

Université de Montréal

Développement d'une méthode de marquage protéique par fluorescence

par

Karine Caron

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Chimie

novembre 2009

© Karine Caron, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement d'une méthode de marquage protéique par fluorescence

présenté par :

Karine Caron

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Joelle N. Pelletier, président-rapporteur

Pr. Jeffrey W. Keillor, directeur de recherche

Pr. Andreea Schmitzer, membre du jury

RÉSUMÉ

Le marquage protéique par fluorescence est une méthode de choix permettant d'étudier l'évolution des protéines depuis leur synthèse cellulaire jusqu'à leur dégradation, en plus de rendre possible leur localisation ainsi que la visualisation des interactions entre protéines. De cet intérêt certain ont découlé différentes techniques de marquage, dont celle présentement développée dans le groupe Keillor. Le principe de celle-ci repose sur la réaction entre deux maléimides portés par un fluorogène et une séquence peptidique cible, laquelle contient deux résidus cystéines séparés par une distance appropriée. Suite à cette double addition de thiols du peptide sur les maléimides du fluorogène, la fluorescence latente de ce dernier est régénérée, menant au marquage covalent de la protéine d'intérêt. Afin d'optimiser la spécificité et la sensibilité de cette méthode de marquage, la synthèse de nouveaux fluorogènes et l'étude de l'efficacité de *quench* de la fluorescence par les maléimides est présentement en cours dans les laboratoires du groupe Keillor.

Mots-clés: marquage, protéine, fluorescence, fluorogène, addition de Michael, maléimide, thiol, cystéine, hélice.

ABSTRACT

The fluorescent labelling of proteins is a powerful approach for following the dynamic process of their cellular synthesis and degradation, in addition to determining their localization and protein-protein interactions. We have developed a 'small molecule'-based labelling technique that is complementary to existing methods. Our fluorogenic approach relies on the use of dimaleimide fluorogens that react with a target peptide sequence that presents appropriately spaced, solvent-exposed Cys residues. The thiol addition reaction between target sequence and dimaleimide fluorogen restores the latent fluorescence of the latter and results in the covalent fluorescent labelling of the protein of interest. Synthesis of new fluorogens and quench efficiency studies are presently taking place in the Keillor group laboratory in order to optimize the specificity and sensitivity of the labelling method.

Key words: labelling, protein, fluorescence, fluorogenic, Michael addition, maleimide, thiol, cysteine, helix.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES SCHÉMAS.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
CHAPITRE 1.....	1
1.1. DE LA GFP AU MARQUAGE PROTÉIQUE.....	2
1.1.1. Découverte de la GFP	2
1.1.2. Les débuts du marquage protéique par fluorescence.....	10
1.2. CARACTÉRISTIQUES DES MALÉIMIDES ET LEURS APPLICATIONS	15
1.2.1. Marquage spécifique des thiols biologiques	15
1.3. MÉTHODE DE MARQUAGE DÉVELOPPÉE PAR LE GROUPE KEILLOR	17
1.3.1. Première génération de fluorogènes	17
1.3.2. Deuxième génération de fluorogènes.....	22
1.3.3. Design de la nouvelle séquence peptidique cible	24
1.4. OBJECTIFS DE RECHERCHE	28
CHAPITRE 2.....	29
2.1. INTRODUCTION	30
2.1.1. Étude du mécanisme de <i>quench</i>	30

2.1.2. Influence de l'efficacité de <i>quench</i> de la fluorescence sur la méthode de marquage protéique	34
2.2. SYNTHÈSE DE LA SÉRIE DE FLUOROGÈNES	34
2.3. ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DE <i>QUENCH</i>	40
2.3.1. Détermination des facteurs d'augmentation de la fluorescence ..	41
2.3.2. Analyse des résultats.....	46
2.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	52
CHAPITRE 3.....	54
3.1. INTRODUCTION	55
3.1.1. Réactions de dégradation	57
3.2. SYNTHÈSE DU NOUVEAU FRAGMENT DIMALÉIMIDE	60
3.2.1. Réarrangement de Hofmann	60
3.2.2. Réarrangement de Schmidt.....	61
3.3. SYNTHÈSE D'UN PREMIER FLUOROGÈNE DE TROISIÈME GÉNÉRATION	63
3.3.1. Marquage de protéines exprimées en faible quantité.....	66
3.3.2. Caractérisation photophysique du premier fluorogène de troisième génération.....	70
3.4. DÉVELOPPEMENT D'UN DIMALÉIMIDE BENZYLIQUE	73
3.4.1. Synthèse linéaire versus synthèse convergente.....	73
3.4.2. Caractérisation photophysique du fluorogène 3.18	77
3.5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	79
CHAPITRE 4.....	80
4.1. INTRODUCTION : MARQUAGE ORTHOGONAL BASÉ SUR LA FUSION DE PROTÉINES FLUORESCENTES	81
4.2. MARQUAGE ORTHOGONAL DE PROTÉINES DANS LE GROUPE KEILLOR	85

4.2.1. Origine et précédents du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor	85
4.2.2. Développement d'une première famille de dimaléimides.....	88
4.2.3. Développement d'une deuxième famille de fragments dimaléimides	91
4.2.4. Synthèse et évaluation d'un composé modèle.....	92
4.3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	95
CHAPITRE 5.....	98
5.1. MARQUAGE FLUOROGÈNE D'UNE PROTÉINE : ÉTUDE DE L'ORIENTATION DES PROTÉINES PAR FLUORESCENCE POLARISÉE	100
5.1.1. Intérêts de recherche du groupe Zenisek	100
5.1.2. Collaboration entre les groupes Zenisek et Keillor	101
5.2. MARQUAGE D'UNE PROTÉINE EFFECTRICE : ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'INFECTION D'UNE CELLULE MAMMIFÈRE	104
5.2.1. Intérêts de recherche du groupe Palmer	104
5.2.2. Collaboration entre les groupes Palmer et Keillor	105
5.3. ÉTUDE DU REPLIEMENT D'UNE PROTÉINE À L'AIDE D'UNE RÉACTION FLUOROGÈNE SPÉCIFIQUE	106
5.3.1. Intérêts de recherche du groupe Golemi-Kotra	106
CHAPITRE 6.....	108
6.1. CONCLUSION	109
6.1.1. Étude de l'influence conformationnelle sur l'efficacité du <i>quench</i>	109
6.1.2. Fluorogènes de troisième génération	109
6.1.3. Perspectives	110

CHAPITRE 7.....	112
7.1. GÉNÉRALITÉS.....	113
7.1.1. Synthèses organiques : Chapitre 2.....	114
7.1.2. Synthèses organiques : Chapitre 3.....	123
7.1.3. Synthèses organiques : Chapitre 4.....	137
7.1.4. Synthèses organiques : Chapitre 5.....	143
7.2. DÉTERMINATION DES FACTEURS D'AugMENTATION DE LA FLUORESCENCE.....	144
7.2.1. Détermination des FE : Chapitre 2.....	145
7.2.2. Détermination des FE : Chapitre 3.....	150
7.2.3. Détermination du FE : Chapitre 4.....	154
7.2.4. Détermination des FE : Chapitre 5.....	156
7.3 MINIMISATIONS ÉNERGÉTIQUES DES FLUOROGÈNES.....	157

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. <i>Aequorea Victoria</i> , une espèce de méduse vivant dans les eaux du Pacifique.....	3
Figure 1.2. Structure tertiaire de la GFP avec son chromophore au centre.....	4
Figure 1.3. Maxima majoritaire et minoritaire d'absorption et maximum unique de fluorescence de la wtGFP comparé avec l'absorbance unique de la eGFP.....	8
Figure 1.4. A) Mécanisme de réparation de l'ADN par la hAGT. B) Marquage covalent d'une protéine d'intérêt à l'aide de la fusion de la hAGT.....	11
Figure 1.5. Stratégie de marquage protéique tirant avantage de la spécificité de la TGase.....	12
Figure 1.6. Stratégie de marquage protéique développée par Roger Tsien, le <i>FIAsH labelling</i>	14
Figure 1.7. Addition 1,4 de Michael d'un thiol sur le N-éthylmaléimide (NEM).	16
Figure 1.8. Structure des sondes fluorescentes développées par Kanaoka, Langmuir et Corrie.....	17
Figure 1.9. Première génération de fluorogènes synthétisés dans le groupe Keillor.	18
Figure 1.10. Augmentation de fluorescence suite à l'ajout de A) 2 éq. de EtSH et de B) 1 éq. de BMMB au fluorogène 1.2	19
Figure 1.11. Analyse SDS-PAGE du marquage fluorescent de la protéine C35A TRX.	
Figure 1.12. Analyse SDS-PAGE du marquage fluorescent de la diCys-Fos avec les fluorogènes 1.2 et 1.3 , où il n'y a pas de marquage du mCys-Fos.	22
Figure 1.13. a) Modèle général des fluorogènes de deuxième génération b) Exemples de fluorogènes de deuxième génération.....	23
Figure 1.14. Design de la méthode de marquage protéique élaboré par le groupe Keillor.	25
Figure 1.15. Réaction du fluorogène 1.4 avec MBP-dC10, diCys-Fos ou GSH.....	27
Figure 2.1. Représentation du diagramme de Jablonski.....	31
Figure 2.2. Mécanisme de <i>quench</i> de la fluorescence par les maléimides.....	33
Figure 2.3. Exemples de dérivés de coumarine et de leur rendement quantique de fluorescence (Φ_F).....	37

Figure 2.4. Détermination du facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) pour le composé 2.8 a	42
Figure 2.5. Détermination du domaine de linéarité de fluorescence pour le composé de référence 2.8 a	44
Figure 2.6. Optimisation du temps de réaction du composé de référence 2.8 a avec le MPA.	46
Figure 2.7. Comparaison des facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE) de la première et deuxième génération de fluorogènes.	49
Figure 2.8. Représentation de la conformation tridimensionnelle des fluorogènes de la série coumarine.	51
Figure 2.9. Voie rétrosynthétique d'un fluorogène pouvant être obtenu par <i>click chemistry</i>	54
Figure 3.1. Modèles généraux des fluorogènes de première, deuxième et troisième générations.....	56
Figure 3.2. Fluorophores couramment utilisés dans la synthèse de sondes fluorescentes.....	59
Figure 3.3. Composés contrôles pour l'étude de l'influence d'un substituant aromatique sur la fluorescence.	64
Figure 3.4. Représentation tridimensionnelle du composé bis-dansyl 3.8	68
Figure 3.5. Représentation tridimensionnelle du composé contrôle bis-dansyl 3.10	69
Figure 3.6. Caractérisation du caractère fluorogène du composé 3.9 avec un excès de MPA.	71
Figure 3.7. Étude de l'influence d'un substituant benzylique sur la fluorescence de la coumarine. (3.11)	74
Figure 3.8. Détermination du facteur d'augmentation (FE) de fluorescence du fluorogène 3.18	78
Figure 4.1. Librairie de mutants de la GFP développée par Tsien.....	81
Figure 4.2. Recouvrement des bandes d'absorption et d'émission d'une paire de FRET.....	82
Figure 4.3. Design de différentes sondes fluorescentes reposant sur le FRET.	84
Figure 4.4. Fluorogènes de première génération.....	85

Figure 4.5. Développement du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor.	86
Figure 4.6. Limitation actuelle du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor.	89
Figure 4.7. Structures de la première famille de fragments dimaléimides.	90
Figure 4.8. Structures de la deuxième famille de fragments dimaléimides et représentation 3D des fluorogènes dansyl-dM16 et dansyl-dM21.	92
Figure 4.9. Détermination du facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) du composé modèle 4.7	94
Figure 5.1. Fluorogène 3.9 issu de la troisième génération.	101
Figure 5.2. Détermination du facteur d'augmentation (FE) du fluorogène 5.1	103
Figure 5.3. Étude du repliement de la région hélicoïdale de VraR, à l'aide de la méthode de marquage du groupe Keillor.	107
Figure 6.1. Analogue du fluorogène BODIPY-dM10 5.1	110
Figure 7.1. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10 (HEPES/DMSO 5%, 50 μ M).	146
Figure 7.2. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10 (DMSO, 50 μ M).	146
Figure 7.3. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA (HEPES/DMSO 5%, 50 μ M).	147
Figure 7.4. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA (DMSO, 50 μ M).	147
Figure 7.5. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, (HEPES/DMSO 5%, 4 μ M).	148
Figure 7.6. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, (DMSO, 4 μ M).	148
Figure 7.7. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, après réaction avec MPA, (HEPES/DMSO 5%, 4 μ M).	149
Figure 7.8. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA, (DMSO, 4 μ M).	149
Figure 7.9. Détermination des maxima d'absorbance du fluorogène 3.9 (DMSO, 500 μ M).	151

Figure 7.10. Détermination des maxima d'excitation du fluorogène 3.9 après réaction avec le MPA (HEPES/DMSO 5%, 200 μ M).....	151
Figure 7.11. Détermination des maxima d'émission de fluorescence du fluorogène 3.9 (DMSO, 250 μ M).....	152
Figure 7.12. Détermination du maxima d'émission de fluorescence du fluorogène 3.9 (HEPES/DMSO 5%, 100 μ M).....	152
Figure 7.13. Détermination du maxima d'absorbance pour le fluorogène 3.18 (HEPES/DMSO 5 %, 50 μ M).....	153
Figure 7.14. Détermination du maximum d'émission de fluorescence du fluorogène 3.18 (HEPES/DMSO 5 %, 4 μ M).....	153
Figure 7.15. Détermination des maxima d'absorbance du composé modèle 4.7 (DMSO, 200 μ M).....	154
Figure 7.16. Détermination des maxima d'émission de fluorescence du composé modèle 4.7 (DMSO, 160 μ M).....	154
Figure 7.17. Détermination du maximum d'absorbance du fluorogène 5.1 (HEPES/DMSO 5%, 20 μ M).....	156
Figure 7.18. Détermination du maximum d'émission de fluorescence du fluorogène 5.1 (HEPES/DMSO 5%, 1 μ M).....	156

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1.1. Mécanisme proposé pour la formation du chromophore de la GFP.....	5
Schéma 2.1. Voie de synthèse du fragment dimaléimide 10 Å.	36
Schéma 2.2. Voie synthétique menant à la série de fluorogènes.....	38
Schéma 3.1. Réarrangements de Curtius, Hofmann et Schmidt.	58
Schéma 3.2. Conditions du réarrangement de Curtius pouvant mener à l'amine protégée correspondante.	59
Schéma 3.3. Réarrangement de Curtius menant au squelette du nouveau fragment dimaléimide.....	60
Schéma 3.4. Réarrangement de Hofmann envisagé pour la synthèse du nouveau fragment dimaléimide.	61
Schéma 3.5. Voie de synthèse menant au nouveau fragment dimaléimide.	62
Schéma 3.6. Voie de synthèse du premier fluorogène de troisième génération. ...	65
Schéma 3.7. Stratégies de marquage <i>in vivo</i> pour des protéines faiblement exprimées.	67
Schéma 3.8. Voie de synthèse pour le fragment dimaléimide benzylique.....	75
Schéma 3.9. Voie de synthèse linéaire pour le fluorogène dérivé de coumarine 3.18.....	76
Schéma 4.1. Voie de synthèse pour le fragment dM21, selon la première famille de dimaléimides conçus.	90
Schéma 4.2. Voie de synthèse linéaire du composé modèle 4.7.	93
Schéma 4.3. Voie de synthèse envisagée pour le fluorogène dansyl-dM21.	95
Schéma 4.4. Voie de synthèse envisagée pour le fluorogène dansyl-dM17.	96
Schéma 5.1. Voie de synthèse du fluorogène (5.1) dérivé du BODIPY.	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Constantes de vitesse de réaction entre les fluorogènes 1.4 et 1.5 avec diCys-Fos, MBP-dC10 et GSH à 20°C (pH 7.5).....	26
Tableau 2.1. Détermination des facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE) de la série coumarine, dans deux systèmes de solvants.	47
Tableau 3.1. Influence des substituants sur la fluorescence de la coumarine.....	63
Tableau 3.2. Caractéristiques spectroscopiques du fluorogène 3.9	72
Tableau 3.3. Caractéristiques spectroscopiques du fluorogène 3.18	77
Tableau 5.1. Caractéristiques photophysiques du fluorogènes 5.1	103
Tableau 7.1. Corroboration de la double addition de Michael en HRMS pour la série coumarine-dM10.....	149
Tableau 7.2. Caractéristiques photophysiques des composés 3.9 et 3.18.	150
Tableau 7.3. Corroboration de la double addition de Micheal par MPA en HRMS pour les fluorogènes de troisième génération.	150
Tableau 7.4. Corroboration de l'addition de Michael par MPA en HRMS pour le composé modèle 4.7	155
Tableau 7.5. Corroboration de l'addition de Michael par le MPA en HRMS pour le fluorogène 5.1	155

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	Angström
ACN	acétonitrile
Ac ₂ O	anhydride acétique
ADN	acide désoxyribonucléique
Atm	atmosphère
BF ₃ -OEt ₂	diéthérate de trifluorure de bore
BFP	<i>blue fluorescent protein</i>
BMMB	4,4'-bis(mercaptométhyl)-benzophénone
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyle
Boc ₂ O	anhydride de di- <i>tert</i> -butoxycarbonyle
Cbz	Carbobenzyl
CCM	chromatographie sur couche mince
CHCl ₃	chloroforme
Co ₂ (CO) ₈	octacarbonyldicobalt
d	doublet
δ	déplacement chimique
Δ	chauffage
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate
DMAP	<i>N,N</i> -4-diméthylaminopyridine
DME	1,2-diméthoxyéthane
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
EDC	<i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>

EtSH	éthanethiol
FE	facteur d'augmentation de la fluorescence (<i>Fluorescence enhancement</i>)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FPs	protéines fluorescentes
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
g	gramme(s)
GCMS	<i>Gas Chromatography Mass Spectroscopy</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	glutathion
h	heure(s)
H ₂	Hydrogène moléculaire
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
HMDS	hexaméthylidisilazane
HOBt	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
Hz	hertz
IC	conversion interne
I _f	intensité de fluorescence
ISC	conversion intersystème
<i>J</i>	constante de couplage
λ	longueur d'onde
LAH	hydrure d'aluminium de lithium
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	multiplet
M	molaire
MBP	<i>maltose binding protein</i>
MeOH	méthanol
mg	milligramme
MHz	Mega Hertz

min	minute(s)
mL	millilitre(s)
mM	millimolaire
μ M	micromolaire
mmol	millimole(s)
MPA	acide 3-mercaptopropionique
NaBH ₄	hydrure de bore de sodium
NaOAc	acétate de sodium
NEM	<i>N</i> -éthylmaléimide
NEt ₃	triéthylamine
nm	nanomètre(s)
Pd/C	palladium sur charbon activé
PET	<i>photoinduced electron transfer</i>
p.f.	point de fusion
Ph	phényl
pH	$-\log[\text{H}^+]$
<i>p</i> TsOH	acide <i>para</i> -toluènesulfonique
pyr	pyridine
q	quadruplet
Q	quantitatif
Rdt	rendement
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TGase	transglutaminase
THF	tétrahydrofurane
wtGFP	<i>wild type green fluorescent protein</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZnCl ₂	chlorure de zinc

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. DE LA GFP AU MARQUAGE PROTÉIQUE

1.1.1. Découverte de la GFP

Les fondements de la biochimie ayant été établis au cours du XX^e siècle, ils ont ensuite ouvert la porte à l'étude des principes fondamentaux derrière les phénomènes de catabolisme et d'anabolisme essentiels à la vie cellulaire.¹ Les réactions chimiques à la base du métabolisme de la cellule étant assurées par une cascade d'enzymes, le XX^e siècle a donc aussi été témoin d'un tournant important au niveau de la compréhension de la fonction enzymatique et protéique. La seconde moitié de ce siècle a quant à lui été marqué par l'arrivée de la génomique moderne, découlant directement de la génomique structurale, laquelle se concentre sur le séquençage de génomes entiers d'organismes divers. Ces révolutions tant au niveau de la biochimie que de la génomique, ont eu un impact certain au niveau des sciences biologiques, telles que la médecine et la pharmacie, sans toutefois fournir les outils nécessaires à l'étude temporelle et spatiale du protéome. Une telle connaissance tant au niveau de la localisation que du niveau d'expression d'une protéine dans son milieu cellulaire permettrait, entre autre, d'évaluer leur rôle dans certaines pathologies. Ainsi, ce n'est qu'à l'aube du XXI^e siècle que le développement de méthodes pour le marquage de protéines a connu un essor, inspiré par la découverte et l'ingénierie de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et autres protéines fluorescentes appartenant à cette même famille.

