager d'utiliser des acides aminés plus variés et non-naturels. Il est important de prendre en compte la taille globale de ces inhibiteurs qui ne doit pas être trop imposante pour conserver une bonne inhibition, ainsi il sera intéressant de réduire au minimum la taille de celui-ci en utilisant par exemple la glycine sur lequel un fluorophore serait introduit sur l'amine proximale pour obtenir

un composé substrat. Nous avons souligné l'importance de la présence d'un ou plusieurs groupements hydrophobes, qu'ils soient présents sous forme de groupements protecteurs ou de fluorophores. La présence du groupement Fmoc sur la position N-α apporte une augmentation non-négligeable de l'activité, néanmoins seul, ce groupement n'a que peu d'influence il doit être couplé sur une fonction amino-acide pour que celui-ci apporte une réelle plus-value. Le type de liaison entre ce groupement hydrophobe et l'acide aminé est sans importance pour les propriétés inhibitrices, néanmoins on a pu corréler la taille de l'espacement entre la partie hydrophobe et l'acide aminés avec ces propriétés inhibitrices. Il apparaît q'un espacement trop faible limite fortement l'inhibition qui augmente de manière croissante avec l'augmentation de la taille l'espacement. Il sera également intéressant d'accroître cette espacement afin d'observer l'espacement optimale entre partie hydrophobe (fluorophore ou groupement protecteur et l'acide aminé.

Les composés **93** et **98** ont permis d'obtenir de meilleures CI_{50} (gain d'un log avec **93**) que celles observées pour la touche issue du criblage virtuel, **N8**. Nous avons incorporé des motifs fluorescents sur les composés nous ouvrant la voie à la mise au point de tests d'inhibition ou de transport par fluorescence. Pour ce faire, il conviendra bien sûr de corréler les données de fluorescence détaillées dans le chapitre précédant avec les données d'inhibition, afin d'obtenir le meilleur compromis entre fluorescence et inhibition. Dans cette étude, les meilleurs inhibiteurs (**93** et **98**) sont des composés n'ayant pas de très bonnes propriétés de fluorescence. Le composé qui à ce jour, répond le mieux à ces attentes est le composé **91**, qui possède de très bonnes propriétés de fluorescence et une bonne activité inhibitrice (

Figure 77).



CI_{50} = 18 ± 1.2 µM

composés	λabs max	λem max	Stokes (cm^{-1})	rdt quantique	ε (cm^{-1})
91	373	447	4438	0.599	1.76E+04

Figure 77 : Structure, CI_{50} et propriétés de fluorescence du composé 91.

XII.2.c Perspectives

Les résultats obtenus sur ce projet offre de nombreuses perspectives. Il sera très intéressant d'observer les propriétés de fluorescence et le pouvoir inhibiteur des composés fluorescent pH-dépendant qui ont été synthétisés (études en cours de réalisation). Ces composés permettraient d'envisager de manière plus aisée la mise en place de tests par fluorescence qui se déroulent comme nous l'avons décrit dans un milieu extracellulaire acide (pH = 5). A ce pH, la fluorescence de ces composés est presque éteinte, tandis qu'à un pH physiologique (niveau intra-cellulaire dans ces tests) ils retrouveraient de bonnes propriétés de fluorescence. Avant cela, il faudra déterminer le mode d'action de ces composés (substrats ou inhibiteurs).

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction de la sialine, le développement de composés permet d'envisager plusieurs utilisations en fonction de leurs modes d'actions (substrat ou inhibiteur). Si ceux-ci sont transportés via la sialine, agissant ainsi comme de faux substrats fluorescents (FFS), il sera possible de réaliser

des études de suivi en temps réel du transport d'acide sialique, et ainsi de nous fournir de nombreuses informations sur les différents mécanismes impliqués dans ce transport (cinétique, conditions optimales…) et son rôle dans le cerveau. Pour ce faire, il faudra améliorer les propriétés de fluorescence et essayer de réduire la taille globale de ces composés tout en conservant une bonne activité et sélectivité.

Si ceux-ci agissent uniquement en tant qu'inhibiteurs, sans être transportés, ils pourraient être utilisés en tant que molécules chaperonnes et permettraient d'envisager une approche thérapeutique des différentes maladies (plus particulièrement la maladie de Salla) dues à un défaut de repliement de la sialine conduisant à un mauvaise adressage. Pour ce faire il faudra améliorer par modifications chimiques, l'activité inhibitrice de ces composés.

Des tests réalisés par nos collaborateurs biologistes sont en cours afin de déterminer si les composés synthétisés sont transportés à l'intérieur des cellules. Les premiers résultats qui devront être confirmés montrerent que ces composés ne sont pas transportés dans les cellules, ils agiraient uniquement en tant qu'inhibiteurs (sûrement en se plaçant dans le site de reconnaissance de la sialine, bloquant ainsi le changement conformationnel de celle-ci qui permet le transport de ses substrats naturels). Les résultats préliminaires pour l'utilisation de ces composés en tant que molécules chaperonnes sont encourageants, ceux-ci devront également être confirmés.

Le développement de molécules très affines pourrait également aider à la cocristallisation de ce type de protéine et donc permettre une étude des interactions moléculaires clés dans le mécanisme de transport. Il serait rendu possible, à l'aide d'analyse biologique et de modélisation autour de ces composés, de caractériser les différents résidus importants pour le transport dans un contexte physiologique. Ces travaux permettraient entre autre d'élucider le mécanisme de ce transporteur. Deux hypothèses pour ce mécanisme sont envisagées sur la base d'une homologie avec le transporteur fucose perméase (appartenant à la famille SLC16) ou l'antiporteur bactérien Na^+/H^+ (NhaN).[320] La description de ces deux mécanismes s'est appuyée sur des études cristallographiques des différentes positions dans lesquelles ont été retrouvés ces transporteurs.

La première hypothèse de travail est que le transport des substrats de la Sialine (et/ou VNUT) passe par deux états comme une sorte « d'interrupteur à bascule », correlée à l'étude sur la fucose perméase.[240] Le substrat (et ses co-substrats le cas échéant) viendrait se fixer au niveau de son site de reconnaissance, ce qui enclencherait le basculement du transporteur, s'ouvrant ainsi sur le milieu extérieur et libérant le substrat de l'autre côté de la membrane (Figure 78).

Figure 78 : Mécanisme de transport du fucose couplé à un proton via le symporteur FucP. [240]

La seconde hypothèse est que ce mécanisme passe par la rotation des segments transmembranaires autour d'un axe (deux segments transmembranaires immobiles).[320,317] La fixation du ou des substrats au niveau du site actif du transporteur enclencherait un mouvement de rotation fermant l'accès au site actif pour ouvrir une porte de sortie vers le milieu extérieur (ici périplasme) (Figure 79).

Figure 79 : A/ Mouvements possibles de rotation de NhaN conduisant à la libération du substrat au niveau périplasmique. Mouvements évalués par le logiciel ANM1 avec une vue du périplasme (B) et du cytoplasme (C).

Ainsi comme nous venons de le voir le champ d'action de composés, dont le concept (FFS/FFN) est très récent, est assez important. De manière plus générale, le développement de d'outils pharmacologiques fluorescents permettrait d'aider les biologistes à caractériser parfaitement tous les mécanismes impliqués dans le transport de substrats à travers les membranes en fonction de la protéine étudiée.

Chapitre 6 : Conclusions et perspectives

Conclusion et perspectives

Les FFNs et FFSs sont issus d'un concept très récent, élaboré en 2009 pour l'étude de VMAT2. Le développement de tels composés, est aujourd'hui un enjeu d'intérêts majeur pour les biologistes. Les FFNs jouant le rôle de faux substrats vis-à-vis de transporteurs permettent d'étudier et d'apporter une contribution à l'élucidation des mécanismes biologiques. Ils sont utilisés dans la littérature pour suivre l'activité de transport in-vivo et ont également très récemment permis la mise au point d'un test d'activité par fluorescence sur VMAT2, permettant un criblage de molécules d'intérêt facilité, comparé à des études menées par radioactivité. La conception de tels outils d'imagerie applicable à VNUT et la sialine a débuté au laboratoire avec ce travail de thèse.

L'un de nos objectifs était la synthèse d'une banque de fluorophores possédant différentes propriétés de fluorescence et permettant la fonctionnalisation de synthons d'intérêt. Ainsi plus d'une trentaine de fluorophores a été synthètisée. Ils possèdent des substituants multiples, tels que des fonctions hydroxyle, amino, acide carboxylique et halogène, conduisant à des variations de leurs propriétés de fluorescence et greffables facilement à des synthons d'intérêts Ces fluorophores ont été utilisés pour l'étude des deux cibles sélectionnées et pourront également être utilisés pour l'étude d'autres transporteurs au sein du laboratoire. L'étude des propriétés de fluorescences menée au cours de cette thèse a permis de déterminer les meilleurs fluorophores pour le développement d'outils d'imagerie fluorescent, ainsi, que le site de fonctionnalisation optimal (engendrant le moins de perte de fluorescence) sur les fluorophores synthétisés. Cette étude sera étendue à de nouveaux motifs fluorescents et permettra de concevoir plus rapidement des molécules fluorescentes adéquates à une utilisation biologique. Nous allons conclure et introduire les perspectives sur chacun de ces projets.

VNUT :

Très peu d'informations étaient et sont encore disponibles sur VNUT (découvert en 2008). L'élaboration de FFNs de VNUT a été réalisée par analogie structurale avec ses substrats naturels. Nous avons introduits des dérivés de ribose sur les fluorophores synthétisés. Une dizaine de composés apparentés à des nucléosides fluorescents, a été synthétisée. Lors de la synthèse de ces dérivés nucléotidiques fluorescents, nous avons tenté de mettre au point une méthode de triphosphorylation efficace et reproductible. La méthode d'Yoshikawa-Ludwig employée et les méthodes de purification ont permis de triphosphorylés deux composés fluorescents ne possédant pas de motifs ribose. L'extrapolation de cette méthode aux dérivés nucléosidiques synthétisés n'a pas permis d'obtenir les composés triphosphorylés résultants malgrè de nombreux essais. La triphosphorylation devra être adaptée à ces composés et mise au point. Nous pourrons ensuite utiliser un test de transport partiellement mis au point pour déterminer leurs potentiels en tant que FFNs.

En parallèle, nous avons partiellement mis en place un test de recapture d'ATP fluorescent (éthéno-ATP). Les synaptosomes apparaissent comme le matériel le plus adéquat, engendrant un moins grand bruit de fond, pour le développement de test d'inhibition et/ou de transport par fluorescence. En effet, ce test permettra de determiner le pouvoir inhibiteur ou substrat des composés fluorescents. L'observation de l'inhibition des composés introduits par mesure de la quantité d'éthéno-ATP recapturé sera possible et permettra de cribler de nombreux composés (fluorescent ou non) dans le cadre de la rechercher de nouveaux inhibiteurs de VNUT.

Celui-ci permettra également de réaliser des mesures de transport de substrats fluorescents par mesure de recapture des composés fluorescents introduits, en se plaçant à leurs longueurs d'onde. La finalisation de la mise au point de ce test faciliterait grandement l'étude et la découverte de nouveaux inhibteurs ou FFNs de VNUT. La découverte de nouveaux inhibiteurs affins de VNUT permettrait également de déterminer les interactions clés au niveau du site actif de VNUT, qui après mutations, permettra de valider le modèle 3D réalisé au sein du laboratoire, comme cela a été le cas pour la sialine (Figure 80)

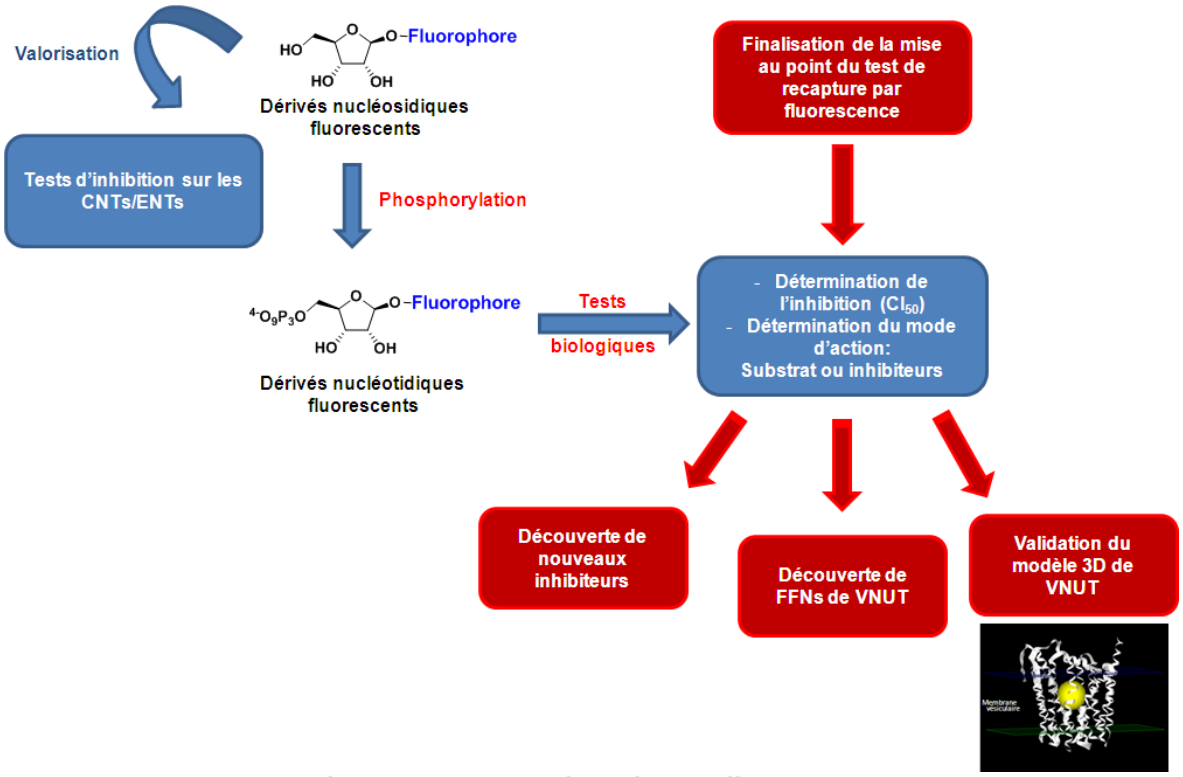


Figure 80 : Perspectives de travail sur VNUT

Les dérivés nucléosidiques fluorescents synthétisés ont été valorisés par des tests d'inhibitions réalisés sur les CNTs/ENTs qui sont de bonnes cibles pharmacalogiques. Les résultats préliminaires obtenus devront être confirmés et étendus à une étude de transport pour analyser leur effet en tant que substrat, ce qui permettrait comme pour les autres transporteurs de développer un test d'inhibition par fluorescence de chacun des sous-types des CNTs ou ENTs et ainsi de mieux suivre l'implicatopn physiologique de ces transporteurs. Le développement d'inhibiteurs sélectifs des sous-types de ces transporteurs permettrait d'augmenter l'indice thérapeutique de nombreux médicaments présent sur le marché (en particulier des anti-cancéreux) en diminuant leurs métabolisation. Ceci permettrait de diminuer les doses reçues par les patients limitant ainsi les nombreux effets secondaires des chimiothérapies.

Sialine :

Un criblage virtuel réalisé sur un modèle 3D validé de la sialine, a permis d'identifier plusieurs touches potentielles qui ont été validées par des tests d'inhibition. Parmi ces touches nous avons sélectionné la Fmoc-Lys(Cbz)-OH, **N8**, pour effectuer des modifications structurales dans le cadre d'études de relations entre la structure et l'activité. Nous avons également introduit des fluorophores sur différentes positions de cette touche

dans le but de développer des FFSs de la sialine. Quelques acides aminés ont été modifiés afin d'élargir la banque d'acide aminés protégés que nous possédions au laboratoire et également permettant l'introduction de fluorophore sur ces structures. Une quinzaine de composés fluorescents dérivant de **N8** a été synthètisée au cours de cette thèse. Le développement de tels composés se poursuit au laboratoire.

Ces composés ont été testés à l'aide de test d'inhibition déjà mis au point et maitrisé par nos collaborateurs biologistes. Ces tests nous ont permis de déterminer les CI_{50} de nos composés et ont permis d'orienter nos synthèses vers d'autres dérivés d'acide aminés. Deux molécules **93** et **98** ont une meilleure CI_{50} que la touche issue du criblage, confirmant la possibilité d'insérer un motif fluorescent sans perte d'activité. Le composé **93** a conduit à un gain de 3 log d'activité comparé au meilleur substrat naturel, le Neu5Ac. Néanmoins, les mesures des propriétés de fluorescence ont montré que celui-ci ne possédait pas des propriétés adéquates pour une utilisation lors de test biologique par fluorescence. Le composé **91** représente aujourd'hui le meilleur compromis entre une bonne activité inhibitrice (identique à la touche **N8**) et de bonne propriété de fluorescence (Figure 81).

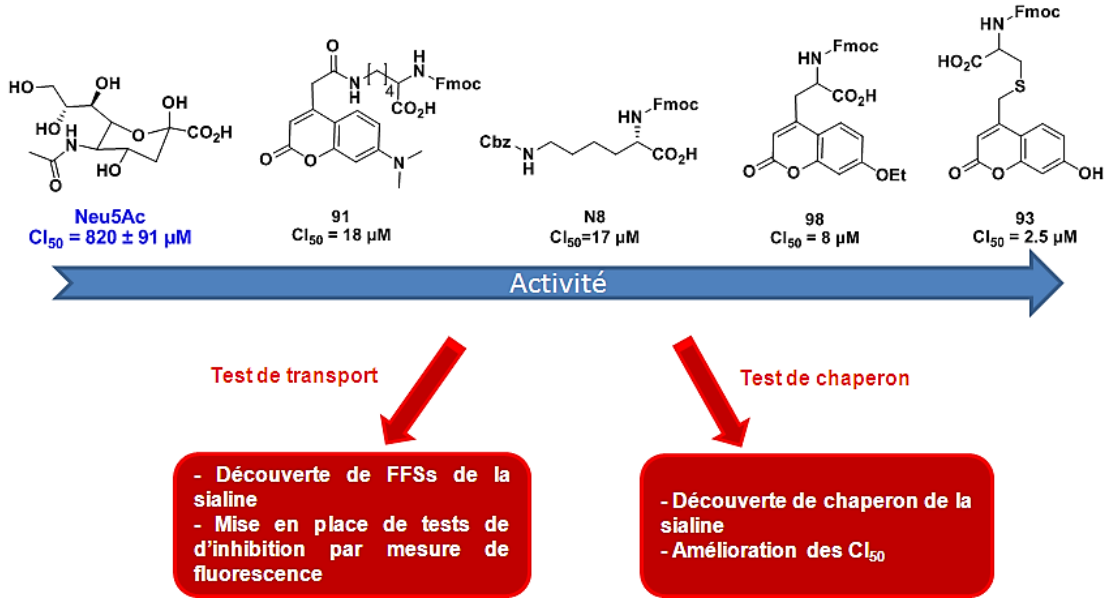


Figure 81 : Perspective de trvail sur la sialine

Deux voies biologiques sont en cours d'étude pour l'utilisation de ces composés fluorescents.

La première est la réalisation de tests de transport qui permettront de déterminer si ces molécules agissent comme substrat et seraient donc des FFSs de la sialine. Si cela est le cas, elles seraient les premières identifiées et permettraient de développer des tests d'inhibition ou de transport de la sialine par mesure de fluorescence et de mieux évaluer son implication dans le SNC.

La seconde voie étudiée est l'utilisation de ces composés en tant que molécules chaperonnes qui corrigeraient le défaut de repliement de la sialine impiqué dans la maladie de Salla. Nos collaborateurs biologistes réalisent ces tests dont les premiers résultats sont prometteurs. La modification des composés déjà synthétisés se poursuit au laboratoire dans le but de développer des molécules ayant des propriétés perméantes améliorées par esterification de l'acide par des groupements éthoxyacétoxy, utilisé fréquemment en biologie. L'entrée de ces molécules dans la cellule, sera facilitée, pour atteindre le réticulum endoplasmique et pouvoir jouer ce rôle de chaperon..

Annexe

Microwave-promoted Michael addition of azaheterocycles to α,β-unsaturated esters and acid under solvent-free conditions

Lilian Dubois, Francine C. Acher, and Isabelle McCort-Tranchepain

Synlett 2012; 23(5): 791-795

Microwave-Promoted Michael Addition of Azaheterocycles to α,β-Unsaturated Esters and Acid under Solvent-Free Conditions

Lilian Dubois, Francine C. Acher, Isabelle McCort-Tranchepain*

Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR 8601 CNRS, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, 45 Rue des Saints-Pères, 75270 Paris Cedex 06, France
Fax +33(1)4286218387; E-Mail: isabelle.mccort@parisdescartes.fr

Received: 09.11.2011; Accepted after revision: 04.01.2012

Abstract: Regioselective Michael addition of *N*-9 adenine to ethyl acrylate under microwave activation in solid-liquid solvent-free phase-transfer catalysis using TBAB as catalyst and DABCO as base was extended to *tert*-butyl acrylate and acrylic acid. Under these conditions and in the presence of a catalytic amount of KOH, first Michael addition of indole and indolylmaleimide to acrylates is also reported.

Key words: microwave irradiation, Michael addition, azaheterocycles, phase-transfer catalysis, green chemistry

Alkylation of purines and indoles usually results in the formation of regioisomeric mixtures. Treatment of 6-substituted- and 2,6-disubstituted-purines with a base such as sodium hydride followed by addition of an alkylating agent normally produces both 7-and 9-alkylpurines,[1] except with 6-(heteroaryl)purine where regiospecific N-9-alkylation occured.[2] Therefore, functionalization at N-6 or C-8 positions of adenine and derivatives is usually performed with N-9-alkylated product to provide the desired compounds with better regioselectivities and yields.[3] Indole can also suffer from a lack of regioselectivity during N-1-alkylation with formation of the C-3 regiomeric product but can usually be controlled by reaction in basic medium.[4]

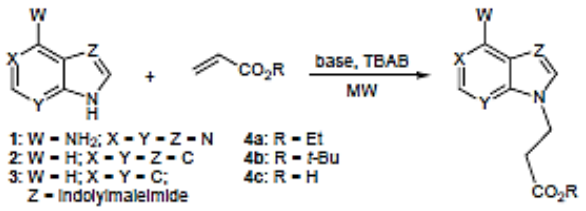
In the course of our ongoing work on ATP mimics, we were interested in functionalizing adenine **1** and alkylating the nitrogen atom of other azaheterocycles, such as indole **2** and bisindolylmaleimide **3** (Scheme 1).[5] Michael addition to α,β-unsaturated carbonyl compounds seems to be a mean of choice to get a short linker bearing a protected group that can be functionalized afterwards to introduce molecular diversity.

For this purpose, microwave irradiation allows performing reactions faster and in higher yields than in a conventional thermal method.[6] The phase-transfer catalyst tetrabutylammonium bromide (TBAB) is a highly microwave-absorbent material that is able to restitute heating around 100 °C in nonpolar reaction mixtures as well as to create a homogeneous medium in solvent-free reactions.

Microwave-assisted Michael addition of *N*-9 adenine **1** to α,β-unsaturated esters has been reported recently in solution[7,8] and under solvent-free conditions.[9,10] Some sterically hindered substituents in α,β-position of the Michael acceptors have been studied but with few alkoxy groups (Me, Et, *n*-Bu). *tert*-Butyl acrylate has only been reported to react with 6-chloropurine in water leading regioselectively to the N-9-alkylated product in 76% yield.[7]

We have been particularly interested in the regioselective addition of *N*-9 adenine **1** to **4a** described by Khalafi-Nezhad et al.[9] in the presence of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), a catalytic amount of TBAB under microwave and solvent-free conditions, leading to compound **5a** in 72% yield. To the best of our knowledge, such conditions have never been described to N-1 position neither of indole **2** nor of bisindolylmaleimide **3** with Michael acceptors **4a–c**.

Herein, we report the results concerning the Michael addition assisted by microwave irradiation of azaheterocycles **1–3** to ethyl and *tert*-butyl acrylates (**4a,b**) and acrylic acid (**4c**) under solvent-free conditions leading to the corresponding derivatives in good yields depending on the presence of an additive base (Scheme 1).

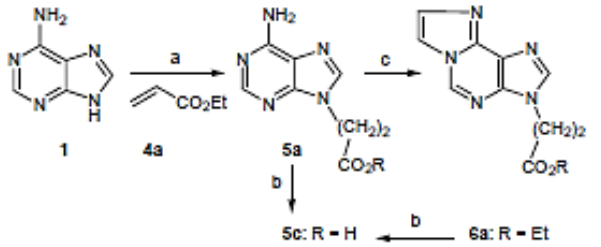


Scheme 1

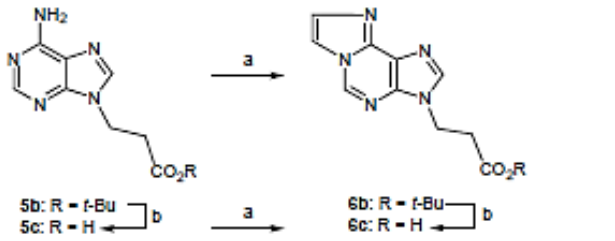
Performing conjugate addition of adenine **1** to **4a**, under the standard conditions reported by Khalafi-Nezhad,[9] led to the N-9-alkylated **5a** in 78% yield (Scheme 2 and Table 1, entry 1). Ethyl ester hydrolysis of **5a** was performed in HCl (3 N) to furnish the deprotected compound **5c**.

We were also interested in synthesizing functionalized ethenonucleobases for their fluorescent properties. *N*-1,*N*-6-Amino cyclization of adenine **5a** with chloroacetaldehyde in a sodium acetate buffer led to the alkylated etheno derivative **6a**[11] that went back to adenine **5c** during the previous acidic hydrolysis conditions of the ethyl ester.

SYNLETT 2012, 23, 791–795
Advanced online publication: 09.02.2012
DOI: 10.1055/s-0031-1290164; Art ID: ST-2011-D0648-L
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York



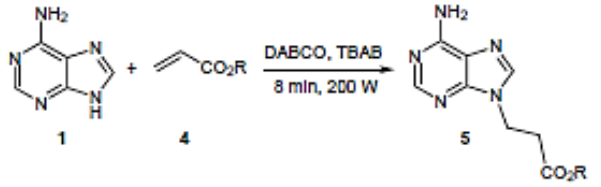
Scheme 2 *Reagents and conditions*: (a) DABCO, TBAB, 200 W, 8 min, 78%; (b) HCl (3 N), reflux, 4 h, 87%; (c) $ClCH_2CHO$, NaOAc, 45 °C, 48 h, 75%.



Scheme 3 *Reagents and conditions*: (a) $ClCH_2CHO$, NaOAc, 45 °C, 48 h, 68% from **5b** and 52% from **5c**; (b) TFA–CH_2Cl_2, r.t., 2 h, 87% from **5b**, and 80% from **6b**.

To overcome this disadvantage, we extended the above reaction to the anhydrous acid-sensitive protected and unprotected Michael acceptors **4b** and **4c**, respectively (Table 1, entries 2 and 3). Interestingly, under the same conditions, compounds **5b** and **5c** were obtained in quite comparable yields from **1** in a 15 mmol scale-up,[12–14] whereas reactions in a tenfold lesser quantity, yields dropped drastically to 17–26%, using a standard vessel. Hence, steric hindrance induced either by the bulky *tert*-butyl group or by the carboxylate salt showed no influence during the reaction, allowing the first preparation in one step of the useful synthon *N*-propanoic acid (**5c**). These encouraging results, added to the fact that ethyl acrylate **4a** has a particularly unpleasant smell, led us to work specifically with the Michael acceptors **4b** and **4c**.

Table 1 Michael Addition of Adenine **1** to Acrylates **4**



Entry	4	R	5	Yield (%)
1	**4a**	Et	**5a**	78[a] (26)[b]
2	**4b**	*t*-Bu	**5b**	71[a] (17)[b]
3[c]	**4c**	H	**5c**	72[a] (22)[b]

[a] Reaction conditions: **1** (15 mmol), molar ratio **1**/4/DABCO/TBAB = 1:1.5:1:0.2.
[b] Reactions performed with **1** (1.5 mmol).
[c] In this reaction a molar ratio of **1**/DABCO = 1:2 was used.

In order to check the relevance of using the *tert*-butylacrylate **4b** in comparison with the acrylic acid (**4c**) during the synthesis of compound **6c**, the alkylated compounds **5b** and **5c** were subjected to the amino cyclization in the conditions previously used for **5a** (Scheme 3) leading to the etheno derivatives **6b** and **6c**.[15] Compounds **5b** and **6b** were then subjected to anhydrous acidic conditions, leading to the corresponding acid derivatives **5c** and **6c** in good yields.

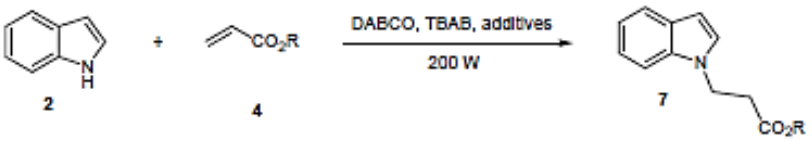
Due to the variety and potent activity exhibited by indole derivatives, we then studied the microwave-assisted Michael addition of indole **2** to acrylates **4** (Table 2) since only one example has been reported in solution but with a C-3-substituted indole.[16] In conventional solution reaction, such Michael acceptors have proved to N-alkylated indole **2** in basic medium,[17] whereas Brønsted acid[18] and Lewis acid[19] catalysts promoted the C-3 alkylation. Interestingly, Michael addition of indole to ethyl 2-(diethylphosphoryl)acrylate in AcOH led to C-3-alkylated compounds and in basic medium to a mixture of both N- and C-3-alkylated products.[20] Under microwave irradiation, Michael addition of indole to β-nitrostyrene in water underwent in C-3 position,[21] whereas to alkyl halide N-alkylation occurred under phase-transfer catalysis.[22]

In the Khalafi-Nezhad's conditions[9] but with a slight excess of DABCO with respect to indole **2**, only 10% reacted with **4b** (Table 2, entry 1) leading regioselectively to **7b**. Indole **2** with a lower acidity than adenine would need a prolonged reaction time and/or a stronger base due to its lowest concentration of the anionic form in the reaction mixture. The presence of four equivalents of both KOH and K_2CO_3, a base mixture previously used with alkyl halide,[22] improved the conversion to 48% and significantly reduced the reaction time to 1.5 minutes until spark appeared (Table 2, entry 2). We could not conclude if the modest yield of compound **7b** was due to a lack of reactivity in this particular heterogeneous mixture or to aza-retro-Michael addition in thermal and basic conditions.[23] Using only KOH as additive base and lowering the amount to 0.4 equivalents dramatically enhance the formation of **7b** to 83% yield (Table 2, entry 3).[24,25] We assume that under microwave activation, TBAB first reacts with KOH to produce tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH), as it was postulated in solution.[26] TBAOH seemed to be a highly microwave-absorbent material since the rise in temperature occurred much faster, reducing the reaction time and promoting the reaction in a more efficient manner.

These conditions applied to the ethyl ester **4a** furnished the alkylated indole **7a** but only in 56% yield, probably due to some saponification during the workup, since analytical control of the crude product showed only traces of the starting material **2** (Table 2, entry 4). In the presence of the acrylic acid (**4c**), although no alkylated product **7c**

 © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Table 2 Michael Addition of Indole 2 to Acrylates 4[a]



Entry	4	Additive (molar ratio)	Time (min)	7	R	Yield (%)
1	**4b**	none	10	**7b**	*t*-Bu	10
2	**4b**	KOH (4), K_2CO_3 (4)	1.5	**7b**	*t*-Bu	48
3	**4b**	KOH (0.4)	1	**7b**	*t*-Bu	83
4	**4a**	KOH (0.4)	1.5	**7a**	Et	56[c]
5[b]	**4c**	KOH (0.8)	1	**7c**	H	0

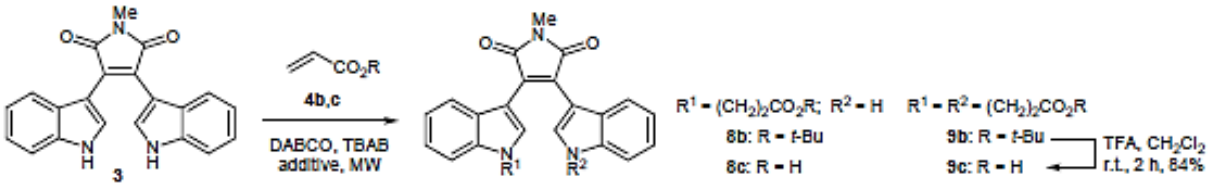
[a] Reaction conditions: **2** (15 mmol), molar ratio 2/4/DABCO/TBAB = 1:1.5:1.2:0.2.
[b] In this reaction a molar ratio of 2/DABCO = 1:2.4 was used.
[c] Unoptimized conditions.

has been isolated, Michael addition did occur, but was followed by in situ retro-Michael reaction under basic conditions and microwave activation (Table 2, entry 5), as already demonstrated to occur from adeninylpropionic acid under thermal and pressure conditions.[27]

We then applied the best conditions reported in Table 2 (entry 3) to Michael addition of adenine **1** to **4b**. In these basic conditions, the N-9-alkylated compound **5b** was obtained in 62% yield along with a mixture of byproducts resulting from nonregioselective and multialkylations. Although these minor byproducts were not independently isolated, mass spectra allowed identifying from mono- to penta-alkylated products. Indeed, positive ionization showed peaks corresponding to the mono- (264), di- (392), tri- (520), tetra- (648), and penta- (776) alkylated compounds, whereas detection by negative mode furnished peaks at 262, 390, and 518 indicating the presence of some unalkylated compounds at N-9 position.

Under the standard conditions,[9] no reaction occurred between the Michael donor **3** and acrylate **4c** until one equivalent of TBAB was used in combination with 500 W microwave activation, leading to the substituted bisindolylmaleimides **8c** and **9c** (Table 3, entry 1). Likewise, the 2-(trimethylsilyl) ethoxymethyl (SEM) *NH*-bisindolylmaleimide[5] reacted under these conditions, but led predominantly to the unprotected compound **3**. Various attempts to regioselectively produce the monoalkylated **8b** failed, even in the presence of KOH (0.4 equiv, Table 3, entry 2). Nevertheless, under these conditions, the reaction took place with a catalytic amount of TBAB with 200 W power microwave activation, supporting our hypothesis of the formation of TBAOH.

Table 3 Michael Addition of Bisindolylmaleimide **3** to Acrylates **4b** and **4c**



Entry	MW power, time	Reagents (molar ratio)	8	Yield (%)	9	Yield (%)
1	500 W, 20 min	**4c** (3), TBAB (1), DABCO (5)[a]	**8c**	27	**9c**	37
2	200 W, 10 min	**4b** (1), TBAB (0.2), DABCO (1.2), KOH (0.4)[b]	**8b**	9	**9b**	25[c]
3	200 W, 10 min	**4b** (2.4), TBAB (0.2), DABCO (1.2), KOH (0.8)[b]	**8b**	0	**9b**	71

[a] Reactions performed with **3** (0.85 mmol).
[b] Reactions performed with **3** (5 mmol).
[c] Along with 60% of recovered starting material.

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Thus, the resulting intermediate **8b** seems to be more reactive towards the alkylation than the starting material **3**. This result is quite different of what is usually observed in solution concerning monoprotection of symmetric bisindolylmaleimide. On the other hand, the bisalkylatedindolylmaleimide **9b** was obtained alone in 71% yield with an excess of Michael acceptor **4b** (Table 3, entry 3) and easily converted into **9c**.

We have shown that previously reported conjugate addition of adenine **1** to ethyl acrylate (**4a**) assisted by microwave activation can be extended to Michael acceptors, *tert*-butyl acrylate (**4b**), and acrylic acid (**4c**), as well as to other Michael donors, indole (**2**) and bisindolylmaleimide (**3**) in the presence of a catalytic amount of KOH, providing a regioselective access in good yields to the corresponding *N*-ethyl and *tert*-butylpropanoate and propanoic acid derivatives that can be further functionalized. In these environmentally friendly conditions, aza-Michael addition with acrylic acid had never been reported yet. Furthermore, *N*-ethyl and *tert*-butyl propanoate are also versatile protective groups of azaheterocycles since after ester hydrolysis, *N*-propanoic acid can easily undergo subsequent retro-Michael addition under basic conditions and thermal or microwave activation.

Acknowledgment

The authors are thankful to the Neuropôle Région Ile-de-France (NeRF) for PhD financial support (L.D.).

Supporting Information for this article is available online at http://www.thieme-connect.com/ejournals/toc/synlett

References and Notes

(1) (a) Estep, K. G.; Josef, K. A.; Bacon, E. R.; Carabateas, P. M.; Rumneyl, V. S.; Pilling, G. M.; Krafte, D. S.; Volberg, W. A.; Dillon, K.; Dugrenier, N.; Briggs, G. M.; Camiff, P. C.; Gorczyca, W. P.; Stankus, G. P.; Ezrid, A. M. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2582. (b) Guillarme, S.; Legoupy, S.; Bourgougnon, N.; Aubertin, A.-M.; Huet, F. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9635.

(2) (a) Zhong, M.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8901. (b) Zhong, M.; Nowak, I.; Cannon, J. F.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4216.

(3) Legraverend, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8585.

(4) Joule, J. A.; Mills, K.; Smith, G. F. *Heterocyclic Chemistry*, 3rd ed.; Chapman and Hall: London, **1995**, 516.

(5) Delarue-Cochin, S.; McCort-Tranchepain, I. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 706.

(6) (a) Caddick, S. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10403. (b) Caddick, S.; Fitzmaurice, R. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3325.

(7) Qu, G.-R.; Zhang, Z.-G.; Geng, M.-W.; Ran, X.; Zhao, L.; Guo, H.-M. *Synlett* **2007**, 721.