Avant de connaître son heure de gloire, la GFP a d'abord vécu dans l'ombre de l'aequorine, une protéine luminescente isolée d'*Aequorea Victoria*,

¹ Ehrenberg, M., "The green fluorescent protein: discovery, expression and development (Scientific background of the Nobel Prize in Chemistry 2008)" *The royal Swedish academy of science*, **2008**

une espèce de méduse.² D'abord tenue pour seule responsable de l'émission de lumière verte observée chez ces méduses, il a ensuite été observé que l'aequorine, lorsque liée au calcium,³ émet plutôt une lumière bleue.⁴ Travaillant à la purification et la caractérisation de cette dernière, l'attention de Shimomura et de son groupe a été captée par la présence d'une seconde protéine en raison de sa couleur verte lorsqu'exposée à la lumière du jour. Ils ont par la suite remarqué que l'irradiation de cette protéine verte à l'aide de rayons UV menait à une vive émission de fluorescence verte dont le maximum se rapprochait sensiblement de celui observé chez *Aequorea Victoria*.⁵ Sans même le savoir, ils avaient fourni la première description de la GFP. Cette découverte inattendue ayant marqué l'année 1962, elle a valu à Osuma Shimomura, entre autres, le prix Nobel de chimie en 2008.

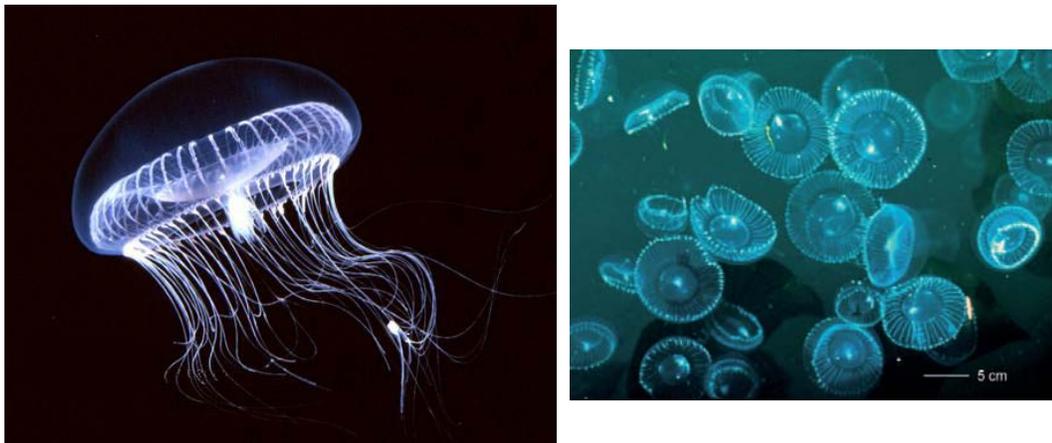


Figure 1.1. *Aequorea Victoria*, une espèce de méduse vivante dans les eaux du Pacifique.⁴

² Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **1962**, *59*, 223-239.

³ Shimomura, O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *211*, 359-363.

⁴ Shimomura, O. *Angew. Chem.-Int. Ed.*, **2009**, *48*, 5590-5602.

⁵ Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, *67*, 509-544.

Pendant la décennie suivant la découverte et l'identification de la GFP, il a été suggéré par Morin et Hastings⁶ et plus tard prouvé par Morise⁷ et que le déplacement d'émission de fluorescence initialement observé par Shimomura est en fait dû à un transfert énergétique non-radiatif de l'aequorine vers la GFP, résultant en l'émission bioluminescente verte caractéristique des méduses et de certaines espèces d'éponges. Bien que la première structure cristalline de la GFP ait été obtenue en 1974,⁷ sa structure n'a été élucidée qu'en 1996,⁸ révélant que la GFP est composée d'un baril- β , lequel est traversé par une hélice- α le long de son axe central (Figure 1.2). Le chromophore responsable de la fluorescence est rattaché à cette l'hélice- α , le fixant au centre de la structure protéique.⁹ Cette dernière joue ainsi le rôle de cage protectrice contre des agents chimiques, tel que l'oxygène moléculaire, minimisant ainsi la dégradation du fluorophore et par conséquent le phénomène de photoblanchiment, soit la perte en intensité de fluorescence dans le temps.

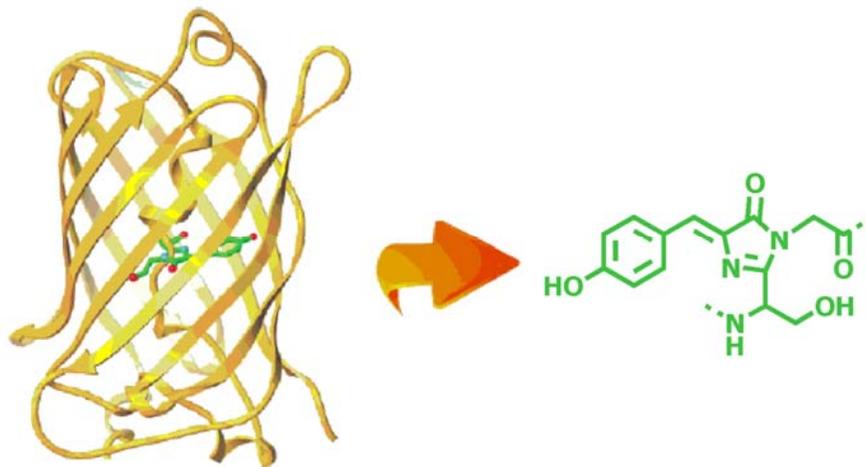


Figure 1.2. Structure tertiaire de la GFP avec son chromophore au centre.¹⁰

⁶ Morin, J. G.; Hastings, J. W. *J. Cell. Physiol.*, **1971**, *77*, 313 – 318.

⁷ Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Winant, J. *Biochemistry*, **1974**, *13*, 2656-2662.

⁸ Ormo, M.; Cubitt, A. B.; Kallio, K.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y.; Remington, S. J. *Science*, **1996**, *273*, 1392-1395.

⁹ a) Yang F.; Moss, L. G.; Phillips, G. N. Jr. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 1246-1251.

b) Phillips, G. N. Jr. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1997**, *7*, 821–27.

¹⁰ Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 1960-1970.

Bien avant la résolution de la structure tridimensionnelle de la protéine verte, Shimomura avait identifié correctement son chromophore. La protéolyse de la GFP dénaturée lui a permis de mettre en évidence un hexapeptide présentant la même absorbance caractéristique que la protéine native.¹¹ Le peptide d'intérêt débutant au résidu 64, le chromophore, la *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone, est quant à lui uniquement formé par la cyclisation des résidus 65 à 67. Cette cyclisation survient à la toute fin du repliement de la GFP et débute par l'attaque nucléophile de l'amide de la Gly67 sur le carbonyle de la Ser65 donnant l'imidazolinone, laquelle perd ensuite une molécule d'eau (Schéma 1.1).¹² Enfin, la liaison α - β de la Tyr66 est déshydrogénée par l'oxygène moléculaire, étendant la conjugaison de l'imidazolinone jusqu'au groupement phénylène.

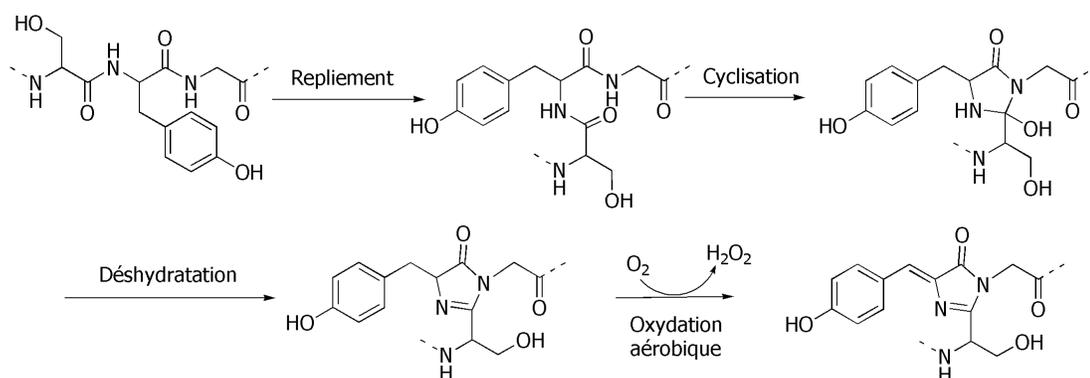


Schéma 1.1. Mécanisme proposé pour la formation du chromophore de la GFP.¹²

Dès la fin des années 80, Douglas Prasher avait envisagé d'utiliser la GFP en tant que marqueur fluorescent afin de suivre le déplacement des protéines à l'intérieur même de la cellule. Quelque peu avant l'essor de la

¹¹ Shimomura, O. *FEBS Lett.*, **1979**, *104*, 220-222.

¹² a) Cody, C. W.; Prasher, D. C.; Westler, W. M.; Prendergast, F. G.; Ward, W. W. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 1212-1218. b) Reid, B. G.; Flynn, G. C. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 6786-6791.

biologie moléculaire au début des années 90, il avait déjà envisagé d'insérer le code génétique de la GFP à la suite de celui d'une protéine afin d'en faire des protéines de fusion. C'est avec cette idée en tête qu'il a travaillé au séquençage et au clonage du gène de la GFP, travaux qu'il publia dans *Gene* en 1992.¹³ Son financement étant venu à terme avant même qu'il ait pu exprimer le clone,¹⁴ c'est donc Martin Chalfie et son groupe qui réalisèrent, en 1994, la première expression de la GFP dans un organisme autre qu'*Aequorea Victoria*.¹⁵ Il a ainsi démontré que le gène à lui seul renferme toute l'information nécessaire pour accomplir la synthèse de la GFP et de son chromophore de manière à générer la fluorescence verte faisant sa renommée. Pour toute l'ampleur des applications découlant de telles découvertes, Martin Chalfie s'est aussi vu décerner le prix Nobel de chimie en 2008.

¹³ Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J. *Gene*, **1992**, *111*, 229-233.

¹⁴ The GFP site : <http://gfp.conncoll.edu/prasher.html> ; (08/11/2009)

¹⁵ Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. *Science*, **1994**, *263*, 802-805.

Tel que démontré par les travaux de Chalfie, l'avantage majeur de la GFP isolée d'*Aequorea Victoria* réside en la présence de son chromophore interne, ce qui en fait une protéine intrinsèquement fluorescente. Effectivement, bien qu'une foule d'autres organismes bioluminescents soient aussi dotés de protéines fluorescentes, les chromophores de celles-ci semblent tous être des cofacteurs de ces apo-protéines, telles que la lumazine¹⁶ ou la flavine.¹⁷ La nécessité d'un cofacteur, organique ou inorganique, place ces protéines fluorescentes dans une classe à part de celle de la GFP. Leur utilisation en tant que protéine de fusion *in vivo* impliquerait l'insertion du cofacteur de manière à obtenir le signal fluorescent, ce qui les rend moins attrayantes que la GFP pour qui la fluorescence est intrinsèque.

Troisième et dernier lauréat du prix Nobel de chimie de l'année 2008, Roger Tsien s'est vu décerner cet honneur pour sa contribution au niveau de la compréhension du phénomène luminescent de la GFP et pour le développement de nouveaux mutants de celle-ci. Avant de créer un arc-en-ciel de couleurs à partir de différents mutants de la GFP, Tsien s'est d'abord concentré à simplifier le spectre de la protéine native (*wt* GFP). Tel que présenté à la Figure 1.3, la *wt* GFP présente deux maxima d'excitation dont un majoritaire à 396 nm et un second de plus faible amplitude à 475 nm.¹⁸ L'intensité relative de ces deux bandes étant dépendante du pH, il a été démontré que la bande à 396 nm correspond au maximum d'excitation du chromophore sous sa forme neutre¹⁹ alors que l'espèce anionique est excitée

¹⁶ Lee, J.; Gibson, B. G.; Okane, D. J.; Kohnle, A.; Bacher, A. *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *210*, 711-719.

¹⁷ Macheroux, P.; Schmidt, K. U.; Steinerstauch, P.; Ghisla, S.; Colepiccolo, P.; Buntic, R.; Hastings, J. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, *146*, 101-106.

¹⁸ Heim, R.; Prasher, D. C.; Tsien, R. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1994**, *91*, 12501-12504.

¹⁹ Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A.; Tsien, R. Y. *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, *20*, 448-455.

à 475 nm.²⁰ Plusieurs facteurs justifient le choix préférentiel de la bande d'absorbance/excitation à 475 nm. D'abord, l'irradiation de cellules avec la lumière visible serait assurément moins dommageable tant pour la cellule que pour l'œil de l'observateur. De plus, les phénomènes d'autofluorescence des cellules et de photoblanchiment pouvant interférer au cours de l'irradiation de cellules sont moins importants dans le visible que dans l'UV. Ainsi, différentes mutations ont été apportées au gène natif dans le but de rendre majoritaire la bande à 475 nm par rapport à celle se trouvant à 396 nm.

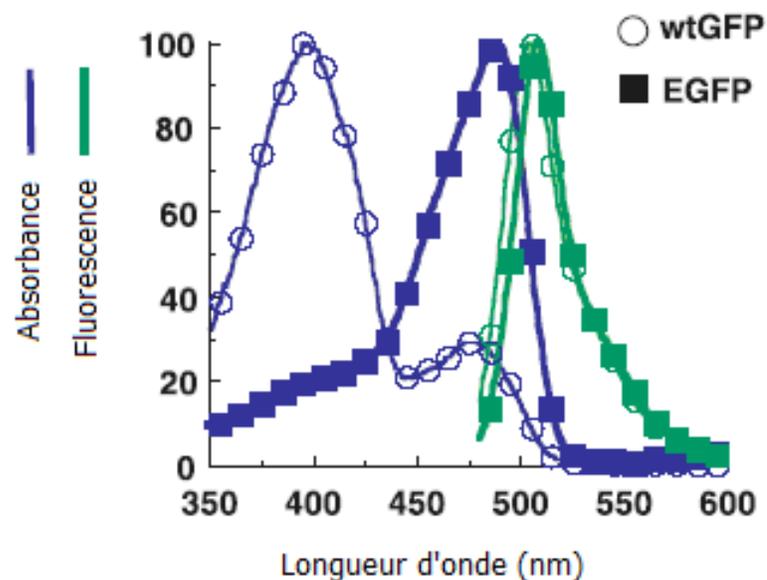


Figure 1.3. Maxima majoritaire et minoritaire (cercles bleus) d'absorption et maximum unique de fluorescence (cercles verts) de la wtGFP comparé avec l'absorbance unique de la eGFP (carrés).²¹

Bien que des mutations aléatoires du gène natif de la GFP aient permis d'avoir un certain contrôle des caractéristiques spectroscopiques de la GFP, c'est la résolution de sa structure cristalline, réalisée par Tsien, qui a permis de rationaliser les effets de ces mutations. Enfin, il a été trouvé que même si

²⁰ Ward, W. W.; Prentice, H. J.; Roth, A. F.; Cody, C. W.; Reeves, S. C. *Photochem. Photobiol.*, **1982**, *35*, 803-808.

plus d'une mutation peut entraîner la même modification du spectre d'excitation, le mutant S65T se démarque des autres pour des raisons cinétiques.²¹ Effectivement, il apparaît qu'en plus de favoriser la forme anionique du chromophore, l'introduction d'une thréonine à la position 65 accélère la cyclisation des résidus 65-67, menant à la formation de la *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone.²²

Aequorea Victoria est une espèce de méduse vivant dans les eaux du Pacifique, au nord-ouest de l'Amérique du Nord. Son évolution dans un milieu froid se traduit par une sensibilité de la GFP vis-à-vis un milieu tempéré. Bien que la fluorescence de la GFP en soi demeure stable à des températures relativement élevées,²³ le repliement de la protéine au-delà de la température ambiante résulte en de faibles rendements. Les applications potentielles de la GFP en tant que protéine de fusion gravitent principalement autour des protéines issues des cellules mammifères, il était donc impératif de remédier à cette limitation majeure. Une combinaison aléatoire (*DNA shuffling*) de différents mutants de la GFP native a permis d'identifier un triple mutant, comprenant les mutations F99S, N153T et V163A, comme étant la clé pour l'expression de la GFP à 37°C.²⁴ Ces trois résidus semblent être répartis aléatoirement à travers la structure de la protéine, aucune hypothèse n'a encore été apportée à ce jour pour expliquer l'effet découlant de ces mutations.

²¹ Lippincott-Schwartz, J.; Patterson, G. H. *Science*, **2003**, *300*, 87-91.

²² Heim, R.; Cubitt, A. B.; Tsien, R. Y. *Nature*, **1995**, *373*, 663-664.

²³ Lim, C. R.; Kimata, Y.; Oka, M.; Nomaguchi, K.; Kohno, K. *J. Biochem. (Tokyo)*, **1995**, *118*, 13-17.

²⁴ a) Cramer, A.; Whitehorn, E. A.; Tate E.; Stemmer, W. P. C. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 315-319. b) Yokoe H.; Meyer, T. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 1252-1256.

1.1.2. Les débuts du marquage protéique par fluorescence

Les modifications apportées au gène natif de la GFP sont aujourd'hui regroupées dans un seul mutant connu sous le nom de eGFP, ou *enhanced*-GFP, mutant à partir duquel la protéine verte a su trouver bon nombre d'applications.²¹ Parmi celles-ci, la plus répandue est sans aucun doute le rôle de la GFP en tant que protéine de fusion afin de permettre la localisation, dans le temps et l'espace, d'une protéine spécifique. Cette application ayant été largement commercialisée, il existe à ce jour de nombreux exemples de fusion de la GFP qui ont permis de marquer spécifiquement l'ensemble des organelles de la cellule, allant du noyau jusqu'à la membrane plasmique.⁵ Malgré les succès rencontrés pour cette méthode de marquage des protéines, la taille de la GFP en soi est souvent équivalente, voire supérieure, à celle de la protéine hôte, générant un encombrement stérique pouvant interférer avec la fonction et la localisation de celle-ci.²⁵ La taille moléculaire de la GFP représentant le principal inconvénient, son utilisation en tant que protéine de fusion peut aussi être limitée par sa tendance à former des agrégats et sa faible vitesse de repliement. Le potentiel du marquage protéique pour l'étude des processus cellulaires ayant été mis en évidence grâce à la découverte de la GFP et aux applications en ayant découlé, diverses méthodes de marquage ont été développées au cours des années, dont quelques exemples sont présentés ci-dessous.

De façon analogue à la fusion de la GFP, il est possible de marquer de manière covalente une protéine fusionnée à la O^6 -alkylguanine-DNA alkyltransferase (hAGT).²⁶ Cette dernière fait partie d'une famille de protéines

²⁵ a) Lisenbee, C.S.; Karnik, S.K. *Traffic*, **2003**, *4*, 491-501. b) Andresen, M.; Schmitz-Salue, R.; Jakobs, S. *Mol. Biol. Cell*, **2004**, *15*, 5616-5622.

²⁶ a) Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 86-89. b) Keppler, A.; Pick, H.; Arrivoli, C.; Vogel, H.; Johnsson, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 9955-9959.

réparant les irrégularités de l'ADN afin d'éviter d'éventuelles mutations. Plus précisément, la hAGT assure la réparation des lésions d'ADN en transférant de manière irréversible le groupement alkyle en position O6 d'une guanine endommagée à sa propre cystéine catalytique, tel qu'illustré à la Figure 1.4 A. Puisque la hAGT présente une spécificité relativement faible, elle peut donc éliminer une variété d'alkyles, allant du méthyle jusqu'à des groupements plus gros, tel le benzyle, ce qui rend la nucléobase *O*⁶-benzylguanine et de ses dérivés des substrats de la hAGT. Ainsi, la fusion de la hAGT et sa réaction subséquente avec des dérivés fluorescents de la *O*⁶-benzylguanine constituent une méthode de marquage irréversible de protéine (Figure 1.4 B). Bien que cette technique se soit avérée assez spécifique et peu cytotoxique, il n'en reste pas moins qu'elle partage le désavantage principal de la fusion de la GFP, soit l'encombrement stérique engendré par la protéine de fusion elle-même.