(8) Zare, A.; Hasaninejad, A.; Safinejad, R.; Moosavi, Zare. A. R.; Khalafi-Nezhad, A.; Beyzavi, M. H.; Miralai-Moredi, M.; Dehghani, E.; Kazerooni-Mojarrad, P. *ARKIVOC* **2008**, (*xvi*), 61.

(9) Khalafi-Nezhad, A.; Zarea, A.; Rad, M. N. S.; Mokhtari, B.; Parhami, A. *Synthesis* **2005**, 419.

(10) (a) Zare, A.; Hasaninejad, A.; Beyzavi, M. H.; Parhami, A.; Moosavi, Zare. A. R.; Khalafi-Nezhad, A.; Sharghi, H. *Can. J. Chem.* **2008**, *86*, 317. (b) Zare, A.; Hasaninejad, A.; Beyzavi, M. H.; MoosaviZare, A. R.; Safinejad, R.; Khalafi-Nezhad, A.; Asadi, F.; Baramaki, L.; Jomhori-Angali, S.; Ghaleh-Golobi, R. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 139.

(11) Borissow, C. N.; Black, S. J.; Paul, M.; Tovey, S. C.; Dedos, S. G.; Taylor, C. W.; Potter, B. V. L. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 245.

(12) Esposito, A.; Perino, M. G.; Taddei, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 931.

(13) **Procedure for the Synthesis of 9-(2-*tert*-Butoxycarbonylethyl)adenine (5b)**
Adenine **1** (2.027 g, 15 mmol), DABCO(1.681 g, 15 mmol), TBAB (967 mg, 3 mmol) were ground until a homogeneous mass was obtained, then **4b** (3.27 mL, 22.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred using a dark magnetic bar for 30 min before irradiation at 200 W in a microwave oven. The reaction mixture was suspended in $CHCl_3$ (450 mL) and washed with H_2O (3 × 250 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered, and evaporated under reduced pressure to give 2.81 g (71%) of **5b** as a white powder.

(14) **Spectral and Analytical Data of Compound 5b**
Mp 182–184 °C (lit.[12] 183–185 °C); R_f = 0.6 (CH_2Cl_2–MeOH = 9:1). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.14 (s, 1H, H-2), 8.09 (s, 1H, H-8), 7.16 (s, 2H, NH_2), 4.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2N), 2.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2CO), 1.31 (s, 9H, CH_3). ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO): δ = 169.7 (CO), 155.9 (Cq-Ar), 152.3 (C-2), 149.4 (Cq-Ar), 140.9 (C-8), 118.7 (Cq-Ar), 80.4 (Cq-*t*-Bu), 39.0 (CH_2N), 34.9 (CH_2CO), 27.8 (CH_3). IR: ν = 3292 (NH_2), 1723 (CO) cm^{-1}. MS (ESI$^+$): *m/z* (%) = 264.0 (100) $[M+H]^+$. HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{12}H_{17}N_5O_2+H]^+$: 264.1457; found: 264.1451.

(15) Karskela, T.; Lönnberg, H. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9446.

(16) Jennings, L. D.; Foreman, K. W.; Rush, T. S. III; Tsao, D. H. H.; Mosyak, L.; Kincaid, S. L.; Sukhdeo, M. N.; Sutherland, A. G.; Ding, W.; Kenny, C. H.; Sabus, C. L.; Liu, H.; Dushin, E. G.; Moghazeh, S. L.; Labthavikul, P.; Petersen, P. J.; Tuckman, M.; Ruzin, A. V. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5115.

(17) (a) Robarge, M. J.; Bom, D. C.; Tumey, L. N.; Varga, N.; Gleason, E.; Silver, D.; Song, J.; Murphy, S. M.; Ekema, G.; Doucette, C.; Hanniford, D.; Palmer, M.; Pawlowski, G.; Danzig, J.; Loftus, M.; Hunady, K.; Sherf, B. A.; Mays, R. W.; Stricker-Krongrad, A.; Brunden, K. R.; Harrington, J. J.; Bennani, Y. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1749. (b) Yeom, C.-E.; Kim, M. J.; Kim, B. M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 904. (c) Ferlin, M. G.; Bortolozzi, R.; Brun, P.; Castagliuolo, I.; Hamel, E.; Basso, G.; Viola, G. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1373. (d) Hou, X.; Hemit, H.; Yong, J.; Nie, L.; Aisa, H. A. *Synth. Commun.* **2010**, *40*, 973; and references cited therein.

(18) Cooper, L. C.; Chicchi, G. G.; Dinnell, K.; Elliott, J. M.; Hollingworth, G. J.; Kurtz, M. M.; Locker, K. L.; Morrison, D.; Shaw, D. E.; Tsao, K.-L.; Watt, A. P.; Williams, A. R.; Swain, C. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1233.

(19) (a) Mohammadpoor-Baltork, I.; Memarian, H. R.; Khosropour, A. R.; Nikoofar, K. *Heterocycles* **2006**, *68*, 1837. (b) Kumar, V.; Kaur, S.; Kumar, S. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7001.

(20) Couthon-Gourvès, H.; Simon, G.; Haelters, J.-P.; Corbel, B. *Synthesis* **2006**, 81.

(21) De Rosa, M.; Soriente, A. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2981.

(22) Bogdal, D.; Pielichowski, J.; Jaskot, K. *Heterocycles* **1997**, *45*, 715.

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

(23) Boncel, S. A.; Mączka, M.; Walczak, K. Z. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8450.

(24) **Optimized Procedure for the Synthesis of 1-(2-*tert*-Butoxycarbonylethyl)indole (7b)**
Indole **2** (1.77 g, 15 mmol), DABCO (1.681 g, 15 mmol), TBAB (967 mg, 3 mmol) were ground until a homogeneous mass was obtained, then **4b** (3.27 mL, 22.5 mmol) was added. The reaction mixture was stirred using a dark magnetic bar for 30 min. KOH (337 mg, 6 mmol) was added, and the mixture was stirred for further 2 min just before irradiation at 200 W in a microwave oven. The reaction mixture was suspended in CH_2Cl_2 (200 mL), washed with H_2O (3 × 200 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$) and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane–EtOAc = 99:1) to give 3.06 g (83%) of **7b** as a brown oil.

(25) **Spectral and Analytical Data of Compound 7b**
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 7.56 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-7), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, H-4), 7.35 (d, *J* = 3.2 Hz, 1 H, H-2), 7.14 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-6), 7.02 (t, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.42 (d, *J* = 3.2 Hz, 1 H, H-3), 4.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, CH_2N), 2.74 (t, *J* = 6.7 Hz, 2 H, CH_2CO), 1.32 (s, 9 H, CH_3). ^{13}C NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.2 (CO), 135.7, 128.7 (Cq-Ar), 127.8 (C-4), 121.4 (C-5), 120.9 (C-7), 119.3 (C-6), 109.1 (C-2), 101.3 (C-3), 80.7 (Cq-*t*-Bu), 41.7 (CH_2N), 36.0 (CH_2CO), 27.8 (CH_3). IR: ν = 1726 (CO) cm^{-1}. MS (ESI$^+$): m/z (%) = 246.1 (100) [M+H]$^+$. HRMS (ESI$^+$): *m/z* calcd for [$C_{15}H_{19}N_3O_2$ +H]$^+$: 246.1489; found: 246.1488.

(26) Wang, M.-L.; Liu, B.-L. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* **2007**, *38*, 85.

(27) Lira, E. P.; Huffman, C. W. *J. Chem. Soc.* **1966**, 2188.

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Partie expérimentale

Experimental part

General directions

Reagents were purchased from Aldrich or Acros. Prior to use, tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium-benzophenone and dichloromethane (CH_2Cl_2) from CaH_2.

All reactions were carried out under argon atmosphere, and were monitored by thinlayer chromatography with Merck 60F-254 precoated silica (0.2 mm) on glass. Flash chromatography was performed with Merck Kieselgel 60 (200–500 mm); the solvent systems were given v/v.

^{1}H NMR (250 MHz), ^{13}C NMR (63 MHz) and ^{31}P NMR (101 MHz) spectra were recorded on a Bruker ARX-250 spectrometer and ^{1}HNMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) spectra were recorded on a Bruker AVANCEII-500 spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in ppm. Multiplicity was given using the following abbreviations: s (singulet), brs (broad singulet), d (doublet), dd (doublet of doublets), t (triplet), dt (doublet of triplets), m (multiplet). During acquisition, the spectral window covers a proton chemical shift range from ⁻1 to +12 ppm or from ⁻5 to +20 ppm. ^{13}C chemical attributions were assigned using ^{1}H-decoupled spectra.

Melting points were determined with a Büchi 530 apparatus and are uncorrected.

Specific rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter with sodium (589 nm) or mercury (365 nm) lamps at 20 °C.

IR spectra were obtained with a Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer equipped with a MIRacleTM single reflection horizontal ATR unit (zirconium-selenium crystal). Mass spectra were recorded on a Thermo Finnigan LCD Advantage spectrometer. Spectroscopic (^{1}H and ^{13}C NMR, MS) and/or analytical data were obtained using chromatographically homogeneous samples.

Microwave reactions were performed using standard Pyrex vessels in open mode, maintaining the temperature max 100 °C by power modulation.

General Procedures

***General procedure A**: Michael addition to synthesize the propionate derivatives*

Aza-heterocycle (1 eq), DABCO (1–5 eq) and TBAB (0.2–1 eq) were grounded until a homogeneous mass before adding α,β-unsaturated esters (1.5 eq). The reaction mixture was stirred for 30 min using a dark magnetic bar. In some reactions K_2CO_3 (4 eq) and/or KOH (0.4–4 eq) were added and the mixture was stirred for further 2 min just before irradiation. The resulting mixture was then irradiated in a microwave oven using power and time appropriate and purified as mentioned in each case.

***General procedure B**: Synthesis of 1,N^6-etheno-adenine derivatives*

Adenine derivative (1 eq) in 25 mM aqueous sodium acetate solution (1 N) was acidified to pH ≈ 5 with aqueous HCl solution (1 N). The reaction mixture was heated to 45 °C for 10 min before adding aqueous chloroacetaldehyde solution (50%, 10–25 eq) and stirring was maintained 48 h at this room temperature. The solution was then evaporated under vacuum and the residue purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 97/3 or 9/1). .

***General procedure C**: Synthesis of 1,N^6-etheno-adenine derivatives*

Adenine derivative (1 eq) was added to aqueous chloroacetaldehyde solution (2 M). The solution was heated to 30 °C and the pH was maintained to 4.5 during 24 h with aqueous NaOH solution (1 N). The reaction mixture was quenched by addition of saturated aqueous solution of $NaHCO_3$ (up to pH = 7.2). The solution was evaporated under vacuum and the residue purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 85/15).

***General procedure D**: O-Ribosylation of fluorescent derivatives*

Fluorescent derivative (1 eq) was suspended in dry CH_2Cl_2 (1 M) in the presence of freshly activated 4 Å molecular sieves (100 mg/mmol) at 0 °C, then $BF_3 \cdot Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 1.1 eq) was slowly added to the solution and after 10 min, a cooled solution of 2,3,5-tri-*O*-acetyl-D-ribofuranosyl trichloroacetamidate (1 eq) in CH_2Cl_2 (0.3 M) was added over 30 min. After 20 min, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 2 h. The reaction was quenched by successively addition of Et_3N (1 eq) and AcOH (1 eq) and filtered. The filtrate was concentrated in vacuo and the residue was purified by silica-gel column chromatography (CH_2Cl_2/MeOH: 98/2).

***General procedure E**: Deprotection of tri-O-acetyl-D-ribofuranose*

A crude mixture (1 mmol) obtained by general *procedure D* was dissolved in MeOH (15 mL) and treated with concentrated NH_4OH (5 mL). The solution was stirred 24–48 h at room temperature. The solvents were gently evaporated and the residue was co-evaporated with H_2O (2×50 mL) then EtOH (50 mL). The resulting mixture was dissolved in EtOH (75 mL) and the triol precipitated at 0 °C. The solution was filtered and the precipitate was washed with Et_2O (100 mL).

***General procedure F**: Deprotection of tri-O-acetyl-D-ribofuranose*

A crude mixture (1 mmol) obtained by *general procedure D* was dissolved in MeOH/H_2O (7.75 mL, 20/1) and treated with Et_3N (1 mL). The solution was stirred 18 h at room temperature. The solvents were gently evaporated and the residue was co-evaporated with MeOH (3×20 mL). The resulting mixture was dissolved in MeOH (10 mL) and the triol precipitated at 0 °C. The solution was filtered and the residue was washed with MeOH (10 mL). Filtrate was evaporated and crystallization was performed twice.

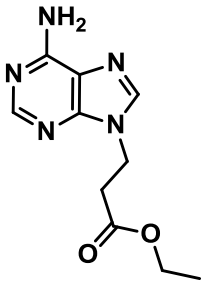
General procedure G*: Coupling of amino acid with fluorescent derivative*

Fluorescent derivative (1 eq), amino acid derivative (1.1 eq) and HBTU (1.1 eq), were suspended in CH_2Cl_2 (0.1 M), then DIEA (4–6 eq) was added dropwise at 0 °C and the reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solution was diluted with CH_2Cl_2 (50 mL/mmol) and washed three times with aqueous HCl solution (0.1 N, 20 mL/mmol). Aqueous layers were extracted twice with CH_2Cl_2 (50 mL/mmol), then the organic layers were pooled, dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The mixture was treated with aqueous LiOH solution (0.5 M, 1.2 eq)/THF (1/1) and stirred for 2 h at room temperature. The solution was evaporated and diluted with H_2O, then acidified to pH 2 with HCl (1 N). The precipitate was filtered and, when necessary, purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 95/5/0.1 to 85/15/1).

General procedure H*: Synthesis of 7-aminocoumarin moiety*

A 0.5 M solution of $ClTi(O\textit{i}Pr)_3$ (1.5 eq) in dry toluene was added to aminophenol (1 eq) and β-cetoester (1 eq) derivatives. The reaction mixture was refluxed overnight, then cooled to room temperature and diluted with CH_2Cl_2 (7.5 mL/mmol). The whole solution was poured into H_2O (10 mL/mmol) and stirred for few min. The aqueous layer was extracted twice with CH_2Cl_2 (2×30 mL/mmol). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4) and the solvent was removed in vacuo. The crude product was purified or used directly to another reaction as mentioned in each case.

9-(2-Ethoxycarbonylethyl)adenine (1)



$C_{10}H_{13}N_5O_2$

M.W. = 235.24 g.mol^{-1}

According to *general procedure A*, adenine (2.027 g, 15 mmol, 1 eq), DABCO (1.681 g, 15 mmol, 1 eq), TBAB (967 mg, 3 mmol, 0.2 eq) and ethyl acrylate (2.45 mL, 22.5 mmol, 1.5 eq) were submitted to irradiation for 8 min at 200 W. The reaction mixture was suspended in $CHCl_3$ (450 mL) and washed with H_2O (3×250 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated under reduced pressure to give **1** (2.753 g) as a white powder in 78% yield.

R_f = 0.4 (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1)

Melting point: 161–163 °C (lit. 164–166°C[321])

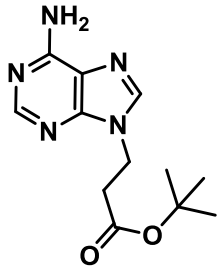
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 8.33 (s, 1H, H-2), 7.91 (s, 1H, H-8), 6.03 (s, 2H NH_2), 4.48 (t, *J* = 6.25 Hz, 2H, CH_2N), 4.10 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2CH_3), 2.90 (t, *J* = 6.25 Hz, 2H, CH_2CO), 0.84 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 170.5 (CO), 155.9 (C-6), 152.4 (C–2), 149.4 (C-4), 140.9 (C–8), 118.7 (C-5), 60.2 (CH_2CH_3), 39.0 (CH_2N), 34.9 (CH_2CO), 13.8 (CH_3).

IR (ν, cm^{-1}): 3290 (NH_2), 1718 (CO)

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 236.1 (100%)

9-(2-*tert*-Butoxycarbonylethyl)adenine (2)



$C_{12}H_{17}N_5O_2$

M.W. = 263.30 g.mol^{-1}

According to *general procedure A*, adenine (2.027 g, 15 mmol, 1 eq), DABCO (1.69 g, 15 mmol, 1 eq), TBAB (967 mg, 3 mmol, 0.2 eq) and *tert*-butyl acrylate (3.27 mL, 22.5 mmol, 1.5 eq) were submitted to irradiation for 8 min at 200 W. The reaction mixture was suspended in $CHCl_3$ (450 mL)

and washed with H_2O (3×250 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated under reduced pressure to give **2** (2.81 g) as a white powder in 71% yield.

R_f = 0.6 (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1)

Melting point: 182–184 °C (lit. 183–185 °C[322])

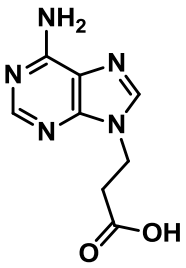
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 8.14 (s, 1H, H-2), 8.09 (s, 1H, H-8), 7.16 (s, 2H, NH_2), 4.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2N), 2.85 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2CO), 1.31 (s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 169.7 (CO), 155.9 (C-6), 152.3 (C-2), 149.4 (C-4), 140.9 (C-8), 118.7 (C-5), 80.4 (Cq-*t*Bu), 39.0 (CH_2N), 34.9 (CH_2CO), 27.8 (CH_3).

IR (ν, cm^{-1}): 3292 (NH_2), 1723 (CO)

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 264.0 (100%) ; HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{12}H_{17}N_5O_2+H]^+$: 264.1457; found: 264.1451

9-(2-Carboxyethyl)adenine (3)



$C_8H_9N_5O_2$

M.W. = 207.19 g.mol^{-1}

Compound **1** (235 mg, 1 mmol, 1 eq) in aqueous HCL solution (3 N, 18 mL) was refluxed for 4 h. The solution was cooled to 0 °C (ice bath) and the pH was adjusted to 3 with solid NaOH (≈ 3 g). The precipitate was recovered by filtration, washed with aqueous HCl solution (1 N, 3×15 mL) and then dried under reduced pressure for 48 h. Compound **3** (125 mg) was obtained as a white powder in 61% yield.

According to *general procedure A*, adenine (2.027 g, 15 mmol, 1 eq), DABCO (1.681 g, 15 mmol, 1 eq), TBAB (967 mg, 3 mmol, 0.2 eq) and acrylic acid (1.54 mL, 22.5 mmol, 1.5 eq) were submitted to irradiation for 8 min at 200 W. The reaction mixture was suspended in H_2O (50 mL) and filtered to remove the precipitate. The pH of the filtrate was adjusted to 3 with aqueous HCl solution (1 N). The precipitate was recovered by filtration and then dried under reduced pressure for 48 h. Compound **3** (2.17 g) was obtained as a white powder in 72% yield.

Compound **3** was also obtained by acidic hydrolysis of **2**. To **2** (263 mg, 1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) was added TFA (1 mL) and stirring was maintained for 2 h at room temperature. Evaporation of the solvents to dryness and precipation in Et_2O gave **3** (180 mg) in 87% yield.

R_f = 0.1 (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1)

Melting point: 284–286 C (lit. 284–288 °C[145])

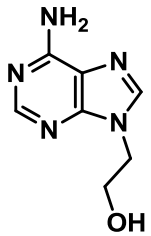
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 12.4 (brs, 1H, CO_2H), 8.13 (s, 1H, H-2), 8.08 (s, 1H, H-8), 7.20 (s, 2H, NH_2), 4.33 (t, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2N), 2.87 (t, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2CO).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 172.1 (CO), 155.8 (C-6_r), 152.2 (C-2), 149.4 (C-4), 142.9 (C-8), 120.6 (C-5_r), 40.1 (CH_2N), 35.5 (CH_2CO).

IR (ν, cm^{-1}): 3170 (NH_2), 3065 (OH), 1706 (CO)

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 208.1 (100%) ; HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_8H_9N_5O_2+H]^+$:208.0833; found: 208.0825

2-Hydroxyethyladenine (4)



$C_7H_9N_5O$

M.W. = 178.18 g.mol^{-1}

Adenine (6.79 g, 50 mmol, 1 eq) in DMF (40 mL), ethylcarbonate (4.44 g, 50 mmol, 1 eq) and NaOH (200 mg, 5 mmol, 0.1 eq) were heated to 140 °C for 20 h. After cooling the solution to room temperature, the precipitate was obtained by filtration and recrystallized in absolute ethanol. Compound **4** (7.78 g) was obtained as a white solid in 86.5% yield.

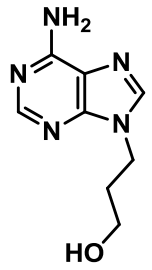
Melting point: 95–96 °C

R_f = 0.5 (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1)

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): *δ* 8.13, 8.06 (2s, 2H, H-2, H-8), 7.16 (s, 2H, NH_2), 5.0 (s, 1H, OH), 4.18 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH_2N), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH_2OH).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 180.1 (100%)

2-Hydroxypropyladenine (5)



$C_8H_{11}N_5O$

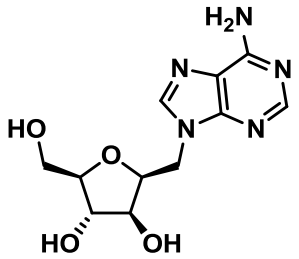
M.W. = 193.20 g.mol^{-1}

Adenine (1.41 g, 6 mmol, 1 eq) in THF (50 mL) was added dropwise over 5 h at 0 °C to a suspension of $LiAlH_4$ (480 mg, 12 mmol, 2 eq) in THF (50 mL). After being stirred at this temperature overnight, H_2O was added carefully and the reaction mixture was filtered, evaporated and purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 95/5). Compound **5** (973 mg) was obtained as a white solid in 84% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): *δ* 8.13, 8.07 (2s, 2H, H-2, H-8), 7.05 (s, 2H, NH_2), 4.64 (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.19 (t, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2N), 3.39 (q, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2O), 1.94 (quint, 2H, *J* = 6.5 Hz, 2H, $(CH_2)_2$).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 194.1 (100%)

1-(6-Amino-9*H*-purin-9-yl)-2,5-anhydro-1-deoxy-D-glucitol (6)



$C_{11}H_{15}N_5O_4$

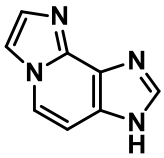
M.W. = 281.26 g.mol^{-1}

A suspension of adenine (246 mg, 1.54 mmol, 1 eq) and cesium carbonate (1.51 g, 4.62 mmol, 3 eq) in dry DMF (7.7 mL) was stirred for 2 h at room temperature. A solution of L-bis-epoxide (504.27 mg, 1.54 mmol, 1 eq) in dry DMF (7.7 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 15 h at 100 °C. After cooling to 0 °C, H_2O (10 mL) was added and the crude mixture was extracted with EtOAc (3x30 mL), and the combined organic layers were washed with brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated in vacuo. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1). Compound dibenzyl was obtained. A solution of boron trichloride in CH_2Cl_2 (1 M, 13.6 mmol, 9 eq) was added dropwise to a cooled solution of di-*O*-benzyl compound (695 mg, 1.50 mmol, 1 eq) in dry CH_2Cl_2 (86 mL) at 0 °C. The reaction mixture was stirred 2 h at 0 °C, then quenched by addition of MeOH (86 mL) and concentrated under vacuum. The residue was purified by chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 8/2). Compound **6** (390 mg) was obtained as a white solid in 52% yield.

Melting point: 185 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.30 (s, 1H, H_{Ar}-2), 7.58 (s, 1H, H_{Ar}-8), 5.70 (brs, 2H, NH_2), 4.44-4.36 (m, 2H, H-1, H-4), 4.26-4.17 (m, 3H, H-1', H-2, H-3), 3.94 (m, 1H, H-5), 3.77 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-6), 3.61 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.8 Hz, 1H, H-6').

3H-imidazo[1,2-i]purine (7)



$C_8H_6N_4$

M.W. = 158.16 g.mol^{-1}

From **adénine** (675 mg, 5 mmol) and chloroacetaldehyde (13.5 mL, 80 mmol), compound **7** (340 mg) was obtained as a white powder in 42% yield, according to *general procedure B.*

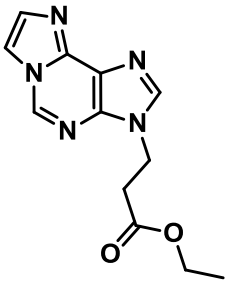
R_f = 0.42 (CH_2Cl_2/MeOH : 9/1)

Melting point: 131°C

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 160.1 (100%) ; $[2M+H]^+$ = 318.8 (25%) ; $[M+Na^+]$ = 182.1

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 13.64 (brs, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, H_2), 8.21 (s, 1H, H_8), 7.99 (d, *J* = 1.5Hz, 1H, $H_{6''}$), 7.55 (d, J = 1.5Hz 1H, $H_{6'}$)

3-(2-Ethoxycarbonylethyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine (8)



$C_{12}H_{13}N_5O_2$

M.W. = 259.26 g.mol^{-1}

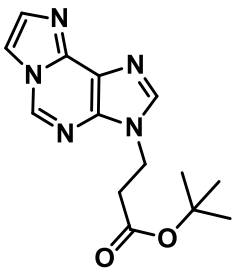
From **1** (110 mg, 0.465 mmol) and chloroacetaldehyde (2 mL, 12 mmol), compound **8** (90 mg) was obtained as a white powder in 75% yield, according to *general procedure B.*

R_f = 0.55 (CH_2Cl_2/MeOH: 95/5)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 8.83 (s, 1H, H-5), 8.04 (s, 1H, H-2), 7.69 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-7), 7.54 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-8), 4.56 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2N), 4.08 (q, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2CH_3), 2.92 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2CO), 1.17 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.7 (CO), 141.7 (C-2), 138.2 (Cq_{Ar}), 135.7 (C-5), 133.0 (C-8), 115.3 (Cq_{Ar}), 111.3 (C-7), 61.4 (CH_2CH_3), 40.4 (CH_2N), 34.6 (CH_2CO), 14.2 (CH_3).

3-(2-*tert*-Butoxycarbonylethyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine (9)



$C_{14}H_{17}N_5O_2$

M.W. = 287.32 g.mol^{-1}

From **2** (1.316 g, 5 mmol, 1 eq), chloroacetaldehyde (7.85 mL, 50 mmol, 10 eq), **9** (980 mg) was obtained as a white powder in 68% yield, according to *general procedure B.*

R_f = 0.3 (CH_2Cl_2/MeOH: 95/5)

Melting point: 169–171 °C

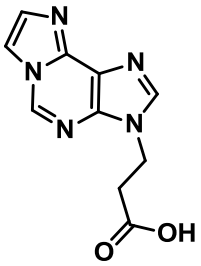
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 8.82 (s, 1H, H-5), 8.02 (s, 1H, H-2), 7.68 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-7), 7.57 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-8), 4.52 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2N), 2.82 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2CO), 1.34 (s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 169.6 (CO), 141.2 (C-2), 140.6 (Cq_{Ar}), 136.6 (C-5), 132.5 (C-8), 122.6 (Cq_{Ar}), 111.9 (C-7), 80.4 (Cq-*t*Bu), 40.2 (CH_2N), 35.0 (CH_2CO), 27.5 (CH_3).

IR (ν, cm^{-1}): 1726 (CO)

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 288.0 (100%) ; HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{14}H_{17}N_5O_2+H]^+$: 288.1457; found: 288.1456

3-(2-Carboxyethyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine (10)



$C_{10}H_9N_5O_2$

M.W. = 231.21 g.mol^{-1}

From **3** (125 mg, 0.6 mmol), chloroacetaldehyde (2.4 mL, 30 mmol), compound **10** (72 mg) was obtained as a white powder in 52% yield, according to *general procedure B.*

Compound **10** was also obtained by acidic hydrolysis of **9**. To compound **9** (263 mg, 1 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (4 mL) was added TFA (1 mL) and stirring was maintained for 2 h at room temperature. Evaporation of the solvents to dryness and precipitation in Et_2O gave **10** (180 mg) in 87% yield.

R_f = 0.15 (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 95/5/1)

Melting point: 238–240 °C

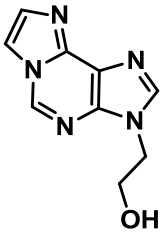
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9.67 (s, 1H, H-5), 8.66 (s, 1H, H-2), 8.48 (s, 1H, H-7), 8.06 (s, 1H, H-8), 4.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2N), 2.98 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH_2CO).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 171.7 (CO), 144.7 (C-2), 142.5 (Cq_{Ar}), 137.4 (C-5), 123.5 (C-8), 118.9 (Cq_{Ar}), 114.1 (C-7), 40.5 (CH_2N), 33.7 (CH_2CO).

IR (ν, cm^{-1}): 3015 (OH), 1728 (CO)

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 232.1 (100%) ; HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{10}H_9N_5O_2+H]^+$: 232.0833; found: 232.0826

3-(2-Hydroxyethyl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine (11)



$C_9H_9N_5O$

M.W. = 203.20 g.mol^{-1}

From **5** (896 mg, 5 mmol), chloroacetaldehyde (4.7 mL, 30 mmol), compound **11** (570 mg) was obtained as a white powder in 54% yield, according to *general procedure B.*

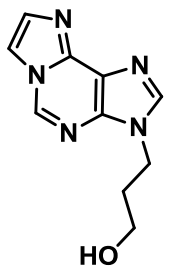
Melting point: 200–202 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 9.26 (s, 1H, H-5), 8.66 (s, 1H, H-2), 8.24 (s, 1H, H-7), 7.54 (s, 1H, H-8), 5.02, (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.34 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2N), 3.82 (q, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 141.6 (C-2), 140.8 (Cq_{Ar}), 136.5 (C-5), 132.5 (C-8), 122.5 (Cq_{Ar}), 111.8 (C-7), 59.4 (CH_2O), 46.3 (CH_2N).

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 204.1 (100%)

3-(2-Hydroxypropryl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine (12)



$C_{10}H_{11}N_5O$

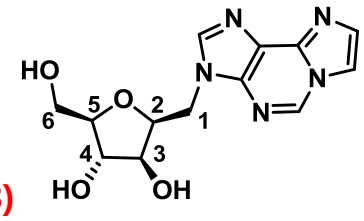
M.W. = 217.22 g.mol^{-1}

From **4** (784 mg, 4 mmol), chloroacetaldehyde (2.7 mL, 17 mmol), compound **12** (685 mg) was obtained as a white powder in 78% yield, according to *general procedure B.*

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 9.18 (s, 1H, H-5), 8.55 (s, 1H, H-2), 8.20 (s, 1H, H-7), 7.49 (s, 1H, H-8), 4.95, (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.24 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2N), 3.80 (q, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2OH), 2.05 (t, *J* = 5 Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2$)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 141.6 (C-2), 140.8 (Cq_{Ar}), 136.5 (C-5), 132.5 (C-8), 122.5 (Cq_{Ar}), 111.8 (C-7), 59.4 (CH_2O), 46.3 (CH_2N), 30.8 ($CH_2CH_2CH_2$)

3-(2,5-anhydro-1-deoxy-D-glucitol)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purine



(13)

$C_{13}H_{15}N_5O_4$

M.W. = 305.29 g.mol^{-1}

From 1-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-2,5-anhydro-1-deoxy-D-glucitol (1.250 g, 4.28 mmol, 1 eq) and chloroacetaldehyde (2 M, 5 mL), **13** (1.014 g) was obtained as a white powder in 78% yield, according to *general procedure C.*

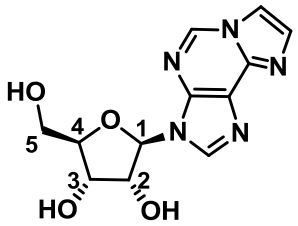
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 9.29 (s, 1H, H_{Ar}-5), 8.28 (s, 1H, H_{Ar}-2), 8.08 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}-7), 7.53 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}-8), 5.51 (d, *J* = 4 Hz, 1H, OH), 5.29 (brs, 1H, OH), 4.98 (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.52 (dd, *J* = 14 Hz, *J* = 3 Hz, 1H, H-1), 4.36 (dd, *J* = 14 Hz, *J* = 8.5 Hz, H-1'), 4.30 (m, 1H, H-2), 3.93 (brs, 2H, H-3, H-4), 3.60 (m, 1H, H-5), 3.52 (m, 2H, H-6).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 141.7 (CH_{Ar}), 140.7, 138.7 (Cq_{Ar}), 136.7, 132.6 (CH_{Ar}), 122.5 (Cq_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 86.0 (C-5), 78.4 (C-2), 77.8 (C-3), 76.5 (C-4), 61.7 (C-6), 44.1 (C-1).

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 306.1 (60%) ; $[2M+Na]^+$ = 633.0 (100%)

λ max (ex/em): ≤300/415 nm

Etheno-adenosine (14)



$C_{12}H_{13}N_5O_4$

M.W. = 291.26 g.mol^{-1}

From adenosine (1.960 g, 7.33 mmol, 1 eq) and chloroacetaldehyde (2 M, 5.5 mL), compound **14** (1.370 g) was obtained as a white powder in 64% yield, according to *general procedure C.*

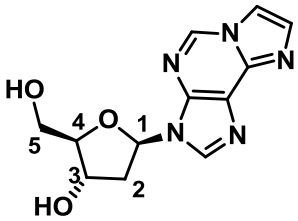
Melting point: 129–130 °C

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): δ 9.30 (s, 1H, H_{Ar}-5), 8.57 (s, 1H, H_{Ar}-2), 8.08 (s, 1H, H_{Ar}-7), 7.56 (s, 1H, H_{Ar}-8), 6.06 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-1), 5.54 (d, *J* = 6 Hz, 1H, OH), 5.24 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-2), 5.07 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.58 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-3), 4.18 (m, 1H, OH), 3.98 (m, 1H, H-4), 3.74-3.54 (m, 2H, H-5).

Mass spectrometry: (ESI^-), m/z (%): $[M+Cl]^-$ = 326.1 (100%); HRMS (ESI^-) calcd for $[C_{12}H_{13}N_5O_4-H]^-$: 292.0667; found: 292.1053

λ max (ex/em): ≤300/415 nm

Etheno-2-deoxy-adenosine (15)



$C_{12}H_{13}N_5O_3$

M.W. = 275.26 g.mol^{-1}

From 2-deoxy-adenosine (1 g, 3.71 mmol, 1 eq) and chloroacetaldehyde (2 M, 2.5 mL), compound **15** (2.071 g) was obtained as a white powder in 95% yield, according to *general procedure C.*

Melting point: 78–79 °C

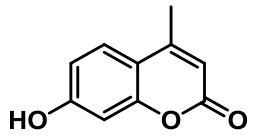
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 9.30 (s, 1H, H_{Ar}-5), 8.52 (s, 1H, H_{Ar}-2), 8.08 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}-7), 7.55 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H_{Ar}-8), 6.49 (t, *J* = 7 Hz, 1H, H-1), 5.39 (d, *J* = 4 Hz, 1H, OH), 4.98 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, OH), 4.44 (m, 1H, H-3), 3.89 (m, 1H, H-4), 3.64-3.55 (m, 2H, H-5), 2.72 (m, 1H, H-2), 2.38 (m, 1H, H-2').

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 140.5 (Cq_{Ar}), 139.5 (CH_{Ar}), 138.0 (Cq_{Ar}), 136.9), 132.7 (CH_{Ar}), 123.0 (Cq_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 87.9 (C-4), 83.8 (C-1), 70.6 (C-3), 61.6 (C-5), 48.5 (C-2).

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{12}H_{13}N_5O_3\text{-}H]^-$: 274.0945; found: 274.0961

λ max (ex/em): ≤300/415 nm

4-Methyl-7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (16)



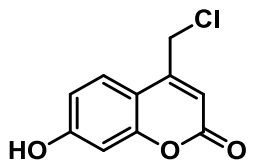
$C_{10}H_8O_3$

M.W. = 176.17 g.mol^{-1}

Resorcinol (5 g, 45.5 mmol, 1.05 eq) was added to aqueous H_2SO_4 solution (70%, 50 mL). The reaction mixture was stirred for 10 min at 0 °C. Ethyl acetoacetate (5.523 mL, 43.3 mmol, 1 eq) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 1.5 h at 0 °C. The mixture was poured onto ice-water (500 mL). The precipitate was filtered and recrystallized in EtOH/pentane (2/1). Compound **16** (6.19 g) was obtained as a white solid in 81% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): *δ* 10.51 (brs, 1H, OH), 7.56 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.80 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.69 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.10 (s, 1H, H_{Ar}), 2.35 (s, 3H, CH_3).

4-(Chloromethyl)-7-hydroxy-2*H*-chromen-2-one (17)



$C_{10}H_7ClO_3$

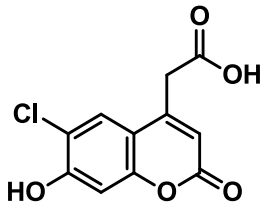
M.W. = 210.61 g.mol^{-1}

Resorcinol (10 g, 91 mmol, 1.25 eq) was added to aqueous H_2SO_4 solution (70%, 100 mL). The reaction mixture was stirred for 10 min at 0 °C. Chloroacetoacetate (10 mL, 74 mmol, 1 eq) was added dropwise then the reaction mixture was stirred for 1.5 h at 0 °C. The mixture was poured onto ice-water (1 L). The precipitate was filtered and recrystallized in EtOH/pentane (2/1). Compound **17** (18.24 g) was obtained as a white solid in 97% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, acetone-d_6): *δ* 7.73 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.90 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.79 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.40 (s, 1H, H_{Ar}), 4.91 (s, 2H, CH_2).

Mass spectrometry: ESI, m/z (%): $[M+H]^+$ = 211.0 (100%) ; $[2M+Na]^+$ = 442.6 (30%)

4-acetic-6-chloro-7-hydroxycoumarin acid (18)



$C_{11}H_7ClO_5$

M.W. = 254.62 g.mol^{-1}

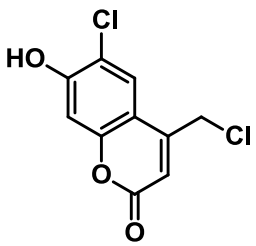
4-Chlororesorcinol (1.446 g, 10 mmol, 1. eq) in aqueous H_2SO_4 solution (80%, 100 mL) was stirred for 10 min at 0 °C. Dimethyl-3-oxopentandioate (1.470 mL, 10 mmol, 1 eq) was added dropwise, and the reaction mixture was stirred for 1 h at 0 °C, then overnight at room temperature. The mixture was poured onto ice-water (300 mL) and stirred for 30 min. The precipitate was filtered and dried (≈ 2 g) then dissolved in MeOH (25 mL) and aqueous NaOH solution (1 N, 25 mL) and stirred overnight at room temperature The pH warmed up to 2 with aqueous HCl solution (2 N), concentrated under vacuum and the resulting precipitate was recovered by filtration and washed with HCl solution (0.1 N). Compound **18** (1.170 g) was obtained as a white powder in 46% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12.81 (brs, 1H, CO_2H), 11.45 (brs, 1H, OH), 7.71 (s, 1H, H_{Ar}), 6.91 (s, 1H, H_{Ar}), 6.29 (s, 1H, H_{Ar}), 3.86 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.5 (CO_2H), 159.7 (C=O), 156.3 (Cq_{Ar}-OH), 153.2 (Cq_{Ar}-O), 149.4 (Cq_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 116.9 (Cq_{Ar}-Cl), 113.1 (CH_{Ar}), 112.1(Cq_{Ar}), 103.4 (CH_{Ar}), 37.1 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI^-), m/z (%): $[M-CO_2H]^-$ = 209.1 (100%), 211.2 (25%) ; $[2M-H]^-$ = 506.7 (90%), 508.6 (40%) ; $[M-H]^-$ = 252.9 (25%), 255.0 (10%)

4-chloromethyl-6-chloro-7-hydroxycoumarin (19)



$C_{10}H_6Cl_2O_3$

M.W. = 245.06 g.mol^{-1}

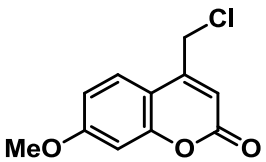
4-Chlororesorcinol (1.446 g, 10 mmol, 1 eq) in concentrated H_2SO_4 solution (50 mL) was stirred for 10 min at 0 °C, then 4-chloroacetoacetate (1.358 mL, 10 mmol, 1 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred 1 h at 0 °C and 5 h at room temperature, then poured onto ice-water (300 mL) and stirred for further 30 min. The resulting precipitate was filtered, washed with aqueous HCl solution (0.1 N) and dried under vacuum. Compound **19** (170 mg) was obtained as a white powder in 7% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.86 (s, 1H, H_{Ar}), 6.94 (s, 1H, H_{Ar}), 6.48 (s, 1H, H_{Ar}), 4.98 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 159.7 (C=O), 156.6 (Cq_{Ar}-O), 153.5 (Cq_{Ar}-OH), 150.2 (Cq_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 117.1 (Cq_{Ar}-Cl), 112.2 (CH_{Ar}), 110.1(Cq_{Ar}), 103.6 (CH_{Ar}), 41.2 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 243.1 (100%) ; $[M-H]^-$ = 245.1 (70%)

4-Chloromethyl-7-methoxycoumarin (20)



$C_{11}H_9ClO_3$

M.W. = 224.64 g.mol^{-1}

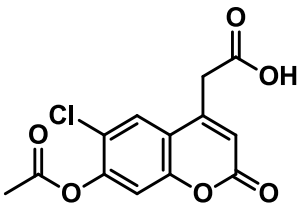
Compound **3098** (1.050 g, 5 mmol, 1eq) and K_2CO_3 (3.455 g, 25 mmol, 5 eq) were suspended in dry acetone (50 mL) and Me_2SO_4 (495 µL, 5.25 mmol, 1.05 eq) was added dropwise. The solution was stirred overnight at room temperature, then quenched by addition of H_2O (50 mL) and extracted with EtOAc (3×100 mL). The organic layers were dried, filtered and evaporated under vacuum. Compound **20** (1.058 g) was obtained as a white solid in 94% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.77 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.01 (m, 2H, H_{Ar}), 6.49 (s, 1H, H_{Ar}), 4.98 (s, 2H, CH_2), 3.86 (s, 3H, OCH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 162.6 (C=O), 159.9 (Cq_{Ar}-OMe), 155.2, 150.8 (Cq_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 112.3 (Cq_{Ar}), 112.0, 110.4, 101.0 (CH_{Ar}), 55.9 (CH_3), 41.3 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 225.1 (30%), 227.1 (10%) ; $[M+Na]^+$ = 246.9 (100%), 248.9 (30%)

4-acetic-6-chloro-7-acetoxycoumarin acid (21)



$C_{13}H_9ClO_6$

M.W. = 296.66 g.mol^{-1}

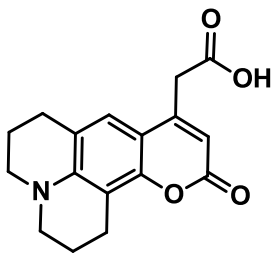
Compound **3132** (700 mg, 3 mmol, 1eq) was dissolved in anhydride acetic (12 mL) and $BF_3{\cdot}Et_2O$ (48%, 120 µL) was added. The solution was stirred for 10 min at room temperature and H_2O (100 mL) was added and the resulting mixture was stirred for further 20 min. The white precipitate was filtered, washed with aqueous HCl solution (0.1 N) and dried under vacuum. Compound **21** (390 mg) was obtained in 44% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.97 (s, 1H, H_{Ar}), 7.54 (s, 1H, H_{Ar}), 6.57 (s, 1H, H_{Ar}), 3.98 (s, 2H, CH_2), 2.37 (CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.3 (CO_2H), 167.9 (COMe), 159.0 (C=O), 152.2 (Cq_{Ar}-OAc), 148.8 (Cq_{Ar}-O), 148.7 (Cq_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.9 (Cq_{Ar}), 118.4 (Cq_{Ar}-Cl), 116.8, 106.0 (CH_{Ar}), 36.9 (CH_2), 20.3 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[2M-H]^-$ = 590.7 (100%), 592.7 (60%) ; $[M-CO_2H]^-$ = 251.1 (50%), 253.2 (15%)

(10-Oxo-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3a-aza-benzo[*de*]anthracen-8-yl)-acetic acid (22)



$C_{17}H_{17}NO_4$

M.W. = 299.32 g.mol^{-1}

From $ClTi(O\textit{i}Pr)_3$ (2.262 mL, 6.75 mmol, 1.5 eq) in toluene (9 mL), 8-hydroxyjulodin (851 mg, 4.5 mmol, 1 eq) and dimethyl 3-oxopentanedioate (681 µL, 4.5 mmol, 1 eq), compound methylester was obtained, according to *general procedure H.* Compound methylester was dissolved in MeOH (15 mL) and aqueous NaOH solution (1 N) (15 mL) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The pH was adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N) and the resulting precipitate was recovered by filtration and washed with aqueous HCl solution (0.1 N, 30 mL). Compound **22** (890 mg) was obtained as a yellow powder in 66% yield.

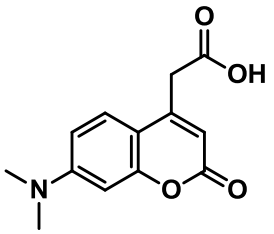
Melting point: 186–187 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12.67 (brs, 1H, CO_2H), 7.05 (s, 1H, H_{Ar}), 5.94 (s, 1H, H_{Ar}), 3.71 (s, 2H, CH_2CO_2H), 3.24 (m, 4H, CH_2-N), 2.71 (m, 4H, CH_2-Ar), 1.88 (m, 4H, CH_2-CH_2-CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.8 (CO_2H), 160.7 (C=O), 150.7, 150.1, 145.5 (Cq_{Ar}), 122.0 (CH_{Ar}), 117.7 (Cq_{Ar}), 108.3 (CH_{Ar}), 107.4, 105.6 (Cq_{Ar}), 49.2, 48.6 (CH_2-N), 37.2 (CH_2CO_2H), 27.0, 20.9, 20.0, 19.9 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 300.1 (80%) ; $[2M+Na]^+$ = 621.1 (100%)

4-Acetic-7-dimethylaminocoumarin acid (23)



$C_{13}H_{13}NO_4$

M.W. = 247.25 g.mol^{-1}

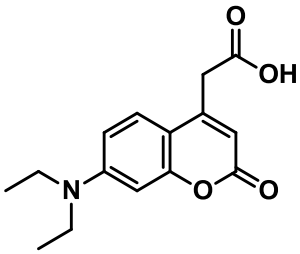
The *general procedure H* was followed using, ClTi(O*i*Pr)$_3$ (1.791 mL, 7.5 mmol, 1.5 eq) in toluene (12 mL), 3-dimethylaminophenol (685 mg, 5 mmol, 1 eq) and dimethyl 3-oxopentanedioate (1.791 mL, 5 mmol, 1 eq). The crude product was dissolved in MeOH (12.5 mL) and in aqueous NaOH solution (1 N, 12.5 mL) and stirred overnight at room temperature. The solution was acidified to pH 5 with aqueous HCl solution (2 N) and the resulting precipitate was recovered by filtration, washed with HCl (0.1 N) and dried under vacuum. Compound **23** (487 mg) was obtained as a green-yellow powder in 40% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.47 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.72 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.56 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.05 (s, 1H, H_{Ar}), 3.77 (s, 2H, CH_2), 3.01 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 170.7 (CO_2H), 160.6 (C=O), 155.4 (Cq_{Ar}-O), 152.8 (Cq_{Ar}), 150.2 (Cq_{Ar}-N), 126.0, 109.6, 109.1 (CH_{Ar}), 108.0 (Cq_{Ar}), 97.5 (CH_{Ar}), 40.1 (2×NCH_3), 37.2 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 248.3 (100%) ; $[2M+Na]^+$ = 517.0 (80%)

4-Acetic-7-diethylaminocoumarin acid (24)



$C_{15}H_{17}NO_4$

M.W. = 275.30 g.mol^{-1}

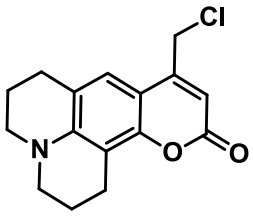
The *general procedure H* was followed using, ClTi(O*i*Pr)$_3$ (3.582 mL, 15 mmol, 1.5 eq) in toluene (25 mL), 3-diethylaminophenol (1.652 g, 10 mmol, 1 eq) and dimethyl 3-oxopentanedioate (1.470 mL, 10 mmol, 1 eq). The crude product was dissolved in MeOH (25 mL) and in aqueous NaOH solution (1 N, 25 mL), then stirred overnight at room temperature. The solution was acidified to pH 5 with aqueous HCl solution (2 N) and the resulting precipitate was recovered by filtration, washed with HCl (0.1 N) and dried under vacuum. Compound **24** (947 mg) was obtained as a green powder in 35% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.44 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.69 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.51 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.99 (s, 1H, H_{Ar}), 3.75 (s, 2H, CH_2CO_2H), 3.41 (q, *J* = 7 Hz, 4H, NCH_2), 1.11 (t, *J* = 7 Hz, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.7 (CO_2H), 160.7 (C=O), 155.8 (Cq_{Ar}-O), 150.4 (Cq_{Ar}), 150.1 (Cq_{Ar}-N), 126.3, 109.1, 108.7 (CH_{Ar}), 107.6 (Cq_{Ar}), 96.8 (CH_{Ar}), 44.0 (2×NCH_2), 37.2 (CH_2CO_2H), 12.3 (2×CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 276.3 (100%) ; $[2M+Na]^+$ = 573.0 (85%) ; $[2M+H]^+$ = 550.9 (70%)

8-Chloromethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3a-aza-benzo[*de*]anthracen-10-one (25)



$C_{16}H_{16}ClNO_2$

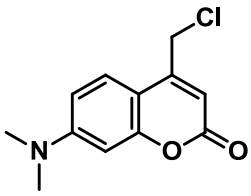
M.W. = 299.32 g.mol^{-1}

The *general procedure H* was followed using, $ClTi(OiPr)_3$ (954 µL, 4 mmol, 2 eq) in toluene (4 mL), 8-hydroxyjulodin (358 mg, 2 mmol, 1 eq) and 4-chloroacetoacetate (272 µL, 2 mmol, 1 eq). The reaction mixture was purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 7/3). Compound **3097** (340 mg) was obtained as a yellow powder in 59% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.19 (s, 1H, H_{Ar}), 6.13 (s, 1H, H_{Ar}), 4.85 (s, 2H, CH_2Cl), 3.24 (q, *J* = 5 Hz, *J* = 6.25 Hz, 4H, CH_2-N), 2.72 (t, *J* = 6.25 Hz, 4H, CH_2-Ar), 1.88 (m, 4H, CH_2-CH_2-CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 290.1 (100%) ; 292.1 (30%) ; $[M+Na]^+$ = 312.1 (30%) ; 314.2 (10%)

4-Chloromethyl-7-dimethylaminocoumarin (26)



$C_{12}H_{12}ClNO_2$

M.W. = 237.68 g.mol^{-1}

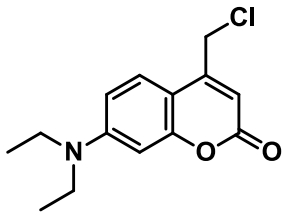
The *general procedure H* was followed using, $ClTi(OiPr)_3$ (2.865 mL, 12 mmol, 1.2 eq) in toluene (25 mL), 3-dimethylaminophenol (1.372 g, 10 mmol, 1 eq) and 4-chloroacetoacetate (1.358 mL, 10 mmol, 1 eq). The crude product was placed in a minimum of EtOH and the resulting precipitate was recovered by filtration and dried under vacuum. Compound **26** (657 mg) was obtained as a yellow powder in 28% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.76 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.57 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, H_{Ar}), 4.91 (s, 2H, CH_2), 3.03 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 160.5 (C=O), 155.6 (Cq_{Ar}-O), 152.9 (Cq_{Ar}), 151.1 (Cq_{Ar}-N), 125.8, 109.1, 108.5 (CH_{Ar}), 106.0 (Cq_{Ar}), 97.5 (CH_{Ar}), 41.4 (CH_2), 40.1 (2×NCH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 238.1 (100%), 240.1 (40%)

4-chloromethyl-7-diethylaminocoumarin (27)



$C_{14}H_{16}ClNO_2$

M.W. = 265.73 g.mol^{-1}

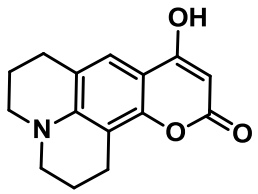
The *general procedure H* was followed using, $ClTi(O\textit{i}Pr)_3$ (2.865 mL, 12 mmol, 1.2 eq) in dry toluene (25 mL), 3-diethylaminophenol (1.652 g, 10 mmol, 1 eq) and 4-chloroacetoacetate (1.358 mL, 10 mmol, 1 eq). The crude product was placed in a minimum of EtOH and the resulting precipitate was recovered by filtration and dried under vacuum. Compound **27** (1.640 mg) was obtained as a brown powder in 61% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.57 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.73 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.19 (s, 1H, H_{Ar}), 4.92 (s, 2H, CH_2Cl), 3.42 (q, *J* = 6.5 Hz, 4H, CH_2CH_3), 1.12 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, CH_2CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 160.6 (C=O), 156.0 (Cq_{Ar}-O), 150.9 (Cq_{Ar}), 150.5 (Cq_{Ar}-N), 126.1, 108.7, 108.4 (CH_{Ar}), 105.5 (Cq_{Ar}), 96.8 (CH_{Ar}), 43.9 (2×NCH_2), 41.3 (CH_2Cl), 12.3 (2×CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 266.2 (100%), 268.2 (30%)

1*H*,5*H*,11*H*-[1]Benzopyrano[6,7,8]quinolizin-11-one, 2,3,6,7-tetrahydro-9-hydroxy (28)



$C_{15}H_{15}NO_3$

M.W. = 257.28 g.mol^{-1}

Malonic acid (1.04 g, 10 mmol, 1 eq) and 2,4,6-trichloro-phenol (2.962 g, 15 mmol, 1.5 eq) were added to phosphorus oxychloride (4.66 mL, 50 mmol, 5 eq), then the reaction mixture was refluxed for 4 h. This solution was cooled to 0 °C and H_2O (40 mL) was added. The precipitate was filtered and

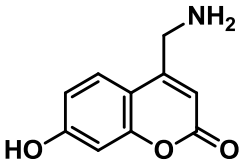
washed with water (3×30 mL) to lead to bis-(2,4-dichlorophenyl)malonate as a gray solid (4.2 g), which was used in the next step without further purification. 8-Hydroxyjulolidine (567 mg, 3 mmol, 1 eq) and the crude bis-(2,4-dichlorophenyl)malonate (1.640 g, 3.6 mmol, 1.2 eq) were dissolved in dry toluene (12 mL) and the reaction mixture was refluxed for 2 h. The light brown suspension was cooled to room temperature, filtered, and the solids were washed with hexane (3×30 mL) and acetone (30 mL) to afford compound **28** (640 mg) as a green solid in 50% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 11.75 (brs, 1H, OH), 7.14 (s, 1H, H_{Ar}), 5.21 (s, 1H, H_{Ar}), 3.22 (m, 4H, CH_2-N), 2.69 (m, 4H, CH_2-Ar), 1.86 (m, 4H, CH_2-C*H*$_2$-CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 166.5 (Cq_{Ar}-OH), 162.8 (C=O), 151.0, 146.0 (Cq_{Ar}), 119.8 (CH_{Ar}), 117.3, 105.4, 103.0 (Cq_{Ar}), 85.8 (CH_{Ar}), 49.2, 48.7, 26.9, 21.0, 20.1, 20.0 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 258.1 (100%)

4-aminomethyl-7-hydroxycoumarin (29)



$C_{10}H_9NO_3$

M.W. = 191.18 g.mol^{-1}

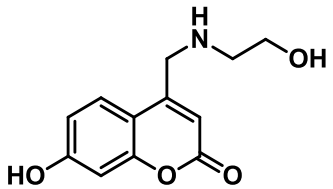
17 (2.106 g, 10 mmol) in concentrated NH_4OH (150 mL) was stirred for 1 h at 50 °C. Aqueous HCl solution (2 N) was then carefully added until pH 2 and the precipitate was filtered. The filtrate was gently neutralized with aqueous NaOH solution (2 N). The resulting precipitate was isolated by filtration and dried under vacuum to afford compound **29** (1.797 g) as a yellow powder in 94% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.58 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.82 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.76 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.30 (s, 1H, H_{Ar}), 3.95 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 161.2 (C=O), 160.8 (Cq_{Ar}-OH), 156.3 (Cq_{Ar}-O), 154.9 (Cq_{Ar}), 125.6 (CH_{Ar}), 113.0 (Cq_{Ar}), 110.2, 107.7, 102.4 (CH_{Ar}), 40.7 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 192.2 (100%)

7-Hydroxy-4-((2-hydroxyethylamino)methyl)-2H-chromen-2-one (30)



$C_{12}H_{13}NO_4$

M.W. = 235.24 g.mol^{-1}

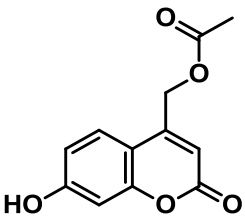
A solution of **17** (1.5 g, 7.15 mmol, 1 eq) in MeOH (40 mL) was added to aqueous $NaHCO_3$ solution (0.3 N, 20 mL) and ethanolamine (453 µL, 7.5 mmol, 1.05 eq). The reaction was stirred overnight at room temperature then solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was diluted in MeOH (50 mL) with silica gel for solid deposit and evaporated under vaccum. The product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH: 100/0 to 90/10). After evaporation, compound **30** (239 mg) was obtained by recristallization into EtOH, as a white powder in 13.5% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, MeOD): *δ* 7.57 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.77 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.64 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.28 (s, 1H, H_{Ar}), 3.95 (s, 2H, CH_2-Ar), 3.72 (t, *J* = 5.25 Hz, 2H, CH_2N), 2.83 (t, *J* = 5.25 Hz, 2H, CH_2O).

^{13}C NMR (63 MHz, MeOD): *δ* 164.0 (C=O), 163.0 (Cq_{Ar}-OH), 156.7, 156.4 (Cq_{Ar}), 126.7 (CH_{Ar}), 114.5 (Cq_{Ar}), 112.2, 109.6, 103.7 (CH_{Ar}), 61.9 (CH_2-OH), 61.6 (CH_2-Ar), 52.4 (CH_2-N).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 234.1 (100%)

(7-Hydroxy-4-methylacetic)-coumarin acid (31)



$C_{12}H_{10}NO_5$

M.W. = 234.20 g.mol^{-1}

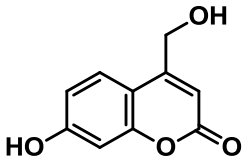
Compound **17** (1.575 g, 7.5 mmol, 1 eq), KOAc (883 mg, 9 mmol, 1.2 eq) and TBAB (catalytic amount) were added in dry DMF (6 mL). The solution was heated to 50 °C for 1 h and stirred overnight at room temperature. Water (45 mL) was added and the resulting precipitate was recovered by filtration, washed with Et_2O (2×50 mL) and dried. Compound **31** (1.120 g) was obtained as a white powder in 64% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.58 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.81 (dd, *J* = 8.75 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.20 (s, 1H, H_{Ar}), 5.31 (s, 2H, CH_2), 2.18 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 170.0 (CH_3CO), 161.4 (Cq_{Ar}-OH), 160.1 (C=O), 155.0 (Cq_{Ar}-O), 150.6 (Cq_{Ar}-CH_2), 125.9 (CH_{Ar}), 113.1 (Cq_{Ar}), 109.1, 108.0, 102.4 (CH_{Ar}), 61.1 (CH_2), 20.5 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 233.2 (100%) ; $[2M-H]^-$ = 466.9 (50%)

7-Hydroxy-4-methylhydroxycoumarin (32)



$C_{10}H_8O_4$

M.W. = 192.17 g.mol^{-1}

Compound **31** (562 mg, 2.4 mmol, 1 eq) and K_2CO_3 (364 mg, 2.65 mmol, 1.1 eq) in MeOH (25 mL) were heated overnight to 35 °C. After cooling to room temperature, the solution was diluted with THF (100 mL) and dried with Na_2SO_4. The solid was filtered and filtrate was evaporated under vacuum. Water (20 mL) was added and acidified to pH 5 with aqueous HCl solution (1 N) and the resulting precipitate was recovered by filtration and dried under vacuum. Compound **32** (230 mg) was obtained as a white solid in 50% yield.

Compound **17** (3.430 g, 16.3 mmol) was suspended in H_2O (600 mL) and refluxed for 48 h. After cooling to room temperature, the solvent was evaporated and the residue was taken up into a minimum of H_2O. The resulting precipitate was recovered by filtration to give compound **32** (2.145 g) as a white solid in 69% yield.

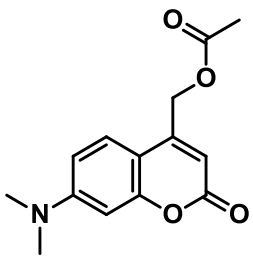
Melting point: 225–226 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 10.50 (s, 1H, OH), 7.52 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.77 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.72 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, H_{Ar}), 4.69 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 160.9 (C=O), 160.6 (Cq_{Ar}-OH), 156.7, 154.8 (Cq_{Ar}), 125.4 (CH_{Ar}), 112.8 (Cq_{Ar}), 109.5, 106.5, 102.2 (CH_{Ar}), 59.0 (CH_2), 20.5 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 191.0 (100%)

4-Acetoxymethyl-7-dimethylaminocoumarin (33)



$C_{14}H_{15}NO_4$

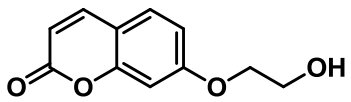
M.W. = 261.27 g.mol^{-1}

Compound **26** (379 mg, 1.6 mmol, 1 eq), KOAc (314 mg, 3.2 mmol, 2 eq) and TBAB (catalytic amount) was added in dry DMF (3 mL). The solution was heated to 50 °C for 1 h and stirred overnight at room temperature. Water (25 mL) was then added and the resulting precipitate was recovered by filtration, washed with Et_2O (2×50 mL) and dried under vacuum. Compound **33** (370 mg) was obtained as a yellow powder in 88% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): *δ* 7.51 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.73 (dd, *J* = 8.75 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.58 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.03 (s, 1H, H_{Ar}), 5.28 (s, 2H, CH_2), 3.02 (s, 6H, $N(CH_3)_2$), 2.17 (s, 3H, CH_3).

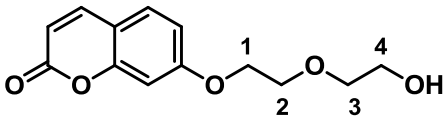
Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 262.2 (100%)

7-(2-Hydroxyethoxy)-2H-chromen-2-one (34-a) and 7-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)-2H-chromen-2-one (34-b)



34-a

$C_{11}H_{10}O_4$
M.W. = 206.19 g.mol^{-1}



34-b

$C_{13}H_{14}O_5$
M.W. = 250.25 g.mol^{-1}

K_2CO_3 (1.520 g, 11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of 7-hydroxycoumarin (1.621 g, 10 mmol, 1 eq) and ethyl carbonate (1.761 g, 20 mmol, 2 eq) in DMF (40 mL), then the reaction mixture was refluxed for 5 h. After cooling to room temperature, the solution was diluted with H_2O (50 mL) and extracted with EtOAc (2×150 mL). The organic layers were successively washed with 10% aqueous NaOH solution (200 mL), H_2O (2×200 mL), then dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to give compound **34-a** (630 mg) as a white powder in 30.5% yield and compound **34-b** (40 mg) as a white crystal in 2% yield.

Compound 34-a:

Melting point: 88–89 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.97 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.61 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.96 (m, 2H, H_{Ar}), 6.28 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.90 (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.09 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2-O-Ar), 3.74 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2-OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 161.9 (C=O), 160.3 ($Cq_{Ar}O$), 155.4 ($Cq_{Ar}O$), 144.3, 129.4, 112.7, 112.4 (CH_{Ar}), 112.3 (Cq_{Ar}), 101.2 (CH_{Ar}), 70.3 (CH_2O), 59.3 (CH_2-OH).

Mass spectrometry: (ESI^-), m/z (%): $[M-H]^-$ = 207.1 (100%)

Elemental analysis: found (calcd), % C 63.88 (64.07) ; % O 30.91 (31.04) ; % H 4.85 (4.89)

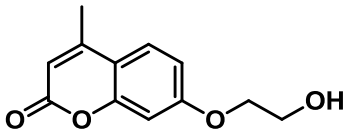
Compound 34-b:

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 7.59 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.83 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.78 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.21 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.16 (t, *J* = 5 Hz, 2H, H-1), 3.86 (t, *J* = 5 Hz, 2H, H-2), 3.74 (t, *J* = 5 Hz, 2H, H-3) 3.64 (t, *J* = 5 Hz, 2H, H-4).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 162.0 (C=O), 161.3 (Cq_{Ar}-O), 156.0 (Cq_{Ar}), 143.5, 129.0, 113.4, 113.1 (CH_{Ar}), 113.0 (Cq_{Ar}), 101.7 (CH_{Ar}), 72.9 (CH_2-1), 69.5 (CH_2-2), 68.1 (CH_2-3), 61.9 (CH_2-4).

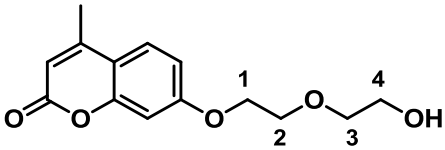
Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 207.1 (100%)

7-(2-Hydroxyethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (35-a) and 7-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)-4-methyl-2H-chromen-2-one (35-b)



35-a

$C_{12}H_{12}O_4$
M.W. = 220.22 g.mol^{-1}



35-b

$C_{14}H_{16}O_5$
M.W. = 264.27 g.mol^{-1}

K_2CO_3 (1.426 g, 10.3 mmol, 1.2 eq) was added to a solution of 4-methyl-7-hydroxycoumarin (1.506 g, 8.6 mmol, 1 eq) and ethyl carbonate (3.780 g, 43 mmol, 5 eq) in DMF (15 mL), then the reaction mixture was refluxed for 5 h. After cooling to room temperature, the solution was diluted with H_2O (50 mL) and extracted with EtOAc (3×75 mL). The organic layers were successively washed with 10% aqueous NaOH solution (2×150 mL) and H_2O (2×150 mL), dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc) to give compound **2158** (350 mg) as a white powder in 18.5% yield and compound **2158-2** (480 mg) as a colorless crystal in 21% yield.

Compound 35-a:

Melting point: 140–141 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.68 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.97 (m, 2H, H_{Ar}), 6.20 (s, 1H, H_{Ar}), 4.92 (t, *J* = 5 Hz, 1H, OH), 4.09 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2-O), 3.74 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2-OH), 2.39 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.7 (C=O), 162.0, 156.6 ($Cq_{Ar}O$), 155.3 (Cq_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 114.9 (Cq_{Ar}), 114.4, 113.0, 103.1 (CH_{Ar}), 72.2 (CH_2-O), 61.3 (CH_2-OH), 20.0 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 221.1 (100%)

Elemental analysis: found (calcd), % C, 65.37 (65.45) ; % O, 28.93 (29.06) ; % H, 5.37 (5.49)

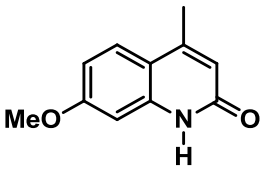
Compound 35-b:

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.32 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.71 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.60 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.94 (s, 1H, H_{Ar}), 4.03 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-1), 3.76 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2), 3.64 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3) 3.55 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-4), 2.22 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 161.5 (C=O), 161.1 (Cq_{Ar}-O), 154.8, 152.7 (Cq_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 113.5 (Cq_{Ar}), 112.4, 111.7, 101.3 (CH_{Ar}), 72.7 (CH_2-1), 69.1 (CH_2-2), 67.8 (CH_2-3), 61.4 (CH_2-4), 18.5 (CH_3).

Mass spectrometry: ESI, m/z (%): $[M+H]^+$ = 265.0 (100%)

7-Methoxy-4-methylquinolin-2(1*H*)-one (36)



$C_{11}H_{11}NO_2$

M.W. = 189.21 g.mol^{-1}

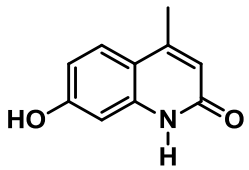
m-Anisidine (11.61 mL, 100 mmol, 1 eq) was added dropwise into ethyl acetoacetate (21.83 mL, 170 mmol, 1.7 eq). The solution was refluxed for 20 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was quenched by addition of saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (50 mL) and extracted with $CHCl_3$ (3×50 mL), dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated under vaccum. The residue was treated with aqueous H_2SO_4 solution (70%, 20 mL), and heated to 95 °C for 2 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and poured onto ice-water (1 L). The precipitate was filtered and washed with Et_2O/H_2O (300 mL, 1/1). Compound **36** (9.96 g) was obtained as a white solid in 53% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): δ 12.04 (brs, 1H, NH), 7.57 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.78 (dd, *J* = 8.75 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.34 (s, 1H, H_{Ar}), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 2.41 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO): δ 162.4 (C=O), 159.6 (Cq_{Ar}-O), 155.8 (Cq_{Ar}), 140.6 (Cq_{Ar}), 128.8, 118.1 (CH_{Ar}), 114.3 (Cq_{Ar}), 111.5, 100.3 (CH_{Ar}), 56.3 (OCH_3) 18.5 (CH_3-Ar).

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 190.1 (100%) ; $[2M+H]^+$ = 378.7 (40%)

7-Hydroxy-4-methylquinolin-2(1*H*)-one (37)



$C_{10}H_9NO_2$

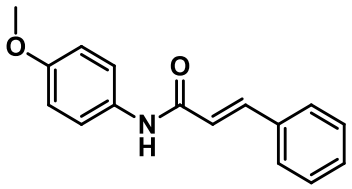
M.W. = 175.18 g.mol^{-1}

Compound **36** (3.55 g, 18.76 mmol, 1eq.) was added to HBr solution (33% in AcOH, 10 mL) and refluxed for 5 days. The solution was cooled to room temperature and poured into ice-water (400 mL), then filtered. The precipitate was diluted into CH_2Cl_2/MeOH and purified by chromatography on silica gel CH_2Cl_2/MeOH: 98/2 to 90/10). Compound **37** (2.92 g) was obtained as a white powder in 89% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 11.44 (brs, 1H, NH), 10.11 (brs, 1H, OH) 7.47 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.73 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.65 (dd, *J* = 8.75 Hz, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.14 (s, 1H, H_{Ar}), 2.31 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 162.4 (C=O), 159.6 (Cq_{Ar}-O), 148.1, 140.6 (Cq_{Ar}), 126.2, 117.0 (CH_{Ar}), 113.0 (Cq_{Ar}), 111.5, 100.3 (CH_{Ar}), 18.5 (CH_3-Ar).

4-Methoxycinnamanilide (38)



$C_{16}H_{15}NO_2$

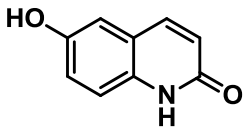
M.W. = 253.30 g.mol^{-1}

p-Methoxy-anisidine (3.693 g, 30 mmol, 1 eq) was added into acetone/H_2O (100 mL, 1/2) containing K_2CO_3 (6.219 g, 45 mmol, 1.5 eq). After 15 min at 0 °C, cinnamoyl chloride (7.497 g, 45 mmol, 1.5 eq) was added. The solution was stirred for 1 h at 0 °C, and poured into ice-water (1 L). The precipitate was filtered and washed with Et_2O (100 mL) and CH_2Cl_2 (100 mL). Compound **38** (6.620 g) was obtained as a grey solid in 87% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 10.06 (brs, 1H, NH), 7.60 (d, *J* = 9 Hz, 4H, H_{Ar}), 7.54 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, $CH_{vinylic}$), 7.43 (m, 3H, H_{Ar}), 6.92 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.80 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, $CH_{vinylic}$), 3.74 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 163.0 (C=O), 155.3 (Cq_{Ar}-OCH_3), 139.6 (CH_{vinyl}), 134.8, 132.4 (Cq_{Ar}), 129.6, 128.9, 127.6 (2×CH_{Ar}), 122.4 (CH_{vinyl}), 120.7 (CH_{Ar}), 113.9 (2×CH_{Ar}), 55.1 (OCH_3).

6-Hydroxy-quinolin-2(1*H*)-one (39)



$C_9H_7NO_2$

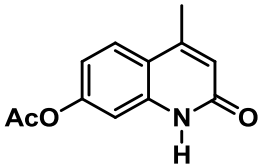
M.W. = 161.16 g.mol^{-1}

$AlCl_3$ (9.6 g, 72 mmol, 6 eq) was added portionwise to a suspension of **38** (3.039 g, 12 mmol, 1 eq) in chlorobenzene (80 mL) at 0 °C. The reaction mixture was gradually warmed to 120 °C and then stirred for 2 h. After cooling to room temperature, the solution was poured into ice-water (300 mL), the resulting precipitate was collected. The crude product was chromatographed (silica gel, CH_2Cl_2/MeOH: 95/5) and, crystallized from MeOH to give **39** (760 mg) as a white powder in 40% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 11.49 (brs, 1H, NH), 9.37(brs, 1H, OH), 7.60 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.16 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.99 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.95 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H_{Ar}), 6.42 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 161.3 (CO_{Ar}), 151.9 (C_{Ar}-OH), 139.5 (CH_{Ar}), 132.1 (Cq_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.8 (Cq_{Ar}), 119.6, 116.1, 111.3 (CH_{Ar}).

4-Methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-7-yl acetate (40)



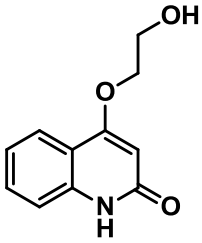
$C_{12}H_{11}NO_3$

M.W. = 217.22 g.mol^{-1}

Compound **37** (200 mg, 1.2 mmol, 1 eq) was suspended in a solution of Ac_2O/AcOH (4 mL, 1/3) and stirred at reflux for 6 h. The solution was cooled to room temperature and poured into ice-water (75 mL). The precipitate was filtered and recrystallized into EtOH/pentane (1/1). Compound **40** (135 mg) was obtained as a white powder in 52% yield.

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): *δ* 11.63 (brs, 1H, NH), 7.71 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.15 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.03 (dd, *J* = 8.75 Hz, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.56 (s, 1H, H_{Ar}), 2.50 (s, 3H, $COCH_3$), 2.32 (s, 3H, CH_3).

4-(2-Hydroxyethoxy)quinolin-2(1H)-one (41)



$C_{11}H_{11}NO_3$

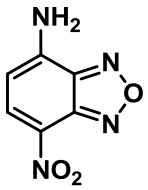
M.W. = 205.21 g.mol^{-1}

K_2CO_3 (1.520 g, 11 mmol, 1.1 eq) was added to a solution of 2,4-quinolinediol (1.621 g, 10 mmol, 1 eq) and ethyl carbonate (1.761 g, 20 mmol, 2 eq) in DMF (10 mL), then the reaction mixture was refluxed for 5 h. After cooling to room temperature, solvent was removed under vacuum. The residue was suspended in H_2O (20 mL) and the pH was adjusted to 10 with an aqueous NaOH solution (1 N) to obtain a precipitate, which was recovered by filtration and purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH: 10/0 to 9/1) to give compound **41** (550 mg) as a white powder in 27% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 11.30 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.86 (s, 1H, H_{Ar}), 4.99 (t, *J* = 6 Hz, 1H, OH), 4.11 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H, CH_2-O-Ar), 3.80 (dd, *J* = 4.5 Hz, *J* = 5 Hz, 2H, CH_2-OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.2 (C=O), 162.5 ($Cq_{Ar}O$), 138.6 (Cq_{Ar}), 130.9, 122.6, 121.1, 115.1 (CH_{Ar}), 114.6 (Cq_{Ar}), 96.9 (CH_{Ar}), 70.4 (CH_2-O-Ar), 59.1 (CH_2-OH).