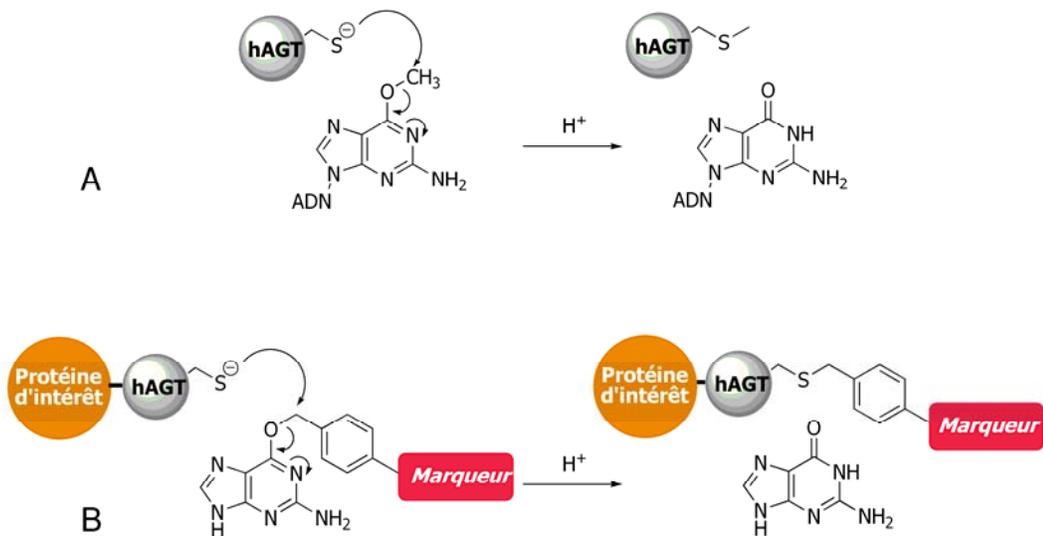


Figure 1.4. A) Mécanisme de réparation de l'ADN par la hAGT. B) Marquage covalent d'une protéine d'intérêt à l'aide de la fusion de la hAGT.

Une troisième classe de méthodes de marquage implique la fusion de la protéine d'intérêt à une séquence peptidique pouvant jouer le rôle de

substrat pour une enzyme catalysant la formation d'un lien covalent avec un second substrat présentant un fluorophore.²⁷ Un exemple bien connu de ce type de marquage est celui utilisant la transglutaminase (TGase), une enzyme catalysant la formation d'un lien amide entre un résidu glutamine et une amine primaire.²⁸ La TGase est une enzyme ubiquitaire des organismes multicellulaires dont la plus connue est celle isolée du foie de cobaye. Alors qu'elle se distingue par sa grande spécificité envers son substrat donneur, comprenant une glutamine, la TGase est plutôt tolérante envers une gamme d'amines primaires en tant que substrats accepteurs. Ainsi, il est possible de marquer de manière covalente une protéine fusionnée à un *Q-Tag*, séquence peptidique comprenant une glutamine, en catalysant, à l'aide de la TGase, la formation d'un lien amide avec un fluorophore présentant une amine primaire, tel qu'illustré à la Figure 1.5. Bien que cette technique ait démontré une utilité certaine pour le marquage extracellulaire, il restera impossible de l'appliquer en milieu intracellulaire en raison de la trop faible concentration en calcium et de la présence d'une multitude de substrats de la TGase pouvant interférer avec le marquage.

²⁷ a) George, N.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, N.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8896-8897. b) Chen, I.; Howarth, M.; Lin, W.Y.; Ting, A.Y. *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 99-104.

²⁸ Lin, C.W.; Ting, A.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4542- 4543.

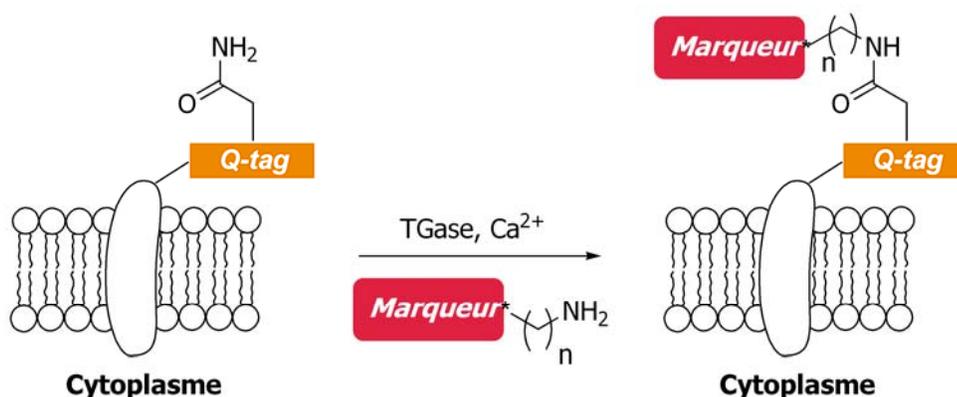


Figure 1.5. Stratégie de marquage protéique tirant avantage de la spécificité de la TGase.

Ayant pris de l'ampleur plus récemment, une quatrième catégorie de marquage fait plutôt appel à l'utilisation de fluorophores organiques conçus pour réagir avec une séquence spécifique préalablement incorporée à la protéine d'intérêt. Un exemple d'une telle alternative est le *FIAsH Labelling*, une méthode de marquage développée par Roger Tsien, où une séquence peptidique, optimisée à partir d'un tour- β , présente quatre résidus cystéine positionnés de manière à réagir spécifiquement avec un fluorogène biarsenate,²⁹ tel qu'illustré à la Figure 1.6. L'avantage principal de cette séquence peptidique tétraCys réside en sa petite taille, entraînant une perturbation minimale de la protéine cible, tout en conférant suffisamment de spécificité envers les fluorogènes organoarsenates pour permettre le marquage *in vivo*. D'un autre côté, le désavantage le plus évident de cette méthode est sans aucun doute l'utilisation de dérivés d'arsenic qui, en raison de leur toxicité, doivent être accompagnés d'antidotes pour permettre l'application de la méthode. Grâce à sa commercialisation, entre autre, cette nouvelle méthode de marquage a su trouver bon nombre d'applications, lesquelles ont permis de mettre en lumière les limitations du *FIAsH*

²⁹ Griffin, B.A.; Adams, S.R.; Tsien, R.Y. *Science* **1998**, *281*, 269-272.

*Labelling.*³⁰ Parmi celles-ci figurent le bruit de fond non-négligeable persistant malgré plusieurs lavages, la sensibilité de l'épingle tétraCys envers les milieux oxydants et sa tendance à former des ponts disulfure intermoléculaires.³¹

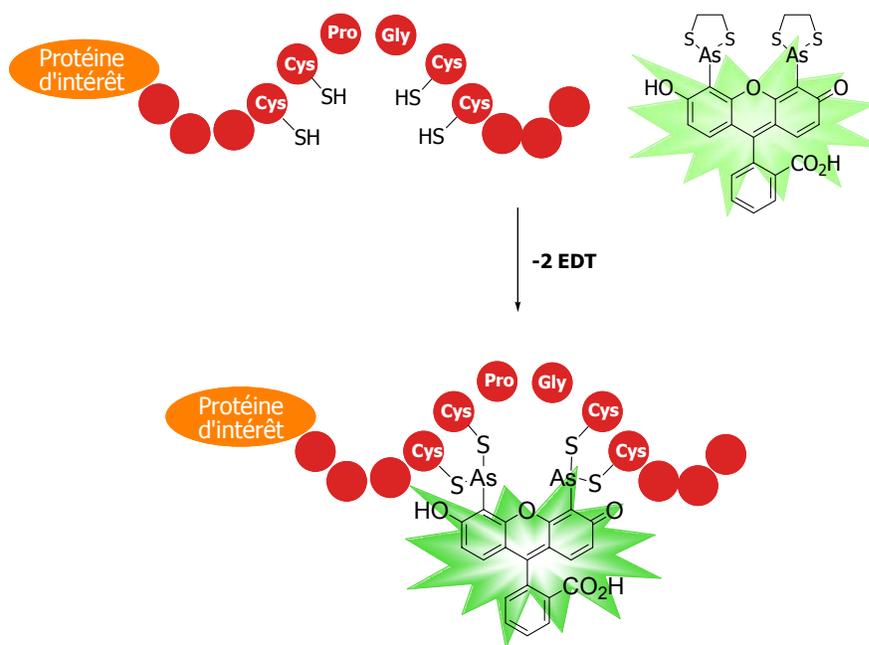


Figure 1.6. Stratégie de marquage protéique développée par Roger Tsien, la *FIAsH labelling*.

Une multitude de techniques pour le marquage de protéines sont disponibles aujourd'hui, où chacune d'entre elles présente néanmoins des désavantages non-négligeables limitant leur utilisation à différents niveaux. Ainsi, malgré le développement récent de nouvelles méthodes, la nécessité de développer ce type d'outils est toujours pressante, ce qui a poussé le groupe Keillor à concentrer ses efforts au développement d'une méthode de marquage protéique versatile, facile d'utilisation et peu invasive, se démarquant de celles déjà disponibles.

³⁰ a) Ju, W.; Morishita, W.; Tsui, J., Gaietta, G.; Deerinck, T.J.; Adams, S.R.; Garner, C.C.; Tsien, R.Y.; Ellisman, M.H.; Malenka, R.C. *Nat. Neurosci.* **2004**, *7*, 244-253. b) Hoffmann, C.; Gaietta, G.; Bunemann, M.; Adams, S.R.; Oberdorff-Maass, S.; Behr, B.; Vilardaga, J.P.; Tsien, R.Y.; Eisman, M.H.; Lohse, M.J. *Nat. Meth.* **2005**, *2*, 171-176.

³¹ Stroffekava, K.; Proenza, C.; Beam, K.G. *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* **2001**, *442*, 859-866.

1.2. CARACTÉRISTIQUES DES MALÉIMIDES ET LEURS APPLICATIONS

Les groupements de type maléimide sont depuis longtemps utilisés en enzymologie en tant qu'agents alkylants de thiols biologiques de toute sorte.³² L'attaque nucléophile de l'anion thiolate sur la double liaison d'un maléimide mène à la formation d'un thioéther stable, inactivant le thiol. Les connaissances acquises à ce jour au niveau de la réactivité des maléimides et de leur stabilité en milieu aqueux sont en grande partie dues à J.D. Grégory.³³ Ses travaux ont permis de mettre en évidence la spécificité de la réaction entre les groupements sulfhydryles et les maléimides en démontrant qu'à pH inférieur à 7.5, ces derniers ne sont pas réactifs vis-à-vis des amines primaires ou des hydroxyles. Enfin, il a été noté qu'à ces mêmes valeurs de pH, la vitesse d'hydrolyse des maléimides est négligeable comparativement à celle de l'addition de thiols biologiques, tel le glutathion (GSH).

1.2.1. Marquage spécifique des thiols biologiques

Pour l'ensemble de leurs caractéristiques spécifiques, les maléimides ont joué un rôle important dans l'étude des thiols biologiques. À titre d'exemple, le N-éthylmaléimide (NEM) a été utilisé à maintes reprises comme inhibiteur irréversible non-spécifique d'enzymes où le site actif est suspecté de renfermer un thiol catalytique.³⁴ Le NEM s'est aussi avéré fort utile en tant qu'agent de blocage des sulfhydryles de la cystéine et du glutathion pouvant interférer avec certaines méthodes d'analyse.³⁵ Enfin, l'addition de thiols sur les maléimides pouvant être suivie avec la disparition de la bande d'absorption à 300 nm, NEM a aussi permis le titrage des groupements

³² a) Haugaard, N.; Cutler, J.; Ruggieri, M. R. *Anal. Biochem.*, **1981**, *116*, 341-343. b) Heitz, J. R.; Anderson, C. D.; Anderson, B. M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1968**, *127*, 627-636.

³³ Gregory, J. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, *77*, 3922-3923.

³⁴ Gorin, G.; Martic, P. A.; Doughty, G. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1966**, *115*, 593-597.

³⁵ Haugaard, N.; Cutler, J.; Ruggieri, M.R. *Anal. Biochem.*, **1981**, *116*, 341-343.

sulfhydryles. Dans le même ordre d'idées, un dérivé de NEM radiomarké au ^{14}C a aussi été utilisé pour identifier la cystéine catalytique de la myosine-ATPase.³⁶ Ce type de marqueur étant plutôt dispendieux, des réactifs colorés dérivés de NEM ont aussi été conçus pour l'étude des résidus cystéines de l'albumine. Bien que plus abordable que les radiomarqueurs, l'utilisation de cette catégorie de sondes colorées est restreinte par sa limite de détection élevée.

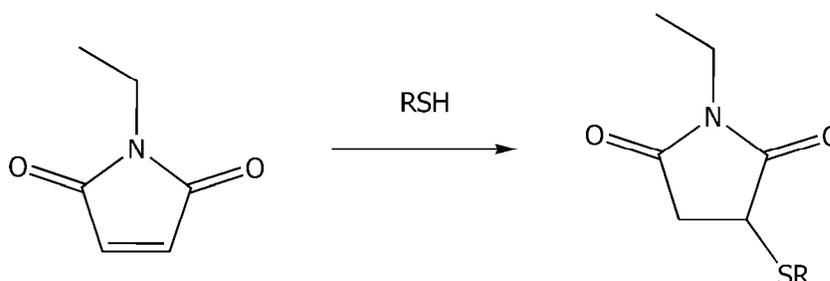


Figure 1.7. Addition 1,4 de Michael d'un thiol sur le *N*-éthylmaléimide (NEM).

Devant le manque d'outils sensibles et peu coûteux disponibles pour l'étude structurale des protéines, Kanaoka fût ainsi le premier à regrouper maléimide et fluorophore dans la conception d'un marqueur de thiol.³⁷ De manière moins prévisible, il a ensuite été observé que la réaction d'un thiol avec ces dérivés de maléimide avait pour conséquence d'augmenter considérablement l'intensité de fluorescence du composé original, révélant la capacité qu'ont les maléimides de produire un *quench* de la fluorescence. Cette dernière observation a ouvert la porte à une nouvelle catégorie de sondes fluorogènes, permettant la détection et la quantification des thiols biologiques avec une dimension supplémentaire, soit le suivi de processus biologiques en temps réel. Bien que le développement de cette méthode de

³⁶ Kanaoka, Y.; Sekin, T.; Machida, M.; Sôma, Y.; Tanizawa, K.; Ban, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1964**, *12*, 127-134.

³⁷ Kanaoka, Y. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1977**, *16*, 137-147.

marquage des thiols soit attribuable à Kanaoka, c'est Corrie et Langmuir qui l'ont plus tard appliqué à des fluorophores plus appropriés au niveau pratique.³⁸

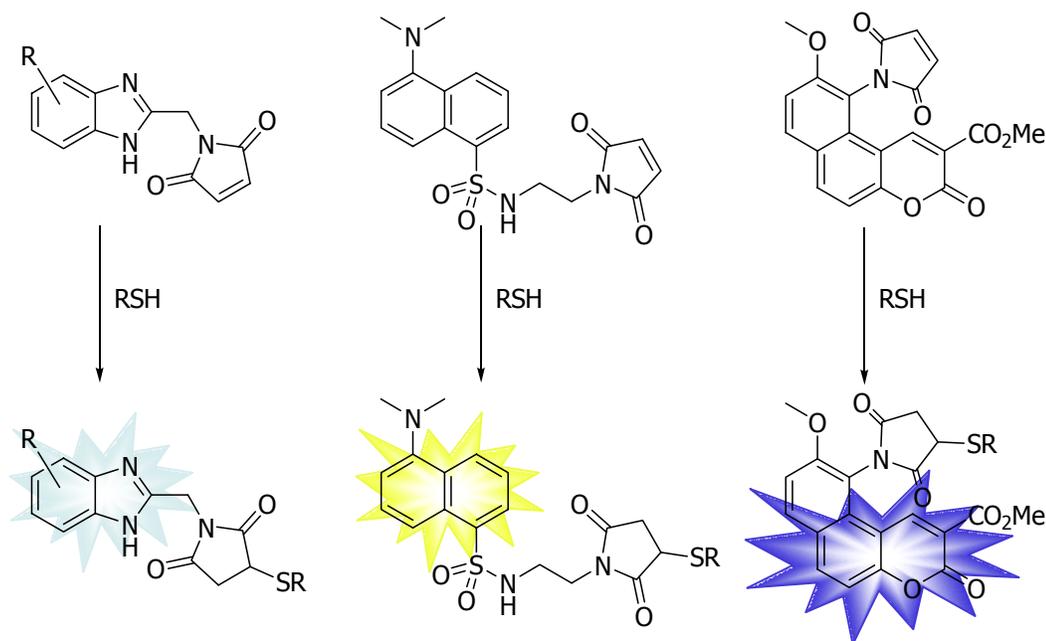


Figure 1.8. Structure des sondes fluorescentes développées par Kanaoka, Langmuir et Corrie.

1.3. MÉTHODE DE MARQUAGE DÉVELOPPÉE PAR LE GROUPE KEILLOR

1.3.1. Première génération de fluorogènes

La méthode de marquage protéique conçue par le groupe Keillor s'appuie sur le concept de marquage fluorogène proposé par Kanaoka. Sur la base des fluorogènes ayant découlé de cette méthode, il a été raisonné qu'un fluorophore qui présenterait deux groupements maléimides plutôt qu'un seul ne pourrait recouvrer sa fluorescence latente que suite à l'addition de deux

³⁸ a) Corrie, J. E. T. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, **1994**, 2975-2982. b) Langmuir, M. E.; Yang, J. R.; Moussa, A. M.; Laura, R.; Lecompte, K. A. *Tet. Letters*, **1995**, 36, 3989-3992. c) Yang, J. R.; Langmuir, M. E. *J. Heterocycl. Chem.*, **1991**, 28, 1177-1180.

équivalents de thiols. De plus, en prenant soin de positionner les maléimides à une distance définie l'un de l'autre, le fluorogène ainsi construit pourrait réagir rapidement et sélectivement avec une structure qui présenterait deux groupes sulfhydryles séparés par la distance correspondante.

Ainsi, une première génération de fluorogènes a été synthétisée, où l'échafaudage de ces composés se résume en un noyau fluorescent, ici coumarine ou naphthalène, auquel sont directement greffés deux groupements maléimides distancés de 10 ou 15 Å. Le caractère fluorogène des composés **1.1**, **1.2** et **1.3** de la Figure 1.9 a d'abord été démontré en les mettant en présence d'un excès de thiol. L'augmentation de la fluorescence en fonction du nombre d'équivalents de thiol permet d'observer, à la Figure 1.10, l'obtention d'un plateau correspondant à deux équivalents, concordant avec la formation de l'adduit fluorescent dithiolé.³⁹

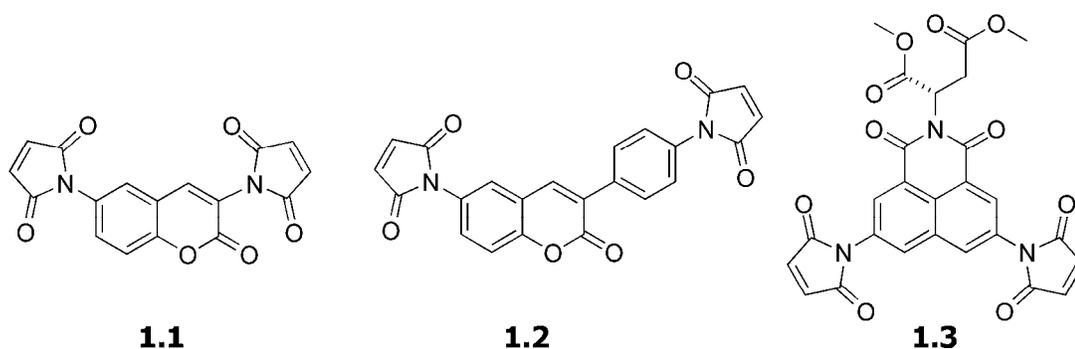


Figure 1.9. Première génération de fluorogènes synthétisés dans le groupe Keillor.

Ces fluorogènes ayant été conçus de manière à réagir avec une structure présentant deux groupements sulfhydryles, la formation d'un plateau a donc aussi été suivie suite à l'addition d'un dithiol synthétique, soit le 4,4'-bis(mercaptométhyl)-benzophenone (BMMB).

³⁹ Girouard, S.; Houle, M. H.; Grandbois, A.; Keillor, J. W.; Michnick, S. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 559-566.