4-Amino-7-nitrobenzofurazan (42)



$C_6H_4N_4O_3$

M.W. = 180.12g.mol^{-1}

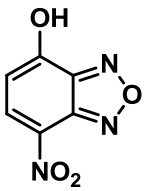
Concentrated NH_4OH (10 mL) was added to a solution of 4-chloro-6-nitrobenzofurazan (796 mg, 4 mmol, 1 eq) in MeOH (100 mL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, and solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/C: 1/1). After evaporation, compound **42** (509 mg) was obtained as a yellow-green powder in 71% yield.

Melting point: 254–255 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.85 (brs, 2H, NH_2), 8.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 147.2, 144.3, 144.0 (Cq_{Ar}), 137.9 (CH_{Ar}), 120.5 (Cq_{Ar}), 102.6 (CH_{Ar}).

4-Hydroxy-7-nitrobenzofurazan (43)



$C_6H_3N_3O_4$

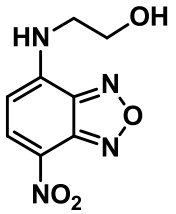
M.W. = 181.01 g.mol^{-1}

$NaHCO_3$ (840 mg, 10 mmol, 2 eq) was added to a solution of 4-chloro-6-nitrobenzofurazan (995 mg, 5 mmol, 1 eq) in water (15 mL). The reaction mixture was stirred for 4 h at 60 °C. After cooling at room temperature the pH was adjusted to 2 with an aqueous HCl solution (1 N). The precipitate was filtered and purified by column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc/MeOH: 45/45/10). After evaporation, compound **43** (470 mg) was obtained as a brown powder in 52% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.33 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.88 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 145.2, 141.9, 140.0 (Cq_{Ar}), 135.6 (CH_{Ar}), 118.6 (Cq_{Ar}), 100.8 (CH_{Ar}).

4-Ethanolamine-7-nitrobenzofurazan (44)



$C_8H_8N_4O_4$

M.W. = 224.17 g.mol^{-1}

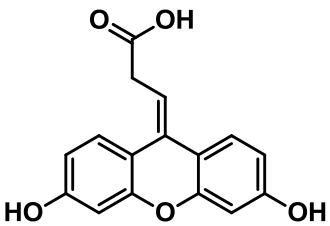
A solution of 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (597 mg, 3 mmol, 1 eq) in MeOH (20 mL) was added to aqueous $NaHCO_3$ solution (0.3 N, 20 mL) and ethanolamine (190 µL, 3.15 mmol, 1.05 eq). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature, and the solvents were evaporated under reduced pressure. The mixture was diluted in MeOH (30 mL) with silica gel for solid deposit. The product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH: 100/0 to 90/10). After evaporation, the compound **44** (220 mg) was obtained as a red powder in 33% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9.39 (brs, 1H, NH), 8.51 (d, J = 4 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.46 (d, J = 4 Hz, 1H, H_{Ar}), 4.95 (s, 1H, OH), 3.68 (m, 2H, CH_2OH), 3.56 (brs, 2H, CH_2N).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 145.6, 144.5 (Cq_{Ar}), 138.0 (CH_{Ar}), 137.9, 120.6 (Cq_{Ar}), 99.5 (CH_{Ar}), 58.9 (CH_2OH), 46.1 (CH_2N).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 223.0 (100%)

6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthene-9-propanoic acid / Succinylfluoresceine (45)



$C_{16}H_{12}O_5$

M.W. = 284.26 g.mol^{-1}

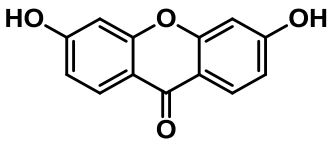
A stirred mixture of phtalic anhydride (2.50 g, 25 mmol, 1 eq) and resorcinol (2.75 g, 25 mmol, 1 eq) in aqueous H_2SO_4 solution (70%, 30 mL) was heated to 140 °C for 4 h. The reaction mixture was then cooled to room temperature and poured into H_2O (500 mL). The stirred solution was alkalinized to pH 12, with aqueous NaOH solution (50%), while the temperature was kept at 0 °C. Acetic acid was added to the solution until pH 4, and the resulting brown precipitate was filtered. The filtrate was washed with H_2O (3×25 mL), acetone (15 mL), and dried under reduced pressure to give pure **45** (3.280 g) as an orange solid in 46% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.51 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H_{Ar}), 7.41 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H_{Ar}), 6.65-6.47 (m, 4H, H_{Ar}), 5.87 (t, 1H, J = 7 Hz), 3.31 (d, 2H, J = 7 Hz).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 173.5 (CO_2H), 158.2, 157.9 (Cq_{Ar}-OH), 153.0, 151.3 (Cq_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 125.7 (Cq_{Ar}), 124.3, 116.1 (CH_{Ar}), 114.0, 113.1 (Cq_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 110.8 (=CH), 102.6, 102.3 (CH_{Ar}), 36.3 (CH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 285.1 (100%)

3,6-Dihydroxy-9H-xanthen-9-one (46)



$C_{13}H_8O_4$

M.W. = 228.20 g.mol^{-1}

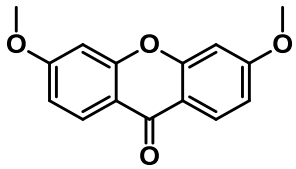
A stirred suspension of 2,2′,4,4′-tetrahydroxybenzophenone (6.2 g, 24.2 mmol) in pure H_2O (50 mL) was heated to 200 °C for 6 h in a sealed bottle. The reaction mixture was then cooled to 40 °C, and 3,6-dihydroxy-9H-xanthen-9-one was obtained as a cluster of needles, which was filtered off, washed with hot H_2O (3×15 mL), and dried under reduced pressure to give **46** (5.712 g) as light orange needles in 99% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 10.79 (s, 2H, OH), 7.99 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H_{Ar}), 6.85 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.81 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 173.9 (C=O), 163.4 (Cq_{Ar}-OH), 157.5 (Cq_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 114.0 (Cq_{Ar}), 113.6, 102.1 (CH_{Ar}).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 227.2 (100%)

3,6-Dimethoxy-9H-xanthen-9-one (47)



$C_{15}H_{12}O_4$

M.W. = 256.25 g.mol^{-1}

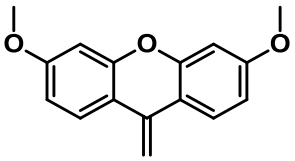
Dimethyl sulfate (22.4 mL, 237 mmol, 10 eq) was added dropwise over 45 min to a suspension of **46** (5.4 g, 23.66 mmol, 1 eq), anhydrous K_2CO_3 (16.3 g, 118 mmol, 5 eq) in acetone (450 mL). The resulting mixture was stirred for 30 min at room temperature and then refluxed overnight. After cooling to 0 °C, NH_4OH (1 N, 35 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for an additional 1 h at room temperature. Addition of H_2O (500 mL) to the mixture led to a white precipitate, which was filtered off, washed with H_2O (3×30 mL), and dried under reduced pressure to give **47** (6.120 g) in 99% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 8.05 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H_{Ar}), 6.90-6.86 (m, 4H, H_{Ar}), 3.87 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 174.2 (C=O), 164.2 (Cq_{Ar}-OCH_3), 157.4 (Cq_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 115.0 (Cq_{Ar}), 112.6, 99.9 (CH_{Ar}), 55.5 (OCH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 257.2 (100%)

3,6-Dimethoxy-9-methylene-9H-xanthene (48)



$C_{16}H_{14}O_3$

M.W. = 254.28 g.mol^{-1}

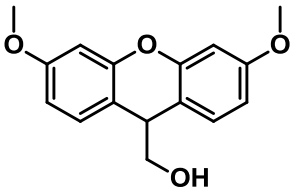
Trimethylaluminium (11.7 mL, 23.4 mmol, 2 M solution in toluene, 1.1 eq) was added dropwise to a stirred suspension of **47** (5.450 g, 21.27 mmol) in dry toluene (150 mL) under argon atmosphere at room temperature. The yellow mixture became homogeneous after warming to 50 °C. After cooling to room temperature, trimethylaluminium (23.4 mL, 46.8 mmol, 2 M solution in toluene, 2.2 eq) was carefully added since methane as a side product is released. The reaction mixture was then heated to 65 °C for 90 min, cooled to 0 °C, before adding cautionsly ice-water (200 mL), aqueous HCl solution (0.1 M, 50 mL) then after 5 min aqueous HCl solution (1 M, 50 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3×250 mL) and the combined organic layers were dried (Na_2SO_4), and evaporated under reduced pressure to give **48** (4.895 g) as a yellow solid in 90% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.66 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H_{Ar}), 6.73 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.63 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.29 (s, 2H, CH_2), 3.84 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 160.9 (Cq_{Ar}-OCH_3), 151.7, 128.3 (Cq_{Ar}), 125.0 (CH_{Ar}), 114.4 (CH_2), 111.3, 96.4 (CH_{Ar}), 55.6 (OCH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 255.2 (100%)

(3,6-Dimethoxy-9H-xanthen-9-yl)methanol (49)



$C_{16}H_{16}O_4$

M.W. = 272.30 g.mol^{-1}

BH_3·THF (1.0 M in THF, 40 mL, 40 mmol, 2.5 eq) was added to a stirred solution of **48** (4 g, 15.7 mmol, 1 eq) in dry THF (125 mL) over a period of 20 min at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 4 h at room temperature and cooled to 0 °C, then were cautiously added H_2O (40 mL, 10% solution in THF), aqueous NaOH solution (3 N, 35 mL, 105 mmol, 6.7 eq), and aqueous H_2O_2 solution (30%, 54 mL, ≈ 520 mmol, ≈ 33 eq). The resulting mixture was stirred for 1.5 h at room temperature,

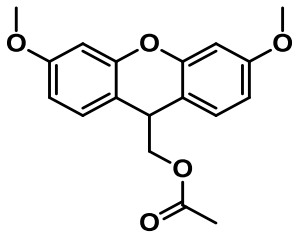
then poured into H_2O (500 mL), and neutralized with aqueous HCl solution (1 M) to pH 7, and the organic material was extracted with Et_2O (3×600 mL). The combined organic layers were washed with brine (500 mL), dried (Na_2SO_4), filtered, evaporated under reduced pressure to give **49** (4.020 g) as a pale green solid in 94 % yield.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 7.15 (d, 2H, *J* = 9 Hz, H_{Ar}), 6.66-6.63 (m, 4H, H_{Ar}), 3.95 (t, *J* = 6 Hz, 1H, CH), 3.87 (s, 6H, 2×CH_3), 3.63 (d, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 159.9 (Cq_{Ar}-OCH_3), 153.1 (Cq_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 114.3 (Cq_{Ar}), 110.1, 101.9 (CH_{Ar}), 69.4 (CH_2), 55.9 (OCH_3), 40.8 (CH).

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[2M+H]^+$ = 534.9 (100%)

(3,6-Dimethoxy-9H-xanthen-9-yl)methyl acetate (50)



$C_{18}H_{18}O_5$

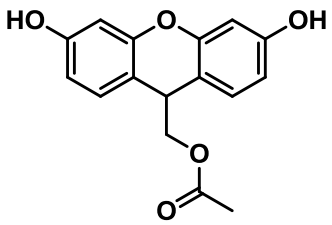
M.W. = 314.33 g.mol^{-1}

Compound **49** (3.105 g, 11.4 mmol), triethylamine (4.8 mL, 34.2 mmol, 3 eq), 4-dimethylaminopyridine (130 mg, 1.14 mmol, 0.1 eq), and acetic anhydride (4.31 mL, 45.6 mmol, 4 eq) were stirred for 14 h at room temperature. The reaction mixture was then stirred with Et_2O (150 mL) and aqueous HCl solution (2 M, 100 mL). After decantation, the organic layer was washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (2×200 mL), dried over Na_2SO_4, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure to give **50** (3.226 g) as a slightly brownish oil in 90 % yield.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 7.11 (d, *J* = 9 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.64-6.61 (m, 4H, H_{Ar}), 4.11-4.08 (m, 3H, CH-CH_2), 3.74 (s, 6H, CH_3), 1.98 (s, 3H, $COCH_3$).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.5 (C=O), 159.7 (Cq_{Ar}-OCH_3), 152.6 (Cq_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 113.4 (Cq_{Ar}), 109.7, 101.4 (CH_{Ar}), 69.6 (CH_2), 55.1 (OCH_3), 37.1 (CH), 20.4 (CH_3).

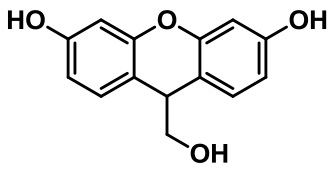
(3,6-Dihydroxy-9H-xanthen-9-yl)methyl acetate (51) and (3,6-Dihydroxy-9H-xanthen-9-yl)methanol (52)



3065-1

$C_{16}H_{14}O_5$

M.W. = 286.28 g.mol^{-1}



3065-2

$C_{14}H_{12}O_4$

M.W. = 244.24 g.mol^{-1}

Boron tribromide (1 M in CH_2Cl_2, 100 mL, 100 mmol, 9.35 eq) was added dropwise to a solution of **50** (3.370 g, 10.7 mmol, 1 eq) in dry CH_2Cl_2 (200 mL) at −78 °C. The reaction mixture was stirred and left to warm to −5 °C in 24 h. Water (300 mL) was then added, and the mixture was extracted with EtOAc (3×300 mL). The c+ombined organic layers were washed with brine (500 mL) and dried over MgSO4, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 95/5/2) to give **51** (856 mg) and **52** (1.207 g) as beige powders in 28% and 46% yields, respectively.

Compound **51:**

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.01 (d, 2H, *J* = 8 Hz, H_{Ar}), 6.54-6.49 (m, 4H, H_{Ar}), 3.99 (d, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2), 3.90 (t, *J* = 6 Hz, 1H, CH), 1.87 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 172.7 (C=O), 158.4 (Cq_{Ar}-OH), 154.0 (Cq_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 113.8 (Cq_{Ar}), 111.8, 103.9 (CH_{Ar}), 70.8 (CH_2), 38.4 (CH), 20.8 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 284.9 (100%)

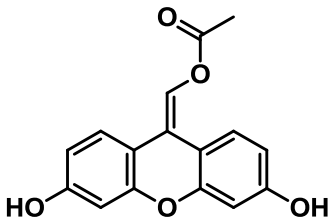
Compound **52:**

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.08 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, H_{Ar}), 6.55 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.51 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 3.79 (t, *J* = 6 Hz, 1H, CH), 3.56 (d, *J* = 6 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 158.1 (Cq_{Ar}-OH), 154.1 (Cq_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 115.1 (Cq_{Ar}), 111.7, 103.8 (CH_{Ar}), 70.0 (CH_2), 41.8 (CH).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 244.9 (100%)

(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)methyl acetate (53)



$C_{16}H_{12}O_5$

M.W. = 284.26g.mol^{-1}

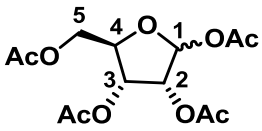
2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ, 761 mg, 3.35 mmol, 1.2 eq) was added to a solution of **52** (800 mg, 2.8 mmol, 1 eq) in dry CH_3CN (40 mL) at room temperature, and the mixture was stirred for 20 min at this temperature. The resulting red precipitate was filtered off, washed with CH_3CN (20 mL), and dried (Na_2SO_4) under reduced pressure to give **53** (1.237 g) a complex with DDQ as a dark red solid in 86% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 9.67 (brs, 2H, OH), 7.58 (m, 2H, H_{Ar}), 6.62 (m, 2H, H_{Ar}), 6.48 (m, 2H, H_{Ar}), 6.25 (s, 1H, H_{vinyl}), 1.94 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 169.5 (C=O), 158.2 (Cq_{Ar}-OH), 158.1 (Cq_{Ar}-OH), 151.7 (Cq_{Ar}), 151.6 (Cq_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 117.9(Cq_{Ar}), 114.4 (Cq_{Ar}), 113.1 (CH_{Ar}), 110.7 (CH_{Ar}), 101.6 (Cq_{Ar}), 101.3 (CH_{Ar}), 98.9 (CH_{Ar}), 67.9 (CH_{vinyl}), 20.3 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 285.1 (100%)

1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl-α/β-D-ribofuranose (54)



$C_{13}H_{18}O_9$

M.W. = 318.28 g.mol^{-1}

D-(-)-Ribose (7.5 g, 50 mmol, 1 eq) in anhydrous pyridine (100 mL) was stirred few minutes at 0 °C before adding dropwise Ac_2O (25 mL). The solution was stirred for 16 h at room temperature and the solvent was removed under vaccum. The residue was taken up three times in toluene (3×20 mL) and evapored. The mixture obtained was diluted into EtOAc (300 mL) and washed with H_2O (2×300 mL) and brine (300 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evoparated. The mixture was filtered on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 1/1) and the filtrate was evapored. Compound **54** (15.160 g) was obtained as a translucent foam in 95% yield.

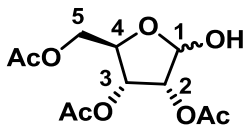
R_f = 0.45 (cyclohexane/EtOAc: 6/4)

$[\alpha]_D$ = -15.5 (c = 1.0, CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_{Hg}$ = -45.5 (c = 1.0, CH_2Cl_2)

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 5.79 (d, *J* = 4.25 Hz, 1H, H-1), 5.24 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.92 (m, 1H, H-4), 4.81 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.80 (m, 1H, H-5), 3.68 (m, 1H, H-5'), 1.88, 1.84, 1.82, 1.80 (4s, 12H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ 169.5, 169.3, 169.1, 168.3 (C=O), 90.7 (C-1), 67.0 (C-2), 65.9, 65.8 (C-3, C-4), 62.3 (C-5), 20.4, 20.4, 20.3, 20.2 (CH_3).

2,3,5-Tri-*O*-acetyl-α/β-D-ribofuranose (55)



$C_{11}H_{16}O_8$

M.W. = 276.24 g.mol^{-1}

Compound **54** (15.160 g, 47.65 mmol, 1eq) and NH_4OAc (6.775 g, 95.3 mmol, 2 eq) in anhydrous DMF (80 mL) were stirred at room temperature for 60 h. The solvent was evaporated.and the residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4). Compound **54** (1.940 g) was recovered, and compound **55** (6.221 g) was obtained as a translucent foam in 47% yield.

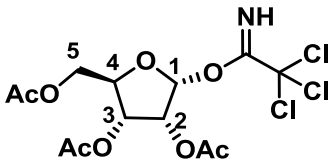
R_f = 0.2 (cyclohexane/EtOAc: 6/4)

$[\alpha]_D$ = -29 (c = 1.0, CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_{Hg}$ = -91 (c = 1.0, CH_2Cl_2)

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 5.27 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.89 (m, 2H, H-4, H-1), 4.72 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-2), 3.86 (m, 1H, H-5), 3.56 (m, 1H, H-5'), 1.94, 1.93, 1.91 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 170.0, 169.9 (C=O), 92.5 (C-1), 69.4 (C-2), 66.6, 66.5 (C-3, C-4), 60.9 (C-5), 20.4, 20.3, 20.2 (3 × CH_3).

2,3,5-Tri-*O*-acetyl-α-D-ribofuranosyl trichloro-acetimidate (56)



$C_{13}H_{16}Cl_3NO_8$

M.W. = 420.63 g.mol^{-1}

Compound **54** (1.590g, 5 mmol, 1 eq) and sodium methanolate (531 mg, 10 mmol, 2 eq) were suspended in anhydrous THF (20 mL) at 0 °C and stirred for 30 min before adding AcOH (572 µL, 10mmol, 2eq). The reaction mixture was then diluted with CH_2Cl_2 (40 mL) and washed with H_2O (10 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$) filtered and evaporated to give **55**, which was used in the next step without further purification. The crude product **55** was taken up in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) then K_2CO_3 (3.45 g, 25 mmol, 5 eq.) was added followed by the dropwise addition of

trichloroacetonitrile (2.001 mL, 20 mmol, 4 eq). The reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature, then filtered and evaporated under vaccum. The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4). Compound **56** (399 mg) was obtained as a translucent crystal in 19% yield.

K_2CO_3 (15.568 g, 112.65 mmol, 5 eq) was added to compound **55** (6.221 g, 22.53 mmol, 1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (60 mL), then trichloroacetonitrile (9.037 mL, 90.12 mmol, 4 eq) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature then filtered and evaporated under vaccum. The mixture was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4). Compound **56** (8.971 mg) was obtained as a translucent foam in 95% yield.

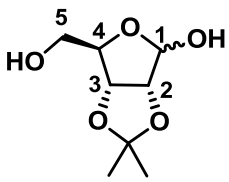
R_f = 0.6 (cyclohexane/EtOAc: 6/4)

$[\alpha]_D$ = -38 (c = 1.0, CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_{Hg}$ = -111.5 (c = 1.0, CH_2Cl_2)

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): *δ* 8.7 (s, 1H, NH), 6.15 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-1), 5.40 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.19 (m, 2H, H-4, H-2), 4.12 (m, 1H, H-5), 3.91 (m, 1H, H-5'), 2.04, 1.98, 1.94 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.0, 169.6, 169.5 (C=O), 160.2 (C=NH), 95.2 (C-1), 90.1 (CCl_3), 66.7 (C-2), 66.2(C-3), 65.7 (C-4), 63.2 (C-5), 20.9, 207, 20.6 (CH_3).

2,3-*O*-Isopropylidene-α/β-D-ribofuranose (57)



$C_8H_{14}O_5$

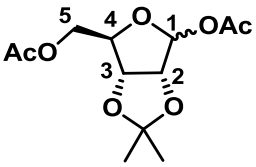
M.W. = 190.19 g.mol^{-1}

D-(-)-Ribose (15.010 g, 0.1 mol, 1 eq) and PTSA (1.9 g, 10 mmol, 0.1 eq) were added to anhydrous DMF (40 mL). After stirring for few minutes, 2,2-dimethoxypropane (124 mL, 1 mol, 10 eq) was added and the solution was stirred for 2 h at room temperature. The reaction was stopped by addition of aqueous K_2CO_3 solution (1 N, 100 mL) and was extracted with Et_2O (3×250 mL) and EtOAc (2×300 mL). The organic layers were dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 6/4). Compound **57** (13.249 g) was obtained as a translucent foam in 70% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 4.98 (s, 1H, H-1), 4.77 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-2), 4.44 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-3), 4.22 (s, 1H, H-4), 3.71 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H-5), 3.62 (d, *J* = 11 Hz, 1H, H-5'), 1.40, 1.26 (2s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 112.0 ($C(CH_3)_2$), 106.9 (C-1), 87.8 (C-2), 86.7 (C-3), 82.1 (C-4), 63.3 (C-5), 26.6, 25.0 (CH_3).

2,3-*O*-Isopropyl-1,5-O-acetyl-α/β-D-ribofuranose (58)



$C_{12}H_{18}O_7$

M.W. = 274.27 g.mol^{-1}

Compound **57** (13.1 g, 68.9 mmol, 1 eq) was added to anhydrous pyridine (90 mL). After few minutes at 0 °C, Ac_2O (40 mL) was added dropwise and the solution was stirred for 24 h at room temperature. The solvent was removed under vacuum, then, the residue was diluted in toluene (80 mL) and evaporated four times The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 8/2 to 6/4). Compound **58** (17.732 g) was obtained as a translucent foam in 94% yield.

Mixture α/β = 0.4/1

β Isomer:

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 6.01 (s, 1H, H-1), 4.57 (m, 2H, H-2, H-3), 4.28 (t, *J* = 6.75 Hz, 1H, H-4), 3.96 (m, 2H, H-5), 1.91, 1.88 (2s, 6H, $COCH_3$), 1.32, 1.16, (2s, 6H, CH_3).

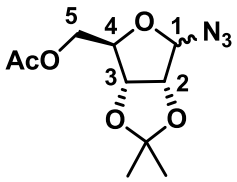
^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ 170.0, 168.8 (C=O), 112.8 ($C(CH_3)_2$), 101.8 (C-1), 85.1 (C-2), 84.8 (C-3), 81.2 (C-4), 63.8 (C-5), 26.1, 24.7, 20.8, 20.4 (CH_3).

α Isomer:

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 5.66 (d, *J* = 3.75 Hz, 1H, H-1), 4.65 (m, 1H, H-2), 4.50 (m, 1H, H-3), 4.14 (m, *J* = 6.75 Hz, 1H, H-4), 3.96 (m, 2H, H-5), 1.96, 1.91 (2s, 6H, $COCH_3$), 1.38, 1.16, (2s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, $CDCl_3$): δ 170.2, 169.7 (C=O), 112.7 ($C(CH_3)_2$), 104.0 (C-1), 76.9 (C-2), 75.2 (C-3), 72.1 (C-4), 62.2 (C-5), 26.6, 26.3, 20.4, 20.2 (CH_3).

2,3-*O*-Isopropyl-5-*O*-acetyl-α/β-D-ribofuranosyl azide (59)



$C_{10}H_{15}N_3O_5$

M.W. = 257.24 g.mol^{-1}

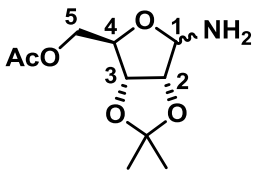
Compound **58** (15.9 g, 58 mmol, 1 eq) was added to anhydrous CH_2Cl_2 (250 mL) and Me_3SiN_3 (9.776 mL, 69.5 mmol, 1.2 eq). After few minutes, a solution of $SnCl_4$ (1 M in CH_2Cl_2, 58 mL, 58 mmol, 1 eq) in CH_2Cl_2 (150 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 5 h at room temperature. The reaction mixture was quenched by addition of saturated aqueous $NaHCO_3$ solution (300 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (2×300 mL). The organic layers were dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 9/1). Compound **59** (6.560 g) was obtained as a translucent foam in 44% yield.

Mixture α/β (0.4/1):

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): *δ* 5.46 (s, 1H, H-1), 4.60 (d, *J* = 6Hz, 1H, H-2), 4.42 (t, *J* = 6 Hz, 1H, H-3), 4.39 (t, *J* = 7Hz, 1H, H-4), 4.15 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-5), 4.09 (dd, *J* = 11.5 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-5'), 2.03 (s, 3H, $COCH_3$), 1.42, 1.25, (2s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (250 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.6 (C=O), 113.4 ($C(CH_3)_2$), 97.0 (C-1), 85.5 (C-2), 85.1 (C-3), 82.1 (C-4), 63.9 (C-5), 26.6, 25.1, 20.8 (CH_3).

2,3-*O*-Isopropyl-5-*O*-acetyl-α/β-D-ribofuranosyl amine (60)



$C_{10}H_{17}NO_5$

M.W. = 231.25 g.mol^{-1}

Compound **59** (6.560 g, 25.5 mmol, 1 eq) was added to Pd Black (600 mg, 10% w/w) in absolute EtOH (250 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature under H_2 (1 atm.) for 24 h, then filtered through a celite pad and rinced with MeOH. The solvents were evaporated to dryness to afford a mixture of α/β **60** (5.870 g) as a syrup in 99% yield.

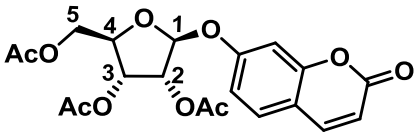
Mixture α/β (0.4/1):

$[\alpha]_D$ = (c = 1.0, CH_2Cl_2)

^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): *δ* 4.77 (d, *J* = 3 Hz, 1H, Hα-1), 4.63-4.46 (m, 5 H, Hβ-1, H-2, H-3), 4.11-3.90 (m, 6H, H-5, H-4), 2.03 (s, 6H, OAc), 1.40 (s, 6H, CH_3), 1.27, 1.24 (s, 6H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 170.1 (C=O), 111.2 ($C(CH_3)_2$), 87.0 (C-1), 81.4 (C-2), 79.4 (C-3), 78.0 (C-4), 63.8 (C-5), 26.2, 24.9, 20.6 (CH_3).

1-(7-Hydroxy-coumarin)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (61)



$C_{20}H_{20}O_{10}$

M.W. = 420.37 g.mol^{-1}

From 7-hydroxycoumarin (405 mg, 2.5 mmol, 1 eq), compound **56** (1.051 g, 2.5 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 340 µL, 2.75 mmol, 1.1 eq), Et_3N (350 µL, 2.5 mmol, 1 eq) and AcOH (150 µL, 2.5 mmol, 1 eq), compound **61** (940 mg) was obtained as a white powder in 89% yield, according to *general procedure D.*

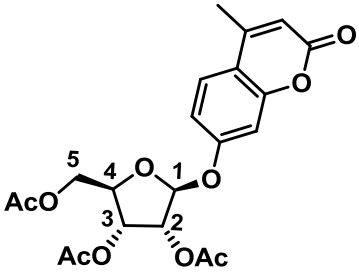
R_f = 0.3 (cyclohexane/EtOAc: 1/1)

^{1}H NMR (250 MHz, MeOD): *δ* 7.88 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.55 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.06 (m, 2H, H_{Ar}), 6.30 (d, *J* = 10Hz, 1H, H_{Ar}), 5.71 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-1), 5.57 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.22 (m, 2H, H-2, H-4), 4.05 (m, 1H, H-5), 3.94 (m, 1H, H-5'), 2.15, 2.12, 2.08 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 171.9, 171.6, 171.5 ($OCOCH_3$), 162.9 (C=O), 160.5 (Cq_{Ar}-O), 156.7 (Cq_{Ar}), 145.4, 130.7, 115.7 (CH_{Ar}), 115.2 (Cq_{Ar}), 114.8, 105.0 (CH_{Ar}), 97.9 (C-1), 69.2 (C-2), 68.0 (C-4), 67.5 (C-3), 63.1 (C-5), 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 434.8 (100%)

1-(7-Hydroxy-4-methyl-coumarin)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (62)



$C_{21}H_{22}O_{10}$

M.W. = 434.39 g.mol^{-1}

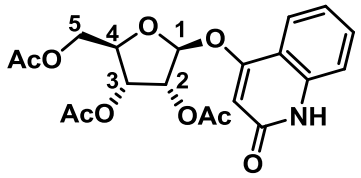
From **16** (352 mg, 2 mmol, 1 eq), compound **56** (841 mg, 2 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 271 µL, 2.2 mmol, 1.1 eq), Et_3N (273 µL, 2 mmol, 1 eq) and AcOH (114 µL, 2 mmol, 1 eq), compound **62** (717 mg) was obtained as a white powder in 83% yield, according to *general procedure D.*

R_f = 0.3 (cyclohexane/EtOAc: 1/1)

^{1}H NMR (250 MHz, MeOD): *δ* 7.70 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.06 (m, 2H, H_{Ar}), 6.19 (s, 1H, H_{Ar}), 5.69 (d, *J* = 4Hz, 1H, H-1), 5.57 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.22 (m, 2H, H-2, H-4), 4.05 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3 Hz, 1H, H-5), 3.94 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.75 Hz, 1H, H-5'), 2.46 (s, 3H, CH_3-Ar), 2.12, 2.09, 2.05 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (63 MHz, MeOD): δ 171.5, 171.4, 171.3 ($OCOCH_3$), 165.9 (CO_{Ar}), 163.9 (Cq_{Ar}-O), 158.9 (Cq_{Ar}), 143.9 (Cq_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 115.0 (CH_{Ar}), 113.3 (Cq_{Ar}), 113.2 (CH_{Ar}), 105.0 (CH_{Ar}), 97.8 (C-1), 69.2 (C-2), 67.9 (C-4), 67.4 (C-3), 63.1 (C-5), 21.0, 20.9, 20.8 (CH_3), 18.8 (CH_3-Ar).

1-(4-Hydroxyquinolin)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (63)



$C_{20}H_{21}NO_9$

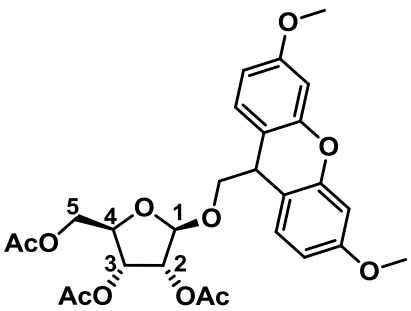
M.W. = 419.38 g.mol^{-1}

From 2,4 quinolinediol (564 mg, 3.5 mmol, 1eq), compound **56** (1.472 g, 3.5 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 1.134 mL, 4.2 mmol, 1.2 eq), E_3N (490 µL, 3.5 mmol, 1 eq) and AcOH (210 µL, 3.5 mmol, 1 eq), compound **63** (1.174 g) was obtained as a white powder in 82% yield, according to *general procedure D.*

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.51 (brs, 1H, NH), 7.78 (d, *J* = 8Hz, 1H, H_{Ar}), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.31 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.20 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.12 (s, 1H, H_{Ar}), 5.86 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-1), 5.55 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.29 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-2), 5.17 (dd, *J* = 3 Hz, *J* = 5 Hz, 1H, H-4), 4.05 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3 Hz, 1H, H-5), 3.94 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 5 Hz, 1H, H-5'), 2.08, 2.07, 2.06 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 171.9, 169.6, 169.4 ($OCOCH_3$), 162.8 (C=O), 159.4 (Cq_{Ar}-O), 138.8 (Cq_{Ar}), 131.2, 122.1, 121.6, 115.3 (CH_{Ar}), 114.0 (Cq_{Ar}), 100.2 (CH_{Ar}), 95.4 (C-1), 66.9 (C-2), 65.9 (C-4), 65.7 (C-3), 61.8 (C-5), 21.0, 20.6, 20.5 (CH_3).

1-methyl-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (64)



$C_{27}H_{30}NO_{11}$

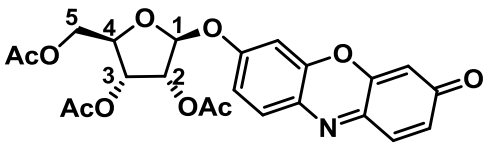
M = 530.52 g.mol^{-1}

From **49** (272 mg, 1 mmol, 1 eq), compound **56** (420 mg, 1 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 394 µL, 1.1 mmol, 1.1 eq), Et_3N (151 µL, 1 mmol, 1.1 eq) and AcOH (62 µL, 5 mmol, 1.1 eq), compound **64** (383 mg) was obtained as yellow powder in 67% yield, according to *general procedure D.*

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.15 (d, 1H, *J* = 9 Hz, H_{Ar}), 7.11 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, H_{Ar}), 6.64 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.60 (m, 2H, H_{Ar}), 5.26 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 4.98 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-2), 4.95 (dd, *J* = 3.5 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-4), 4.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, C*H*CH_2), 3.76 (s, 6H, OCH_3), 3.66 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$) 3.50 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-5), 3.45 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$), (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-5'), 2.05, 2.04, 2.00 (3s, 9H, $COCH_3$).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 170.2, 169.9, 169.7 (O*C*OCH_3), 159.7, 159.6 (Cq_{Ar}-OCH_3), 152.9, 152.8 (Cq_{Ar}), 130.0, 129.8 (CH_{Ar}), 114.1, 114.0 (Cq_{Ar}), 109.9, 109.7, 101.6, 101.5 (CH_{Ar}), 97.7 (C-1), 73.6 (CH*C*H_2) 68.0 (C-2), 66.8 (C-4), 65.7 (C-3), 61.0 (C-5), 55.4 (2×OCH_3), 38.0 (*C*HCH_2), 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3).

7-(2,3,5-Tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranosyl) resorufin (65)



$C_{23}H_{21}NO_{10}$

M.W. = 471.41 g.mol^{-1}

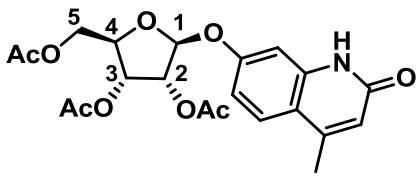
From Resorufin (673 mg, 3 mmol, 1 eq), compound **56** (1.262 g, 3 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 972 µL, 3.6 mmol, 1.2 eq), Et_3N (420 µL, 3 mmol, 1 eq) and AcOH (180 µL, 3 mmol, 1 eq), compound **65** (440 mg) was obtained as a red powder in 31% yield, according to *general procedure D.*

^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7.60 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 9.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.92 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.89 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.68 (dd, *J* = 9.75 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}) 6.16 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.50 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 5.44 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.13 (m, 2H, H-2, H-4), 3.92 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-5), 3.81 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4 Hz, 1H, H-5'), 2.03, 2.01, 1.96 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ 186.1 (C=O),169.9, 169.6, 169.5 (O*C*OCH_3), 159.3, 149.5, 146.7, 145.1 (Cq_{Ar}), 134.7, 134.5, 131.6 (CH_{Ar}) 129.4 (Cq_{Ar}), 114.7, 106.8, 103.2 (CH_{Ar}), 96.6 (C-1), 67.6 (C-2), 66.1 (C-4), 65.6 (C-3), 62.1 (C-5), 20.7, 20.6, 20.5 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 471.7 (100%)

1-(7-Hydroxy-4-methyl-quinolin)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (66)



$C_{21}H_{23}NO_9$

M = 433.41 g.mol^{-1}

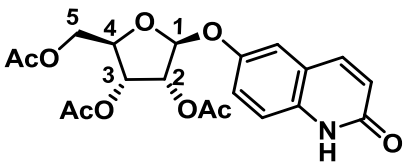
From **37** (876 mg, 5 mmol, 1 eq), compound **56** (2.103 g, 5 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 1.539 mL, 5.70 mmol, 1.15 eq), Et_3N (700 µL, 5 mmol, 1 eq) and AcOH (300 µL, 5 mmol, 1 eq), compound **66** (552 mg) was obtained as a white powder in 28% yield, according to *general procedure D.*

R_f = 0.5 (CH_2Cl_2/MeOH: 9.5/0.5)

^{1}H *NMR (500 MHz, CDCl$_3$)*: *δ* 12.34 (brs, 1H, NH), 7.70 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.55 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.31 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.20 (t, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.12 (s, 1H, H_{Ar}), 5.86 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-1), 5.55 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.29 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-2), 5.17 (dd, *J* = 3 Hz, *J* = 5 Hz, 1H, H-4), 4.05 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 3 Hz, 1H, H-5), 3.94 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 5 Hz, 1H, H-5'), 2.32 (CH_3-Ar), 2.08, 2.07, 2.06 (3s, 9H, CH_3).

^{13}C *NMR (126 MHz, CDCl$_3$)*: *δ* 170.2, 169.9, 169.8 (O*C*OCH_3), 164.8 (C=O), 157.6 (Cq_{Ar}-O), 149.3, 139.6 (Cq_{Ar}), 126.1, 116.4 (CH_{Ar}), 112.5 (Cq_{Ar}), 112.4, 102.6 (CH_{Ar}), 96.3 (C-1), 67.8 (C-2), 66.5 (C-4), 65.5 (C-3), 62.0 (C-5), 20.9, 20.8, 20.7 (CH_3), 19.1 (CH_3–Ar).

1-(6-Hydroxyquinolin)-2,3,5-tri-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (67)



$C_{20}H_{21}NO_9$

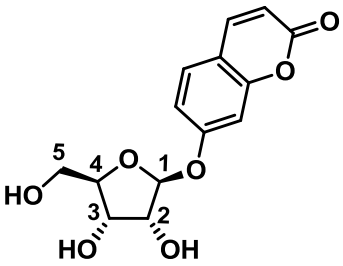
M.W. = 419.38 g.mol^{-1}

From **39** (645 mg, 4 mmol, 1 eq), compound **56** (1.682 g, 4 mmol, 1 eq), $BF_3.Et_2O$ (48% in CH_2Cl_2, 1.296 mL, 4.8 mmol, 1.2 eq), Et_3N (560 µL, 4 mmol, 1 eq) and AcOH (240 µL, 4 mmol, 1 eq), the compound **67** (270 mg) was obtained as a white powder in 16% yield, according to *general procedure D.*

^{1}*H NMR (250 MHz, CD$_3$CN)*: *δ* 11. 01 (brs, 1H, NH), 7.75 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.25 (m, 3H, H_{Ar}), 6.55 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.51 (d, *J* = 4 Hz, 1H, H-1), 5.46 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.17 (m, 2H, H-2, H-4), 4.05 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H-5), 3.82 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-5'), 2.06, 2.03, 1.99 (3s, 9H, CH_3).

^{13}*C NMR (63 MHz, CD$_3$CN)*: *δ* 171.2, 171.0, 170.9 (O*C*OCH_3), 164.1 (C=O), 152.2 (Cq_{Ar}-O), 141.5 (CH_{Ar}), 135.4, 123.0 (Cq_{Ar}), 122.4, 121.3, 117.9, 115.1 (CH_{Ar}), 98.2 (C-1), 68.8 (C-2), 67.4 (C-4), 66.9 (C-3), 62.7 (C-5), 21.2, 21.1, 20.9 (CH_3).

1-(7-Hydroxy-coumarin)-ß-D-ribofuranose (68)



$C_{14}H_{14}O_7$

M.W. = 294.26 g.mol^{-1}

From Compound **61** (900 mg, 2.14 mmol, 1 eq), MeOH (30 mL) and concentrated NH_4OH (12.5 mL), **68** (385 mg) was obtained as a white powder in 61% yield, according to *general procedure E.*

From Compound **61** (512 mg, 1.3 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (26.25 mL) and Et_3N (2.5 mL), **68** (241 mg) was obtained as a white powder in 82% yield, according to *general procedure F.*

R_f = 0.4 (CH_2Cl_2/EtOH: 95/5)

Melting point: 226 °C

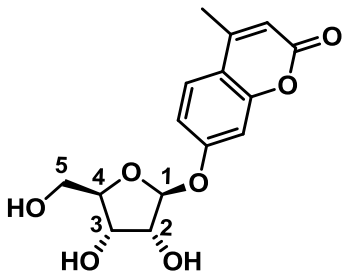
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 8.01 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.03 (m, 2H, H_{Ar}), 6.31 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.42 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 5.20 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-3), 4.99 (m, 2H, H-2, H-4), 3.89 (brs, 1H, OH), 3.69 (m, 2H, H-5, OH), 3.61 (m, 2H, H-5', OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 160.1 (C=O), 159.6 (Cq_{Ar}-O), 154.9 (Cq_{Ar}), 144.1, 129.5, 113.6 (CH_{Ar}), 113.4 (Cq_{Ar}), 113.2, 103.4 (CH_{Ar}), 98.5 (C-1), 70.1 (C-2), 68.0 (C-4), 67.7 (C-3), 64.1 (C-5).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 294.9 (100%) ; $[2M-H]^-$ = 587.4 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{14}H_{14}O_7-H]^-$: 293.0667; found: 293.1811

λ max (ex/em): 316/396 nm

1-(7-Hydroxy-4-methyl-coumarin)-ß-D-ribofuranose (69)



$C_{15}H_{16}O_7$

M.W. = 308.28 g.mol^{-1}

From Compound **62** (550 mg, 1.3 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (26.25 mL) and Et_3N (2.5 mL), **69** (215 mg) was obtained as a white powder in 70% yield, according to *general procedure F.*

R_f = 0.4 (CH_2Cl_2/EtOH: 95/5)

Melting point: 196 °C

$[\alpha]_D$ = -120 (c = 1.0, CH_2Cl_2) ; $[\alpha]_{Hg}$ = -535 (c = 1.0, CH_2Cl_2)

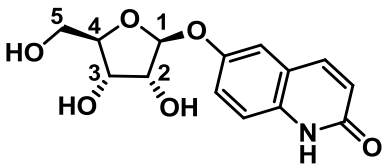
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.01 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.03 (m, 2H, H_{Ar}), 6.31 (d, *J* = 10 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.42 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-1), 5.20 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H-3), 4.99 (m, 2H, H-2, H-4), 3.89 (brs, 1H, OH), 3.69 (m, 2H, H-5, OH), 3.61 (m, 2H, H-5', OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 160.0 (C=O), 159.4 (Cq_{Ar}-O), 154.3, 153.2 (Cq_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 114.1 (Cq_{Ar}), 113.1, 111.8, 103.4 (CH_{Ar}), 98.5 (C-1), 70.1 (C-2), 67.9 (C-4), 67.7 (C-3), 64.1 (C-5), 18.1 (CH_3).

Mass spectrometry: ESI, m/z (%): $[M+H]^+$ = 308.9 (100%) ; $[2M+Na]^+$ = 638.9 (40%) ; $[2M-H]^-$ = 615.0 (100%); HRMS (ESI^-) calcd for $[C_{15}H_{16}O_7-H]^-$: 307.0823; found: 307.0173

λ max (ex/em): 316/390 nm

2-Quinolinol-6-β-D-ribofuranose (70)



$C_{14}H_{15}NO_6$

M.W. = 293.27 g.mol^{-1}

From Compound **67** (210 mg, 0.5 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (8.4 mL) and Et_3N (0.8 mL), **70** (128 mg) was obtained as a white powder in 74% yield, according to *general procedure F.*

Melting point: 154–155 °C

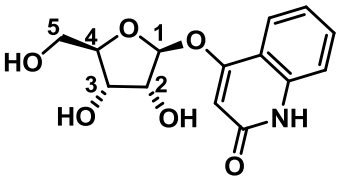
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.63 (s, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (s, 1H, H_{Ar}), 7.22 (m, 2H, H_{Ar}), 6.48 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.28 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-1), 5.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-3), 4.93 (m, 2H, H-2, H-4), 3.87 (brs, 1H, OH), 3.68 (brs, 1H, OH), 3.64 (m, 2H, H-5), 3.58 (brs, 1H, OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 161.6 (C=O), 151.3 (Cq_{Ar}-O), 139.8 (CH_{Ar}), 134.2 (Cq_{Ar}), 122.3, 121.0 (CH_{Ar}), 119.6 (Cq_{Ar}), 116.2, 113.6 (CH_{Ar}), 99.2 (C-1), 70.3 (C-2), 68.0 (C-4), 67.9 (C-3), 64.1 (C-5).

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 294,0 (100%); HRMS (ESI^-) calcd for $[C_{14}H_{15}NO_6-H]^-$: 292.0827; found: 292.0842

λ max (ex/em): 337/405 nm

2-Quinolinol-4-β-D-ribofuranose (71)



$C_{14}H_{15}NO_6$

M.W. = 293.27 g.mol^{-}

From Compound **63** (543 mg, 1.3 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (10.5 mL) and Et_3N (1.2 mL), compound **71** (250 mg) was obtained as a pink powder in 66% yield, according to *general procedure F.*

Melting point: 224–225 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.45 (s, 1H, NH), 7.85 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.52 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.29 (d, *J* = 8Hz, 1H, H_{Ar}), 7.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.96 (s, 1H, H_{Ar}), 5.47 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H-1), 5.27-5.03 (m, 3H, H-3, H-2, H-4), 3.95 (s, 1H, OH), 3.73-3.65 (m, 4H, H-5, OH).

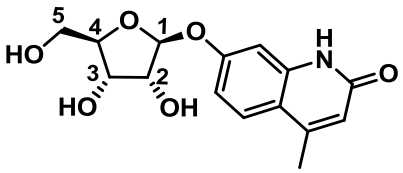
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.0 (C=O), 160.4 (Cq_{Ar}-OH), 138.7 (Cq_{Ar}), 131.0, 122.5, 121.3, 115.1 (CH_{Ar}), 114.4 (Cq_{Ar}), 99.6 (C-1), 98.2 (CH_{Ar}), 70.0 (C-2), 67.8 (C-4), 67.7 (C-3), 64.5 (C-5).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 293.8 (100%); HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{14}H_{15}NO_6+H]^+$: 294.0972; found: 294.1007

Elemental analysis: found (calcd), % C 56.10 (57.34) ; % H 5.18 (5.16) ; % N 4.70 (4.78) ; % O 32.07 (32.73).

λ max (ex/em): 313/380 nm

2-Quinolinol-4-methyl-7-β-D-ribofuranose (72)



$C_{15}H_{17}NO_6$

M.W. = 307.30 g.mol^{-1}

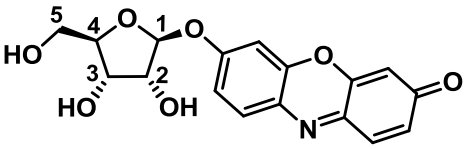
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): δ 11.63 (s, 1H, NH), 7.86 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (s, 1H, H_{Ar}), 7.22 (m, 2H, H_{Ar}), 6.48 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.28 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-1), 5.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, H-3), 4.93 (m, 2H, H-2, H-4), 3.87 (brs, 1H, OH), 3.68 (brs, 1H, OH) , 3.64 (m, 2H, H-5), 3.58 (brs, 1H, OH), 2.30 (CH_3).

Elemental analysis: found (calcd), % C 57.56 (58.63) ; % H 5.63 (5.58) ; % N 4.44 (4.56) ; % O 30.68 (31.24).

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{15}H_{17}NO_6+H]^+$: 294.0972; found: 294.0987

λ max (ex/em): 319/375 nm

Resorufin-7-β-D-ribofuranose (73)



$C_{17}H_{15}NO_7$

M.W. = 345.30 g.mol^{-1}

From Compound **65** (120 mg, 0.25 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (5.25 mL) and Et_3N (0.7 mL), **73** (63 mg) was obtained as a red powder in 72% yield, according to *general procedure F.*

Melting point: 246–247 °C

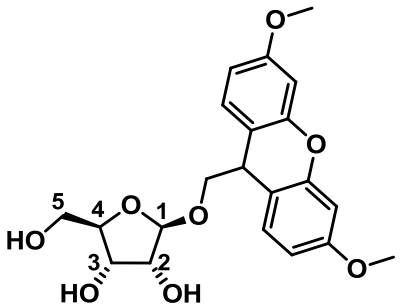
^{1}H NMR (250 MHz, DMSO): δ 7.79 (d, *J* = 9.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.53 (d, *J* = 9.75 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.10 (m, 2H, H_{Ar}), 6.79 (dd, *J* = 9.75 Hz, *J* = 2.25 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.27 (d, *J* = 2.25 Hz 1H, H_{Ar}), 5.46 (d, *J* = 5.75 Hz, 1H, H-1), 5.22 (d, *J* = 7Hz, 1H, H-3), 5.00 (m, 2H, H-2, H-4), 3.89 (brs, 1H, OH), 3.64 (m, 4H, H-5, OH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 185.4 (C=O), 160.3 (Cq_{Ar}), 149.7 (CH_{Ar}), 145.9 (Cq_{Ar}), 144.9 (Cq_{Ar}), 134.9 (CH_{Ar}), 133.9 (CH_{Ar}), 131.3 (Cq_{Ar}), 128.5 (Cq_{Ar}), 114.8 (CH_{Ar}), 105.8 (CH_{Ar}), 102.9 (CH_{Ar}), 98.7 (C-1), 70.1 (C-2), 68.1 (C-4), 67.6 (C-3), 64.2(C-5).

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{17}H_{15}NO_7-H]^-$: 344.0776; found: 344.0808

λ max (ex/em): 493/587 nm

1-Methyl-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-ß-D-ribofuranose (74)



$C_{21}H_{24}NO_8$

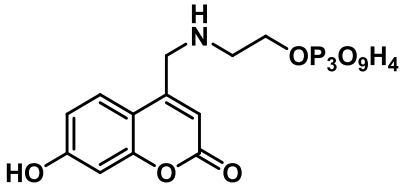
M.W. = 404.41 g.mol^{-1}

Compound **64** (187 mg, 0.25 mmol, 1 eq), MeOH/H_2O (3.125 mL) and Et_3N (0.3 mL), **74** (134 mg) was obtained as a green powder in 90% yield, according to *general procedure F.*

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.15 (m, 2H, H_{Ar}), 6.64-6.60 (m, 4H, H_{Ar}), 4.96 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-1), 4.82 (d, *J* = 7 Hz, 1H, H-3), 4.78 (m, 2H, H-2, H-4), 4.60 (t, *J* = 7 Hz, 1H, C*H*CH_2), 3.80 (s, 6H, OCH_3),

3.66 (dd, *J* = 7 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$), 3.56 (m, 1H, H-5), 3.48 (dd, *J* = 7 Hz, *J* = 8.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$), 3.40 (m, 1H, H-5').

7-Hydroxy-4-((2-triphosphate-ethylamino)methyl)-2H-chromen-2-one (75)



$C_{12}H_{16}NO_{13}P_3$

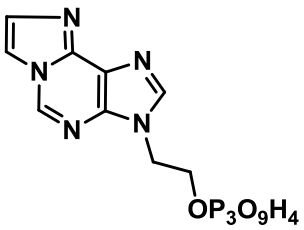
M.W. = 475.17 g.mol^{-1}

$POCl_3$ (93 µL, 1 mmol, 2 eq) was added to a solution of **30** (154 mg, 0.5 mmol, 1 eq) and proton sponge (214 mg, 1 mmol, 2 eq) in $PO(OMe)_3$ (1.5 mL). The reaction mixture was stirred for 2 h at 0 °C, and then a solution of TBAP/TBA (0.5 M) in DMF (2 mL) was added. After 3 min, a solution of TEAB (0.2 M, 20 mL) was added and the reaction was stirred for further 10 min at room temperature. The solution was concentrated and diluted into water (50 mL). The solution was purified by sephadex DEAE A-25 (TEAB : 0.01 M to 0.5 M during 4 h). The mixture obtained containing **75** was purified by preparative HPLC (CH_3CN/TEAA: 9/1 to 7/3). After lyophilisation, compound **75** (6 mg) was obtained as a pale yellow powder in 2% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): *δ* 7.76 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.94 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.87 (s, 1H, H_{Ar}), 6.39 (s, 1H, H_{Ar}), 4.42 (s, 2H, CH_2-Ar), 4.06 (m, CH_2N), 3.38 (t, 3H, CH_2O).

^{31}P NMR (101 MHz, D_2O): *δ* -6.56 (m, 1P), -11.02 (m, 1P), -21.03 (m, 1P).

Etheno-adenine-*N*-9-ethyltriphosphate (76)



$C_9H_{12}N_5O_{10}P_3$

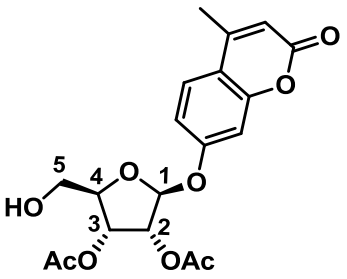
M.W. = 443.14 g.mol^{-1}

$POCl_3$ (139 µL, 1.5 mmol, 3 eq) was added to a solution of **11** (101 mg, 0.5 mmol, 1 eq) and proton sponge (214 mg, 1 mmol, 2 eq) in $PO(OMe)_3$ (1.5 mL). The reaction was stirred for 2 h at 0 °C, and then a solution of TBAP/TBA (0.5 M) in DMF (2 mL) was added. After 3 min, a solution of TEAB (0.2 M, 20 mL) was added and the reaction was stirred for 10 min at room temperature. The solution was concentrated and diluted into water (50 mL). The solution was purified by sephadex DEAE A-25 (TEAB : 0.01 M to 0.5 M during 4 h). The mixture obtained containing **76** was purified by HPLC preparative (CH_3CN/TEAA: 9/1 to 7/3) After lyophilisation, compound **76** (9 mg) was obtained as a pale yellow powder in 4% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ 9.31 (s, 1H, H_{Ar}), 8.54 (s, 1H, H_{Ar}), 8.17 (s, 1H, H_{Ar}), 7.79 (s, 1H, H_{Ar}), 4.39 (m, 2H, CH_2N), 3.55 (m, 2H, CH_2O).

^{31}P NMR (101 MHz, D_2O): δ -5.82 (m, 1P), -11.62 (m, 1P), -19.97 (m, 1P)

1-(7-Hydroxy-4-methyl-coumarin)-2,3-di-*O*-acetyl-ß-D-ribofuranose (77)



$C_{19}H_{20}O_9$

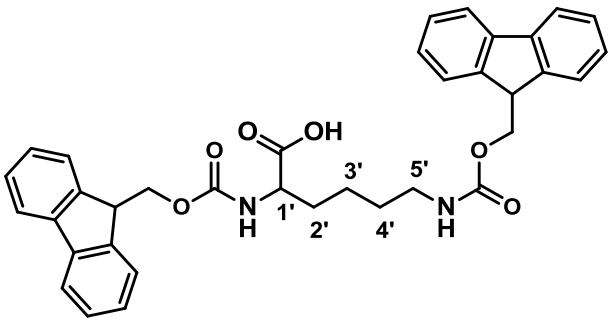
M.W. = 392.35 g.mol^{-1}

Compound **69** (157 mg, 0.36 mmol, 1 eq) was added in a solution of phosphate buffer (0.1 M NaH_2PO_4,13.5 mL) and DMF (1.5 mL) containing the lipase (*candida cylindracea*, 300 mg, 30000u/g). The solution was gently stirred (200 rpm) for 20 h at 28 °C and extracted with EtOAc (2×50 mL). The organic layers were dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. The residue was purified by chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc: 2/8). Compound **77** (9 mg) was obtained as a translucent foam in 6% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.09 (m, 2H, H_{Ar}), 6.27 (s, 1H, H_{Ar}), 5.70 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-1), 5.49 (d, *J* = 6 Hz, 1H, H-3), 4.94 (m, 2H, H-2, H-4), 4.26 (m, 1H, OH), 3.86 (m, 2H, H-5), 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.09, 2.07 (s, 3H, $COCH_3$).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 170.2, 169.9 ($OCOCH_3$), 159.9 (CO_{Ar}), 158.5(Cq_{Ar}-O), 154.3, 153.1 (Cq_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 114.6 (CH_{Ar}), 113.3 (Cq_{Ar}), 112.0(CH_{Ar}), 103.6 (CH_{Ar}), 95.6 (C-1), 70.0 (C-2), 68.4 (C-4), 63.5 (C-3), 61.2 (C-5), 20.9, 20.8 (CH_3), 14.0 (CH_3-Ar).

Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (78)



$C_{36}H_{34}N_2O_4$

M.W. = 590.66g.mol^{-1}

Fmoc-Lys(Boc)-OH (936 mg, 2 mmol, 1eq) was diluted in CH_2Cl_2/TFA (6 mL, 1/1) at 0 °C and the solution was stirred for 1 h at 0 °C. After evaporation, the residue was trated with aqueous Na_2CO_3 solution (0.5 N, 20 mL) and a solution of Fmoc-Cl (570 mg, 2.2 mmol, 1.1 eq) in THF (20 mL) was

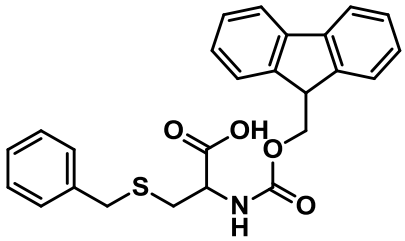
added. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature then THF was evaporated. The pH was adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N) and extracted with CH_2Cl_2 (3×50 mL). The organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The mixture obtained was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 90/10 to 80/20). Compound **78** (540 mg) was obtained as a white powder in 46% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, acetone-d_6): *δ* 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H, H_{Ar}), 7.67 (m, 4H, H_{Ar}), 7.41-7.26 (m, 9H, H_{Ar}, NH), 6.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 4.31-4.18 (m, 6H, OC*H*$_2$CH), 3.85 (m, 1H, H-1'), 2.97 (m, 2H, H-5'), 1.76-1.55 (m, 2H, H-2') 1.39-1.21 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, acetone-d_6): *δ* 172.2 (CO_2H), 157.4, 157.2 ($NHCO_2$), 145.2, 145.0 (2×Cq_{Ar}), 142.1 (4×Cq_{Ar}), 128.5 (4×CH_{Ar}), 128.0, 127.9 (2×CH_{Ar}), 126.2, 126.1 (2×CH_{Ar}), 120.8 (4×CH_{Ar}), 67.4, 66.9 (OCH_2), 49.8 (C-1'), 48.2, 48.1 (OCH_2*C*H), 41.3 (C-5'), 30.4 (C-2'), 23.8 (C-4'), 20.6 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 589.0 (30%) ; $[2M-H]^-$ = 1179.3 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{36}H_{34}N_2O_4-H]^-$: 589.2344; found: 589.2345

Fmoc-Cys(Cbz)-OH (79)



$C_{25}H_{23}NO_4S$

M.W. = 433.52 g.mol^{-1}

HCl·Cys(benzyl)-OH (100 mg, 0.4 mmol, 1 eq) was suspended in anhydrous CH_3CN (5 mL), then TMS-Cl (63 µL, 0.5 mmol, 1.25 eq) and DIEA (346 µL, 2 mmol, 5 eq) were added. The resulting solution was stirred for 30 min at room temperature, then a solution of Fmoc-Cl (1 M in CH_3CN) was added dropwise over 30 min at 0 °C. After stirring at this temperature for 30 min, EtOAc (15 mL) was added and the organic solution was washed with aqueous HCl solution (1 M, 15 mL) and brine (20 mL). Organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated in vacuo. Compound **79** (50 mg) was obtained as a white powder in 29% yield.

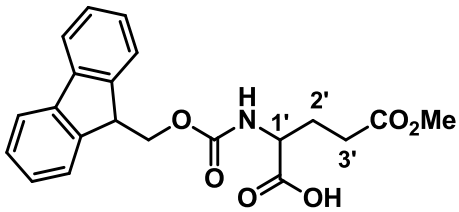
Melting point: 224–225 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.87 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.72 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.30-7.24 (m, 7H, H_{Ar}), 4.36-4.16 (m, 4H, OCH_2CH, NHC*H*), 3.79 (s, 2H, CH_2-Ph), 2.83-2.67 (m, 2H, (SC*H*$_2$CH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 171.7 (CO_2H), 156.0 ($NHCO_2$), 143.9, 140.8 (4 × Cq_{Ar} – Fmoc), 138.5 (Cq_{Ar}), 129.1, 129.0, 128.6, 128.5 (CH_{Ar}), 127.8, 127.2 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 126.9 (CH_{Ar}), 125.5 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 120.2 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 66.0 (OCH_2-Fmoc), 54.4 (NHCH), 46.7 (CH–Fmoc), 35.4 (CH_2-Ph), 26.4 (SCH_2CH).

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{25}H_{23}NO_4S-H]^-$: 432.1275; found: 432.1289

Fmoc-Glu(OMe)-OH (80)



$C_{21}H_{21}NO_6$

M.W. = 383.39 g.mol^{-1}

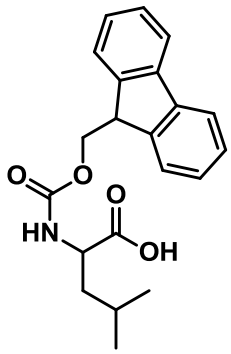
Glu(OMe)-OH (805 mg, 5 mmol, 1eq) was dissolved in aqueous Na_2CO_3 solution (0.5 N, 40 mL) and a solution of Fmoc-Cl (1.420 g, 5.5 mmol, 1.1 eq) in THF (40 mL) was added. The resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and THF was evaporated. The pH was adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N) and extracted with CH_2Cl_2 (3×200 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The mixture obtained was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 90/10/0.5).Compound **80** (1.250 g) was obtained as a white powder in 65% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 10.67 (brs, 1H, CO_2H), 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.27 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.37 (m, 3H, OCH_2, H-1'), 4.21 (m, 1H, OCH_2CH), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 2.44 (m, 2H, H-3'), 2.32 (m, 1H, H-2'), 2.01 (m, 1H, H-2'').

^{13}C NMR (126 MHz, acetone-d_6): *δ* 174.1 (CO_2H), 173.4 (CO_2CH_3), 157.3 ($NHCO_2$), 145.2, 142.1 (2×Cq_{Ar}), 128.5, 128.0, 126.3, 120.8 (2×CH_{Ar}), 67.5 (OCH_2), 57.6 (C-1'), 51.8 (OCH_3), 48.1 (OCH_2CH), 31.0, 30.7 (C-2', C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[2M-H]^-$ = 764.8 (100%) ; (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 384.0 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{21}H_{21}NO_6-H]^-$: 382.1296; found: 382.1309

Fmoc-DL-Leucine (81)



$C_{21}H_{23}NO_4$

M.W. = 353.41 g.mol^{-1}

DL-Leucine (1.312 g, 10 mmol, 1eq) was diluted in dioxane (30 mL) and 10% aqueous Na_2CO_3 solution (30 mL) then Fmoc-Cl (2.845 g, 11 mmol, 1.1 eq) was added by portion over 30 min. The solution was stirred overnight at room temperature, then extracted with EtOAc (2×200 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated in vacuo. The mixture obtained was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 95/5/0.1 to 85/15/0.5). Compound **81** (3.016 g) was obtained as a white powder in 85% yield.

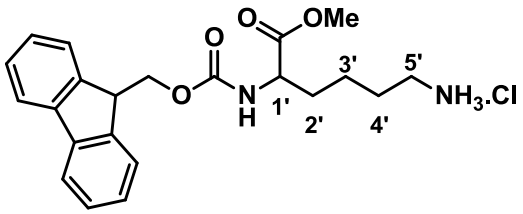
Melting point: 54–55 °C

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.57 (dd, *J* = 5 Hz, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.21 (s, 2H), 4.27 (m, 3H, OC*H*$_2$C*H*), 4.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, NHC*H*), 1.68 (m, 3H, C*H*$_2$C*H*(CH_3)$_2$), 0.91 (d, *J* = 7 Hz, 6H, $CH_2CH(CH_3)_2$).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 176.6 (CO_2H), 158.6 ($NHCO_2$), 145.2, 145.0 (Cq_{Ar}), 142.5 (2×Cq_{Ar}), 129.9, 129.1, 128.7, 128.2, 128.1 126.2, 126.1, 121.0 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH_2), 53.8 ($NHCH_2$), 48.3 (OCH_2CH), 41.8 ($NHCH_2CH$), 25.9 ($CH(CH_3)_2$), 23.5, 21.9 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 354.0 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{21}H_{23}NO_4\text{-}H]^-$: 352.1554; found: 352.1572

Fmoc-Lys-OMe (82)



$C_{22}H_{27}ClN_2O_4$

M.W. = 418.91 g.mol^{-1}

Fmoc-Lys(Boc)-OH (4.685 g, 10 mmol, 1 eq) was suspended in MeOH (100 mL), then $SOCl_2$ (1.814 mL, 25 mmol, 2.5 eq) was added dropwise at 0 °C. After 20 min, the solution was refluxed for 45 min, then cooled at room temperature and evaporated in vacuo. The mixture obtained was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 95/5). Compound **82** (3.688 g) was obtained as a white powder in 96% yield.

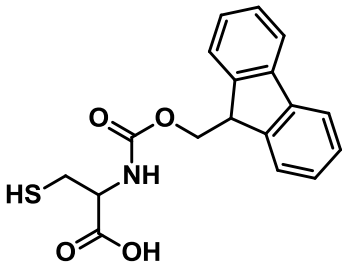
Melting point: 148–149 °C

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 8.20 (brs, 3H, NH_3^+), 7.74 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.62 (m, 2H, H_{Ar}), 7.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 5.91 (brs, 1H, NH), 4.36 (m, 3H, OC*H*$_2$CH, H-1'), 4.18 (t, *J* = 7 Hz, 1H, OCH_2CH), 3.69, (s, 3H, OCH_3), 3.06 (brs, 2H, H-5'), 1.93-1.71 (m, 4H, H-2', H-4') 1.49 (brs, 2H, H-3').

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 173.0 (CO_2Me), 156.3 ($NHCO_2$), 143.9, 141.4 (2×Cq_{Ar}), 127.8, 127.1, 125.3, 120.1 (2×CH_{Ar}), 67.2 (OCH_2), 53.8 (C-1'), 52.6 (OCH_3), 47.2 (OCH_2CH), 39.7 (C-5'), 31.6 (C-2'), 27.1 (C-4'), 22.5 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 383,1 (100%)

Fmoc-Cys-OH (83)



$C_{18}H_{17}NO_4S$

M.W. = 343.40 g.mol^{-1}

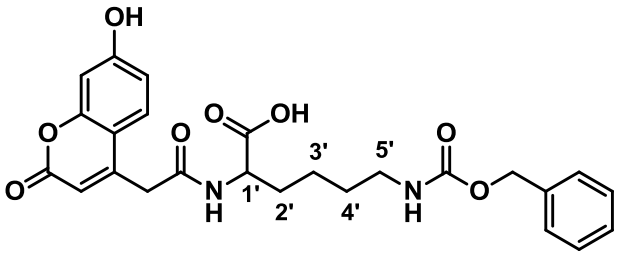
Fmoc-Cys(Trt)-OH (878 mg, 1.5 mmol, 1eq) was diluted in a solution of CH_2Cl_2/TFA (15 mL, 2/1) at 0 °C. The solution was stirred for 30 min at room temperature then the yellow color was quenched by the addition of triethyl silane (1.2 mL, 7.5 mmol, 5 eq). Upon complete addition, the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h and then concentrated. The oil was dissolved three times in CH_2Cl_2 (30 mL) and concentrated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 95/5/0.1 to 85/15/0.5). Compound **83** (498 mg) was obtained as a white powder in 97% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 12.60 (brs, 1H, CO_2H), 7.90 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.74 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.65 (d, *J* = 8 Hz, 1H, NH), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.33 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 4.30 (d, *J* = 7 Hz, 2H, OCH_2), 4.24 (t, *J* = 7 Hz, 1H, OCH_2CH), 4.12 (q, *J* = 8 Hz, 1H, NHC*H*), 2.89 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 3.5 Hz, 1H, SCH_2), 2.75 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, SCH_2), 1.91 (brs, 1H, SH).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 171.8 (CO_2H), 156.0 ($NHCO_2$), 143.8 (2×Cq_{Ar}), 140.7 (2×Cq_{Ar}), 127.6, 127.0, 125.2, 120.1 (2×CH_{Ar}), 65.7 (OCH_2), 56.5 (NHCH), 46.6 (OCH_2CH), 25.5 (CH_2SH).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 342.3 (90%) ; $[2M-H]^-$ = 685.2 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{18}H_{17}NO_4S-H]^-$: 342.0805; found: 342.0817

7-Hydroxy-4-(methylacetamido-Lys(Cbz)-OH)coumarin (84)



$C_{25}H_{26}N_2O_8$

M.W. = 482.48 g.mol^{-1}

7-Hydroxy-4-acid coumarin (220 mg, 1 mmol, 1 eq), HBTU (417 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) and HOBt (148 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) were diluted in anhydrous DMF (3 mL). DIEA (380 µL, 2.2 mmol, 2.2 eq) was added dropwise and the resulting solution was stirred few min, then a solution of Cbz-Lys(OMe)-OH (330.8 mg, 1 mmol, 1 eq) in DMF (1 mL) was added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and DMF was evaporated. The residue was diluted in EtOAc (50 mL), washed with brine (3×40 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The ester compound

was diluted with THF (4 mL) and a solution of aqueous LiOH (0.5 M, 4 mL) and stirred 2 h at room temperature. After evaporation THF, pH was adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N) and extracted with EtOAc (2×40 mL). Organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1). Compound **84** (90 mg) was obtained as a white powder in 19% yield.

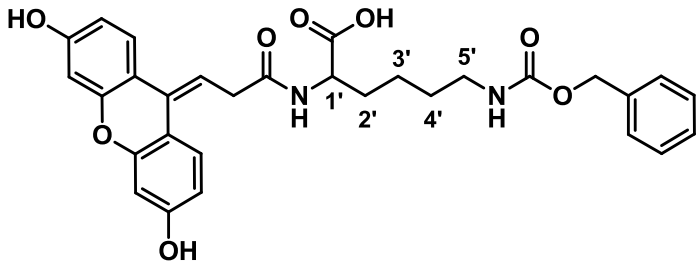
Melting point: *78*–79 °C

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.17 (m, 5H, H_{Ar}-Cbz), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.54 (s, 1H, H_{Ar}), 6.06 (s, 1H, H_{Ar}), 4.89 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.19 (m, 1H, H-1'), 3.60 (s, 2H, CH_2-Coum.), 2.93 (m, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-5'), 1.70, 1.56 (2m, 2H, H-2'), 1.34-1.25 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 175.2 (CO_2H), 170.8 (CONH) 163.1, 163.0, 158.9 (CO-coum.), 156.8 ($NHCO_2$), 152.6, 138.7 (Cq_{Ar}), 129.7 (2×CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.9 (2×CH_{Ar}), 127.9, 114.4 (CH_{Ar}), 113.2 (CH_{Ar}, Cq_{Ar}), 103.8 (CH_{Ar}), 67.3 (OCH_2-Ph), 66.9 (CH_2-Coum.), 54.0 (C-1'), 41.6 (C-5'), 32.2 (C-2'), 30.6 (C-4'), 24.3 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 483.1 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{25}H_{26}N_2O_8\text{-}H]^-$: 481.1616; found: 481.1619

Succinylfluoresceine-Lys(Cbz)-OH (85)



$C_{30}H_{30}N_2O_8$

M.W. = 549.57 g.mol^{-1}

Compound **45** (384 mg, 1 mmol, 1 eq), HBTU (417 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) and HOBt (148 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) were diluted with anhydrous DMF (3 mL). DIEA (380 µL, 2.2 mmol, 2.2 eq) was added dropwise and this solution was stirred for few min, then a solution of Cbz-Lys(OMe)-OH (330.8 mg, 1 mmol, 1 eq) in DMF (1 mL) was added. The solution was stirred overnight at room temperature. Solvent was evaporated and the residue was diluted in EtOAc (50 mL). The organic layer was washed with brine (3×40 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The mixture was diluted with a solution of aqueous LiOH (0.5 M)/THF (40 mL, 1/1) and stirred 2 h at room temperature. After evaporation of THF, the pH was adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N) and extracted with EtOAc (2×40 mL). Organic layer was dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1). Compound **85** (45 mg) was obtained as a red powder in 8% yield.