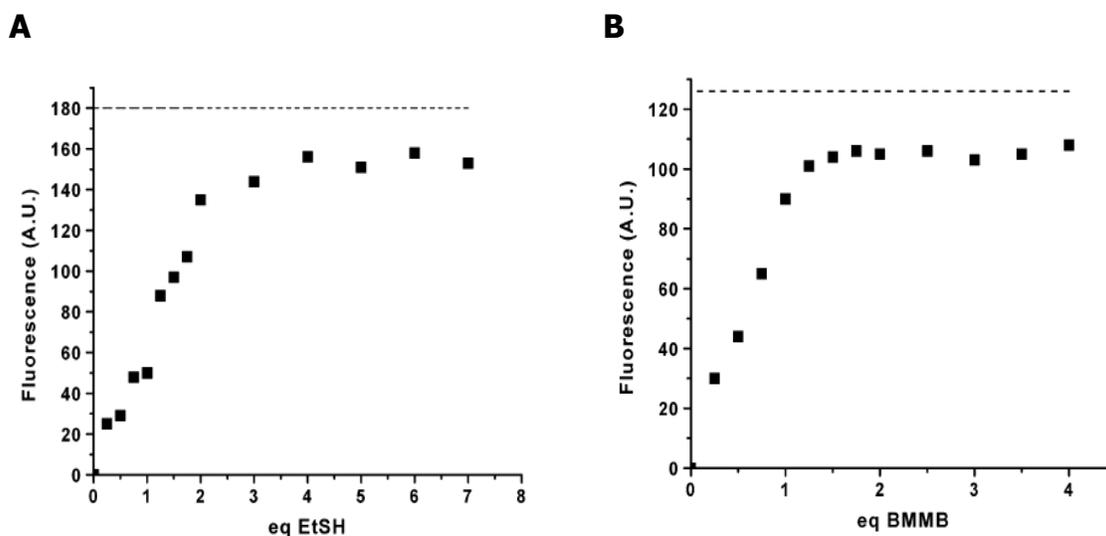


Figure 1.10. Augmentation de fluorescence suite à l'ajout de A) 2 éq. de EtSH et de B) 1 éq. de BMMB au fluorogène **1.2**.³⁹

Les fluorogènes présentant un seul groupement maléimide trouvent leur utilité au niveau du marquage non-spécifique des thiols alors que ceux en arborant deux ont le potentiel de marquer spécifiquement une protéine présentant deux résidus cystéines. Une première étape de validation de cette hypothèse a été d'éliminer la possibilité pour des fluorogènes dimaléimides de subir l'addition de deux équivalents d'une protéine exposant un résidu cystéine à sa surface et, dans un deuxième temps, de démontrer que la simple addition d'un thiol ne suffit pas à régénérer la fluorescence du marqueur, assurant la spécificité du marquage. Pour ce faire, un mutant de la thiorédoxine (C35A-TRX), une protéine monomérique ne présentant qu'un seul résidu cystéine,⁴⁰ a été incubé avec le fluorogène **1.2** à pH 7.0, incubation qui n'a pas mené à l'augmentation de fluorescence préalablement observée pour l'adduit dithiolé de ce composé. Cette observation suggère que l'encombrement généré par l'addition de la première protéine bloque l'addition sur le second maléimide qui, toujours intact, permet toujours le *quench* de la fluorescence du mono-adduit. Corroborant cette idée, une

⁴⁰ Houle, M.-H. M. Sc., Thèse, Université de Montréal, 2002.

seconde incubation avec un thiol chimique, permettant la réaction du second maléimide, a permis d'observer le maximum de fluorescence attendu. Une analyse par SDS-PAGE, présentée à la Figure 1.11, permet de visualiser la fluorescence négligeable résultant du mono adduit (puits 2) et la fluorescence régénérée suite à l'ajout du second thiol (puits 3). Cette discrimination due à l'encombrement suggère qu'il serait ainsi possible de marquer sélectivement une protéine présentant la séquence appropriée.

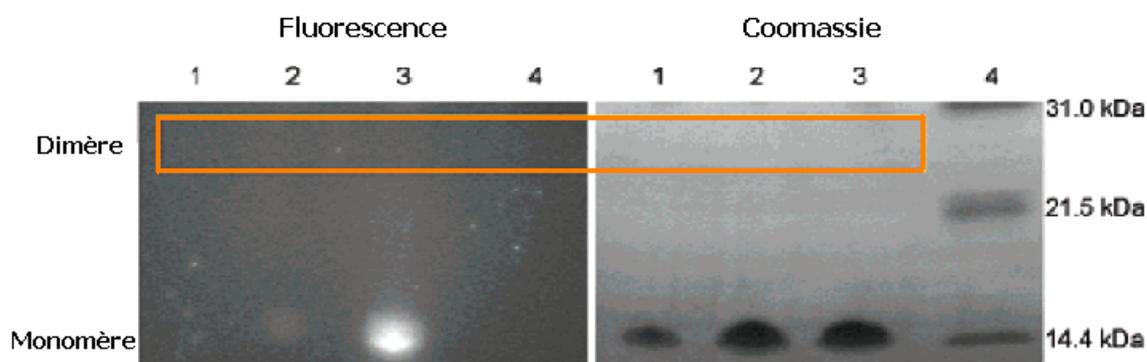


Figure 1.11. Analyse SDS-PAGE du marquage fluorescent de la protéine C35A TRX.³⁹ Puits 1 : C35A-TRX ; Puits 2 : C35A-TRX avec le fluorogène **1.2**; Puits 3 : C35A-TRX avec le fluorogène **1.2** et ensuite un excès de EtSH ; Puits 4 : Marqueur de tailles.

Enfin, le groupe Keillor a voulu confirmer l'hypothèse de départ en concevant une protéine test. Afin que la réaction de celle-ci avec le fluorogène-dimaléimide soit optimale, une telle protéine devrait arborer deux résidus cystéines dont les thiols, bien exposés au solvant, présentent peu de gêne stérique et sont séparés par la même distance que les groupements maléimides du fluorogène. Les hélices- α étant connues pour leur stabilité conformationnelle, elles ont donc été retenues comme structure de base afin de positionner deux résidus cystéines à une distance précise l'une de l'autre. C'est pour cette raison qu'un mutant d'un fragment de la protéine Fos,⁴¹ un

⁴¹ a) Abate, C.; Luk, D.; Gentz, R.; Rauscher, F. J., III; Curran, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 1032. b) O'Shea, E. K.; Rutkowski, R.; Kim, P. S. *Cell* **1992**, *68*, 699.

facteur de transcription, a été choisi comme échafaudage de départ, sa structure secondaire hélicoïdale subsistant même à certaines mutations et tronctions. La protéine native présentant déjà un résidu cystéine à la position 49, la mutation L56C a permis de positionner une seconde cystéine à environ 10 Å de la première, soit deux tours d'hélice- α .³⁹ Les mutants de Fos présentant une (mCys-Fos) et deux cystéines (diCys-Fos) ont donc été exprimés et purifiés avant d'être utilisés *in vitro* pour tester leur propension à réagir avec les fluorogènes. Suite à l'incubation des composés **1.2** et **1.3** avec chacun des mutants mCys-Fos et diCys-Fos, les milieux réactionnels ont été analysés par SDS-PAGE à l'aide d'une coloration au bleu de Coomassie et d'une irradiation aux rayons UV, tel que présenté à la Figure 1.12. Il est ainsi possible d'y observer la protéine diCys-Fos marquée de manière efficace par l'un ou l'autre des fluorogènes **1.2** ou **1.3** alors que la protéine n'ayant qu'une cystéine à sa surface ne présente qu'une fluorescence basale. De plus, l'absence d'une bande correspondant à la masse moléculaire du dimère de Fos sur ce même gel appuie l'idée selon laquelle l'augmentation de fluorescence des fluorogènes est due à la réaction d'un seul équivalent de diCys-Fos et non à deux équivalents de mCys-Fos. Cette sélectivité de réaction des fluorogènes envers les protéines présentant deux thiols est en concordance avec les observations antérieures avec le dithiol chimique (BMMB).

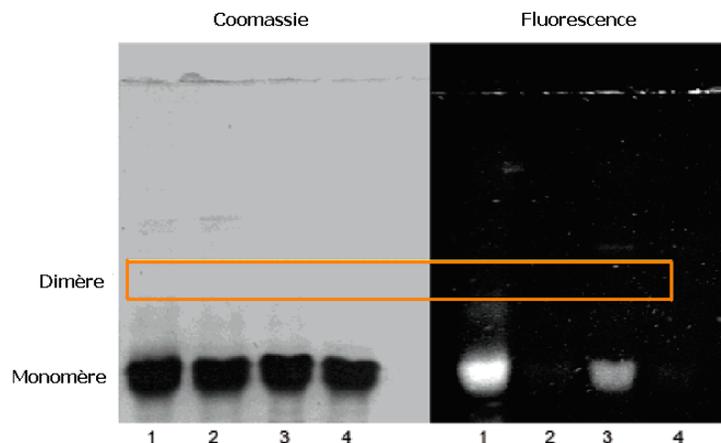


Figure 1.12. Analyse SDS-PAGE du marquage fluorescent de la diCys-Fos avec les fluorogènes **1.2** et **1.3**, où il n’y a pas de marquage du mCys-Fos.³⁹

Puits 1 : diCys-Fos avec **1.3** ; Puits 2 : mCys-Fos avec **1.3** ;

Puits 3 : diCys-Fos avec **1.2**; Puits 4 : mCys-Fos avec **1.2**.

1.3.2. Deuxième génération de fluorogènes

La présente méthode visant à fournir un outil de marquage protéique pouvant être utilisé tant *in vitro* qu'*in vivo*, il est de première importance d’avoir accès à une librairie de fluorogènes facilement modifiables et dont les différentes caractéristiques répondent aux besoins spécifiques d’une variété d’applications. Bien que les fluorogènes de première génération aient permis de valider le principe de cette nouvelle méthode de marquage protéique, leur structure générale présente néanmoins quelques limitations au niveau de la modification de ces derniers et de leurs perspectives d’utilisation. Effectivement, l’élaboration d’une telle banque de fluorogènes implique des variations indépendantes du fluorophore et de la distance entre les groupements maléimides, une liberté qui n’est pas disponible selon l’approche synthétique des fluorogènes de la première génération. Effectivement, puisque les maléimides se trouvent directement liés au fluorophore, la distance les séparant est dictée par les possibilités synthétiques menant à la

formation des maléimides, ce qui restreint la variété de fluorogènes pouvant être obtenue.

Afin de remédier à cette problématique, une deuxième génération de fluorogènes a été conçue selon une approche synthétique convergente. Celle-ci permet le développement indépendant de fragments dimaléimide, lesquels sont ensuite greffés à une gamme de fluorophores par l'intermédiaire d'un espaceur tel qu'illustré à la Figure 1.13.⁴² Sur la base de cette nouvelle approche convergente, deux principaux aspects de la présente méthode de marquage ont été étudiés, soit la cinétique de réaction d'addition de thiols biologiques sur les maléimides et le mécanisme de *quench* de la fluorescence. Il était d'une importance certaine de s'attarder à mieux comprendre ces phénomènes puisqu'ils sont à la base du principe de la méthode de marquage présentement développée.

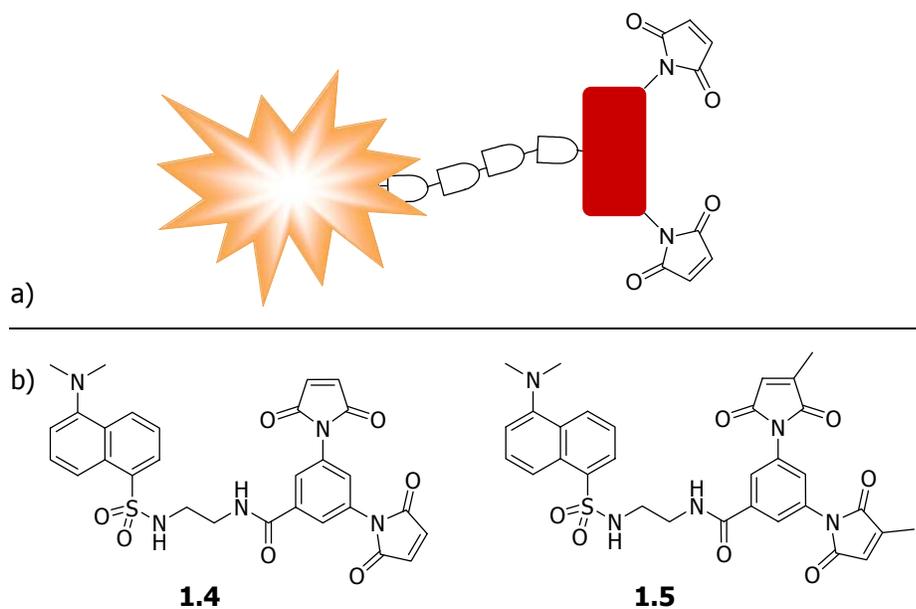


Figure 1.13. a) Modèle général des fluorogènes de deuxième génération.

b) Exemples de fluorogènes de deuxième génération.

⁴² Guy, J.; Caron, K.; Dufresne, S.; Michnick, S. W.; Skene, W. G.; Keillor, J. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 11969-11977.

1.3.3. Design de la nouvelle séquence peptidique cible

Tel que mentionné plus haut, le facteur de transcription Fos a été utilisé comme échafaudage hélicoïdal pour la démonstration du principe de la méthode. Le marquage fluorescent de la séquence diCys-Fos a permis de démontrer qu'un équivalent de fluorogène est suffisant pour marquer un équivalent du peptide d'intérêt. De plus, il a été possible de marquer, avec une certaine sélectivité, ce même peptide dans le lysat cellulaire de son milieu d'expression. L'application de cette séquence peptidique pour le marquage intracellulaire a révélé la faisabilité de cette approche, mais aussi une tendance de la protéine à se localiser dans le noyau, probablement due au rôle de facteur de transcription de la protéine parent.⁴³ Ces résultats préliminaires ayant permis de valider le principe de la méthode et le potentiel de celle-ci, deux principales raisons ont cependant incité le groupe Keillor à créer une séquence hélicoïdale *de novo*, la première étant la tendance de la protéine hélicoïdale à se diriger vers le noyau et la seconde, la taille considérable du mutant diCys-Fos.

Un survol de la littérature a permis d'identifier un peptide synthétique ayant été conçu pour adopter une structure hélicoïdale monomérique comprenant quatre tours complets.⁴⁴ Ce modèle a ainsi servi de référence pour l'élaboration de la séquence de base présentée au Tableau 1.1. À celle-ci ont ensuite été introduits deux résidus cystéine à différentes positions, selon le patron $(i, i + 7)$, positionnant les deux cystéines du même côté de l'hélice- α , à deux tours d'intervalle l'une de l'autre. L'hélicité des mutants diCys de cette série a pu être évaluée par modélisation selon l'algorithme

⁴³ Guy, J.; Castonguay, R.; Campos-Reales, N. B.; Jacquier, V.; Caron, K.; Michnick, S.; Keillor, J. W. : *De novo* Helical Peptides as Target Sequences for a Specific, Fluorogenic Protein Labeling Strategy., *Mol. Biosystems*, en révision.

⁴⁴ a) Marqusee, S.; Robbins, V. H.; Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5286-5290. b) Merutka, G.; Stellwagen, E. *Biochemistry* **1990**, *29*, 894-898.

AGADIR,⁴⁵ permettant de retenir une séquence finale, dont le nom dC10 fait référence aux 10 Å séparant les deux thiols.

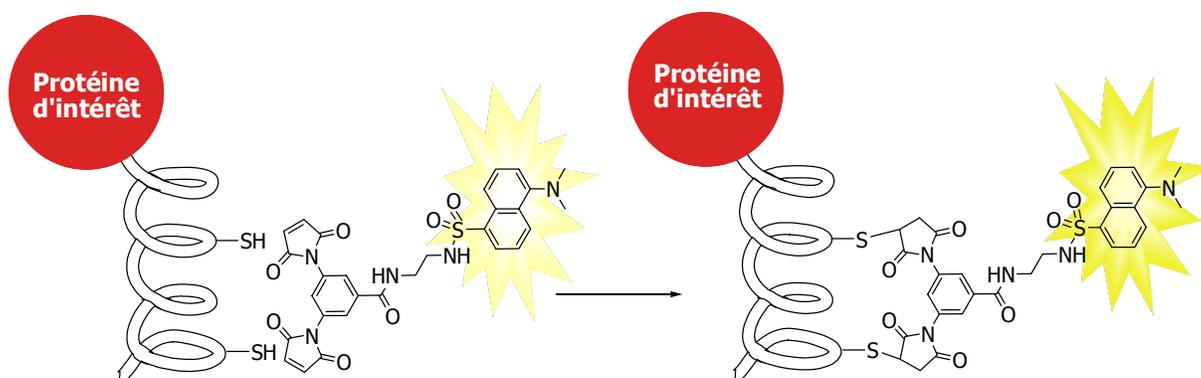


Figure 1.14. Design de la méthode de marquage protéique élaboré par le groupe Keillor.

Afin d'évaluer la réactivité de cette nouvelle hélice dC10, cette dernière a d'abord été fusionnée à la MBP, la *Maltose Binding Protein*, puis une étude cinétique a été menée avec le fluorogène dansyle **1.4**. La nouvelle hélice- α ayant été conçue dans le but d'améliorer le système de première génération, la cinétique de réaction de ce même fluorogène a aussi été étudiée avec le diCys-Fos. Enfin, puisqu'il serait ultimement souhaitable d'utiliser cette méthode de marquage en cellule, il était impératif de comparer la cinétique d'addition de **1.4** avec le glutathion (GSH), un thiol biologique présent en concentration importante dans le milieu cellulaire. Les constantes de vitesse présentées au Tableau 1.1 ont été mesurées en suivant l'augmentation de la fluorescence générée par la réaction de quantités équimolaires de protéine et de fluorogène **1.4**. Il a ainsi été observé que la nouvelle séquence dC10 présente l'avantage de réagir au moins trois fois plus rapidement que la protéine diCys-Fos utilisée à l'origine de la méthode. D'un côté plus pratique,

⁴⁵ a) Muñoz, V.; Serrano, L. *Biopolymers* **1997**, *41*, 495-509. b) L'algorithme AGADIR est disponible en ligne à l'adresse suivante : <http://www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html>.

aucune réaction n'a pu être observée avec la MBP non-modifiée, ayant servi de contrôle négatif. Enfin, il a été trouvé que la constante de vitesse de réaction de MBP-dC10 dépasse largement celle du GSH, soit d'un ordre de magnitude. Bien que la séquence peptidique cible ait présenté un avantage cinétique considérable par rapport au GSH, il n'en reste pas moins que la grande réactivité des groupements maléimides pourrait constituer une limitation lors de l'application de la méthode de marquage en milieu cellulaire.

Tableau 1.1. Constantes de vitesse de réaction entre les fluorogènes **1.4** et **1.5** avec diCys-Fos, MBP-dC10 et GSH à 20°C (pH 7.5).⁴³

	k_2 (M ⁻¹ s ⁻¹)		Atténuation de la constante de vitesse
	fluorogène 1.4	fluorogène 1.5	
diCys-Fos	4000	53	75
MBP-dC10	11130	190	59
GSH	1097	1.44	762

De ce fait, l'atténuation de l'électrophilie des groupements maléimides a été envisagée dans l'optique de minimiser les additions non spécifiques sur les fluorogènes et, du même coup, minimiser le bruit de fond du marquage. Pour ce faire, un nouveau fragment dimaléimide a été synthétisé à partir de groupements maléimides méthylés, menant au fluorogène **1.5**. L'encombrement stérique généré par le groupement méthyle a eu l'effet escompté en ralentissant la réaction d'addition des thiols sur la double liaison des maléimides. Tout comme pour le fluorogène **1.4**, les constantes de vitesse de réaction de diCysFos, dC10-MBP et GSH avec le fluorogène **1.5** sont présentées au Tableau 1.1. Alors que les vitesses de réaction vis-à-vis des protéines cibles se sont vues diminuées d'environ deux ordres de magnitude, la vitesse de réaction du GSH est quant à elle diminuée de trois ordres de grandeur. Il en retourne donc que l'introduction d'un groupement

méthyle sur chacun des maléimides a non seulement permis de ralentir la vitesse d'addition sur les maléimides, mais aussi d'augmenter considérablement l'avantage cinétique de la séquence dC10 au détriment du GSH, dont la réaction est alors cent fois moins rapide. Il est possible de visualiser une telle discrimination à la Figure 1.15, où le marquage fluorescent de la protéine MBP-dC10 se distingue nettement de la réaction avec le GSH en quelques minutes seulement.