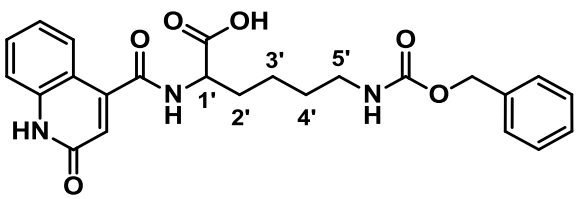
Melting point: 106–107 °C

^{1}H NMR (126 MHz, DMSO): δ 7.51 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{Ar}), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{Ar}), 7.15 (m, 5H, H_{Ar} -Cbz), 6.59-6.45 (m, 4H, H_{Ar}), 5.78 (t, 1H, *J* = 7 Hz), 4.69 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.25 (m, 1H, H-1'),3.31 (d, 2H, *J* = 7 Hz), 2.88 (m, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-5'), 1.70, 1.55 (m, 2H, H-2'), 1.29-1.18 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 172.9 (CO_2H), 164.8 (CONH),158.2, 157.9 (C_{Ar}-OH), 156.0 ($NHCO_2$)153.0 (Cq_{Ar}), 151.3 (Cq_{Ar}), 138.7 (Cq_{Ar}), , 128.3 (CH_{Ar}), 128.1 (2×CH_{Ar}), 127.2 (3×CH_{Ar}),125.7 (Cq_{Ar}), 123.3 (CH_{Ar}), 115.7 (CH_{Ar}), 114.0 (Cq_{Ar}), 113.1 (Cq_{Ar}), 111.9 (CH_{Ar}), 109.8 (=CH), 103.0 (CH_{Ar}), 102.4 (CH_{Ar}), 66.1 (OCH_2-Ph),52.6 (C-1'), 40.6(C-5'), 36.3 (CH_2CO). 31.0 (C-2'), 29.1 (C-4'), 22.9 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI^+), m/z (%): $[M+H]^+$ = 547.2 (100%); HRMS (ESI^-) calcd for $[C_{30}H_{30}N_2O_8\text{-}H]^-$: 545.1929; found: 545.1956

4-(Acetamido-Lys(Cbz)-OH)-2-quinolinone (86)



$C_{24}H_{25}N_3O_6$

M.W. = 451.47 g.mol^{-1}

From 4-craboxylic-2-quinolone acid (189 mg, 1 mmol, 1 eq), HCl·Lys(Cbz)-OMe (364 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq), HBTU (420 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) and DIEA (692 µL, 4 mmol, 4 eq), compound **86** (168 mg) was obtained, after purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1), as a white powder in 43% yield, according to *general procedure G.*

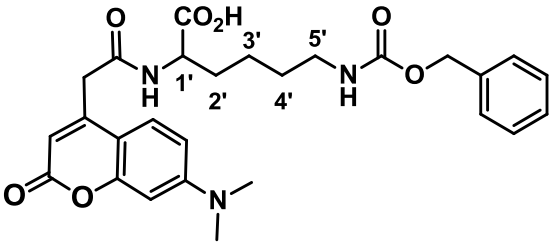
Melting point: 214–215 °C

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.94 (brs, 1H, CO_2H), 8.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.35-7.21 (m, 7H, H_{Ar}-Cbz), 7.17 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.53 (s, 1H, H_{Ar}), 4.98 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.27 (m, 1H, H-1'), 2.99 (m, 2H, H-5'), 1.85, 1.64 (m, 2H, H-2'), 1.46-1.34 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 173.0 (CO_2H), 165.3 ($CONH_{Ar}$), 161.4 (CO_{Ar}) 156.0 ($NHCO_2$), 146.6 (Cq_{Ar}), 139.2 (Cq_{Ar}), 137.3 (Cq_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 128.3 (2×CH_{Ar}), 127.6 (3×CH_{Ar}), 126.2 (Cq_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.5 (CH_{Ar}), 116.4 (CH_{Ar}), 115.5 (CH_{Ar}), 65.1 (OCH_2-Ph), 53.6 (C-1'), 40.2(C-5'), 31.1 (C-2'), 29.2 (C-4'), 23.0 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI^-), m/z (%): $[M-H]^-$ = 450.6 (20%) ; $[2M-H]^-$ = 902.0 (100%); HRMS (ESI^-) calcd for $[C_{24}H_{25}N_3O_6\text{-}H]^-$: 450.1670; found: 450.1669

7-Dimethylamine-4-(methylacetamido-Lys(Cbz)-OH)coumarin (87)



$C_{27}H_{31}N_3O_7$

M.W. = 509.55 g.mol^{-1}

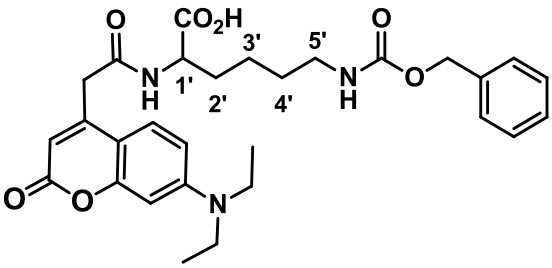
From **23** (125 mg, 0.5 mmol, 1 eq), HCl·Lys(Cbz)-OMe (165 mg, 0.6 mmol, 1.1 eq), HBTU (220 mg, 0.6 mmol, 1.1 eq) and DIEA (346 µL, 2 mmol, 4 eq), compound **87** (128 mg) was obtained by filtration, as a yellow powder in 49% yield, according to *general procedure G.*

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 8.55 (d, *J* = 7 Hz, 1H, NH), 7.56 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.30 (m, 6H, H_{Ar}-Cbz, NH), 6.66 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.54 (s, 1H, H_{Ar}), 6.04 (s, 1H, H_{Ar}), 5.00 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.16 (m, 1H, H-1'), 3.67 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.00 (m, 8H, H-5', CH_3), 1.71, 1.61 (2m, 2H, H-2'), 1.39-1.30 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 173.4 (CO_2H), 168.0 (CONH) 160.7, 156.0 (CO-coum.), 155.3 ($NHCO_2$), 152.8 (Cq_{Ar}), 151.3 (Cq_{Ar}-$N(Me)_2$), 137.7 (Cq_{Ar}), 128.3 (2×CH_{Ar}), 127.7 (3×CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 109.3 (CH_{Ar}), 108.9 (CH_{Ar}), 108.2 (Cq_{Ar}), 97.5 (CH_{Ar}), 65.1 (OCH_2-Ph), 52.00 (C-1'), 40.1 (C-5', CH_3), 38.4 (CH_2-Coum.), 30.6 (C-2'), 29.0 (C-4'), 22.7 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 510.1 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{27}H_{31}N_3O_7-H]^-$: 508.2089; found: 508.2089

7-Diethylamine-4-(methylacetamido-Lys(Cbz)-OH)coumarin (88)



$C_{29}H_{35}N_3O_7$

M.W. = 537.60 g.mol^{-1}

From **24** (275 mg, 1 mmol, 1 eq), HCl·Lys(Cbz)-OMe (360 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq), HBTU (440 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) and DIEA (865 µL, 5 mmol, 5 eq), compound **88** (128 mg) was obtained by filtration, as a yellow powder in 19% yield, according to *general procedure G.*

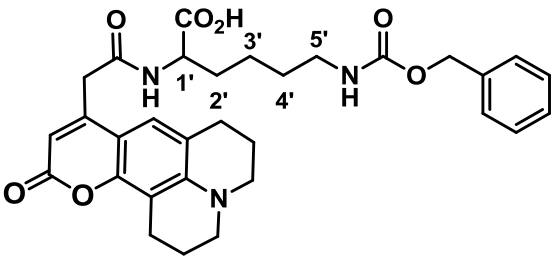
^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 8.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, NH), 7.52 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.30 (m, 6H, H_{Ar}-Cbz, NH), 6.66 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.54 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 5.99 (s, 1H, H_{Ar}), 5.00 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.15 (m, 1H, H-1'), 3.65 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.41 (q, *J* = 7 Hz, 4H,

N(CH_2CH_3)$_2$), 2.96 (m, 2H, H-5'), 1.72, 1.60 (2m, 2H, H-2'), 1.45-1.26 (m, 4H, H-3', H-4'), 1.10 (t, *J* = 7 Hz, 6H, N(CH_2CH_3)$_2$)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 173.4 (CO_2H), 168.0 (CONH), 160.7, 156.0 (CO-coum.), 155.7 ($NHCO_2$), 151.2 (Cq_{Ar}), 150.3 (Cq-N(Me)$_2$), 137.3 (Cq_{Ar}), 128.3 (2×CH_{Ar}), 127.7 (3×CH_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 108.8(CH_{Ar}), 108.5 (CH_{Ar}), 107.7 (Cq_{Ar}), 96.8 (CH_{Ar}), 65.1 (OCH_2-Ph), 52.00 (C-1'), 44.0 (NCH_2CH_3), 40.1 (C-5'), 38.4 (CH_2-Coum.), 30.6 (C-2'), 29.0 (C-4'), 22.7 (C-3'), 12.3 (NCH_2CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 538.1 (95%) ; $[2M+H]^+$ = 1074.9 (90%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{29}H_{35}N_3O_7\text{-}H]^-$: 536.2402; found: 536.2402

8-(Methylacetamido-Lys(Cbz)-OH)-2,3,5,6-tetrahydro-1*H*,4*H*-11-oxa-3a-aza-benzo[*de*]anthracen-10-one (89)



$C_{31}H_{35}N_3O_7$

M.W. = 561.63 g.mol^{-1}

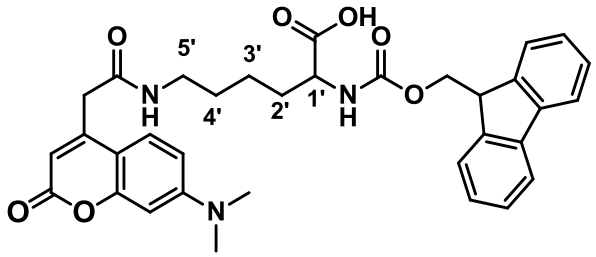
From **22** (150 mg, 0.5 mmol, 1 eq), HCl·Lys(Cbz)-OMe (182 mg, 0.55 mmol, 1.1 eq), HBTU (209 mg, 0.55 mmol, 1.1 eq) and DIEA (346 µL, 2 mmol, 4 eq), compound **89** (33 mg) was obtained by filtration, as a yellow powder in 12% yield, according to *general procedure G.*

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.40 (m, 5H, H_{Ar}-Cbz) 7.15 (s, 1H, H_{Ar}), 6.01 (s, 1H, H_{Ar}), 5.06 (s, 2H, CH_2-Ph), 4.40 (m, 1H, H-1'), 3.72 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.27 (m, 4H, CH_2N), 2.84-2.71 (m, 6H, 2 × CH_2-Ar, H-5'), 1.98-1.91 (m, 5H, 2 × CH_2-CH_2-CH_2, H-2'), 1.75 (m, 1H, H-2'), 1.62-1.41 (m, 4H, H-3', H-4')

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ 175.6 (CO_2H), 171.6 (CONH), 165.3, 161.4 (CO-coum.), 159.1($NHCO_2$), 152.7, 152.3, 147.7 (Cq_{Ar}), 138.3 (Cq_{Ar}), 129.6 (2×CH_{Ar}), 129.1(CH_{Ar}), 128.8 (3×CH_{Ar}), 123.3 (CH_{Ar}), 118.7 (Cq_{Ar}), 109.2 (CH_{Ar}), 108.8 (Cq_{Ar}), 67.5 (OCH_2-Ph), 51.0, 50.5 (CH_2-N), 41.5 (CH_2-Coum.), 40.1(C-5'), 32.0 (C-2'), 30.8 (C-4'), 28.8 (CH_2), 24.1 (C-3'), 22.5, 21.6, 21.4 (CH_2).

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{31}H_{35}N_3O_7\text{-}H]^-$: 560.2402; found: 560.2424

Fmoc-Lys(7-dimethylamine-4-methylacetamido-coumarin)-OH (91)



$C_{34}H_{35}N_3O_7$

M.W. = 597.66 g.mol^{-1}

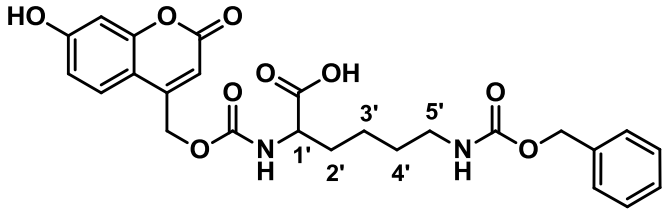
From **23** (247 mg, 1 mmol, 1 eq), **82** (442 mg, 1 mmol, 1 eq), HBTU (416 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) and DIEA (865 µL, 5 mmol, 5 eq), compound **91** (30 mg) was obtained, after purification by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1), as a yellow powder in 5% yield, according to *general procedure G.*

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.51 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.71 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.48 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.02 (s, 1H, H_{Ar}), 4.33 (d, *J* = 6 Hz, 2H, OC*H*$_2$CH), 4.18 (t, *J* = 6 Hz, 1H, OCH$_2$C*H*), 4.09 (m, 1H, H-1'), 3.64 (s, 2H, CH$_2$-Coum.), 3.21 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-5') 3.01 (m, 6H, N(CH$_3$)$_2$), 1.84, 1.68 (m, 2H, H-2'), 1.56-1.38 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 177.4 (CO_2H), 167.5 (CONH), 160.7 (CO-coum.), 155.5, 155.3 (Cq_{Ar}-O, $NHCO_2$), 152.7 (Cq_{Ar}), 151.4 (Cq-N(Me)$_2$), 143.8, 140.6 (2×Cq_{Ar}–Fmoc), 127.5, 127.0 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 126.0 (CH_{Ar}), 125.2 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 120.0 (2×CH_{Ar}–Fmoc), 109.3 (CH_{Ar}), 108.9 (CH_{Ar}), 108.2 (Cq_{Ar}), 97.4 (CH_{Ar}), 65.2 (OCH_2-Fmoc), 52.00 (C-1'), 46.7 (CH-Fmoc), 40.1 (C-5'), 40.0 (N(CH$_3$)$_2$), 38.7 (CH_2-Coum.), 32.0 (C-2'), 28.9 (C-4'), 22.7 (C-3').

Mass spectrometry: HRMS (ESI$^+$) calcd for $[C_{34}H_{33}N_3O_7+H]^+$: 596.24022, found: 596.24084

7-Hydroxy-4-(methoxyacetamido-Lys(Cbz)-OH)coumarin (92)



$C_{25}H_{26}N_2O_9$

M.W. = 498.48 g.mol^{-1}

Compound **32** (150 mg, 0.78 mmol, 1eq) and CDI (156 mg, 0.93 mmol, 1.2 eq) was added in dry DMF (2 mL) and the solution was stirred for 3 h at room temperature leading to a white precipitate. HCl·Lys(Cbz)-OMe. (307 mg, 0.93 mmol, 1.2 eq) and DIEA (215 µL, 1.25 mmol, 1.6 eq) were added in solution and heated to 80 °C for 1.5 h. After cooling to room temperature, the pH was adjusted to 3 with HCl (1 N) and solution was extracted with EtOAc (2×30 mL). Organic layer was washed with H_2O (2×20 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. After purification by column chromatography on silica gel (EtOAc), the ester compound was diluted with a solution of aqueous LiOH (0.5 M)/THF (3 mL, 1/1) and stirred at room temperature for 2 h. THF was removed under vaccum and the pH was

adjusted to 2 with aqueous HCl solution (1 N), then extracted with EtOAc (2×15 mL). Organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1). Compound **92** (80 mg) was obtained as a white gum in 21% yield.

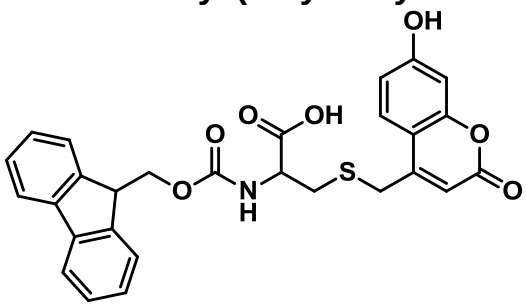
Melting point: 72–73 °C

^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.44 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.28 (m, 5H, H_{Ar}-Cbz), 6.76 (dd, *J* = 7.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.68 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.24 (s, 1H, H_{Ar}), 5.25 (s, 2H, CH_2-Ph), 5.02 (s, 2H, CH_2-Coum.), 4.18 (m, 1H, H-1'), 3.11 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H-5'), 1.87,1.72 (2m, 1H, H-2'), 1.54-1.42 (m, 4H, H-3', H-4').

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 175.3 (CO_2H), 163.5, 163.0, 158.9 (CO-coum.) 157.7, 156.7 ($NHCO_2$), 153.2 (Cq_{Ar}), 138.4 (Cq_{Ar}), 129.5 (2×CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.7 (2×CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 114.6 (CH_{Ar}), 111.0 (Cq_{Ar}), 108.9 (CH_{Ar}), 103.9 (CH_{Ar}), 67.4 (OCH_2-Ph), 62.0 (CH_2-Coum.), 52.9 (C-1'), 41.6 (C-5'), 32.4 (C-2'), 30.4 (C-4'), 24.1 (C-3').

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 499.1 (50%) ; $[2M+Na]^+$ = 1019.0 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{25}H_{26}N_2O_9\text{-}H]^-$: 497.1565; found: 497.1567

Fmoc-Cys(7-hydroxy-4-methylthiocoumarin)-OH (93)



$C_{28}H_{23}NO_7S$

M.W. = 517.55 g.mol^{-1}

Compound **17** (210 mg, 1 mmol, 1eq) and compound **83** (343 mg, 1 mmol, 1 eq) were diluted in dry THF (5 mL), then DIEA (173 µL, 1 mmol, 1 eq) was added dropwise and the solution was stirred overnight at room temperature. After evaporation, the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1) leading to compound **93** (102 mg) was obtained as a white powder in 20% yield.

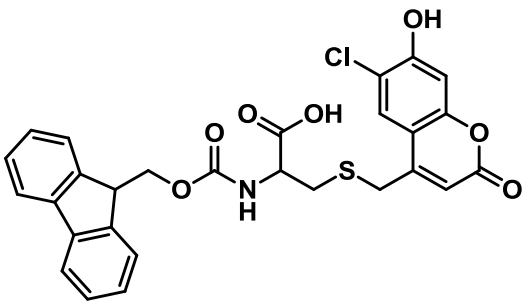
^{1}H NMR (500 MHz, MeOD): *δ* 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.70 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.40 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.78 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.71 (d, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, H_{Ar}), 4.29-4.22 (m, 3H, OCH_2CH), 4.10 (m, 1H, NHC*H*), 3.88 (s, 2H, CH_2-Coum.), 2.95 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4 Hz, 1H, CH_2S), 2.79 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH_2S).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): *δ* 172.0 (CO_2H), 161.3 (CO-coum.), 160.1 (Cq-OH), 155.8, 155.4 (Cq_{Ar}-O, $NHCO_2$), 152.4 (Cq_{Ar}), 143.8 (2×Cq_{Ar}), 140.7 (2×Cq_{Ar}), 127.6, 127.0 (2×CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 125.2,

120.0 (2×CH_{Ar}), 112.8 (CH_{Ar}), 110.3 (CH_{Ar}), 110.0 (Cq_{Ar}), 102.3 (CH_{Ar}), 65.6 (OCH_2), 54.2 (NHCH), 46.6 (OCH_2*C*H), 33.4 (CH*C*H_2S), 31.3 (CH_2-Coum.).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 516.1 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{28}H_{23}NO_7S-H]^-$: 516.1122; found: 516.1126

Fmoc-Cys(6-chloro-7-hydroxy-4-methylthiocoumarin)-OH (94)



$C_{28}H_{22}ClNO_7S$

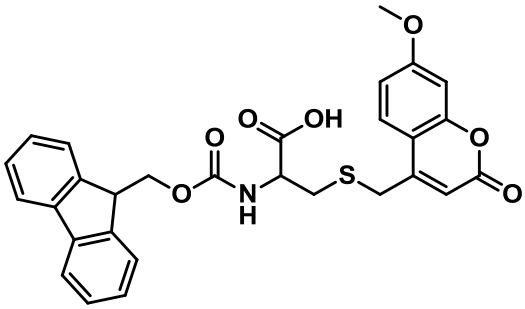
M.W. = 551.08 g.mol^{-1}

4-Chloromethyl coumarin **19** (49 mg, 0.2 mmol, 1eq) and Fmoc-Cys-OH **83** (68 mg, 0.2 mmol, 1 eq) were diluted in dry THF (2 mL), then DIEA (108 µL, 0.6 mmol, 3 eq) was added dropwise and the solution was stirred overnight at room temperature. After evaporation, the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 9/1/0.1) leading to compound **94** (35 mg) as a white powder in 32% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 12.87 (brs, 1H, CO_2H), 11.37 (brs, 1H, OH_{Ar}), 7.88 (m, 3H, 2H, H_{Ar}, H_{Ar}), 7.75 (d, *J* = 8 Hz, 1H, NH), 7.71 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.91 (s, 1H, H_{Ar}), 6.71 (s, 1H, H_{Ar}), 6.23 (s, 1H, H_{Ar}), 4.33-4.15 (m, 4H, OCH_2CH, NHC*H*), 3.96 (m, 2H, CH_2-Coum.), 2.95 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 4 Hz, 1H, C*H*$_2$S), 2.76 (dd, *J* = 13.5 Hz, *J* = 10 Hz, 1H, C*H*$_2$S).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 172.0 (CO_2H), 159.6 (CO-coum.), 156.2, 155.9, 155.8, 153.6, 151.4, 143.8, 143.7 (Cq_{Ar}), 140.7 (2×Cq_{Ar}), 127.6, 127.0 (2xCH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 125.2, 125.1 (CH_{Ar}), 120.0 (2×CH_{Ar}), 116.7 (Cq_{Ar}), 111.6 (CH_{Ar}), 110.9 (Cq_{Ar}), 103.4 (CH_{Ar}), 65.7 (OCH_2), 53.6 (NHCH), 46.6 (OCH_2*C*H), 32.7 (CH*C*H_2S), 31.2 (CH_2-Coum.).

Fmoc-Cys(7-methoxy-4-methylthiocoumarin)-OH (95)



$C_{29}H_{25}NO_7S$

M.W. = 531.58 g.mol^{-1}

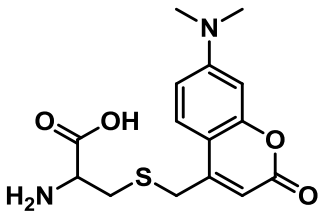
Compound **20** (224 mg, 1 mmol, 1 eq) and compound **83** (343 mg, 1 mmol, 1 eq) were diluted in dry DMF (8 mL), then Et_3N (278 µL, 2 mmol, 2 eq) was added dropwise and the solution was stirred overnight at room temperature. After evaporation, the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1) and compound **95** (152 mg) was obtained as a white powder in 28% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.75 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.70 (d, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.39 (t, *J* = 7 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.95 (s, 1H, H_{Ar}), 6.89 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.31 (s, 1H, H_{Ar}), 4.27-4.19 (m, 3H, OCH_2CH), 4.05 (m, 1H, NHC*H*), 3.92 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.81 (s, 3H, CH_3), 2.98 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, C*H*$_2$S), 2.79 (dd, *J* = 12.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, C*H*$_2$S).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 172.1 (CO_2H), 162.2 (CO coum.), 159.9 (Cq-OMe), 155.6, 155.3 (Cq_{Ar}-O, $NHCO_2$), 152.3 (Cq_{Ar}), 143.8 (2×Cq_{Ar}), 140.6 (2×Cq_{Ar}), 127.5, 127.0 (4 ×CH_{Ar}), 126.7 (CH_{Ar}), 125.2 and 120.0 (4×CH_{Ar}), 111.8 (CH_{Ar}), 111.3 (CH_{Ar}), 111.2 (Cq_{Ar}), 100.9 (CH_{Ar}), 65.6 (OCH_2), 55.8 and 55.7 (NHCH, OCH_3), 46.6 (OCH_2*C*H), 33.7 (CH*C*H$_2$S), 31.3 (CH_2-Coum.).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 532.2 (100%) ; (ESI$^-$), m/z (%) : $[M-H]^-$ = 530.2 (60%), $[2M-H]^-$ = 1061.3 (100%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{29}H_{25}NO_7S-H]^-$: 530.1279; found: 530.1277

Cys(7-dimethylamino-4-methylthiocoumarin)-OH (96)



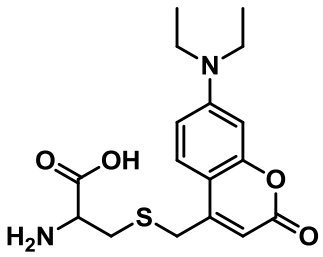
$C_{15}H_{18}N_2O_4S$

M.W. = 322.38 g.mol^{-1}

Compound **26** (237 mg, 1 mmol, 1 eq) and compound **83** (343 mg, 1 mmol, 1 eq) were diluted in dry DMF (8 mL), then Et_3N (560 µL, 4 mmol, 4 eq) was added dropwise, then the resulting solution was stirred overnight at room temperature. After evaporation to dryness, the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1) and compound **96** (186 mg) was obtained as a yellow powder in 58% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.92 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.56 (t, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.45 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.46 (s, 1H, H_{Ar}), 4.17 (m, 1H, NHC*H*), 3.90 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.16 (m, 6H, $N(CH_3)_2$) 2.99 (dd, *J* = 15 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, C*H*$_2$S), 2.91 (dd, *J* = 15 Hz, *J* = 7 Hz, 1H, C*H*$_2$S).

Cys(7-diethylamino-4-methylthiocoumarin)-OH (97)



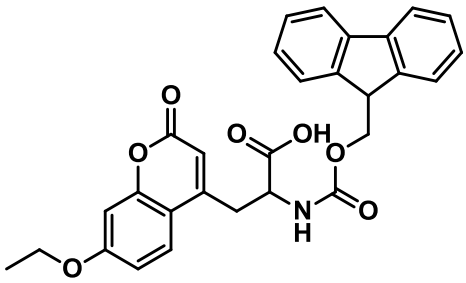
$C_{17}H_{22}N_2O_4S$

M.W. = 350.43 g.mol^{-1}

Compound **27** (319 mg, 1.2 mmol, 1.2 eq) and compound **83** (343 mg, 1 mmol, 1 eq) were diluted in dry DMF (8 mL), then Et_3N (560 µL, 4 mmol, 4 eq) was added dropwise, then the solution was stirred overnight at room temperature. After evaporation, the residue was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH/AcOH: 85/15/1) and compound **97** (168 mg) was obtained as a yellow powder in 48% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.82 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.45 (t, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.32 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.43 (s, 1H, H_{Ar}), 4.14 (m, 1H, NHC*H*), 3.85 (s, 2H, CH_2-Coum.), 3.26 (q, *J* = 6.5 Hz, 4H, $N(CH_2CH_3)_2$) 2.90 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H, C*H*$_2$S), 2.91 (dd, *J* = 14.5 Hz, *J* = 7 Hz, 1H, C*H*$_2$S), 1.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, $N(CH_2CH_3)_2$)

2-((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)-3-(7-ethoxy-coumarin)propanoic acid (98)



$C_{29}H_{25}NO_7$

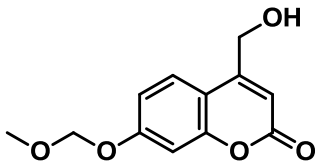
M.W. = 499.51 g.mol^{-1}

(1*S*)-1-Carboxy-2-(7-ethoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)ethyl ammonium methanesulfonate, **MPB75** (74 mg, 0.2 mmol, 1 eq) was diluted with solution of aqueous Na_2CO_3 (10%)/dioxane (4 mL, 1/1) and Fmoc-Cl (57 mg, 0.22 mmol, 1.1 eq) was added by portion over 30 min. The solution was stirred overnight at room temperature, then extracted with EtOAc (2×10 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and evaporated in vacuo. The mixture obtained was purified by column chromatography on silica gel (CH_2Cl_2/MeOH: 95/5 to 90/10). Compound **99** (20 mg) was obtained as a white powder in 25% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.87 (d, *J* = 8 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.84 (d, *J* = 8 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.60 (m, 2H, H_{Ar}), 7.39 (m, 2H, H_{Ar}), 7.28 (m, 2H, H_{Ar}), 6.93 (m, 3H, H_{Ar}), 6.16 (s, 1H, H_{Ar}), 5.33 (s, 2H, CH_2-coum), 4.23 (m, 1H, OCH_2C*H*), 4.13 (m, 2H, OC*H*$_2$CH), 4.11 (q, *J* = 7 Hz, 2H, C*H*$_2$$CH_3$), 3.12 (m, 1H, C*H*$_2$-Coum), 2.95 (m, 1H, C*H*$_2$-Coum), 1.33 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH_2C*H*$_3$).

Mass spectrometry: (ESI$^-$), m/z (%): $[M-H]^-$ = 498.1 (100%) ; $[2M-H]^-$ = 997.1 (60%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{29}H_{25}NO_7-H]^-$: 498.1558; found: 498.1563

7-(Methoxymethoxy)-4-hydroxymethylcoumarin (99)



$C_{12}H_{12}O_5$

M.W. = 236.22 g.mol^{-1}

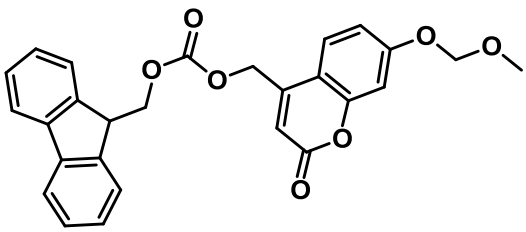
Compound **32** (576 mg, 3mmol, 1 eq) was suspended in CH_2Cl_2 at 0 °C. DIEA (272 µL, 3.6 mmol, 1.2 eq) and MOM-Cl (627 µL, 3.6 mmol, 1.2 eq) were added dropwise, and the solution was stirred for 45 min at 0 °C. After evaporation under reduced pressure, H_2O (10 mL) was added to the residue and the resulting precipitate was recovered by filtration and dried under vacuo. Compound **99** (511 mg) was obtained as a white solid in 71% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 7.64 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.05 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.00 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}) 6.33 (s, 1H, H_{Ar}), 5.31 (s, 2H, OCH_2O), 4.72 (s, 2H, CH_2OH), 3.40 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 160.3 (C=O), 159.4 (Cq_{Ar}-O), 156.5 (Cq-OMOM), 154.4, 148.4 (Cq_{Ar}), 125.5, 113.1 (CH_{Ar}), 111.5 (Cq_{Ar}), 111.1, 103.2 (CH_{Ar}), 93.9 (OCH_2O), 59.0 (CH_2OH), 58.9 (CH_3).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 237.1 (100%)

7-(Methoxymethoxy)-4-(methyl-*O*-Fmoc)-coumarin (100)



$C_{27}H_{22}O_7$

M.W. = 458.46 g.mol^{-1}

Fmoc-Cl (206 mg, 0.8 mmol, 1.2 eq) was added by portion over 30 min to a solution of compound **99** (160 mg, 0.68 mmol, 1eq) in dry pyridine (3 mL). After stirring 2 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with EtOAc (20 mL) and washed with brine (3×20 mL). The organic layer was dried, filtered and evaporated under vacuum. The residue was purified by silica-gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc: 9/1 to 7/3). Compound **100** (108 mg) was obtained as a white powder in 34% yield.

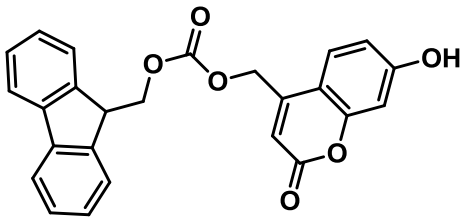
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* 7.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.40 (m, 3H, H_{Ar}), 7.31 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.97 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar})

6.38 (s, 1H, H_{Ar}), 5.29 (s, 2H, CH_2-Ar), 5.22 (s, 2H, OCH_2O), 4.48 (d, *J* = 7 Hz, 2H, CH_2OCO_2), 4.26 (t, *J* = 7 Hz, 1H, CH), 3.47 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): *δ* 160.7, 160.6 (C=O, Cq_{Ar}-O), 155.5 (OCO_2), 154.7 (Cq-OMOM), 148.4 (Cq_{Ar}), 143.2, 141.5 (2×Cq_{Ar}), 128.2, 125.3 (2×CH_{Ar}), 124.6 (CH_{Ar}), 120.4 (2×CH_{Ar}), 113.8 (CH_{Ar}), 111.5 (Cq_{Ar}), 111.1, 104.5 (CH_{Ar}), 94.6 (OCH_2O), 70.7 (CH*CH*$_2$), 64.7 (OCH_2Ar), 56.6 (CH_3), 46.9 (*C*HCH_2).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 458.3 (100%)

7-Hydroxy-4-(methyl-*O*-Fmoc)-coumarin (101)



$C_{25}H_{18}O_6$

M.W. = 414.41 g.mol^{-1}

Compound **100** (90 mg, 0.2 mmol) was supended in CH_2Cl_2 (1.5 mL) at 0 °C and TFA (1.5 mL) was added. The solution was stirred 1.5 h at room temperature. After evaporation of the solvents, the residue was purified by silica-gel column chromatography (cyclohexane/EtOAc: 9/1 to 7/3). Compound **101** (69 mg) was obtained as a white powder in 83% yield.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO): *δ* 10.63 (s, 1H, OH), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.66 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.51 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 7.41 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 7.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H_{Ar}), 6.81 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.75 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{Ar}), 6.08 (s, 1H, H_{Ar}), 5.33 (s, 2H, CH_2-coum), 4.61 (d, *J* = 6 Hz, 2H, OC*H*$_2$CH), 4.34 (t, *J* = 6 Hz, 1H, OCH_2C*H*).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): *δ* 161.4, 159.9, 155.0 (Cq_{Ar}-O), 153.9 (OCO_2), 149.7 (Cq_{Ar}), 143.2 (2×Cq_{Ar}), 140.8 (2×Cq_{Ar}), 127.7, 127.1 (2×CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.8, 120.1 (2×CH_{Ar}), 113.0 (CH_{Ar}), 108.9 (Cq_{Ar}), 108.4 (CH_{Ar}), 102.4 (CH_{Ar}), 69.2 (OCH_2-Fmoc), 64.6 (CH_2-Coum.), 46.3 (CH-Fmoc).

Mass spectrometry: (ESI$^+$), m/z (%): $[M+H]^+$ = 415.1 (100%) ; $[2M+Na]^+$ = 850.9 (60%); HRMS (ESI$^-$) calcd for $[C_{25}H_{18}O_6\text{-}H]^-$: 413.1030; found: 413.1040

Références bibliographiques

1. F. BARRAS, A. D., T. MIGNOT, *Photo, CNRS* **-**.
2. NICOT, A., *photo, IGBMC* **-**.
3. Leticia, P., *Photo, Inserm*.
4. Gubernator, N. G.; Zhang, H.; Staal, R. G.; Mosharov, E. V.; Pereira, D. B.; Yue, M.; Balsanek, V.; Vadola, P. A.; Mukherjee, B.; Edwards, R. H.; Sulzer, D.; Sames, D., Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science* **2009,** 324, (5933), 1441-4.
5. Sulzer, D.; Lee, M.; Gubernator, N. G.; Sames, D., Development of pH-Responsive Fluorescent False Neurotransmitters. *J Am Chem Soc* **2010,** 132, (26), 8828-+.
6. Rodriguez, P. C.; Pereira, D. B.; Borgkvist, A.; Wong, M. Y.; Barnard, C.; Sonders, M. S.; Zhang, H.; Sames, D.; Sulzer, D., Fluorescent dopamine tracer resolves individual dopaminergic synapses and their activity in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**.
7. Seixas de Melo, J.; Takato, S.; Sousa, M.; Melo, M. J.; Parola, A. J., Revisiting Perkin's dye(s): the spectroscopy and photophysics of two new mauveine compounds (B2 and C). *Chem Commun (Camb)* **2007**, (25), 2624-6.
8. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley: 2001.
9. Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, 1983.
10. Lakowicz, J., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press: New York, 1991.
11. Berezin, M. Y.; Achilefu, S., Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem Rev* **2010,** 110, (5), 2641-84.
12. Handbook, T. M. P., A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. **2013**.
13. Pang, Z.; Barash, E.; Santamaria-Pang, A.; Sevinsky, C.; Li, Q.; Ginty, F., Autofluorescence removal using a customized filter set. *Microsc Res Tech* **2013**.
14. Schnell, S. A.; Staines, W. A.; Wessendorf, M. W., Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem* **1999,** 47, (6), 719-30.
15. Liu, L.; Nie, Y.; Lin, L.; Li, W.; Huang, Z.; Xie, S.; Li, B., Pattern recognition of multiple excitation autofluorescence spectra for colon tissue classification. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **2013,** 10, (2), 111-9.
16. Cigan, M.; Donovalova, J.; Szocs, V.; Gaspar, J.; Jakusova, K.; Gaplovsky, A., 7-(Dimethylamino)coumarin-3-carbaldehyde and its phenylsemicarbazone: TICT excited state modulation, fluorescent H-aggregates, and preferential solvation. *J Phys Chem A* **2013,** 117, (23), 4870-83.
17. Clayton, R. M.; Feldman, M., Detection of antigens in the embryo by labelled antisera. *Experientia* **1955,** 11, (1), 29-31.
18. Mayersbach, H., [Immunohistological methods. II. Another labeling dye: 1-dimethylaminonaphthyl-5-sulfonic acid]. *Acta Histochem* **1958,** 5, (5-8), 351-68.
19. Riggs, J. L.; Seiwald, R. J.; Burckhalter, J. H.; Downs, C. M.; Metcalf, T. G., Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Am J Pathol* **1958,** 34, (6), 1081-97.
20. Marshall, J. D.; Eveland, W. C.; Smith, C. W., Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody technic with a modification of its application. *Proc Soc Exp Biol Med* **1958,** 98, (4), 898-900.
21. Marshall, J. M., Jr., Distributions of chymotrypsinogen, procarboxypeptidase, desoxyribonuclease, and ribonuclease in bovine pancreas. *Exp Cell Res* **1954,** 6, (1), 240-2.
22. Hobson, P. N.; Mann, S. O., Some studies on the identification of rumen bacteria with fluorescent antibodies. *J Gen Microbiol* **1957,** 16, (2), 463-71.
23. Moody, M. D.; Winter, C. C., Rapid identification of Pasteurella pestis with fluorescent antibody. III. Staining Pasteurella pestis in tissue impression smears. *J Infect Dis* **1959,** 104, (3), 288-94.
24. Thomason, B. M.; Cherry, W. B.; Edwards, P. R., Staining bacterial smears with fluorescent antibody. VI. Identification of Salmonellae in fecal specimens. *J Bacteriol* **1959,** 77, (4), 478-86.
25. Carver, R. K.; Goldman, M., Staining Toxoplasma gondii with fluorescein-labeled antibody. III. The reaction in frozen and paraffin sections. *Am J Clin Pathol* **1959,** 32, (2), 159-64.
26. Coons, A. H., The diagnostic application of fluorescent antibodies. *Schweiz Z Pathol Bakteriol* **1959,** 22, 700-23.
27. Watson, B. K.; Coons, A. H., Studies of influenza virus infection in the chick embryo using fluorescent antibody. *J Exp Med* **1954,** 99, (5), 419-28.
28. Hoyle, L., Structure of the influenza virus; the relation between biological activity and chemical structure of virus fractions. *J Hyg (Lond)* **1952,** 50, (2), 229-45.
29. Breitenfeld, P. M.; Schafer, W., The formation of fowl plague virus antigens in infected cells, as studied with fluorescent antibodies. *Virology* **1957,** 4, (2), 328-45.

30. Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **1962,** 59, 223-39.
31. Smith, A. M.; Gao, X.; Nie, S., Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. *Photochem Photobiol* **2004,** 80, (3), 377-85.
32. Kloepfer, J. A.; Mielke, R. E.; Wong, M. S.; Nealson, K. H.; Stucky, G.; Nadeau, J. L., Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels. *Appl Environ Microbiol* **2003,** 69, (7), 4205-13.
33. Wenhua, L.; Haiyan, X.; Zhixiong, X.; Jianhong, O.; Xiangdong, C.; Ping, S., Exploring permeability of Escherichia coli competence using quantum dots as fluorescent probes. *J Biochem Biophys Methods* **2004,** 61, (3), 265-70.
34. Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J., Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **1992,** 111, (2), 229-33.
35. Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y., Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994,** 91, (26), 12501-4.
36. Cody, C. W.; Prasher, D. C.; Westler, W. M.; Prendergast, F. G.; Ward, W. W., Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry* **1993,** 32, (5), 1212-8.
37. Tsien, R. Y., The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **1998,** 67, 509-44.
38. Ormo, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J., Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* **1996,** 273, (5280), 1392-5.
39. Yang, F.; Moss, L. G.; Phillips, G. N., Jr., The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **1996,** 14, (10), 1246-51.
40. Ehrmann, M. A.; Scheyhing, C. H.; Vogel, R. F., In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol* **2001,** 32, (4), 230-4.
41. Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994,** 263, (5148), 802-5.
42. Shaner, N. C.; Patterson, G. H.; Davidson, M. W., Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* **2007,** 120, (Pt 24), 4247-60.
43. Goedhart, J.; von Stetten, D.; Noirclerc-Savoye, M.; Lelimousin, M.; Joosen, L.; Hink, M. A.; van Weeren, L.; Gadella, T. W., Jr.; Royant, A., Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat Commun* **2012,** 3, 751.
44. Peterman, E. J. G.; Brasselet, S.; Moerner, W. E., The Fluorescence Dynamics of Single Molecules of Green Fluorescent Protein. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999,** 103, (49), 10553-10560.
45. Jung, G.; Wiehler, J.; Steipe, B.; Brauchle, C.; Zumbusch, A., Single-molecule microscopy of the green fluorescent protein using simultaneous two-color excitation. *Chemphyschem* **2001,** 2, (6), 392-6.
46. Matz, M. V.; Lukyanov, K. A.; Lukyanov, S. A., Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays* **2002,** 24, (10), 953-9.
47. Matz, M. V.; Fradkov, A. F.; Labas, Y. A.; Savitsky, A. P.; Zaraisky, A. G.; Markelov, M. L.; Lukyanov, S. A., Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **1999,** 17, (10), 969-73.
48. Tsien, R. Y., Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Lett* **2005,** 579, (4), 927-32.
49. Dabrowski, S.; Brillowska-Dabrowska, A.; Kur, J., Fluorescent protein vector for directional selection of PCR clones. *Biotechniques* **2000,** 29, (4), 800, 802, 804, 806 passim.
50. Kotarsky, K.; Owman, C.; Olde, B., A chimeric reporter gene allowing for clone selection and high-throughput screening of reporter cell lines expressing G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem* **2001,** 288, (2), 209-15.
51. Sun, Y.; Wong, M. D.; Rosen, B. P., Role of cysteinyl residues in sensing Pb(II), Cd(II), and Zn(II) by the plasmid pI258 CadC repressor. *J Biol Chem* **2001,** 276, (18), 14955-60.
52. Zhao, H.; Ivic, L.; Otaki, J. M.; Hashimoto, M.; Mikoshiba, K.; Firestein, S., Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **1998,** 279, (5348), 237-42.
53. Josenhans, C.; Friedrich, S.; Suerbaum, S., Green fluorescent protein as a novel marker and reporter system in Helicobacter sp. *FEMS Microbiol Lett* **1998,** 161, (2), 263-73.
54. Lemaire-Vieille, C.; Schulze, T.; Podevin-Dimster, V.; Follet, J.; Bailly, Y.; Blanquet-Grossard, F.; Decavel, J. P.; Heinen, E.; Cesbron, J. Y., Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000,** 97, (10), 5422-7.
55. Terskikh, A.; Fradkov, A.; Ermakova, G.; Zaraisky, A.; Tan, P.; Kajava, A. V.; Zhao, X.; Lukyanov, S.; Matz, M.; Kim, S.; Weissman, I.; Siebert, P., "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science* **2000,** 290, (5496), 1585-8.
56. Subach, F. V.; Subach, O. M.; Gundorov, I. S.; Morozova, K. S.; Piatkevich, K. D.; Cuervo, A. M.; Verkhusha, V. V., Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nat Chem Biol* **2009,** 5, (2), 118-26.

57. Wang, S.; Hazelrigg, T., Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in Drosophila oogenesis. *Nature* **1994,** 369, (6479), 400-03.
58. Yang, T. T.; Sinai, P.; Green, G.; Kitts, P. A.; Chen, Y. T.; Lybarger, L.; Chervenak, R.; Patterson, G. H.; Piston, D. W.; Kain, S. R., Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* **1998,** 273, (14), 8212-6.
59. Chiu, W.; Niwa, Y.; Zeng, W.; Hirano, T.; Kobayashi, H.; Sheen, J., Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol* **1996,** 6, (3), 325-30.
60. Lorang, J. M.; Tuori, R. P.; Martinez, J. P.; Sawyer, T. L.; Redman, R. S.; Rollins, J. A.; Wolpert, T. J.; Johnson, K. B.; Rodriguez, R. J.; Dickman, M. B.; Ciuffetti, L. M., Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl Environ Microbiol* **2001,** 67, (5), 1987-94.
61. Cormack, B. P.; Bertram, G.; Egerton, M.; Gow, N. A.; Falkow, S.; Brown, A. J., Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in Candida albicans. *Microbiology* **1997,** 143 (Pt 2), 303-11.
62. Humphris, A. D.; Zhao, B.; Catto, D.; Howard-Knight, J. P.; Kohli, P.; Hobbs, J. K., High speed nano-metrology. *Rev Sci Instrum* **2011,** 82, (4), 043710.
63. D.E. Crone, Y.-M. H., D.J. Pitman, C. Schenkelberg, K. Fraser, S. Macari and C. Bystroff, GFP-Based Biosensors. In *"State of the Art in Biosensors - General Aspects"*, Rinken, T., Ed. 2013.
64. Kulzer, S.; Petersen, W.; Baser, A.; Mandel, K.; Przyborski, J. M., Use of self-assembling GFP to determine protein topology and compartmentalisation in the Plasmodium falciparum-infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol* **2013,** 187, (2), 87-90.
65. Jensen, K. K.; Martini, L.; Schwartz, T. W., Enhanced fluorescence resonance energy transfer between spectral variants of green fluorescent protein through zinc-site engineering. *Biochemistry* **2001,** 40, (4), 938-45.
66. Mahajan, N. P.; Linder, K.; Berry, G.; Gordon, G. W.; Heim, R.; Herman, B., Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. *Nat Biotechnol* **1998,** 16, (6), 547-52.
67. Mahajan, N. P.; Harrison-Shostak, D. C.; Michaux, J.; Herman, B., Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis. *Chem Biol* **1999,** 6, (6), 401-9.
68. Nagai, Y.; Miyazaki, M.; Aoki, R.; Zama, T.; Inouye, S.; Hirose, K.; Iino, M.; Hagiwara, M., A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nat Biotechnol* **2000,** 18, (3), 313-6.
69. Miyawaki, A.; Griesbeck, O.; Heim, R.; Tsien, R. Y., Dynamic and quantitative Ca2+ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999,** 96, (5), 2135-40.
70. Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J. M.; Adams, J. A.; Ikura, M.; Tsien, R. Y., Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **1997,** 388, (6645), 882-7.
71. Li, Y.; Agrawal, A.; Sakon, J.; Beitle, R. R., Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *J Chromatogr A* **2001,** 909, (2), 183-90.
72. Siddiki, M. S.; Kawakami, Y.; Ueda, S.; Maeda, I., Solid phase biosensors for arsenic or cadmium composed of A trans factor and cis element complex. *Sensors (Basel)* **2011,** 11, (11), 10063-73.
73. Sankaranarayanan, S.; De Angelis, D.; Rothman, J. E.; Ryan, T. A., The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J* **2000,** 79, (4), 2199-208.
74. Takahashi, A.; Zhang, Y.; Centonze, E.; Herman, B., Measurement of mitochondrial pH in situ. *Biotechniques* **2001,** 30, (4), 804-8, 810, 812 passim.
75. Cheki, M.; Moslehi, M.; Assadi, M., Marvelous applications of quantum dots. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2013,** 17, (9), 1141-8.
76. F, A., Synthèse et fonctionnalisation de nanocristaux fluorescents (Quantum Dots) pour l'imagerie et la caractérisation des propriétés hydrophobes/hydrophiles de biofilms bactériens. *Thèse* **2010,** Nancy-Université.
77. Gao, X.; Cui, Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W.; Nie, S., In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* **2004,** 22, (8), 969-76.
78. Sukhanova, A.; Devy, J.; Venteo, L.; Kaplan, H.; Artemyev, M.; Oleinikov, V.; Klinov, D.; Pluot, M.; Cohen, J. H.; Nabiev, I., Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem* **2004,** 324, (1), 60-7.
79. Manabe, N.; Hoshino, A.; Liang, Y. Q.; Goto, T.; Kato, N.; Yamamoto, K., Quantum dot as a drug tracer in vivo. *IEEE Trans Nanobioscience* **2006,** 5, (4), 263-7.
80. Qi, L.; Gao, X., Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy. *Expert Opin Drug Deliv* **2008,** 5, (3), 263-7.
81. Tan, W. B.; Jiang, S.; Zhang, Y., Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. *Biomaterials* **2007,** 28, (8), 1565-71.
82. June, C. H.; Moore, J. S., Measurement of intracellular ions by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* **2004,** Chapter 5, Unit 5 5.

83. O'Grady, S. M.; Patil, N.; Melkamu, T.; Maniak, P. J.; Lancto, C.; Kita, H., ATP release and Ca2+ signaling by human bronchial epithelial cells following Alternaria aeroallergen exposure. *J Physiol* **2013**.
84. Kim, H. N.; Ren, W. X.; Kim, J. S.; Yoon, J., Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions. *Chem Soc Rev* **2012,** 41, (8), 3210-44.
85. Horn, M. A.; Meadows, R. P.; Apostol, I.; Jones, C. R.; Gorenstein, D. G.; Heinstein, P. F.; Low, P. S., Effect of Elicitation and Changes in Extracellular pH on the Cytoplasmic and Vacuolar pH of Suspension-Cultured Soybean Cells. *Plant Physiol* **1992,** 98, (2), 680-6.
86. Modesti, M., Fluorescent labeling of proteins. *Methods Mol Biol* **2011,** 783, 101-20.
87. Lukinavicius, G.; Johnsson, K., Switchable fluorophores for protein labeling in living cells. *Curr Opin Chem Biol* **2011,** 15, (6), 768-74.
88. Yee, D. J.; Balsanek, V.; Sames, D., New tools for molecular imaging of redox metabolism: development of a fluorogenic probe for 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases. *J Am Chem Soc* **2004,** 126, (8), 2282-3.
89. Pramanik, A., Ligand-receptor interactions in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* **2004,** 5, (2), 205-12.
90. Brun, M. A.; Griss, R.; Reymond, L.; Tan, K. T.; Piguet, J.; Peters, R. J.; Vogel, H.; Johnsson, K., Semisynthesis of fluorescent metabolite sensors on cell surfaces. *J Am Chem Soc* **2011,** 133, (40), 16235-42.
91. Brun, M. A.; Tan, K. T.; Griss, R.; Kielkowska, A.; Reymond, L.; Johnsson, K., A semisynthetic fluorescent sensor protein for glutamate. *J Am Chem Soc* **2012,** 134, (18), 7676-8.
92. Hediger, M. A.; Clemencon, B.; Burrier, R. E.; Bruford, E. A., The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* **2013,** 34, (2-3), 95-107.
93. Fredriksson, R.; Nordstrom, K. J.; Stephansson, O.; Hagglund, M. G.; Schioth, H. B., The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett* **2008,** 582, (27), 3811-6.
94. . The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series). *Molecular Aspects of Medicine* **2013,** Vol 34, (issues 2-3), 95-752.
95. Sawada, K.; Echigo, N.; Juge, N.; Miyaji, T.; Otsuka, M.; Omote, H.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y., Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008,** 105, (15), 5683-6.
96. Yamada, K.; Nakata, M.; Horimoto, N.; Saito, M.; Matsuoka, H.; Inagaki, N., Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **2000,** 275, (29), 22278-83.
97. Yamada, K.; Saito, M.; Matsuoka, H.; Inagaki, N., A real-time method of imaging glucose uptake in single, living mammalian cells. *Nat Protoc* **2007,** 2, (3), 753-62.
98. O'Neil, R. G.; Wu, L.; Mullani, N., Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol* **2005,** 7, (6), 388-92.
99. Bernardinelli, Y.; Magistretti, P. J.; Chatton, J. Y., Astrocytes generate Na+-mediated metabolic waves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004,** 101, (41), 14937-42.
100. Loaiza, A.; Porras, O. H.; Barros, L. F., Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* **2003,** 23, (19), 7337-42.
101. Chuquet, J.; Quilichini, P.; Nimchinsky, E. A.; Buzsaki, G., Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J Neurosci* **2010,** 30, (45), 15298-303.
102. Gross, H. J., Fluorescent CMP-sialic acids as a tool to study the specificity of the CMP-sialic acid carrier and the glycoconjugate sialylation in permeabilized cells. *Eur J Biochem* **1992,** 203, (1-2), 269-75.
103. Suzuki, K.; Ohtake, A.; Ito, Y.; Kanie, O., Synthesis of a fluorescently tagged sialic acid analogue useful for live-cell imaging. *Chem Commun (Camb)* **2012,** 48, (78), 9744-6.
104. Maiti, S.; Shear, J. B.; Williams, R. M.; Zipfel, W. R.; Webb, W. W., Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation. *Science* **1997,** 275, (5299), 530-2.
105. Colgan, L. A.; Putzier, I.; Levitan, E. S., Activity-dependent vesicular monoamine transporter-mediated depletion of the nucleus supports somatic release by serotonin neurons. *J Neurosci* **2009,** 29, (50), 15878-87.
106. Schwartz, J. W.; Blakely, R. D.; DeFelice, L. J., Binding and transport in norepinephrine transporters. Real-time, spatially resolved analysis in single cells using a fluorescent substrate. *J Biol Chem* **2003,** 278, (11), 9768-77.
107. Solis, E., Jr.; Zdravkovic, I.; Tomlinson, I. D.; Noskov, S. Y.; Rosenthal, S. J.; De Felice, L. J., 4-(4-(dimethylamino)phenyl)-1-methylpyridinium (APP+) is a fluorescent substrate for the human serotonin transporter. *J Biol Chem* **2012,** 287, (12), 8852-63.
108. Vaney, D. I., Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science* **1986,** 233, (4762), 444-6.
109. Silva, N. L.; Mariani, A. P.; Harrison, N. L.; Barker, J. L., 5,7-Dihydroxytryptamine identifies living dopaminergic neurons in mesencephalic cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988,** 85, (19), 7346-50.

110. Lawal, H. O.; Krantz, D. E., SLC18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Molecular Aspects of Medicine* **2013,** 34, (2–3), 360-372.
111. Partilla, J. S.; Dempsey, A. G.; Nagpal, A. S.; Blough, B. E.; Baumann, M. H.; Rothman, R. B., Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **2006,** 319, (1), 237-46.
112. Liu, Y.; Peter, D.; Roghani, A.; Schuldiner, S.; Prive, G. G.; Eisenberg, D.; Brecha, N.; Edwards, R. H., A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **1992,** 70, (4), 539-51.
113. Kopin, I. J., False adrenergic transmitters. *Annu Rev Pharmacol* **1968,** 8, 377-94.
114. Hu, G.; Henke, A.; Karpowicz, R. J.; Sonders, M. S.; Farrimond, F.; Edwards, R.; Sulzer, D.; Sames, D., New Fluorescent Substrate Enables Quantitative and High-Throughput Examination of Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2). *Acs Chem Biol* **2013,** 8, (9), 1947-1954.
115. Reimer, R. J., SLC17: A functionally diverse family of organic anion transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **2013,** 34, (2–3), 350-359.
116. Omote, H.; Miyaji, T.; Juge, N.; Moriyama, Y., Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* **2011,** 50, (25), 5558-65.
117. Gras, C.; Amilhon, B.; Lepicard, E. M.; Poirel, O.; Vinatier, J.; Herbin, M.; Dumas, S.; Tzavara, E. T.; Wade, M. R.; Nomikos, G. G.; Hanoun, N.; Saurini, F.; Kemel, M. L.; Gasnier, B.; Giros, B.; El Mestikawy, S., The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* **2008,** 11, (3), 292-300.
118. El Mestikawy, S.; Wallen-Mackenzie, A.; Fortin, G. M.; Descarries, L.; Trudeau, L. E., From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* **2011,** 12, (4), 204-16.
119. Larsson, M.; Sawada, K.; Morland, C.; Hiasa, M.; Ormel, L.; Moriyama, Y.; Gundersen, V., Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cereb Cortex* **2012,** 22, (5), 1203-14.
120. Sathe, M. N.; Woo, K.; Kresge, C.; Bugde, A.; Luby-Phelps, K.; Lewis, M. A.; Feranchak, A. P., Regulation of purinergic signaling in biliary epithelial cells by exocytosis of SLC17A9-dependent ATP-enriched vesicles. *J Biol Chem* **2011,** 286, (28), 25363-76.
121. Tokunaga, A.; Tsukimoto, M.; Harada, H.; Moriyama, Y.; Kojima, S., Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol Chem* **2010,** 285, (23), 17406-16.
122. Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Verkhratsky, A.; Zimmermann, H., Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* **2009,** 32, (1), 19-29.
123. Housley, G. D.; Bringmann, A.; Reichenbach, A., Purinergic signaling in special senses. *Trends Neurosci* **2009,** 32, (3), 128-41.
124. Sperlagh, B.; Heinrich, A.; Csolle, C., P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update. *Purinergic Signal* **2007,** 3, (4), 269-84.
125. Volonte, C.; D'Ambrosi, N., Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters. *FEBS J* **2009,** 276, (2), 318-29.
126. White, N.; Burnstock, G., P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* **2006,** 27, (4), 211-7.
127. Morin, P.; Sagne, C.; Gasnier, B., Functional characterization of wild-type and mutant human sialin. *EMBO J* **2004,** 23, (23), 4560-70.
128. Aula, P., Gahl, W.A. , The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. In Valle, D., Ed. McGraw-Hill: New York, 2001.
129. Miyaji, T.; Echigo, N.; Hiasa, M.; Senoh, S.; Omote, H.; Moriyama, Y., Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008,** 105, (33), 11720-4.
130. Morland, C.; Nordengen, K.; Larsson, M.; Prolo, L. M.; Farzampour, Z.; Reimer, R. J.; Gundersen, V., Vesicular uptake and exocytosis of L-aspartate is independent of sialin. *FASEB J* **2013,** 27, (3), 1264-74.
131. Verheijen, F. W.; Verbeek, E.; Aula, N.; Beerens, C. E.; Havelaar, A. C.; Joosse, M.; Peltonen, L.; Aula, P.; Galjaard, H.; van der Spek, P. J.; Mancini, G. M., A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat Genet* **1999,** 23, (4), 462-5.
132. Aula, N.; Salomaki, P.; Timonen, R.; Verheijen, F.; Mancini, G.; Mansson, J. E.; Aula, P.; Peltonen, L., The spectrum of SLC17A5-gene mutations resulting in free sialic acid-storage diseases indicates some genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* **2000,** 67, (4), 832-40.
133. Fan, J. Q., A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. *Biol Chem* **2008,** 389, (1), 1-11.
134. Pietrancosta, N.; Anne, C.; Prescher, H.; Ruivo, R.; Sagne, C.; Debacker, C.; Bertrand, H. O.; Brossmer, R.; Acher, F.; Gasnier, B., Successful prediction of substrate-binding pocket in SLC17 transporter sialin. *J Biol Chem* **2012,** 287, (14), 11489-97.
135. Goncalves, T.; Sameiro, M., Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes. *Chem Rev* **2009,** 109, (1), 190-212.
136. Lavis, L. D.; Raines, R. T., Bright ideas for chemical biology. *ACS Chem Biol* **2008,** 3, (3), 142-55.

137. Leskovar, A.; Reinstein, J., Photophysical properties of popular fluorescent adenosine nucleotide analogs used in enzyme mechanism probing. *Arch Biochem Biophys* **2008,** 473, (1), 16-24.
138. Root, D. D.; Reisler, E., The accessibility of etheno-nucleotides to collisional quenchers and the nucleotide cleft in G- and F-actin. *Protein Sci* **1992,** 1, (8), 1014-22.
139. Srivastava, S. C.; Raza, S. K.; Misra, R., 1,N6-etheno deoxy and ribo adenosine and 3,N4-etheno deoxy and ribo cytidine phosphoramidites. Strongly fluorescent structures for selective introduction in defined sequence DNA and RNA molecules. *Nucleic Acids Res* **1994,** 22, (7), 1296-304.
140. Obtulowicz, T.; Winczura, A.; Speina, E.; Swoboda, M.; Janik, J.; Janowska, B.; Ciesla, J. M.; Kowalczyk, P.; Jawien, A.; Gackowski, D.; Banaszkiewicz, Z.; Krasnodebski, I.; Chaber, A.; Olinski, R.; Nair, J.; Bartsch, H.; Douki, T.; Cadet, J.; Tudek, B., Aberrant repair of etheno-DNA adducts in leukocytes and colon tissue of colon cancer patients. *Free Radic Biol Med* **2010,** 49, (6), 1064-71.
141. Fang-Jie, Z.; Sih, C. J., Enzymatic cyclization of 1,N6-etheno-nicotinamide adenine dinucleotide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995,** 5, (15), 1701-1706.
142. Gualix, J.; Abal, M.; Pintor, J.; Garcia-Carmona, F.; Miras-Portugal, M. T., Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules. Evidence for a mnemonic regulation. *J Biol Chem* **1996,** 271, (4), 1957-65.
143. Gualix, J.; Pintor, J.; Miras-Portugal, M. T., Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem* **1999,** 73, (3), 1098-104.
144. Dubois, L.; Acher, F. C.; McCort-Tranchepain, I., Microwave-Promoted Michael Addition of Azaheterocycles to α,β-Unsaturat-ed Esters and Acid under Solvent-Free Conditions. *Synlett* **2012,** 23, (EFirst), 791-795.
145. Lira, E. P.; Huffman, C. W., Some Michael-Type Reactions with Adenine. *The Journal of Organic Chemistry* **1966,** 31, (7), 2188-2191.
146. Loupy, A.; Perreux, L., A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron* **2001,** 57, (45), 9199-9223.
147. Khalafi-Nezhad, A.; Zarea, A.; Rad, M. N. S.; Mokhtari, B.; Parhami, A., Microwave-assisted Michael addition of some pyrimidine and purine nucleobases with alpha,beta-unsaturated esters: A rapid entry into carboacyclic nucleoside synthesis. *Synthesis-Stuttgart* **2005**, (3), 419-424.
148. Busca, P.; McCort, I.; Prangé, T.; Le Merrer, Y., Synthesis of C-Nucleosidic ATP Mimics as Potential FGFR3 Inhibitors. *European Journal of Organic Chemistry* **2006,** 2006, (10), 2403-2409.
149. Chittepu, P.; Sirivolu, V. R.; Seela, F., Nucleosides and oligonucleotides containing 1,2,3-triazole residues with nucleobase tethers: synthesis via the azide-alkyne 'click' reaction. *Bioorg Med Chem* **2008,** 16, (18), 8427-39.
150. Borissow, C.; Black, S.; Paul, M.; Tovey, S.; Dedos, S.; Taylor, C.; Potter, B., Adenophostin A and analogues modified at the adenine moiety: synthesis, conformational analysis and biological activity. *Org Biomol Chem* **2005,** 3, (2), 245-252.
151. Carvalho, V. M.; Gasparutto, D.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H.; Cadet, J., Site-specific incorporation of the 1-hexanol-1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine adduct into oligodeoxyribonucleotides. *Bioorg Med Chem* **2003,** 11, (11), 2445-52.
152. Chirakul, P.; Litzer, J. R.; Sigurdsson, S., Preparation of base-deuterated 2'-deoxyadenosine nucleosides and their site-specific incorporation into DNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001,** 20, (12), 1903-13.
153. Dao, P.; Garbay, C.; Chen, H., Regioselective synthesis of imidazo[1,2-a][1,3,5]triazines and 3,4-dihydroimidazo[1,2-a][1,3,5]triazines from [1,3,5]triazin-2,4-diamines. *Tetrahedron* **2013,** 69, (19), 3867-3871.
154. Raju, B. C.; Tiwari, A. K.; Kumar, J. A.; Ali, A. Z.; Agawane, S. B.; Saidachary, G.; Madhusudana, K., alpha-Glucosidase inhibitory antihyperglycemic activity of substituted chromenone derivatives. *Bioorgan Med Chem* **2010,** 18, (1), 358-365.
155. Nolan, K. A.; Doncaster, J. R.; Dunstan, M. S.; Scott, K. A.; Frenkel, A. D.; Siegel, D.; Ross, D.; Barnes, J.; Levy, C.; Leys, D.; Whitehead, R. C.; Stratford, I. J.; Bryce, R. A., Synthesis and biological evaluation of coumarin-based inhibitors of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1). *J Med Chem* **2009,** 52, (22), 7142-56.
156. Curten, B.; Kullmann, P. H.; Bier, M. E.; Kandler, K.; Schmidt, B. F., Synthesis, photophysical, photochemical and biological properties of caged GABA, 4-[[(2H-1-benzopyran-2-one-7-amino-4-methoxy) carbonyl] amino] butanoic acid. *Photochem Photobiol* **2005,** 81, (3), 641-8.
157. Bourbon, P.; Peng, Q.; Ferraudi, G.; Stauffacher, C.; Wiest, O.; Helquist, P., Synthesis and photochemical behavior of coumarin-caged cholesterol. *Bioorg Med Chem Lett* **2013,** 23, (7), 2162-5.
158. Takaoka, K.; Tatsu, Y.; Yumoto, N.; Nakajima, T.; Shimamoto, K., Synthesis of carbamate-type caged derivatives of a novel glutamate transporter blocker. *Bioorg Med Chem* **2004,** 12, (13), 3687-94.
159. Potdar, M. K.; Mohile, S. S.; Salunkhe, M. M., Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Lett* **2001,** 42, (52), 9285-9287.
160. Johnson, J. R., The Perkin Reaction and Related Reactions. In *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc.: 2004.

161. Shriner, R. L., The Reformatsky Reaction. In *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc.: 2004.
162. Yavari, I.; Hekmat-Shoar, R.; Zonouzi, A., A new and efficient route to 4-carboxymethylcoumarins mediated by vinyltriphenylphosphonium salt. *Tetrahedron Letters* **1998,** 39, (16), 2391-2392.
163. Hermodson, M. A.; Barker, W. M.; Link, K. P., Studies on the 4-hydroxycoumarins. Synthesis of the metabolites and some other derivatives of warfarin. *J Med Chem* **1971,** 14, (2), 167-9.
164. Carotti, A.; Pisani, L.; Muncipinto, G.; Miscioscia, T. F.; Nicolotti, O.; Leonetti, F.; Catto, M.; Caccia, C.; Salvati, P.; Soto-Otero, R.; Mendez-Alvarez, E.; Passeleu, C., Discovery of a Novel Class of Potent Coumarin Monoamine Oxidase B Inhibitors: Development and Biopharmacological Profiling of 7-[(3-Chlorobenzyl)oxy]-4-[(methylamino)methyl]-2H-chromen-2-one Methanesulfonate (NW-1772) as a Highly Potent, Selective, Reversible, and Orally Active Monoamine Oxidase B Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009,** 52, (21), 6685-6706.
165. Păunescu, E.; Louise, L.; Jean, L.; Romieu, A.; Renard, P.-Y., A versatile access to new halogenated 7-azidocoumarins for photoaffinity labeling: Synthesis and photophysical properties. *Dyes and Pigments* **2011,** 91, (3), 427-434.
166. Kirrane, T. M.; Middleton, W. J., 7-Amino-4-perfluoroheptylcoumarins: a novel class of perfluorocarbon-soluble fluorescent dyes. *Journal of Fluorine Chemistry* **1993,** 62, (2–3), 289-292.
167. De, S. K.; Gibbs, R. A., An Efficient and Practical Procedure for the Synthesis of 4-Substituted Coumarins. *Synthesis* **2005,** 2005, (EFirst), 1231-1233.
168. Wirtz, L.; Kazmaier, U., A Mild Titanium-Catalyzed Synthesis of Functionalized Amino Coumarins as Fluorescence Labels. *Eur J Org Chem* **2011,** 2011, (35), 7062-7065.
169. Naik, M.; Mishra, B.; Dubey, A., A simple and efficient protocol for the synthesis of substituted comarins catalyzed by stannic(IV) chloride under solvent-free condition. *React Kinet Catal Lett* **2007,** 91, (1), 169-175.
170. Ferlin, M. G.; Bortolozzi, R.; Brun, P.; Castagliuolo, I.; Hamel, E.; Basso, G.; Viola, G., Synthesis and in vitro Evaluation of 3H-Pyrrolo[3,2-f]quinolin-9-one Derivatives That Show Potent and Selective Anti-leukemic Activity. *Chemmedchem* **2010,** 5, (8), 1373-1385.
171. Gerber, S. A.; Turecek, F.; Gelb, M. H., Design and synthesis of substrate and internal standard conjugates for profiling enzyme activity in the Sanfilippo syndrome by affinity chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Bioconjug Chem* **2001,** 12, (4), 603-15.
172. Seebach, D.; Hungerbühler, E.; Naef, R.; Schnurrenberger, P.; Weidmann, B.; Züger, M., Titanate-Mediated Transesterifications with Functionalized Substrates. *Synthesis* **1982,** 1982, (02), 138-141.
173. Wirtz, L.; Auerbach, D.; Jung, G.; Kazmaier, U., Fluorescence Labeling of Amino Acids and Peptides with 7-Aminocoumarins. *Synthesis* **2012,** 44, (13), 2005-2012.
174. Knierzinger, A.; Wolfbeis, O. S., Syntheses of fluorescent dyes. IX. New 4-hydroxycoumarins, 4-hydroxy-2-quinolones, 2H,5H-Pyrano[3,2-c]benzopyran-2,5-diones and 2H,5H-Pyrano[3,2-c]quinoline-2,5-diones. *J Heterocyclic Chem* **1980,** 17, (2), 225-229.
175. Baba, R.; Hori, Y.; Mizukami, S.; Kikuchi, K., Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J Am Chem Soc* **2012,** 134, (35), 14310-3.
176. Foggi, P.; Gentili, P. L.; Mugnai, M.; Bussotti, L.; Righini, R.; Cicchi, S.; Ghini, G.; Viviani, S.; Brandi, A., The ultrafast energy transfer process in naphtole-nitrobenzofurazan bichromophoric molecular systems - A study by ferntosecond UV-vis pump-probe spectroscopy. *J Photoch Photobio A* **2007,** 187, (2-3), 209-221.
177. Watanabe, S., Synthesis of fluorescent alkyl lactoside derivatives. *Carbohyd Res* **2008,** 343, (13), 2325-2328.
178. Majumdar, K. C.; Kundu, N., Regioselective synthesis of heterocyclic scaffold by aryl radical cyclization. *J Heterocyclic Chem* **2008,** 45, (4), 1039-1044.
179. Zhou, Z.; Fahrni, C. J., A fluorogenic probe for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne ligation reaction: modulation of the fluorescence emission via 3(n,pi)-1(pi,pi) inversion. *J Am Chem Soc* **2004,** 126, (29), 8862-3.
180. Fumagalli, L.; Bolchi, C.; Colleoni, S.; Gobbi, M.; Moroni, B.; Pallavicini, M.; Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G.; Valoti, E., QSAR study for a novel series of ortho monosubstituted phenoxy analogues of alpha1-adrenoceptor antagonist WB4101. *Bioorg Med Chem* **2005,** 13, (7), 2547-59.
181. Laras, Y.; Hugues, V.; Chandrasekaran, Y.; Blanchard-Desce, M.; Acher, F. C.; Pietrancosta, N., Synthesis of quinoline dicarboxylic esters as biocompatible fluorescent tags. *J Org Chem* **2012,** 77, (18), 8294-302.
182. Jung, H. S.; Kwon, P. S.; Lee, J. W.; Kim, J. I.; Hong, C. S.; Kim, J. W.; Yan, S.; Lee, J. Y.; Lee, J. H.; Joo, T.; Kim, J. S., Coumarin-derived Cu(2+)-selective fluorescence sensor: synthesis, mechanisms, and applications in living cells. *J Am Chem Soc* **2009,** 131, (5), 2008-12.
183. Sheng, R.; Wang, P.; Gao, Y.; Wu, Y.; Liu, W.; Ma, J.; Li, H.; Wu, S., Colorimetric test kit for Cu2+ detection. *Org Lett* **2008,** 10, (21), 5015-8.
184. Gao, M.; Wang, M.; Miller, K. D.; Hutchins, G. D.; Zheng, Q. H., Synthesis and in vitro biological evaluation of carbon-11-labeled quinoline derivatives as new candidate PET radioligands for cannabinoid CB2 receptor imaging. *Bioorg Med Chem* **2010,** 18, (6), 2099-106.

185. Gordo, J.; Avo, J.; Parola, A. J.; Lima, J. C.; Pereira, A.; Branco, P. S., Convenient synthesis of 3-vinyl and 3-styryl coumarins. *Org Lett* **2011,** 13, (19), 5112-5.
186. Kantevari, S.; Matsuzaki, M.; Kanemoto, Y.; Kasai, H.; Ellis-Davies, G. C., Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA. *Nat Methods* **2010,** 7, (2), 123-5.
187. Koefod, R. S.; Mann, K. R., Preparation, photochemistry, and electronic structures of coumarin laser dye complexes of cyclopentadienylruthenium(II). *Inorganic Chemistry* **1989,** 28, (12), 2285-2290.
188. Curran, A. C. W., 5,6,7,8-Tetrahydroquinolines. Part I. A novel synthesis of 7,8-dihydroquinolin-5(6H)-ones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1976,** 0, (9), 975-977.
189. Misani, F.; Bogert, M. T., The search for superior drugs for tropical diseases; further experiments in the quinoline group. *J Org Chem* **1945,** 10, 458-63.
190. Sakai, N.; Aoki, D.; Hamajima, T.; Konakahara, T., Yb(OTf)3-catalyzed cyclization of an N-silylenamine with 2-methylene-1,3-cyclohexanedione to afford a 7,8-dihydroquinolin-5(6H)-one derivative and its application to the one-pot conversion to a 2,3,5-trisubstituted quinoline derivative. *Tetrahedron Letters* **2006,** 47, (8), 1261-1265.
191. Wu, Y. C.; Liu, L.; Li, H. J.; Wang, D.; Chen, Y. J., Skraup-Doebner-Von Miller quinoline synthesis revisited: reversal of the regiochemistry for gamma-aryl-beta,gamma-unsaturated alpha-ketoesters. *J Org Chem* **2006,** 71, (17), 6592-5.
192. Ryabukhin, S. V.; Naumchik, V. S.; Plaskon, A. S.; Grygorenko, O. O.; Tolmachev, A. A., 3-haloquinolines by Friedlander reaction of alpha-haloketones. *J Org Chem* **2011,** 76, (14), 5774-81.
193. Gladiali, S.; Chelucci, G.; Mudadu, M. S.; Gastaut, M. A.; Thummel, R. P., Friedlander synthesis of chiral alkyl-substituted 1,10-phenanthrolines. *J Org Chem* **2001,** 66, (2), 400-5.
194. Zhang, X.; Yao, T.; Campo, M. A.; Larock, R. C., Synthesis of substituted quinolines by the electrophilic cyclization of n-(2-alkynyl)anilines. *Tetrahedron* **2010,** 66, (6), 1177-1187.
195. Li, X.; Mao, Z.; Wang, Y.; Chen, W.; Lin, X., Molecular iodine-catalyzed and air-mediated tandem synthesis of quinolines via three-component reaction of amines, aldehydes, and alkynes. *Tetrahedron* **2011,** 67, (21), 3858-3862.
196. Chaskar, A.; Padalkar, V.; Phatangare, K.; Langi, B.; Shah, C., Miceller-Mediated Phosphomolybdic Acid: Highly Effective Reusable Catalyst for Synthesis of Quinoline and Its Derivatives. *Synthetic Commun* **2010,** 40, (15), 2336-2340.
197. Corey, E. J.; Tramontano, A., Total synthesis of the quinonoid alcohol dehydrogenase coenzyme (1) of methylotrophic bacteria. *J Am Chem Soc* **1981,** 103, (18), 5599-5600.
198. Itoh, S.; Kato, J.-i.; Inoue, T.; Kitamura, Y.; Komatsu, M.; Ohshiro, Y., Syntheses of Pyrroloquinoline Quinone Derivatives: Model Compounds of a Novel Coenzyme PQQ (Methoxatin). *Synthesis* **1987,** 1987, (12), 1067-1071.
199. Heindel, N. D.; Bechara, I. S.; Lemke, T. F.; Fish, V. B., Cyclization of aniline-acetylenedicarboxylate adducts. Improved synthesis of 8-nitro-2-carbomethoxy-4(1H)-quinolones. *The Journal of Organic Chemistry* **1967,** 32, (12), 4155-4157.
200. Carmack, M.; Kissinger, L. W.; Von, I., 5-Methyl-6-methoxy-8-(2'-diethylaminoethylamino)-quinoline. *J Am Chem Soc* **1946,** 68, 1551.
201. Inglis, S. R.; Stojkoski, C.; Branson, K. M.; Cawthray, J. F.; Fritz, D.; Wiadrowski, E.; Pyke, S. M.; Booker, G. W., Identification and specificity studies of small-molecule ligands for SH3 protein domains. *J Med Chem* **2004,** 47, (22), 5405-17.
202. Priya, N.; Gupta, A.; Chand, K.; Singh, P.; Kathuria, A.; Raj, H. G.; Parmar, V. S.; Sharma, S. K., Characterization of 4-methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-6-yl acetate as an effective antiplatelet agent. *Bioorg Med Chem* **2010,** 18, (11), 4085-94.
203. Fujioka, T.; Teramoto, S.; Mori, T.; Hosokawa, T.; Sumida, T.; Tominaga, M.; Yabuuchi, Y., Novel positive inotropic agents: synthesis and biological activities of 6-(3-amino-2-hydroxypropoxy)-2(1H)-quinolinone derivatives. *J Med Chem* **1992,** 35, (20), 3607-12.
204. Manimaran, T.; Thiruvengadam, T. K.; Ramakrishnan, V. T., Synthesis of Coumarins (2-Oxo-2H-1-benzopyrans), Thiacoumarins (2-Oxo-2H-1-benzothiopyrans), and Carbostyrils (2-Oxo-1,2-dihydroquinolines). *Synthesis* **1975,** 1975, (11), 739-741.
205. Wang, T.-C.; Chen, Y.-L.; Lee, K.-H.; Tzeng, C.-C., Lewis Acid Catalyzed Reaction of Cinnamanilides: Competition of Intramolecular and Intermolecular Friedel-Crafts Reaction. *Synthesis* **1997,** 1997, (01), 87-90.
206. Seyedi Seyed, M.; Sadeghian, H.; Arghiani, Z., NEW PROCEDURE FOR THE TOTAL SYNTHESIS OF CILOSTAMIDE. In *Heterocyclic Communications*, 2008; Vol. 14, p 183.
207. Kojima, N.; Morioka, T.; Urabe, D.; Yano, M.; Suga, Y.; Maezaki, N.; Ohashi-Kobayashi, A.; Fujimoto, Y.; Maeda, M.; Yamori, T.; Yoshimitsu, T.; Tanaka, T., Convergent synthesis of fluorescence-labeled probes of Annonaceous acetogenins and visualization of their cell distribution. *Bioorgan Med Chem* **2010,** 18, (24), 8630-8641.
208. Bag, B.; Pal, A., Water induced chromogenic and fluorogenic signal modulation in a bi-fluorophore appended acyclic amino-receptor system. *Org Biomol Chem* **2011,** 9, (3), 915-925.