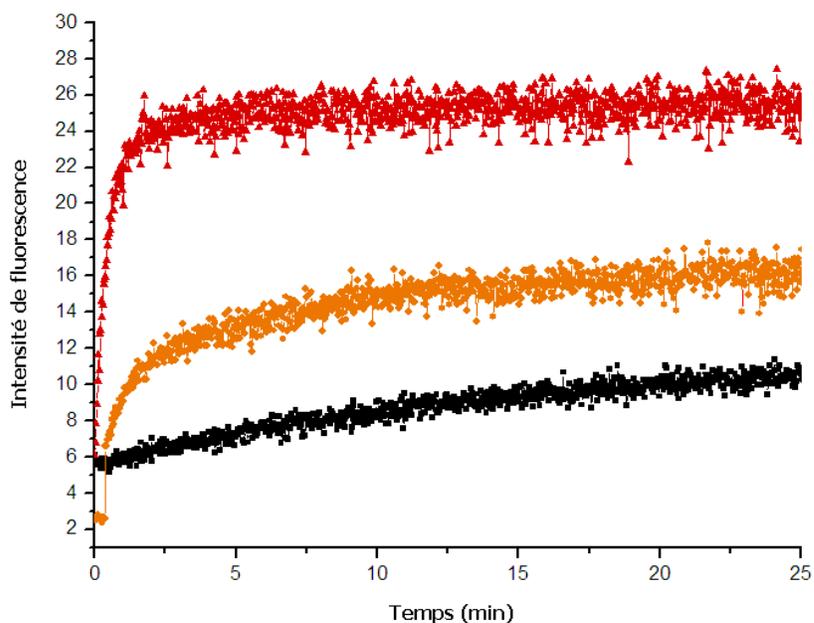


Figure 1.15. Réaction du fluorogène **1.4** avec 1 équiv. de MBP-dC10 (rouge), 1 équiv. de diCys-Fos (orange) ou 2 équiv. de GSH (noir).⁴³

1.4. OBJECTIFS DE RECHERCHE

Maintenant que les principes de la méthode ont été établis, il est alors question d'optimiser certains aspects de la méthode de marquage protéique. Effectivement, le développement de la première génération de fluorogènes ainsi que l'étude de leur réaction avec la protéine diCys-Fos ont permis d'entrevoir la possibilité d'un marquage protéique spécifique par des sondes fluorescentes synthétiques. Par la suite, l'élaboration d'une seconde génération de fluorogènes a élargi les possibilités de sondes fluorogènes pouvant être utilisées. De plus, une simple modification du groupement maléimide a permis d'augmenter la discrimination de la réaction du GSH avec les fluorogènes par rapport à leur réaction avec la séquence peptidique cible.

Bien que le développement des fluorogènes de deuxième génération ait permis d'améliorer le système à plusieurs niveaux, le principal désavantage de ceux-ci par rapport aux fluorogènes de première génération est sans aucun doute leur caractère fluorogène moins prononcé. Effectivement, sur la base d'une étude révélant le mécanisme derrière le *quench* de la fluorescence par les maléimides, il sera alors question d'améliorer l'efficacité de ce *quench* en modifiant l'espaceur qui relie le fragment dimaléimide au fluorophore.

En second lieu, le développement de fragments disposant les maléimides à différentes distances les uns des autres sera présenté. L'intérêt pour ce genre de composé réside dans la possibilité de marquer plus d'une protéine simultanément. Effectivement, tout comme pour le marquage simple des protéines, la méthode la plus couramment empruntée aujourd'hui demeure la fusion de protéines fluorescentes (FPs), avec les mêmes désavantages que ceux décrits pour le marquage simple de protéines.

CHAPITRE 2

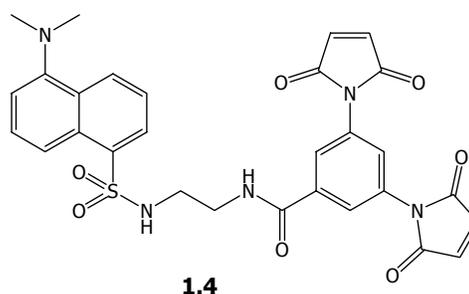
ÉTUDE DE L'INFLUENCE CONFORMATIONNELLE
SUR L'EFFICACITÉ DU *QUENCH*

2.1. INTRODUCTION

La méthode de marquage protéique développée par le groupe Keillor reposant sur la capacité qu'ont les maléimides à produire un *quench* de la fluorescence, une meilleure compréhension du mécanisme impliqué a servi de tremplin pour l'optimisation de la méthode et l'orientation des prochains développements.

2.1.1. Étude du mécanisme de *quench*

Bien que les maléimides aient été utilisés depuis plusieurs années dans différentes sondes fluorescentes, peu d'études ont été rapportées par rapport au mécanisme de *quench* de la fluorescence par ces groupements. En fait, les conclusions tirées de celles-ci diffèrent grandement et s'étendent du PET (*Photoinduced Electron Transfer*)⁴⁶ au réarrangement d'orbitales moléculaires.⁴⁷ Ces conclusions ne s'appuyant sur aucun fait concret, il n'en est pas moins que le perfectionnement d'une méthode de marquage impliquant des maléimides n'est possible qu'avec une compréhension du comportement photophysique de ces groupements. Le mécanisme de *quench* par les maléimides a donc été élucidé à l'aide de dérivés dimaléimide et dansyl.⁴²



La désactivation de l'état excité d'un fluorophore peut survenir de trois différentes manières, soit par émission de fluorescence, par conversion

⁴⁶ de Silva, A. P.; Gunaratne, N.; Gunnlaugsson, T. *Tetrahedron*, **1991**, *39*, 5077.

⁴⁷ Wu, C.-W.; Yarbrough, L. R.; Wu, F. Y.-H. *Biochemistry*, **1976**, *15*, 2863.

intersystème (ISC) ou bien par conversion interne (IC), tel que démontré par l'équation de conservation de l'énergie suivante :⁴⁸

$$\Phi_{fl} + \Phi_{ISC} + \Phi_{IC} = 1 \quad [2.1]$$

où ϕ_{fl} , ϕ_{ISC} et ϕ_{IC} sont les rendements quantiques de fluorescence, de conversion intersystème et de conversion interne, respectivement. Lorsqu'un phénomène de *quench* de la fluorescence est observé, c'est donc que la proportion de désactivation de l'état excité singulet par le biais d'une relaxation non-radiative, soit par IC ou bien par ISC, est augmentée au détriment de l'émission de fluorescence observée pour le composé parent. Tel qu'illustré par le diagramme de Jablonski de la Figure 2.1, la désactivation de l'état excité singulet par ISC implique une population de l'état triplet suivie d'un retour à l'état fondamental par relaxation radiative ou non. Aucune population de l'état triplet n'ayant été détectée par photolyse flash induite au laser (LFP), la conversion intersystème (ISC) a donc été éliminée de la liste des mécanismes de *quench* possiblement impliqués.

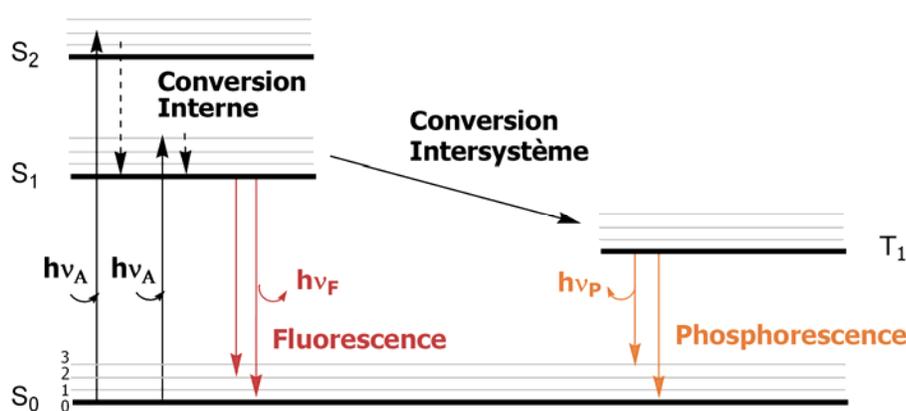


Figure 2.1. Représentation du diagramme de Jablonski.

⁴⁸ Lakowicz, J. R. Dans *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 2006.

Parmi les mécanismes de désactivation pouvant survenir à partir de l'état singulet, seul un transfert électronique photoinduit (PET) est plausible avec le système présentement étudié.⁴⁹ La constante de vitesse de Stern-Volmer mesurée indique qu'un tel transfert d'électron est thermodynamiquement favorable et plus rapide que la limite de diffusion, ce qui permet d'éliminer la possibilité de *quench* par collision. Ainsi, l'hypothèse du *quench* par transfert d'électron a finalement été vérifiée par voltampérométrie cyclique. Effectivement, les potentiels rédox déterminés pour le dansyl et le maléimide permettent de confirmer que le transfert d'un électron du dansyl vers le groupement maléimide est exergonique et donc responsable du phénomène de *quench* observé.⁵⁰ Ce mécanisme est illustré à la Figure 2.2, où il est possible de suivre le retour de l'électron à partir de l'état excité du fluorophore jusqu'à l'état fondamental. La LUMO du maléimide se trouvant à un niveau d'énergie intermédiaire à celles du fluorophore, le retour de l'électron à l'état fondamental s'effectue donc en deux temps, de manière non-radiative, en passant par la LUMO du maléimide, expliquant le *quench* observé. Les dérivés succinimides qui résultent de l'addition de thiols sur les maléimides sont alors moins conjugués et donc plus hauts en énergie, rendant le transfert électronique vers leur LUMO moins favorable, justifiant la régénération de fluorescence observée.

⁴⁹ Ceroni, P.; Laghi, I.; Maestri, M.; Balzani, V.; Gestermann, S.; Gorka, M.; Vögtle, F. *New J. Chem.*, **2002**, *26*, 66.

⁵⁰ Gilbert, A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*, CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.

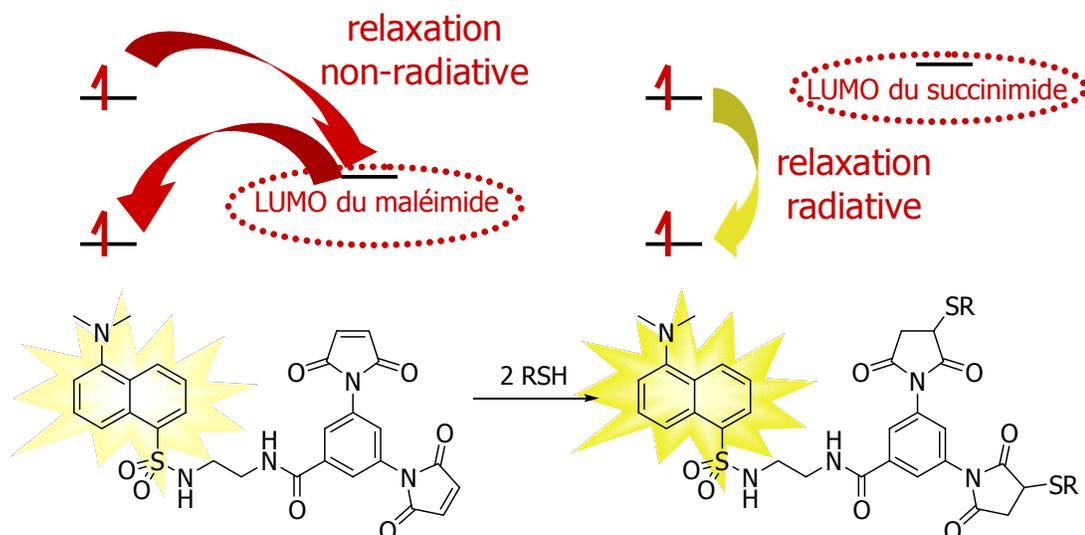


Figure 2.2. Mécanisme de *quench* de la fluorescence par les maléimides.

Tel que mentionné plus haut, il était primordial de s'attarder à l'étude du mécanisme de *quench* de la fluorescence par les maléimides puisque les conclusions qui en sont tirées ont un impact certain sur la conception rationnelle des prochaines générations de fluorogènes. Par exemple, il est important de prendre note que le PET est un transfert électronique qui se produit préférentiellement dans l'espace,⁵¹ soulignant l'importance de la proximité entre les parties dimaléimide et fluorophore. Effectivement, l'efficacité de *quench* de la fluorescence par les maléimides ayant une influence certaine sur le bruit de fond du marquage, l'optimisation du PET pour les fluorogènes est donc un élément clé du développement de la présente méthode de marquage.

⁵¹ Le, T. P.; Rogers, J. E.; Kelly, L. A.; *J. Phys. Chem. A*, **2000**, *104*, 6778-6785.

2.1.2. Influence de l'efficacité de *quench* de la fluorescence sur la méthode de marquage protéique

Il a été conclu qu'un transfert d'électron a lieu à partir du fluorophore vers un groupement maléimide. Fait important, le mécanisme de PET implique que ce transfert d'électron se produit préférentiellement dans l'espace plutôt que par les liens chimiques.⁵¹ Ainsi, il a été rationalisé qu'en disposant les parties dimaléimide et fluorophore le plus près l'une de l'autre dans l'espace, l'efficacité du PET s'en verrait assurément augmentée et conséquemment, l'efficacité du *quench* aussi. D'un côté plus pratique, l'atténuation de la fluorescence initiale des fluorogènes se traduit par le bruit de fond observé lors du marquage d'une protéine, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, une corrélation directe peut être faite entre la sensibilité du marquage et l'efficacité du *quench*, où ce dernier entraîne une plus grande différence entre les intensités de fluorescence initiales et finales. Dans l'éventualité où le bruit de fond d'un marquage *in vivo* limiterait son utilisation, il est possible de procéder à des lavages afin d'éliminer l'excès de marqueur n'ayant pas réagit. Il est cependant préférable d'éviter une telle pratique puisqu'une perturbation du microenvironnement cellulaire pourrait en découler. Effectivement, en tentant de laver l'excès de fluorogène, différents sels et petites molécules pourraient aussi être éliminés de la cellule, ce qui pourrait avoir un effet sur la biologie normale du système à l'étude.

2.2. SYNTHÈSE DE LA SÉRIE DE FLUOROGÈNES

Ainsi, afin d'étudier l'influence de la conformation tridimensionnelle sur l'efficacité du transfert électronique dans un système, une série de fluorogènes a été synthétisée en gardant constantes les parties fluorophore et dimaléimide afin de n'observer que l'influence de l'espaceur sur le système.

Le fragment dimaléimide **2.1** (Schéma 2.1) a été préalablement conçu au cours du développement des fluorogènes de deuxième génération.⁴² La synthèse originale de ce fragment se faisait en deux étapes, soit la formation du di-acide amique à partir de l'acide 3,5-diaminobenzoïque et de l'anhydride citraconique suivie par la cyclisation dans un reflux d'anhydride acétique en présence d'une quantité catalytique d'acétate de sodium. Ce fragment étant devenu un élément clé de la synthèse des fluorogènes de deuxième génération, cette voie synthétique s'est toutefois avérée peu reproductible, imposant l'optimisation des conditions synthétiques. Différentes conditions de synthèse sont envisageables pour chacune des étapes de la formation des maléimides. Effectivement, bien que l'acide amique résulte le plus souvent de l'ouverture de l'anhydrique cyclique correspondant, il est possible de favoriser celle-ci par l'utilisation de solvants polaires, tels que le DMSO ou l'acide acétique. Cependant, dans les cas où l'amine impliquée est suffisamment nucléophile, tout autre solvant polaire leur est préféré afin de simplifier la purification. L'étape limitante de la présente synthèse se situe plutôt au niveau de la cyclisation des maléimides, laquelle peut s'effectuer selon diverses méthodes (DCC/HOBt),⁵² (*p*TsOH),⁵³ dont la plus fréquemment rencontrée est une catalyse acide dans un mélange de Ac₂O/NaOAc.⁵⁴ Enfin, il a été trouvé qu'en portant à reflux une solution de l'acide amique dans un mélange de toluène et de DMF en présence de ZnCl₂ et de HMDS,⁵⁵ il est possible d'obtenir le dimaléimide **2.1** avec un rendement de 92 % et ce, de manière reproductible (Schéma 2.1)

⁵² a) Keana, J. F. W.; Ogan, M. D.; Lu, Y. X.; Beer, M.; Varkey, J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 7957-7963. b) Harris, F. W.; Karnavas, A. J.; Cucuras, C. N.; Das, S. *Polym. Prep.*, **1985**, *26*, 287.

⁵³ Kolyamshin, O. A.; Danilov, V. A.; Kol'tsov, N. I. *Rus. J. Org. Chem.*, **2007**, *43*, 393-396.

⁵⁴ A) Kokotos, G.; Tzougrakic, C. *J. Heterocycl. Chem.*, **1986**, *23*, 87. b) Reddy, P. Y.; Kondo, S.; Fujita, S.; Toru, T. *Synthesis* **1998**, 999. c) Smet, M.; Corens, D.; Van Meervelt, L.; Dehaen, W. *Molecules*, **2000**, *5*, 179-188.

⁵⁵ a) Reddy, P. Y.; Kondo, S.; Fujita, S.; Toru, T. *Synthesis-Stuttgart*, **1998**, 999-1002. b) Reddy, P. Y.; Kondo, S.; Toru, T.; Ueno, Y. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2652-2654.

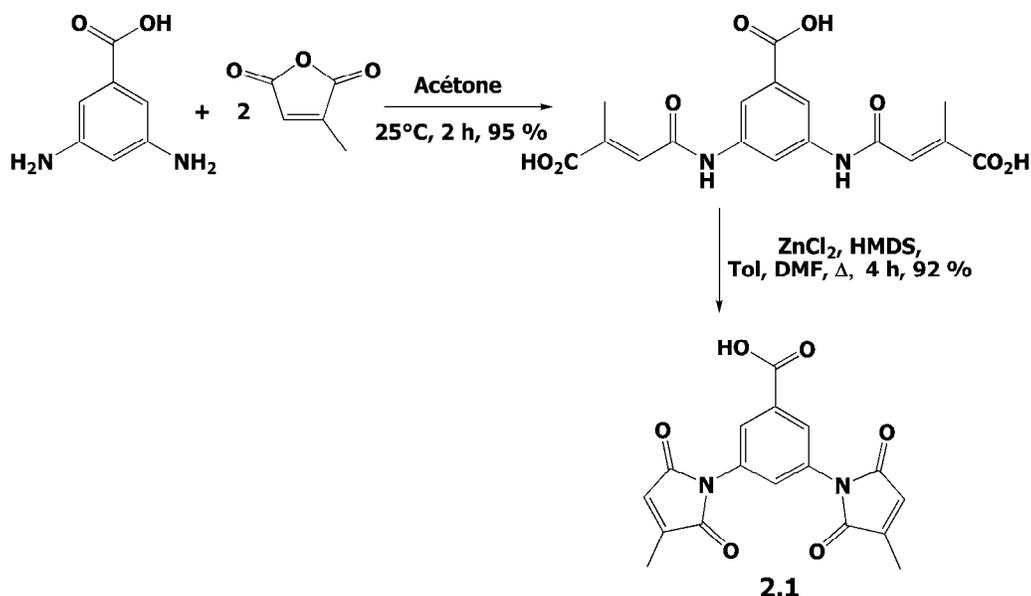


Schéma 2.1. Voie de synthèse du fragment dimaléimide 10 Å.

Le choix de l'acide 7-méthoxycoumarine-3-carboxylique (Figure 2.3) comme fluorophore se justifie par les différentes caractéristiques intéressantes qu'elle présente, tant au niveau spectral que synthétique.⁵⁶ Effectivement, bien que les dérivés de coumarine soient connus et utilisés depuis longtemps comme marqueurs fluorescents, la synthèse de ceux-ci est souvent fastidieuse et leur rendement de réaction faible. De plus, peu d'entre eux présentent des rendements quantiques de fluorescence élevés. Faisant exception à cette règle, le dérivé **2.2** fait partie d'une catégorie de coumarine qui bénéficie d'une forte intensité de fluorescence, grâce à un système *push-pull*, où un groupement électroattracteur et un groupement électrodonneur favorisent la délocalisation électronique essentielle à la fluorescence.⁵⁷ En effet, les dérivés de coumarine **2.3**, **2.4** et **2.5**, ne possédant qu'un substituant donneur, accepteur ou aucun substituant, présentent des

⁵⁶ Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S. *Tet. Letters*, **2003**, *44*, 1755-1758.