209. Altmann, K. H.; Gertsch, J.; Feyen, F.; Butzberger, A.; Gerber, B.; Pfeiffer, B., Making Epothilones Fluoresce: Design, Synthesis, and Biological Characterization of a Fluorescent N12-Aza-Epothilone (Azathilone). *Chembiochem* **2009,** 10, (15), 2513-2521.
210. Gazizova, E. I.; Yusupov, R. A.; Kataeva, O. N.; Yusupova, L. M., The interaction of disodium salt of 4,6-dinitro-1-oxobenzo-[6,5-c]-2,1,3-oxadiazolediol-5,7 with NaOH and HCl. *Russ J Coord Chem* **2008,** 34, (11), 864-868.
211. Zhao, B.; Ranguelova, K.; Jiang, J.; Mason, R. P., Studies on the photosensitized reduction of resorufin and implications for the detection of oxidative stress with Amplex Red. *Free Radic Biol Med* **2011,** 51, (1), 153-9.
212. Jenkins, A. T. A.; Dash, H.-A.; Boundy, S.; Halliwell, C. M.; ffrench-Constant, R. H., Methoxy-resorufin ether as an electrochemically active biological probe for cytochrome P450 O-demethylation. *Bioelectrochemistry* **2006,** 68, (1), 67-71.
213. Reszka, K. J.; Wagner, B. A.; Burns, C. P.; Britigan, B. E., Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/peroxidase assay: antioxidant properties of anthracyclines. *Anal Biochem* **2005,** 342, (2), 327-37.
214. 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. *Org Biomol Chem* **2008,** 6, (4), 682-92.
215. Alves, C. M. A.; Naik, S.; Coutinho, P. J. G.; Gonçalves, M. S. T., Novel long alkyl side chain benzo[a]phenoxazinium chlorides: synthesis, photophysical behaviour and DNA interaction. *Tetrahedron* **2009,** 65, (50), 10441-10452.
216. Sherman, D. B.; Pitner, J. B.; Ambroise, A.; Thomas, K. J., Synthesis of thiol-reactive, long-wavelength fluorescent phenoxazine derivatives for biosensor applications. *Bioconjug Chem* **2006,** 17, (2), 387-92.
217. Chen, B.; Lv, C.; Tang, X., Chemoselective reduction-based fluorescence probe for detection of hydrogen sulfide in living cells. *Anal Bioanal Chem* **2012,** 404, (6-7), 1919-23.
218. Ge, J.-F.; Arai, C.; Yang, M.; Bakar Md, A.; Lu, J.; Ismail, N. S. M.; Wittlin, S.; Kaiser, M.; Brun, R.; Charman, S. A.; Nguyen, T.; Morizzi, J.; Itoh, I.; Ihara, M., Discovery of Novel Benzo[a]phenoxazine SSJ-183 as a Drug Candidate for Malaria. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010,** 1, (7), 360-364.
219. Bolognese, A.; Correale, G.; Manfra, M.; Lavecchia, A.; Novellino, E.; Pepe, S., Antitumor Agents. 5. Synthesis, Structure−Activity Relationships, and Biological Evaluation of Dimethyl-5H-pyridophenoxazin-5-ones, Tetrahydro-5H-benzopyridophenoxazin-5-ones, and 5H-Benzopyridophenoxazin-5-ones with Potent Antiproliferative Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006,** 49, (17), 5110-5118.
220. Miyake, M.; Yamamoto, S.; Sano, O.; Fujii, M.; Kohno, K.; Ushio, S.; Iwaki, K.; Fukuda, S., Inhibitory effects of 2-amino-3H-phenoxazin-3-one on the melanogenesis of murine B16 melanoma cell line. *Biosci Biotechnol Biochem* **2010,** 74, (4), 753-8.
221. Agarwal, N. L.; Schaefer, W., Quinone chemistry. Reaction of 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone with 2-aminophenols in pyridine. *The Journal of Organic Chemistry* **1980,** 45, (25), 5144-5149.
222. Macias, F. A.; Marin, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Chinchilla, D.; Simonet, A. M.; Molinillo, J. M., Isolation and synthesis of allelochemicals from gramineae: benzoxazinones and related compounds. *J Agric Food Chem* **2006,** 54, (4), 991-1000.
223. Kotouček, M.; Martinek, M.; Ružička, E., Kondensation von p-Nitrosodimethylanilin mit Resorcinderivaten. *Monatshefte für Chemie* **1965,** 96, (5), 1433-1434.
224. 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.
225. Park, S.-Y.; Kubota, Y.; Funabiki, K.; Shiro, M.; Matsui, M., Near-infrared solid-state fluorescent naphthooxazine dyes attached with bulky dibutylamino and perfluoroalkenyloxy groups at 6- and 9-positions. *Tetrahedron Letters* **2009,** 50, (10), 1131-1135.
226. Sebej, P.; Wintner, J.; Muller, P.; Slanina, T.; Al Anshori, J.; Antony, L. A.; Klan, P.; Wirz, J., Fluorescein analogues as photoremovable protecting groups absorbing at approximately 520 nm. *J Org Chem* **2013,** 78, (5), 1833-43.
227. Bennacef, I.; Tymciu, S.; Dhilly, M.; Lasne, M. C.; Debruyne, D.; Perrio, C.; Barre, L., Synthesis and biological evaluation of novel fluoro and iodo quinoline carboxamides as potential ligands of NK-3 receptors for in vivo imaging studies. *Bioorg Med Chem* **2004,** 12, (16), 4533-41.
228. Kung, H. F.; Newman, S.; Choi, S. R.; Oya, S.; Hou, C.; Zhuang, Z. P.; Acton, P. D.; Plossl, K.; Winkler, J.; Kung, M. P., 2-(2-(dimethylaminomethyl)phenoxy)-5-iodophenylamine: an improved serotonin transporter imaging agent. *J Med Chem* **2004,** 47, (21), 5258-64.
229. Amat-Guerri, F.; Martin, M. E.; Sanz, J.; Martinez-Utrilla, R., Application of factor analysis to the study of the forms of succinylfluorescein present in buffer solutions in aqueous methanol. *Talanta* **1989,** 36, (6), 704-7.
230. Shi, J.; Zhang, X.; Neckers, D. C., Xanthenes: fluorone derivatives. 1. *The Journal of Organic Chemistry* **1992,** 57, (16), 4418-4421.

231. Alberola, A.; Andrés, C.; Ortega, A. G.; Pedrosa, R.; Vicente, M., One-Pot synthesis of unsymmetrically substituted 2,4-dialkylisoflavenes. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1986,** 23, (6), 1781-1783.
232. Al-Abdullah, E. S.; Al-Obaid, A. R.; Al-Deeb, O. A.; Habib, E. E.; El-Emam, A. A., Synthesis of novel 6-phenyl-2,4-disubstituted pyrimidine-5-carbonitriles as potential antimicrobial agents. *Eur J Med Chem* **2011,** 46, (9), 4642-7.
233. Dai, M.; Danishefsky, S. J., The Total Synthesis of Spirotenuipesines A and B. *J Am Chem Soc* **2007,** 129, (12), 3498-3499.
234. Yang, B. H.; Shi, Z. D.; Wu, Y. L., A stereospecific synthesis of L-deoxyribose, L-ribose and L-ribosides. *Tetrahedron* **2002,** 58, (16), 3287-3296.
235. Moon, H. R.; Kim, W. H.; Kang, J. A.; Lee, H. R.; Park, A. Y.; Chun, P.; Lee, B.; Kim, J.; Kim, J. A.; Jeong, L. S., Efficient and practical synthesis of L-hamamelose. *Carbohyd Res* **2009,** 344, (17), 2317-2321.
236. Moreno-Clavijo, E.; Carmona, A. T.; Moreno-Vargas, A. J.; Alvarez, E.; Robina, I., Synthesis of Novel 3-Amino(Hydroxy)methyl-L-fuco-Azafagomines as Leads for Selective Inhibitors of alpha-L-Fucosidases. *Synlett* **2010**, (9), 1367-1370.
237. Kaskar, B.; Heise, G. L.; Michalak, R. S.; Vishnuvajjala, B. R., A Convenient Large-Scale Synthesis of Protected D-Ribonolactone from D-Ribose. *Synthesis-Stuttgart* **1990**, (11), 1031-1032.
238. Wengel, J.; Hrdlicka, P. J.; Jepsen, J. S.; Nielsen, C., Synthesis and biological evaluation of nucleobase-modified analogs of the anticancer compounds 3 '-C-ethynyluridine (EUrd) and 3 '-C-ethynyleytidine (ECyd). *Bioorgan Med Chem* **2005,** 13, (4), 1249-1260.
239. Zingaro, R. A.; Gao, M. Z.; Chen, Y. W.; Tan, S. D.; Reibenspies, J. H., Syntheses of 1-thio-D-xylose and D-ribose esters of diorganoarsinous acids and their anticancer activity. *Heteroatom Chem* **2008,** 19, (2), 199-206.
240. Dang, S.; Sun, L.; Huang, Y.; Lu, F.; Liu, Y.; Gong, H.; Wang, J.; Yan, N., Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation. *Nature* **2010,** 467, (7316), 734-8.
241. Wang, Q.; Chittaboina, S.; Hodges, B., A facile route for the regioselective deacetylation of peracetylated carbohydrates at anomeric position. *Lett Org Chem* **2006,** 3, (1), 35-38.
242. Gravier-Pelletier, C.; Ginisty, M.; Le Merrer, Y., A versatile scaffold for a library of liposidomycins analogues: A crucial and potent glycosylation step. *Tetrahedron-Asymmetr* **2004,** 15, (2), 189-193.
243. Cicchillo, R. M.; Norris, P., A convenient synthesis of glycosyl chlorides from sugar hemiacetals using triphosgene as the chlorine source. *Carbohyd Res* **2000,** 328, (3), 431-434.
244. Moravcova, J.; Vanclova, Z.; Capkova, J.; Kefurt, K.; Stanek, J., Enzymic hydrolysis of methyl 2,3-di-O-acetyl-5-deoxy-alpha and beta-D-xylofuranosides - An active-site model of pig liver esterase. *J Carbohyd Chem* **1997,** 16, (7), 1011-1028.
245. Wang, Y. G.; Su, Y. H.; Xie, J. S.; Hu, X.; Lin, X. F., Synthesis and antitumor activity of new shikonin glycosides. *Eur J Med Chem* **2010,** 45, (7), 2713-2718.
246. Krulle, T.; Schmidt, R. R.; Brade, H.; Holst, O., Synthesis of 3-deoxy-2-octulosonic acid derivatives and characterisation of their 3-deoxyoctitols. *Carbohydr Res* **1994,** 254, 141-56.
247. Bonache, M. A.; Nuti, F.; Isaad, A. L. C.; Real-Fernandez, F.; Chelli, M.; Rovero, P.; Papini, A. M., Synthesis of new ribosylated Asn building blocks as useful tools for glycopeptide and glycoprotein synthesis. *Tetrahedron Lett* **2009,** 50, (28), 4151-4153.
248. Moon, H. R.; Choi, W. J.; Kim, H. O.; Jeong, L. S., Improved and alternative synthesis of D- and L-cyclopentenone derivatives, the versatile intermediates for the synthesis of carbocyclic nucleosides. *Tetrahedron-Asymmetr* **2002,** 13, (11), 1189-1193.
249. Bickley, J. F.; Roberts, S. A.; Santoro, A. G.; Snape, T. J., Synthesis and revision of the stereochemistry of a cyclopentenone natural product isolated from ascomycete strain A23-98. *Tetrahedron* **2004,** 60, (11), 2569-2576.
250. Zhao, L. X.; Yun, M.; Kim, H. O.; Lee, J. A.; Choi, W. J.; Lee, K. M.; Lee, S. K.; Lee, Y. B.; Ahn, C. H.; Jeong, L. S., Design, synthesis, and anticancer activity of fluorocyclopentenyl-pyrimidines. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* **2005**, (49), 107-8.
251. Tsukamoto, S.; Kaneko, K.; Hayashi, K., A Method to Identify the Absolute-Configuration of Rhamnose, Lyxose, and 2,6-Dideoxy Sugars, Cymarose, Oleandrose, Diginose, and Digitoxose, Using a Chiral High-Performance Liquid-Chromatography (Hplc) Column. *Chem Pharm Bull* **1989,** 37, (3), 637-641.
252. Schmitt, L.; Tampe, R., ATP-lipids - Protein anchor and energy source in two dimensions. *J Am Chem Soc* **1996,** 118, (24), 5532-5543.
253. Ueda, A.; Yamashita, T.; Uenishi, J., Chemical synthesis of beta-D-psicofuranosyl disaccharides. *Carbohyd Res* **2010,** 345, (12), 1722-1729.
254. Furstner, A.; Radkowski, K.; Wirtz, C.; Goddard, R.; Lehmann, C. W.; Mynott, R., Total syntheses of the phytotoxic lactones herbarumin I and II and a synthesis-based solution of the pinolidoxin puzzle. *J Am Chem Soc* **2002,** 124, (24), 7061-9.
255. Boryski, J.; Grynkiewicz, G., A regioselective synthesis of genistein 4 '-O-ribofuranosides. *Synthesis-Stuttgart* **2001**, (14), 2170-2174.

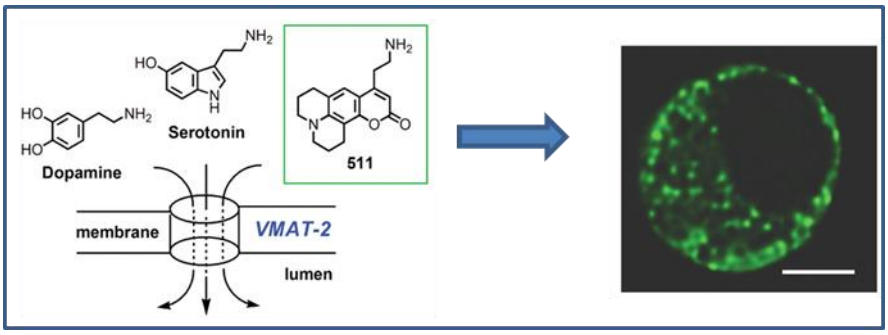
256. Tauss, A.; Greimel, P.; Rupitz, K.; Steiner, A. J.; Stutz, A. E.; Withers, S. G.; Wrodnigg, T. M., Non-natural aldofuranosides as substrates of a beta-glucosidase. *Tetrahedron-Asymmetr* **2005,** 16, (1), 159-165.
257. O'Donohue, M. J.; Remond, C.; Plantier-Royon, R.; Aubry, N., An original chemoenzymatic route for the synthesis of beta-D-galactofuranosides using an alpha-L-arabinofuranosidase. *Carbohyd Res* **2005,** 340, (4), 637-644.
258. Csavas, M.; Borbas, A.; Szilagyi, L.; Liptak, A., Successful combination of (methoxydimethyl)methyl (MIP) and (2-naphthyl)methyl (NAP) ethers for the synthesis of arabinogalactan-type oligosaccharides. *Synlett* **2002**, (6), 887-890.
259. Furneaux, R. H.; Martin, B.; Rendle, P. M.; Taylor, C. M., Glucofuranosylation with penta-O-propanoyl-beta-D-glucofuranose. *Carbohyd Res* **2002,** 337, (21-23), 1999-2004.
260. Kiessling, L. L.; Splain, R. A., Synthesis of galactofuranose-based acceptor substrates for the study of the carbohydrate polymerase GlfT2. *Bioorgan Med Chem* **2010,** 18, (11), 3753-3759.
261. Kong, F. Z.; Zhang, J. J., Synthesis of beta-D-Glcp-(1 -> 2)-[beta-D-Ribf-(1 -> 3)-]alpha-L-Rhap-(1 -> 3)-alpha-L-Rhap-(1 -> 2)-alpha-L-Rhap, the repeating unit of the lipopolysaccharide of Acetobacter diazotrophicus PAL 5. *J Carbohyd Chem* **2002,** 21, (6), 579-589.
262. Hungerford, N. L.; Armitt, D. J.; Banwell, M. G., Syntheses of showdomycin and its anomer using N-(triisopropylsilyl)pyrrole as a synthetic equivalent for the maleimide C3-anion. *Synthesis-Stuttgart* **2003**, (12), 1837-1843.
263. Kumar, A.; Kumar, V.; Dere, R. T.; Schmidt, R. R., Glycoside bond formation via acid-base catalysis. *Org Lett* **2011,** 13, (14), 3612-5.
264. Davisson, V. J.; Davis, D. R.; Dixit, V. M.; Poulter, C. D., Synthesis of nucleotide 5'-diphosphates from 5'-O-tosyl nucleosides. *The Journal of Organic Chemistry* **1987,** 52, (9), 1794-1801.
265. Dixit, V. M.; Poulter, C. D., Convenient syntheses of adenosine 5′-diphosphate, adenosine 5′-methylenediphosphonate, and adenosine 5′-triphosphate. *Tetrahedron Letters* **1984,** 25, (37), 4055-4058.
266. Al-Abdullah, E. S.; Al-Obaid, A.-R. M.; Al-Deeb, O. A.; Habib, E. E.; El-Emam, A. A., Synthesis of novel 6-phenyl-2,4-disubstituted pyrimidine-5-carbonitriles as potential antimicrobial agents. *Eur J Med Chem* **2011,** 46, (9), 4642-7.
267. El-Sayed, H. A.; Moustafa, A. H.; Haikal, A. Z.; Abdou, I. M.; El-Ashry, E. S. H., Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of some pyrimidine glycosides. *Nucleos Nucleot Nucl* **2008,** 27, (9), 1061-1071.
268. Haikal, A. Z.; El Ashry, E. S. H.; Banoub, J., Synthesis and structural characterization of 1-(D-glycosyloxy)phthalazines. *Carbohyd Res* **2003,** 338, (22), 2291-2299.
269. Silamkoti, A. V.; Allan, P. W.; Hassan, A. E.; Fowler, A. T.; Sorscher, E. J.; Parker, W. B.; Secrist, J. A., 3rd, Synthesis and biological activity of 2-fluoro adenine and 6-methyl purine nucleoside analogs as prodrugs for suicide gene therapy of cancer. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005,** 24, (5-7), 881-5.
270. Hocek, M.; Silhar, P.; Shih, I. H.; Mabery, E.; Mackman, R., Cytostatic and antiviral 6-arylpurine ribonucleosides. Part 7: synthesis and evaluation of 6-substituted purine l-ribonucleosides. *Bioorg Med Chem Lett* **2006,** 16, (20), 5290-3.
271. Lalut, J.; Tripoteau, L.; Marty, C.; Bares, H.; Bourgougnon, N.; Felpin, F. X., Synthesis of C3-arylated-3-deazauridine derivatives with potent anti-HSV-1 activities. *Bioorg Med Chem Lett* **2012,** 22, (24), 7461-4.
272. Micotto, T. L.; Brown, A. S.; Wilson, J. N., Fluorescent mimics of 5-hydroxytryptamine based on N-alkylated derivatives of 6-hydroxycarbostyril. *Chem Commun (Camb)* **2009**, (48), 7548-50.
273. Schwogler, A.; Carell, T., Toward catalytically active oligonucleotides: synthesis of a flavin nucleotide and its incorporation into DNA. *Org Lett* **2000,** 2, (10), 1415-8.
274. Sawada, K.; Hiasa, M.; Echigo, N.; Juge, N.; Miyaji, T.; Omote, H.; Moriyama, Y., Identification and characterization of a vesicular nucleotide transporter. *Neurosci Res* **2009,** 65, S77-S77.
275. Soutourina, J.; Wydau, S.; Ambroise, Y.; Boschiero, C.; Werner, M., Direct interaction of RNA polymerase II and mediator required for transcription in vivo. *Science* **2011,** 331, (6023), 1451-4.
276. Bogdanov, A. A.; Sumbatyan, N. V.; Shishkina, A. V.; Karpenko, V. V.; Korshunova, G. A., Ribosomal tunnel and translation regulation. *Biochemistry (Mosc)* **2010,** 75, (13), 1501-16.
277. Storz, G., An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* **2002,** 296, (5571), 1260-3.
278. Burgess, K.; Cook, D., Syntheses of nucleoside triphosphates. *Chem Rev* **2000,** 100, (6), 2047-60.
279. Caton-Williams, J.; Smith, M.; Carrasco, N.; Huang, Z., Protection-free one-pot synthesis of 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphates and DNA polymerization. *Org Lett* **2011,** 13, (16), 4156-9.
280. Zlatev, I.; Lavergne, T.; Debart, F.; Vasseur, J. J.; Manoharan, M.; Morvan, F., Efficient solid-phase chemical synthesis of 5'-triphosphates of DNA, RNA, and their analogues. *Org Lett* **2010,** 12, (10), 2190-3.
281. Schultheisz, H. L.; Szymczyna, B. R.; Scott, L. G.; Williamson, J. R., Enzymatic de novo pyrimidine nucleotide synthesis. *J Am Chem Soc* **2011,** 133, (2), 297-304.
282. Jansen, R. S.; Rosing, H.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H., Facile small scale synthesis of nucleoside 5'-phosphate mixtures. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2010,** 29, (1), 14-26.
283. Ludwig, J., A new route to nucleoside 5'-triphosphates. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* **1981,** 16, (3-4), 131-3.

284. Ludwig, J.; Eckstein, F., Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-0-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. *The Journal of Organic Chemistry* **1989,** 54, (3), 631-635.
285. Taktakishvili, M.; Nair, V., A new method for the phosphorylation of nucleosides. *Tetrahedron Letters* **2000,** 41, (37), 7173-7176.
286. Nair, V.; Taktakishvili, M., A new procedure for the phosphorylation of nucleosides: application to the discovery of inhibitors of HIV integrase. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001,** 20, (4-7), 739-42.
287. Pollak, A.; Baughn, R. L.; Adalsteinsson, O.; Whitesides, G. M., Immobilization of synthetically useful enzymes by condensation polymerization. *J Am Chem Soc* **1978,** 100, (1), 302-304.
288. Zinchenko, A. I.; Barai, V. N.; Zaiashko, L. M.; Poopeiko, N. E.; Pricota, T. I.; Sivets, G. G.; Mikhailopulo, I. A., Enzymatic synthesis of nucleoside 5′-mono and -triphosphates. *FEBS Letters* **1990,** 260, (2), 254-256.
289. Wong, C. H.; Haynie, S. L.; Whitesides, G. M., Preparation of a mixture of nucleoside triphosphates from yeast RNA: use in enzymic synthesis requiring nucleoside triphosphate regeneration and conversion to nucleoside diphosphate sugars. *J Am Chem Soc* **1983,** 105, (1), 115-117.
290. Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T., A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5′-nucleotides. *Tetrahedron Letters* **1967,** 8, (50), 5065-5068.
291. Arabshahi, A.; Frey, P. A., A simplified procedure for synthesizing nucleoside 1-thiotriphosphates: dATP alpha S, dGTP alpha S, UTP alpha S, and dTTP alpha S. *Biochem Biophys Res Commun* **1994,** 204, (1), 150-5.
292. Maruoka, H.; Barrett, M. O.; Ko, H.; Tosh, D. K.; Melman, A.; Burianek, L. E.; Balasubramanian, R.; Berk, B.; Costanzi, S.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A., Pyrimidine ribonucleotides with enhanced selectivity as P2Y(6) receptor agonists: novel 4-alkyloxyimino, (S)-methanocarba, and 5'-triphosphate gamma-ester modifications. *J Med Chem* **2010,** 53, (11), 4488-501.
293. Mastihubova, M.; Szemesova, J.; Biely, P., The acetates of p-nitrophenyl alpha-L-arabinofuranoside--regioselective preparation by action of lipases. *Bioorg Med Chem* **2006,** 14, (6), 1805-10.
294. Smith, A. B., 3rd; Savinov, S. N.; Manjappara, U. V.; Chaiken, I. M., Peptide-small molecule hybrids via orthogonal deprotection-chemoselective conjugation to cysteine-anchored scaffolds. A model study. *Org Lett* **2002,** 4, (23), 4041-4.
295. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005,** 61, (46), 10827-10852.
296. Rudolf, K.; Eberlein, W.; Engel, W.; Pieper, H.; Entzeroth, M.; Hallermayer, G.; Doods, H., Development of human calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonists. 1. Potent and selective small molecule CGRP antagonists. 1-[N2-[3,5-dibromo-N-[[4-(3,4-dihydro-2(1H)-oxoquinazolin-3-yl)-1-piperidinyl]car bonyl]-D-tyrosyl]-l-lysyl]-4-(4-pyridinyl)piperazine: the first CGRP antagonist for clinical trials in acute migraine. *J Med Chem* **2005,** 48, (19), 5921-31.
297. Vasko, R. C.; Rodriguez, R. A.; Cunningham, C. N.; Ardi, V. C.; Agard, D. A.; McAlpine, S. R., Mechanistic studies of Sansalvamide A-amide: an allosteric modulator of Hsp90. *ACS Med Chem Lett* **2010,** 1, (1), 4-8.
298. Liverton, N. J.; Holloway, M. K.; McCauley, J. A.; Rudd, M. T.; Butcher, J. W.; Carroll, S. S.; DiMuzio, J.; Fandozzi, C.; Gilbert, K. F.; Mao, S. S.; McIntyre, C. J.; Nguyen, K. T.; Romano, J. J.; Stahlhut, M.; Wan, B. L.; Olsen, D. B.; Vacca, J. P., Molecular modeling based approach to potent P2-P4 macrocyclic inhibitors of hepatitis C NS3/4A protease. *J Am Chem Soc* **2008,** 130, (14), 4607-9.
299. Fonseca, A. S. C.; Soares, A. M. S.; Gonçalves, M. S. T.; Costa, S. P. G., Thionated coumarins and quinolones in the light triggered release of a model amino acid: synthesis and photolysis studies. *Tetrahedron* **2012,** 68, (38), 7892-7900.
300. Akita, S.; Umezawa, N.; Higuchi, T., On-bead fluorescence assay for serine/threonine kinases. *Org Lett* **2005,** 7, (25), 5565-8.
301. Brun, M.-P.; Bischoff, L.; Garbay, C., A Very Short Route to Enantiomerically Pure Coumarin-Bearing Fluorescent Amino Acids. *Angewandte Chemie International Edition* **2004,** 43, (26), 3432-3436.
302. Johnsson, R.; Lackey, J. G.; Bogojeski, J. J.; Damha, M. J., New light labile linker for solid phase synthesis of 2'-O-acetalester oligonucleotides and applications to siRNA prodrug development. *Bioorg Med Chem Lett* **2011,** 21, (12), 3721-5.
303. Brühwiler, D.; Gfeller, N.; Calzaferri, G., Resorufin in the Channels of Zeolite L. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998,** 102, (16), 2923-2929.
304. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Gronborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brugger, B.; Ringler, P.; Muller, S. A.; Rammner, B.; Grater, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmuller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R., Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006,** 127, (4), 831-46.
305. Gasnier, B.; Scherman, D.; Henry, J. P., Inactivation of the catecholamine transporter during the preparation of chromaffin granule membrane 'ghosts'. *FEBS Lett* **1987,** 222, (1), 215-9.
306. Errasti-Murugarren, E.; Fernandez-Calotti, P.; Veyhl-Wichmann, M.; Diepold, M.; Pinilla-Macua, I.; Perez-Torras, S.; Kipp, H.; Koepsell, H.; Pastor-Anglada, M., Role of the transporter regulator protein (RS1) in the

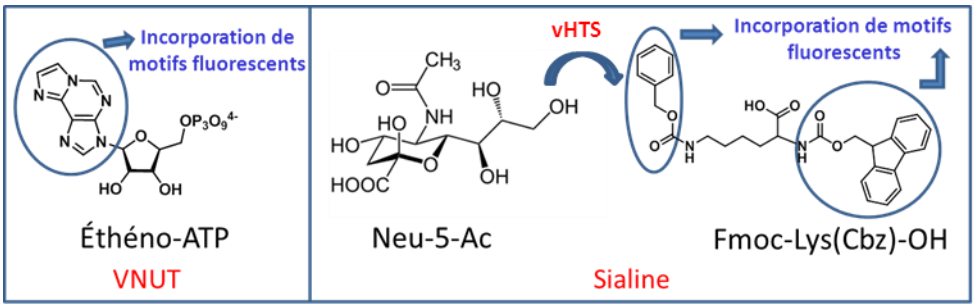
modulation of concentrative nucleoside transporters (CNTs) in epithelia. *Mol Pharmacol* **2012,** 82, (1), 59-67.
307. Medina-Pulido, L.; Molina-Arcas, M.; Justicia, C.; Soriano, E.; Burgaya, F.; Planas, A.; Pastor-Anglada, M., Role of hypoxia and P1 receptor activation on the high affinity concentrative adenosine transporter CNT2 in PC12 cells. *Biochem J* **2013**.
308. Cano-Soldado, P.; Pastor-Anglada, M., Transporters that translocate nucleosides and structural similar drugs: structural requirements for substrate recognition. *Med Res Rev* **2012,** 32, (2), 428-57.
309. Errasti-Murugarren, E.; Pastor-Anglada, M., Drug transporter pharmacogenetics in nucleoside-based therapies. *Pharmacogenomics* **2010,** 11, (6), 809-41.
310. Cano-Soldado, P.; Gorraitz, E.; Errasti-Murugarren, E.; Casado, F. J.; Lostao, M. P.; Pastor-Anglada, M., Functional analysis of the human concentrative nucleoside transporter-1 variant hCNT1S546P provides insight into the sodium-binding pocket. *Am J Physiol Cell Physiol* **2012,** 302, (1), C257-66.
311. Young, J. D.; Yao, S. Y.; Baldwin, J. M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A., The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* **2013,** 34, (2-3), 529-47.
312. Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **2001,** 53, (4), 527-52.
313. Fredholm, B. B.; AP, I. J.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Muller, C. E., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* **2011,** 63, (1), 1-34.
314. Chen, J. F.; Eltzschig, H. K.; Fredholm, B. B., Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* **2013,** 12, (4), 265-86.
315. Zhang, J.; Visser, F.; King, K. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E., The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev* **2007,** 26, (1), 85-110.
316. Yao, S. Y.; Ng, A. M.; Sundaram, M.; Cass, C. E.; Baldwin, S. A.; Young, J. D., Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2) nucleoside transporter proteins produced in Xenopus oocytes. *Mol Membr Biol* **2001,** 18, (2), 161-7.
317. King, A. E.; Ackley, M. A.; Cass, C. E.; Young, J. D.; Baldwin, S. A., Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **2006,** 27, (8), 416-25.
318. Damaraju, V. L.; Smith, K. M.; Mowles, D.; Nowak, I.; Karpinski, E.; Young, J. D.; Robins, M. J.; Cass, C. E., Interaction of fused-pyrimidine nucleoside analogs with human concentrative nucleoside transporters: High-affinity inhibitors of human concentrative nucleoside transporter 1. *Biochem Pharmacol* **2011,** 81, (1), 82-90.
319. Kalatzis, V.; Cherqui, S.; Antignac, C.; Gasnier, B., Cystinosin, the protein defective in cystinosis, is a H(+)-driven lysosomal cystine transporter. *EMBO J* **2001,** 20, (21), 5940-9.
320. Schushan, M.; Rimon, A.; Haliloglu, T.; Forrest, L. R.; Padan, E.; Ben-Tal, N., A model-structure of a periplasm-facing state of the NhaA antiporter suggests the molecular underpinnings of pH-induced conformational changes. *J Biol Chem* **2012,** 287, (22), 18249-61.
321. Zare, A.; Hasaninejad, A.; Beyzavi, M. H.; Parhami, A.; Zare, A. R. M.; Khalafi-Nezhad, A.; Sharghi, H., Zinc oxide-tetrabutylammonium bromide tandem as a highly efficient, green, and reusable catalyst for the Michael addition of pyrimidine and purine nucleobases to alpha,beta-unsaturated esters under solvent-free conditions. *Can J Chem* **2008,** 86, (4), 317-324.
322. Esposito, A.; Perino, M. G.; Taddei, M., Synthesis of Acyclic Carba-Nucleoside Phosphonates, Structural Analogues to Natural Deoxyribonucleotides. *Eur J Org Chem* **1999,** 1999, (4), 931-936.

Conception de faux substrats fluorescents (FFS) dans le cadre de l'étude du transporteur vésiculaire de nucléotides et de la Sialine

Le concept de composés appelés FFS, pour faux substrats fluorescents (ou FFN pour les neurotransmetteurs), a été introduit par le groupe du Dr Sames qui a conçu et optimisé des molécules fluorescentes reconnues comme substrats par le Transporteur Vésiculaire de Monoamine (VMAT2). Ces composés, une fois accumulés dans des vésicules synaptiques, ont permis la visualisation de l'activité neuronale monoaminergique en temps réel.



Ce concept a servi d'hypothèse pour ce travail de thèse. En effet, nous avons conçu, synthétisé et évalué la potentialité de deux familles chimiques comme substrats fluorescents de transporteurs de la famille SLC17 : VNUT (transporteur vésiculaire de nucléotides) et la Sialine (transporteur d'acide sialique). Les molécules fluorescentes synthétisées devront être capables de remplacer/mimer les substrats naturels de la Sialine et VNUT (respectivement le Neu-5-Ac et l'ATP) et de couvrir une large gamme de longueurs d'onde d'émission pour nous adapter aux problématiques biologiques. L'élaboration de tels composés a été effectuée par conception rationnelle en synergie avec les résultats des tests d'inhibition et de transport à partir de touches issues du criblage virtuel. Deux composés ont été plus particulièrement étudiés. D'une part, l'ATP a été modifiée en remplaçant le motif adénine par un fluorophore (éthéno, coumarines, quinoléines…). D'autre part, une touche virtuelle (Fmoc-Lys(Cbz)-OH) issue d'un vHTS sur la sialine a été sélectionnée pour sa structure facilement modifiable, qui a permis l'incorporation aisée de motifs fluorescents.



1.http://www.columbia.edu/cu/chemistry/groups/sames/ ; 2. Gubernator, N.G., et al., *Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals.* Science, 2009, **324** (5933): p. 1441-4. ; 3. Sulzer, D., et al., *Development of pH-Responsive Fluorescent False Neurotransmitters.* Journal of the American Chemical Society, 2010, **132** (26): p. 8828-8830. ; 4. Rodriguez, P.C., et al., *Fluorescent dopamine tracer resolves individual dopaminergic synapses and their activity in the brain.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. ; *5. Dubois, L., et al., Microwave-Promoted Michael Addition of Azaheterocycles to α,β-Unsaturated Esters and Acid under Solvent-Free Conditions. Synlett, 2012, 23: p. 791-795.*

Une cinquantaine de composés a donc été synthétisée et évaluée pour leurs capacités d'inhibition ou de substrat sur les cibles sélectionnées. Les résultats prometteurs de plusieurs composés en tant qu'inhibiteur laissent de nombreuses perspectives pour la compréhension de la machinerie vésiculaire.