⁵⁷ a) Piacenza, M.; Zambianchi, M.; Barbarella, G.; Gigli, G.; Della Sala, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, *10*, 5363-5373. b) Dufresne, S.; Bourgeaux, M.; Skene, W. G. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 1166-1177.

rendements quantiques de fluorescence significativement inférieurs⁵⁸ à celui de la coumarine **2.2**, substituée par des groupements carboxylate et méthoxy.⁵⁹

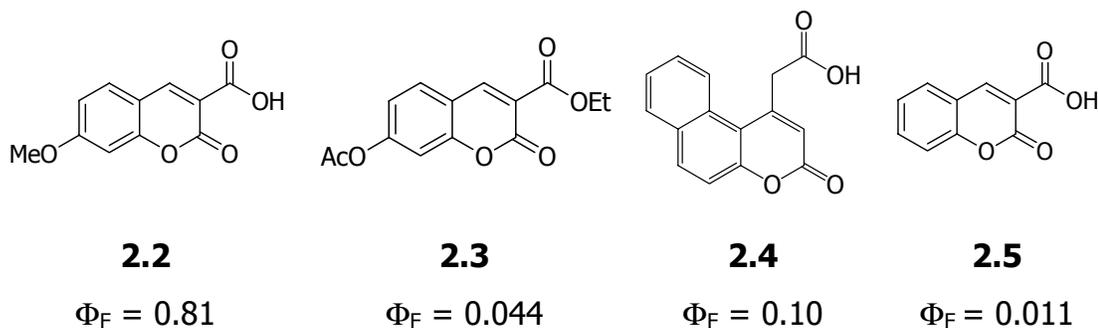


Figure 2.3. Exemples de dérivés de coumarine et de leur rendement quantique de fluorescence (Φ_F).

En raison de cette caractéristique essentielle, la synthèse de tels dérivés de coumarine a été développée par différents groupes et se résume en une condensation de Knoevenagel de l'acide de Meldrum (2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione) avec un dérivé de salicylaldéhyde (2-hydroxybenzaldéhyde) approprié, en présence d'un catalyseur, tel qu'illustré au Schéma 2.2. Ainsi, l'acide-7-méthoxycoumarine-3-carboxylique (**2.2**) a été obtenu selon cette méthode avec un rendement de 84 %, où le composé final précipite du milieu réactionnel, ne nécessitant aucune purification supplémentaire.

⁵⁸ Sameiro, M.; Gonçalves, T. *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 190-212.

⁵⁹ Azuma, K.; Suzuki, S.; Uchiyama, S.; Kajiro, T.; Santa, T.; Imai, K. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2003**, *2*, 443-449.

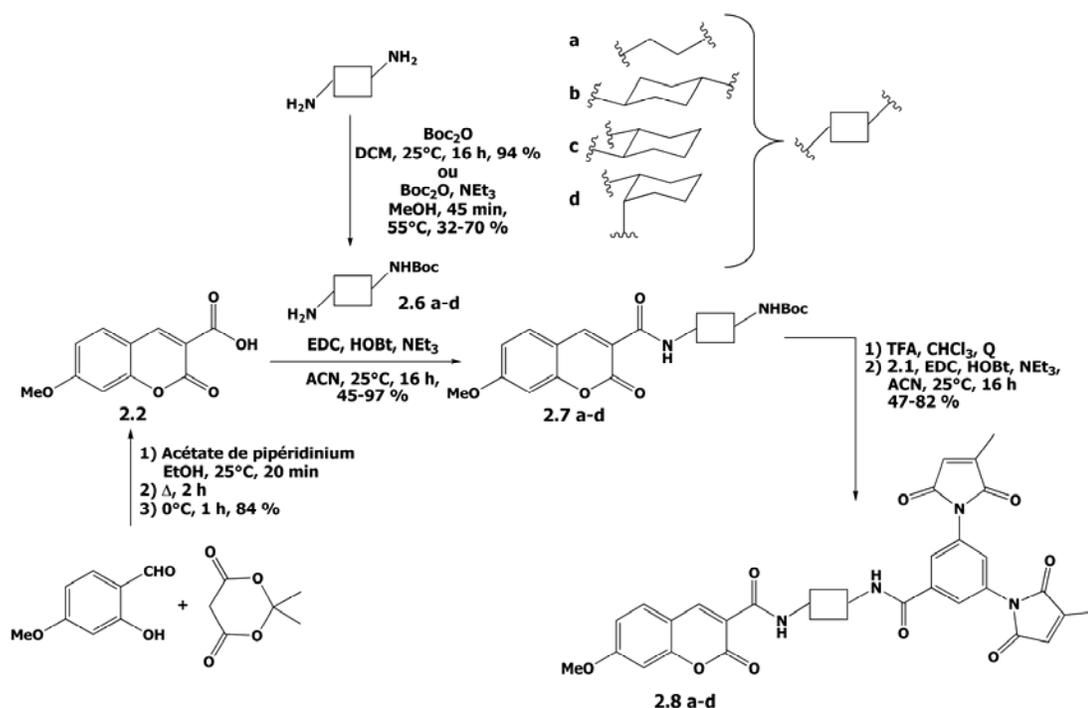


Schéma 2.2. Voie synthétique menant à la série de fluorogènes.

La banque de fluorogènes présentée au Schéma 2.2 a donc été synthétisée en reliant le fluorophore, ici l'acide 7-méthoxycoumarine-3-benzoïque (**2.2**), avec le dimaléimide **2.1** à l'aide de différentes diamines jouant le rôle d'espaceur. Pour ce faire, les diamines ont préalablement été mono-protégées à l'aide d'un groupement Boc selon différentes méthodes. L'éthylènediamine ayant servi d'espaceur pour les premiers composés de la deuxième génération de fluorogènes, elle était alors mono-protégée en faisant réagir un seul équivalent de di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) avec dix équivalents de la diamine afin de favoriser le produit de monoaddition, le produit **2.6 a**, avec un rendement de 94 %.⁶⁰ Puisque cette méthode requiert l'utilisation d'un grand excès de la diamine de départ, elle ne convient pas pour la mono-protection de diamines plus dispendieuses telles que les diaminocyclohexanes **2.6 b-d**. Ainsi, la protection d'une seule des amines de ce type d'espaceur a plutôt été effectuée en additionnant, sur une longue

⁶⁰ Xu, D. Q.; Prasad, K.; Repic, O.; Blacklock, T. J. *Tet. Letters*, **1995**, *36*, 7357-7360.

période de temps, un seul équivalent de di-*tert*-butyl dicarbonate (Boc₂O) à une grande dilution de la diamine, permettant d'obtenir les espaceurs **2.6 b-d** avec des rendements allant de 32 à 70 %.⁶¹ Les fluorogènes **2.7 a-d** ont ainsi été synthétisés de manière convergente en commençant par le couplage de la dimamine-Boc (**2.6 a-d**) avec l'acide 7-méthoxycoumarine-3-carboxylique (**2.2**) en présence de EDC, HOBt et NEt₃,⁶² tel que présenté au Schéma 2.2. Ces précurseurs ont ensuite été rattachés à la partie dimaléimide **2.1** dans les mêmes conditions, suite à la déprotection de l'amine avec un excès de TFA.⁶³

⁶¹ Mizukami, S.; Okada, S.; Kimura, S.; Kikuchi, K. *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 7630-7638.

⁶² Mitsui, T.; Nakano, H.; Yamana, K. *Tet. Letters*, **2000**, *41*, 2605-2608.

⁶³ Orange, C.; Specht, A.; Puliti, D.; Sakr, E.; Furuta, T.; Winsor, B.; Goeldner, M. *Chem. Commun.*, **2008**, 1217-1219.

2.3. ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ DE *QUENCH*

Tel que mentionné plus haut, le transfert électronique responsable du *quench* de la fluorescence se produit en grande partie à travers l'espace. De ce fait, l'adoption d'une certaine conformation tridimensionnelle rapprochant le fluorophore des groupements maléimides favoriserait le transfert d'électron, donc l'efficacité du *quench*. Ainsi, quatre différents espaceurs ont été choisis sur la base de leur potentiel d'induire différentes conformations chez les fluorogènes. Plus précisément, l'éthylènediamine, espaceur commun aux premiers fluorogènes de deuxième génération, est celui offrant le plus grand degré de liberté en raison de sa faible rigidité et de sa longueur moyenne. En comparaison, les dérivés cyclohexanes ont été choisis pour leur rigidité et la possibilité de fixer la conformation des fluorogènes, ce qui devrait influencer l'efficacité de *quench*.

Bien que l'efficacité de *quench* chez un fluorogène se traduise par l'habilité des maléimides à accepter un électron provenant du fluorophore, elle peut être observée concrètement par la différence entre la fluorescence basale du fluorogène et celle résultant du marquage d'une protéine présentant la séquence peptidique cible. De manière analogue, la régénération de la fluorescence d'un fluorogène peut être étudiée suite à sa réaction avec un thiol chimique, ce qui représente une alternative, plus rapide et moins coûteuse, à l'expression et la purification de la protéine modèle. Par la suite, deux possibilités sont envisageables quant à la quantification de cette augmentation de fluorescence, lesquelles seront décrites ci-dessous.

2.3.1. Détermination des facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE)

Une première méthode permettant de déterminer le facteur d'augmentation de la fluorescence (*Fluorescence Enhancement*, FE) d'un fluorogène consiste en la comparaison des rendements quantiques de l'espèce initiale et de son dérivé dithiolé. De façon générale, les rendements quantiques peuvent être calculés selon deux méthodes, soit la mesure directe avec une sphère d'intégration ou bien de manière relative à l'aide d'un échantillon de référence dont le rendement quantique est déjà connu.

Tel que mentionné, une autre approche permettant de déterminer le rendement quantique d'un fluorophore implique l'utilisation d'un fluorophore de référence dont le rendement quantique est connu.⁶⁴ Puisque le rendement quantique de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde d'excitation, il s'agit donc de choisir un étalon dont le spectre d'excitation présente un certain recouvrement avec celui de l'échantillon inconnu. Ainsi, il est possible de déterminer le rendement quantique de fluorescence (Φ) d'un inconnu en intégrant l'intensité de fluorescence pour cet inconnu (I) et sa référence (I_R), et ce pour une même longueur d'onde d'excitation, à l'aide de l'équation suivante :⁴⁸

$$\Phi = \Phi_R \frac{I}{I_R} \frac{DO_R}{DO} \frac{n^2}{n_R^2} \quad [2.2]$$

où les densités optiques (DO), donc la quantité de lumière absorbée par chacun des échantillons, sont normalisées dans l'équation. De plus, puisque

⁶⁴ a) Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831. b) Rusalov, M. V.; Druzhinin, S. I.; Uzhinov, B. M. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 193. c) Drexhage, K. H. In *Dye Lasers*, 2nd ed.; Schäfer, F. P., Ed.; Springer: Berlin, 1977.

la lumière voyage différemment dans différents solvants, les rendements quantiques de fluorescence sont propres à chaque solvant, expliquant la normalisation des indices de réfraction incluse dans l'équation. Bien que cette méthode puisse être utilisée pour toute une gamme de fluorophores en solution dans divers solvants, son application est quelque peu ardue, en partie dû au dégazage préalable des solutions, en plus d'être longue d'utilisation. Enfin, ces méthodes d'évaluation de l'efficacité du *quench* de la fluorescence nécessitent aussi l'isolation, la purification et la caractérisation du dérivé dithiolé, ajoutant au travail nécessaire pour parvenir au résultat final. Cette étape de caractérisation spectroscopique étant d'une importance certaine pour le développement et l'étude des fluorogènes présents et futurs de la méthode de marquage, il est donc impératif d'avoir sous la main une méthode de caractérisation avec un protocole expérimental plus simple et facile d'utilisation.

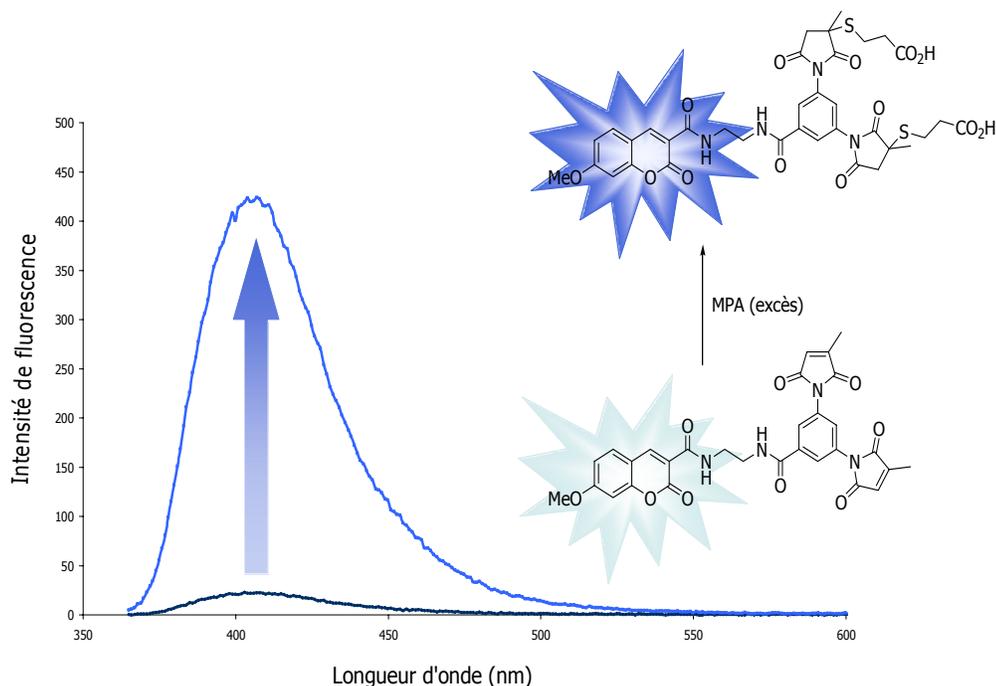


Figure 2.4. Détermination du facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) pour le composé **2.8 a**. ($\lambda_{\text{ex}} = 347 \text{ nm}$)

La détermination des rendements quantiques en soi n'étant pas essentielle à l'étude présentement menée, il a été pensé qu'il serait plus pratique et rapide de procéder à la détermination des FE en comparant directement les intensités de fluorescence avant et après réaction avec un thiol, ici l'acide 3-mercaptopropionique (MPA).⁶⁵ Pour ce faire, le fluorogène **2.8 a** a d'abord servi de composé de référence pour la mise au point des conditions réactionnelles et pour certaines expériences contrôles permettant de valider les résultats obtenus par cette méthode. Le rendement quantique de fluorescence d'un composé pouvant varier d'un solvant à l'autre, il serait ainsi possible qu'il en soit de même pour le facteur de FE. Ainsi, les mesures ont été effectuées dans deux systèmes de solvants différents pour des raisons spécifiques. Premièrement, un mélange de 5% DMSO/HEPES, un tampon à pH 7.5, a été choisi afin reproduire le milieu physiologique d'un marquage protéique *in vivo*. Enfin, les mêmes mesures de FE ont été reproduites dans le DMSO pur pour fins de comparaison, dans le cas où la solubilité de certains composés dans un milieu aqueux serait trop faible pour permettre la détermination du FE (Figure 2.4).

Dans un deuxième temps, il est important de déterminer le domaine de linéarité de fluorescence de cette famille de fluorogènes. Effectivement, l'intensité de fluorescence d'un composé varie normalement de manière linéaire avec sa concentration. Il est cependant possible, à concentration élevée, d'observer une déviation de la linéarité, tel que démontré à la Figure 2.5. Cette observation s'explique par un phénomène d'auto*quench*, où à concentration suffisamment élevée les molécules entrent en collisions, menant à un *quench* partiel de la fluorescence. Ainsi, il a été observé que la fluorescence du fluorogène de référence **2.8 a** varie de manière linéaire jusqu'à une concentration de 5 μM . Il est donc impératif de déterminer les

⁶⁵ Corrie, J. E. T. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, **1994**, 2975-2982.

ratios FE sous cette limite afin de s'assurer que l'augmentation de fluorescence observée est entièrement attribuable à l'addition sur les maléimides et non à une variation du phénomène d'*autoquench* entre les espèces initiale et finale.

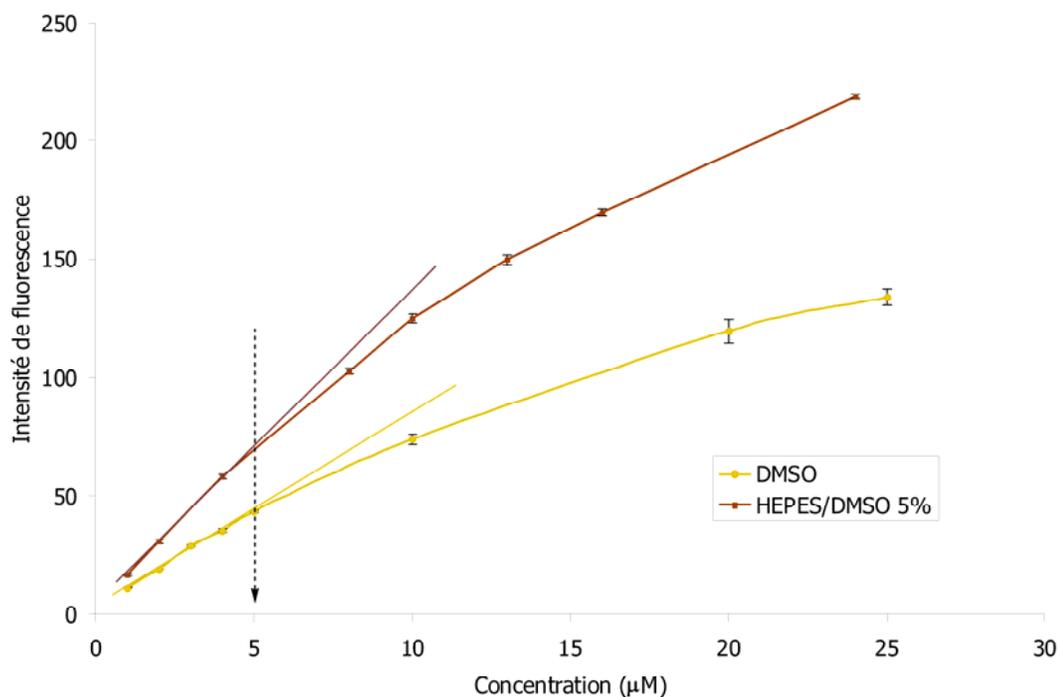


Figure 2.5. Détermination du domaine de linéarité de fluorescence pour le composé de référence **2.8 a** ($\lambda_{\text{ex}} = 347 \text{ nm}$).

La réaction d'addition de l'acide 3-mercaptopropionique sur les maléimides du fluorogène **2.8 a** a d'abord été suivie en mesurant l'augmentation de fluorescence en continu et ce, dans le domaine de linéarité préalablement déterminé, en milieu aqueux (5% DMSO). Malgré un suivi de la réaction pendant plus de six heures, seule une faible pente est observée, synonyme d'une réaction très lente. Il est possible de rationaliser cette observation par les résultats cinétiques préalablement obtenus avec la protéine test, la MBP-dC10. Tel que discuté au point **1.3.3**, la nouvelle

séquence peptidique dC10 présente un avantage cinétique par rapport à des thiols simples. Effectivement, la vitesse d'addition du premier thiol de la séquence dC10 sur le maléimide d'un fluorogène tout comme l'addition d'une molécule de MPA ou de GSH, des thiols simples, sont des réactions intermoléculaires et présentent donc des cinétiques similaires. Toutefois, pour un dithiol protéique ou synthétique, la seconde addition sur le maléimide restant est une réaction intramoléculaire beaucoup plus rapide que la première. À l'opposé, la seconde addition d'un thiol simple présente le même comportement cinétique que la première, justifiant les temps de réaction plus lents. Ainsi, afin de remédier à cette problématique, il a été choisi de faire réagir une solution mère du dérivé **2.8 a** dans le DMSO, à partir de laquelle sont prélevés des aliquots permettant les mesures d'intensités de fluorescence initiale et finale. Tel que présenté à la Figure 2.6, la réaction d'addition des thiols sur les maléimides a été suivie en discontinu jusqu'à l'obtention d'un plateau afin de déterminer le temps nécessaire à la réaction complète. Enfin, il a été conclu que 5.5 heures de réaction à température ambiante sont largement suffisantes pour que la conversion de **2.8 a** soit complète.

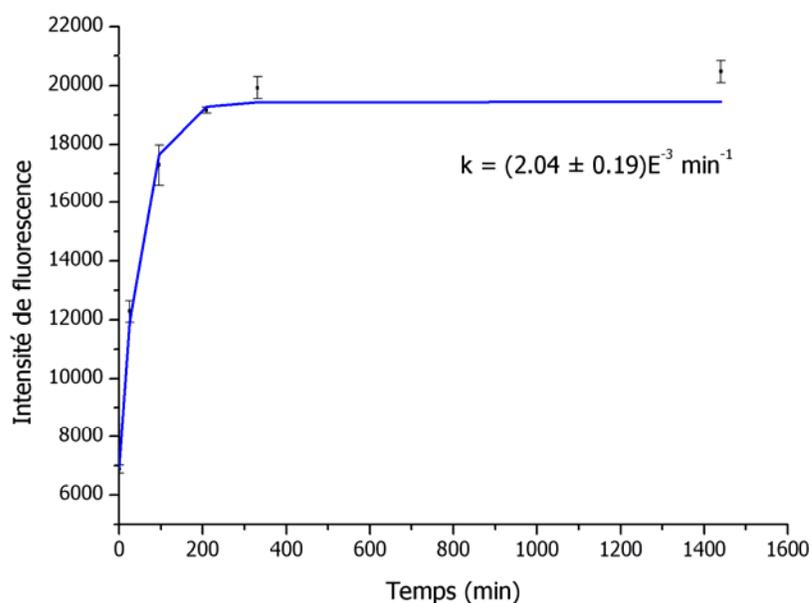
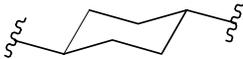
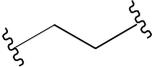
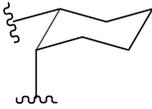


Figure 2.6. Optimisation du temps de réaction du composé de référence **2.8 a** avec MPA. Suivi de la réaction en discontinu à 25°C et à 4.0 μM où $\lambda_{\text{ex}} = 347 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}} = 406 \text{ nm}$.

2.3.2. Analyse des résultats

Suite à la détermination des conditions optimales, le facteur FE des fluorogènes **2.8 b-d** a été mesuré et les résultats obtenus pour chacun des deux systèmes de solvants sont présentés au Tableau 2.1. Il est à noter qu'il est possible de quantifier la fluorescence d'un composé en regardant directement son intensité à une longueur d'onde déterminée ou bien en intégrant la surface sous la courbe, donc en faisant la somme des intensités de fluorescence à toutes les longueurs d'onde. Bien que cette dernière constitue une mesure plus précise, la mesure de l'intensité à une longueur d'onde est cependant plus fréquemment utilisée au cours d'applications pratiques. Ainsi, les facteurs FE ont été déterminés à partir des deux mesures de la fluorescence pour fins de comparaison.

Tableau 2.1. Détermination des facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE) de la série coumarine, dans deux systèmes de solvants ($\lambda_{\text{ex}}=347$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 406$ nm).

fluorogène	espaceur	Facteur FE	
		DMSO Aires (If)	HEPES / DMSO 5% Aires (If)
2.8 b		1.03 (1.04)	1.88 (1.84)
2.8 a		1.42 (1.41)	3.18 (3.17)
2.8 c		1.91 (1.89)	5.10 (4.76)
2.8 d		1.93 (1.92)	6.21 (5.90)

Tel que mentionné plus haut, l'espaceur éthylènediamine est celui utilisé à l'origine des fluorogènes de deuxième génération. Il a été choisi de manière arbitraire pour relier simplement les parties fluorophore et dimaléimide. Bien que le principe de la méthode ait été prouvé pour cette nouvelle famille de fluorogènes, ceux-ci présentent néanmoins des FE moins élevés que ceux de première génération. Effectivement, même si les premiers fluorogènes développés n'étaient que peu fluorescents, leur caractère fluorogène était néanmoins plus prononcé que ceux de deuxième génération. À titre d'exemples, les composés **1.1**, **1.2** et **1.3** (première génération) sont présentés à la Figure 2.7 pour lesquels des FE allant de 8.0 à 50 ont été

trouvés. À l'opposé, les facteurs d'augmentation de fluorescence des fluorogènes de deuxième génération **1.5**, **2.8 a** et **2.9** (Figure 2.7) ne vont guère au-delà de 6.

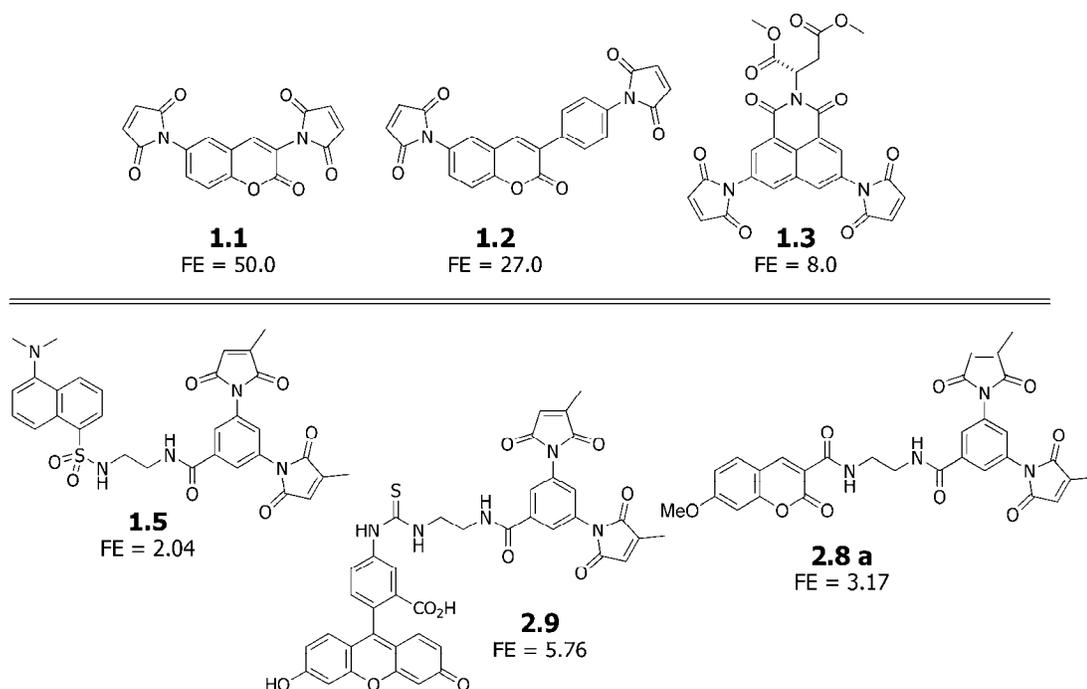
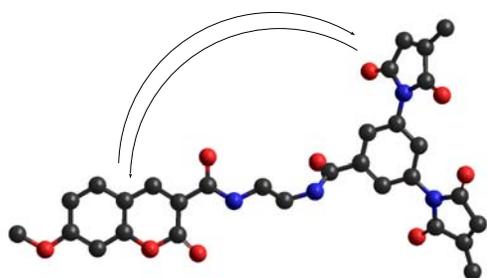


Figure 2.7. Comparaison des facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE) de la première et deuxième génération de fluorogènes. (FE déterminés en milieu aqueux, à partir des I_f de fluorescence)

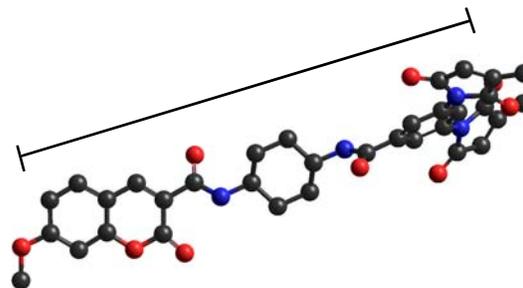
Devant ces résultats et selon la compréhension nouvelle du mécanisme de *quench*, il a été raisonné que cette diminution de FE était probablement due à la plus grande distance qui sépare les maléimides du fluorophore. L'espaceur éthylènediamine permettant une assez grande flexibilité, il est donc possible pour les deux extrémités des fluorogènes de se rapprocher, ce qui favorise le transfert électronique du fluorophore vers les maléimides. Encore une fois, en raison de l'absence de rigidité chez cet espaceur, le fluorogène peut aussi se trouver dans une forme complètement ouverte ou allongée, distançant les groupements donneur et accepteur du fluorogène, ce

qui résulte en une perte d'efficacité du *quench*. Enfin, il en revient à dire que les FE observés pour les premiers fluorogènes de deuxième génération sont en fait des moyennes des transferts électroniques efficaces, dans la forme repliée, et moins efficaces lorsque le fluorogène est dans sa forme ouverte. Ainsi, il a été pensé qu'en rigidifiant l'espaceur, il serait possible de favoriser la forme fermée du fluorogène et, conséquemment, améliorer l'efficacité du *quench*. Pour ce faire, l'éthylènediamine a été remplacée par les isomères *cis* et *trans* du 1,2-diaminocyclohexane pour donner les fluorogènes **2.8 c-d**, respectivement. Tel qu'envisagé, les facteurs FE pour ces deux nouveaux fluorogènes se sont vus augmentés considérablement par rapport au composé de référence **2.8 a**. Enfin, à titre de contre-exemple, le composé **2.8 b**, ayant le 1,4-diaminocyclohexane comme espaceur, a été synthétisé, menant à un FE de 1.93, inférieur à celui de la référence. Effectivement, contrairement aux dérivés 1,2-diaminocyclohexane, cet espaceur favorise plutôt la forme étendue du fluorogène, donc la conformation où l'efficacité de *quench* est à son plus bas. Afin d'illustrer ces observations, une minimisation d'énergie a été effectuée pour les composés de la présente série, permettant de visualiser la conformation adoptée dans l'espace pour chacun d'entre eux (Figure 2.8). Il est en effet possible de voir la conformation complètement ouverte de **2.8 b** et celles en forme de pince de **2.8 c-d**.

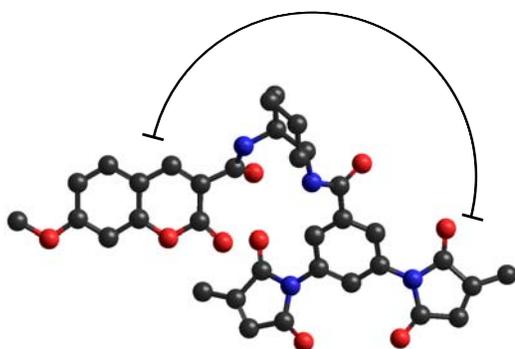
2.8 a



2.8 b



2.8 c



2.8 d

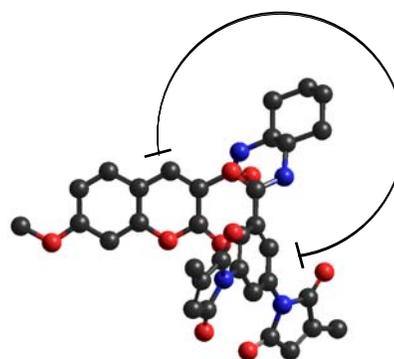


Figure 2.8. Représentation de la conformation tridimensionnelle des fluorogènes de la série coumarine. (voir partie expérimentale, section 7.3)

Ainsi, il est possible d'observer une tendance au niveau des facteurs de FE pour les fluorogènes dérivés de coumarine présentés au Tableau 2.1, où ceux-ci augmentent considérablement en allant de la forme ouverte à la forme fermée des fluorogènes. De plus, il est à noter que cette tendance est la même indépendamment du système de solvants employé. Cependant, bien que l'efficacité de *quench* varie dans le même sens dans le DMSO et en milieu aqueux, cet effet est néanmoins accentué dans ce deuxième cas. Effectivement, les facteurs FE mesurés dans le DMSO pur s'étendent de 1.03 à 1.93 alors que dans l'eau, les résultats varient de 1.88 à 6.21. Cette observation peut être rationalisée par la différence de solvation des fluorogènes pouvant avoir une influence sur la conformation adoptée en

solution. Il a été mentionné plus tôt qu'une forme fermée du fluorogène favorise un rapprochement entre les parties dimaléimide et fluorophore et par le fait même le transfert électronique derrière le *quench* de la fluorescence. Les fluorogènes à l'étude présentant des squelettes aromatiques, leur caractère hydrophobe pourrait les pousser à se replier sur eux-mêmes en milieu aqueux, favorisant le PET, ce qui explique les plus grandes valeurs de FE observées dans ce système de solvant.

2.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Enfin, l'étude de l'influence de la conformation tridimensionnelle sur l'efficacité de *quench* au niveau des fluorogènes de deuxième génération a permis de mettre en évidence l'importance de l'espaceur pour de tels systèmes. De plus, la variation des facteurs d'augmentation de la fluorescence observée en fonction de la conformation adoptée par les fluorogènes dans l'espace a pu corroborer les connaissances acquises au niveau du mécanisme de *quench*. Enfin, bien qu'une amélioration ait été observée au niveau de l'efficacité de *quench* pour la série de fluorogènes dérivés de la coumarine, il n'en reste pas moins que chaque système devrait être optimisé indépendamment. Effectivement, en fonction des fragments dimaléimide et fluorophore utilisés, la conformation induite par un espaceur spécifique pourrait influencer la distance dans l'espace entre ces deux fragments et donc l'efficacité de *quench* de manière différente et imprévisible.

Bien que l'augmentation du facteur de *quench* se situe en-deçà des valeurs envisagées afin d'améliorer significativement le caractère fluorogène de la méthode de marquage protéique, l'étude présentée dans ce chapitre a néanmoins démontré la possibilité d'optimisation de ce paramètre. Pour ce faire, il aurait été envisageable d'utiliser une gamme d'autres diamines comme espaceurs, tels que des phénylènediamines. Effectivement, il serait sûrement possible de tirer avantage de la rigidité de cette classe d'espaceurs en plus de permettre l'étude de l'effet de la conjugaison sur l'efficacité du *quench*. Toutefois, il sera démontré au chapitre suivant que le couplage de ce type de fragment avec la coumarine entraîne une perte quasi-totale de la fluorescence, rendant l'utilisation de ce type d'espaceur conjugué impossible.

Enfin, il serait aussi envisageable d'utiliser des benzotriazoles en empruntant la stratégie 'click' (*click chemistry*),⁶⁶ tel que présenté à la Figure 2.9.

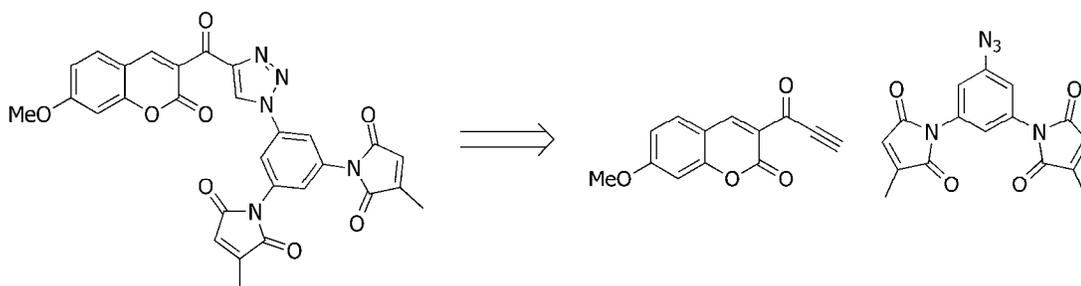


Figure 2.9. Voie rétrosynthétique d'un fluorogène pouvant être obtenu par *click chemistry*.

Devant l'étendue de possibilités pouvant être explorées pour étudier l'efficacité du *quench*, il a enfin été choisi de supprimer complètement l'espaceur reliant les parties dimaléimide et fluorophore. Effectivement, la suppression de toute forme d'espaceur a été favorisée aux autres alternatives en raison de la rigidité et de la courte distance pouvant être engendrées par une telle connectivité. Le développement et l'étude photophysique de cette nouvelle classe de fluorogènes seront ainsi présentés au chapitre suivant.

⁶⁶ Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1249-1262.

CHAPITRE 3

FLUOROGÈNES DE TROISIÈME GÉNÉRATION

3.1. INTRODUCTION

Les résultats de l'étude conformationnelle présentés au chapitre précédent ont permis d'observer que la proximité des parties dimaléimide et fluorophore des fluorogènes joue un rôle certain au niveau de l'efficacité du *quench* de la fluorescence. Selon le type d'espaceur utilisé au cours de cette étude, il a été observé qu'en plus de la distance, une certaine rigidité est nécessaire afin de maintenir le dimaléimide dans l'environnement du fluorophore. Toujours dans l'optique d'augmenter le caractère fluorogène de la méthode de marquage présentement à l'étude, nous nous sommes alors penché sur la conception d'une troisième génération de fluorogènes. Tel que mentionné au chapitre 1, la première catégorie de fluorogènes développée dans le groupe, où les maléimides étaient directement liés au noyau fluorescent, présentait des limitations synthétiques, tant au niveau du choix de fluorophore que de la distance entre les maléimides. L'atout principal de la deuxième génération de fluorogènes résidant en la versatilité que permet sa synthèse convergente, le caractère fluorogène des composés ainsi obtenus semble cependant en avoir payé le prix. Bien que la troisième génération de fluorogènes vise à rétablir un niveau de *quench* plus efficace, elle est toutefois en partie influencée par la précédente, où les fragments dimaléimides et fluorophores sont encore synthétisés séparément. La principale caractéristique faisant de ces nouveaux composés une classe à part est l'absence d'espaceur, puisque le fragment dimaléimide sera dorénavant directement attaché au fluorophore.

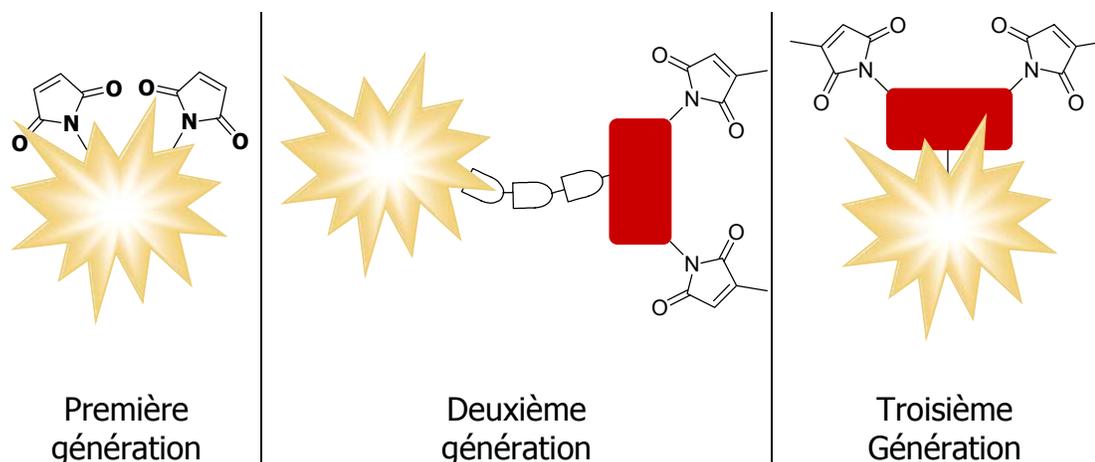


Figure 3.1. Modèles généraux des fluorogènes de première, deuxième et troisième générations.

Une grande proportion des fluorophores disponibles, soit commercialement ou de manière synthétique, présentent des substituants carboxylates, chlorure de sulfonyle ou isothiocyanate comme point d'attachement pour une fonctionnalisation subséquente. Conséquemment, la substitution de cette catégorie de noyaux fluorescents est envisageable à partir de fragments présentant des fonctions nucléophiles telles les amines. Le fragment dimaléimide **2.1** tel qu'il a été conçu pour les fluorogènes de deuxième génération ne convenant donc pas pour la synthèse des nouveaux fluorogènes de prochaine génération, il a été nécessaire de repenser la conception de ce dernier. Effectivement, afin de générer des fluorogènes sans espaceur pour assembler les parties fluorophore et dimaléimide, il était nécessaire de convertir le carboxyle en amine.

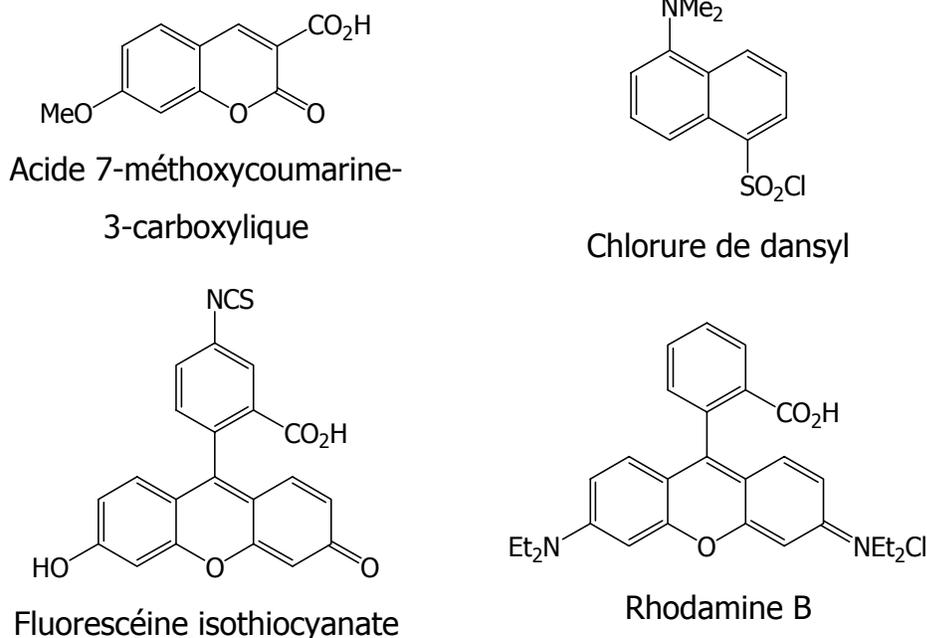


Figure 3.2. Fluorophores couramment utilisés dans la synthèse de sondes fluorescentes.

3.1.1. Réactions de dégradation

La fonction amine est sans équivoque une des plus répandue dans les produits naturels et les drogues pharmaceutiques, ce qui explique la grande place qu'elle occupe en chimie organique. Ainsi, une gamme de réactions de dégradation a été découverte au tournant du XX^e siècle, regroupant les réarrangements de Curtius,⁶⁷ d'Hofmann⁶⁸ et de Schmidt⁶⁹ qui sont aujourd'hui monnaie courante pour effectuer la transformation des carboxyles en amine. Effectuées à partir d'un acide carboxylique ou d'une fonction amide, ces réactions de dégradation ont en commun le passage par un intermédiaire isocyanate, tel qu'illustré à la Figure 3.1. L'isocyanate ainsi formé peut ensuite être hydrolysé, menant à la perte du carbone provenant

⁶⁷ Curtius, T. *Ber*, **1890**, *23*, 3023-3033.

⁶⁸ Hofmann, A.W. *Ber*, **1881**, *14*, 2725-2736.

⁶⁹ Schmidt, R. F. *Ber*, **1924**, *57*, 707.

de la fonction carboxyle sous forme de CO_2 , libération de gaz à la base du nom de dégradation souvent donné à cette famille de réarrangements. Il est à noter que ce même intermédiaire isocyanate peut être piégé par divers nucléophiles, menant à la formation d'amine, d'urées ou de thiouréthanes.

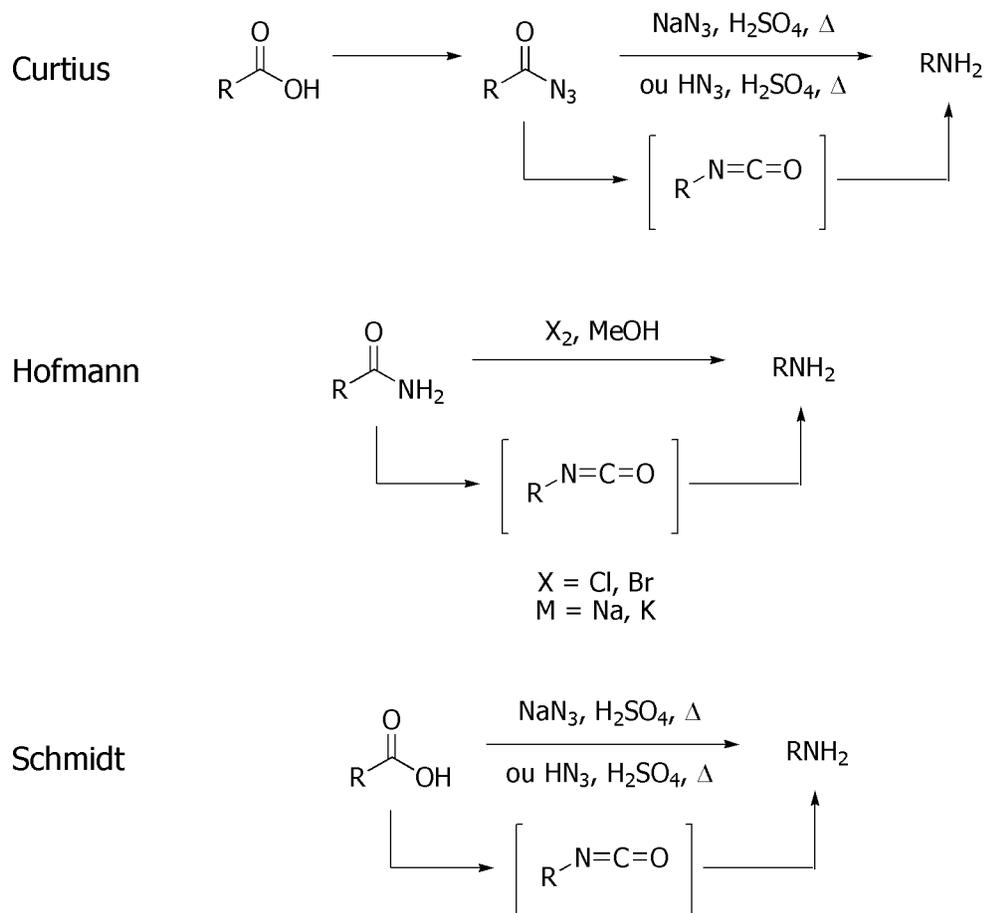


Schéma 3.1. Réarrangements de Curtius, Hofmann et Schmidt.

Les premières tentatives visant à modifier le carboxyle du fragment dimaléimide **2.1** pour donner l'amine protégée correspondante ont été effectuées par Karen Ross du groupe Lebel afin d'appliquer une méthodologie du réarrangement de Curtius développée par ce groupe (Schéma 3.1).⁷⁰ Cette approche a été choisie en raison de la compatibilité des conditions

⁷⁰ a) Lebel, H.; Leogane, O. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4107-4110. b) Lebel, H.; Leogane, O. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5717-5720.

réactionnelles avec une panoplie de groupements fonctionnels. Ainsi, la réaction du benzylchloroformate ou de l'allylchloroformate avec l'azoture de sodium et l'acide carboxylique **2.1** a été tentée dans le diméthoxyéthane (DME) en présence d'une quantité catalytique de *tert*-butoxyde de sodium. Malgré plusieurs tentatives, où la température de réaction et le type de base utilisé ont été variés, seuls des produits de dégradation ont été observés sur CCM et par GCMS. Il apparaît alors que les présentes conditions réactionnelles ne sont pas compatibles avec le substrat **2.1**, probablement en raison des maléimides susceptibles aux additions de Michael en présence d'un nucléophile et d'une base forte.

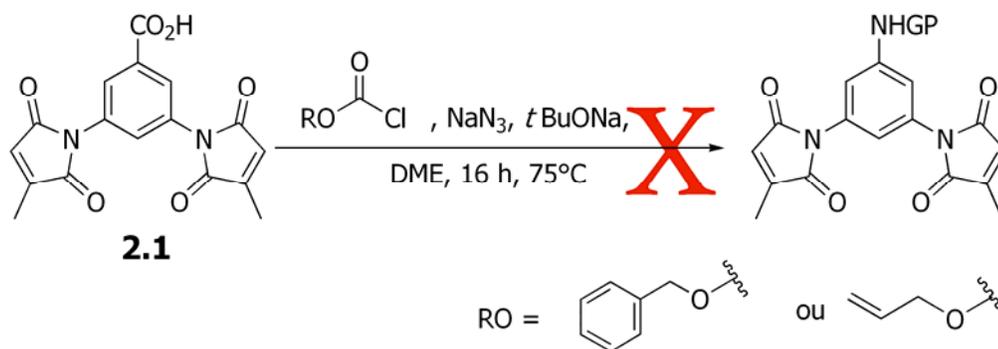


Schéma 3.2. Conditions du réarrangement de Curtius pouvant mener à l'amine protégée correspondante.

Les groupements maléimides ayant été visés comme l'élément problématique des derniers essais, la présente méthodologie a donc été appliquée à deux substrats précurseurs du nouveau fragment dimaléimide, soit l'acide 3,5-dinitrobenzoïque et l'acide 3,5-di-*tert*-butylcarbamatebenzoïque (Schéma 3.3). Le réarrangement de Curtius sur ce dernier substrat n'a mené qu'à des produits de dégradation alors que la réaction avec le dérivé dinitro a donné préférentiellement l'ester correspondant plutôt que le carbamate désiré. Bien qu'aucune explication n'ait été trouvée pour ce dernier résultat, il a été conclu que le

réarrangement de Curtius ne permet pas d'obtenir directement le nouveau fragment dimaléimide ni un précurseur de ce dernier.

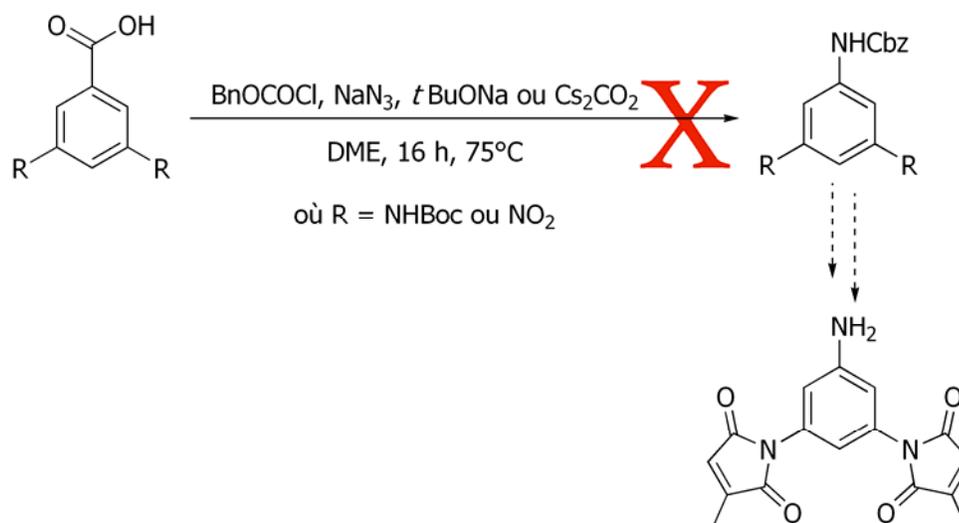


Schéma 3.3. Réarrangement de Curtius menant au squelette du nouveau fragment dimaléimide.

3.2. SYNTHÈSE DU NOUVEAU FRAGMENT DIMALÉIMIDE

3.2.1. Réarrangement de Hofmann

Suite aux échecs des derniers essais, la formation d'un précurseur du fragment dimaléimide visé a été tentée par un réarrangement de Hofmann, à partir des dérivés benzamides correspondants. Ces derniers ont d'abord été obtenus suite à l'activation de l'acide carboxylique en ester de *p*-nitrophényle, suivie par la réaction avec l'ammoniac gazeux (Schéma 3.4). Différentes conditions étant disponibles pour le réarrangement de Hofmann,⁷¹ trois

⁷¹ a) Huang, X.; Keillor, J. W. *Tet. Letters*. **1997**, *38*, 313-316. b) Huang, X.; Seid, M.; Keillor, J. W. *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7495-7496. c) Huang, X.; Keillor, J. W. *Org. Synth.*, **2001**, *78*, 234-238. d) de Macédo, P.; Marrano, C.; Keillor, J. W. *Bioorg. & Med. Chem.* **2002**, *10*, 355-360.

d'entre elles ont été appliquées, telles que présentées au Schéma 3.4 ci-dessous. Encore une fois, ces essais se sont avérés infructueux, permettant d'observer principalement des produits de dégradation par CCM et MS. Bien qu'aucun des essais n'aient permis de former le nouveau fragment dimaléimide ou un précurseur de celui-ci, ils ont malgré tout mis en lumière que toutes conditions réactionnelles impliquant une base forte mènent à la dégradation du produit de départ. Ainsi, afin de contourner ce problème, il est possible de réaliser le réarrangement de l'acide carboxylique en amine primaire en utilisant les conditions acides de la réaction de Schmidt.

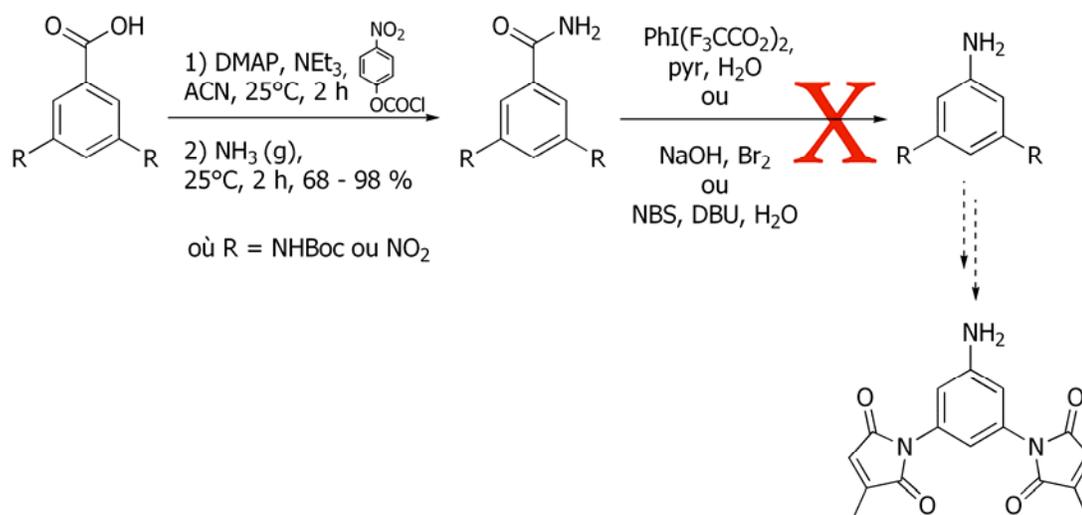


Schéma 3.4. Réarrangement de Hofmann envisagé pour la synthèse du nouveau fragment dimaléimide.

3.2.2. Réarrangement de Schmidt

Le réarrangement de Schmidt implique la réaction de l'azoture d'hydrogène avec un électrophile comme des dérivés carbonylés, des alcools tertiaires et des alcènes, le tout catalysé par un acide tel que l'acide sulfurique (Schéma 3.1). À partir d'un acide carboxylique, l'azoture d'acyle est premièrement formé avant de se réarranger en isocyanate, lequel est ensuite

hydrolysé pour donner l'acide carbamique qui, après décarboxylation, libère l'amine correspondante.⁷² Ainsi, tel qu'illustré au Schéma 3.5, la 3,5-dinitroaniline **3.1** a été obtenue quantitativement à partir de l'acide carboxylique correspondant.⁷³ Il est à noter qu'il est possible d'appliquer ces conditions réactionnelles à grande échelle, où le produit désiré est précipité directement du milieu réactionnel. Cette première étape est la clé de la voie synthétique présentée au Schéma 3.6, puisqu'elle a mené au noyau du nouveau fragment dimaléimide. L'aniline **3.1** étant assez peu nucléophile, il était donc nécessaire de réduire les groupements nitro⁷⁴ avant de protéger l'une des amines avec un Boc. Enfin, les conditions réactionnelles établies pour la formation des maléimides des fluorogènes de deuxième génération ont aussi permis d'achever la synthèse du fragment **3.4** à la base des fluorogènes de troisième génération.

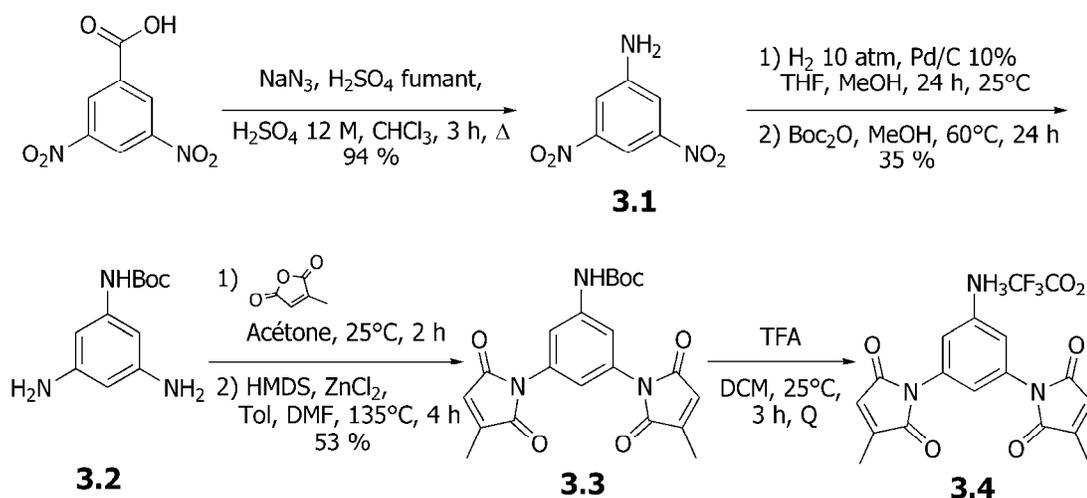


Schéma 3.5. Voie de synthèse menant au nouveau fragment dimaléimide.

⁷² Wolff, H. *Org. React.*, **1946**, *3*, 307-336.

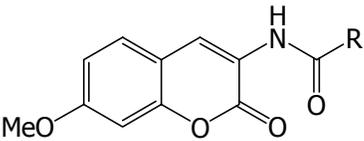
⁷³ Lothrop, W. C.; Handrick, G. R.; Hainer, R.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 3781-3784.

⁷⁴ Jeong, M. J.; park, J. H.; Lee, C.; Chang, J. Y. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 2221-2224.

3.3. SYNTHÈSE D'UN PREMIER FLUOROGÈNE DE TROISIÈME GÉNÉRATION

Les fluorogènes de deuxième génération ayant été bien caractérisés en fluorescence, l'influence nulle du substituant alkyle sur leur émission est alors bien connue. Effectivement, les composés **2.9 a-d** présentés au chapitre précédent présentent des maxima d'excitation et d'émission ainsi que des rendements quantiques de fluorescence similaires au fluorophore original.⁴² À l'opposé, certains dérivés de coumarine et leurs rendements quantiques sont répertoriés dans la littérature et suggèrent que la présence d'un substituant aromatique sur le noyau fluorescent entraîne une perte quasi-totale de sa fluorescence (Tableau 3.1).⁷⁵ Puisque le nouveau fragment dimaléimide conçu et synthétisé pour les fluorogènes de nouvelle génération mènerait à une connectivité similaire, l'évaluation de l'influence d'un substituant aromatique sur la fluorescence des fluorophores couramment utilisés dans le groupe était donc nécessaire.

Tableau 3.1. Influence des substituants sur la fluorescence de la coumarine.

	Substituant (R)	Rendement quantique de fluorescence (Φ_F)
	Me	100
	CF ₃	0.03
	Ph	< 0.01

Pour ce faire, les composés modèles **3.5**, **3.6** et **3.7** présentés à la figure **3.3** ont été synthétisés et leur fluorescence respective en milieu aqueux a été étudiée. De manière analogue à l'exemple ci-haut, le dérivé de coumarine **3.5** présentant un substituant anilide n'est plus fluorescent à des

⁷⁵ Gagey, N.; Emond, M.; Neveu, P.; Benbrahim, C.; Goetz, B.; Aujard, I.; Baudin, J. B.; Jullien, L. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 2341-2344.

concentrations de l'ordre du mM, contrairement aux analogues de coumarine étudiés au chapitre 2. Les composés modèles dansyle **3.6** et fluorescéine **3.7** diffèrent cependant de cette tendance et sont toujours intensément fluorescents malgré la présence du groupement aromatique et pourront donc être utilisés afin de mettre à l'épreuve le nouveau fragment dimaléimide **3.4**.

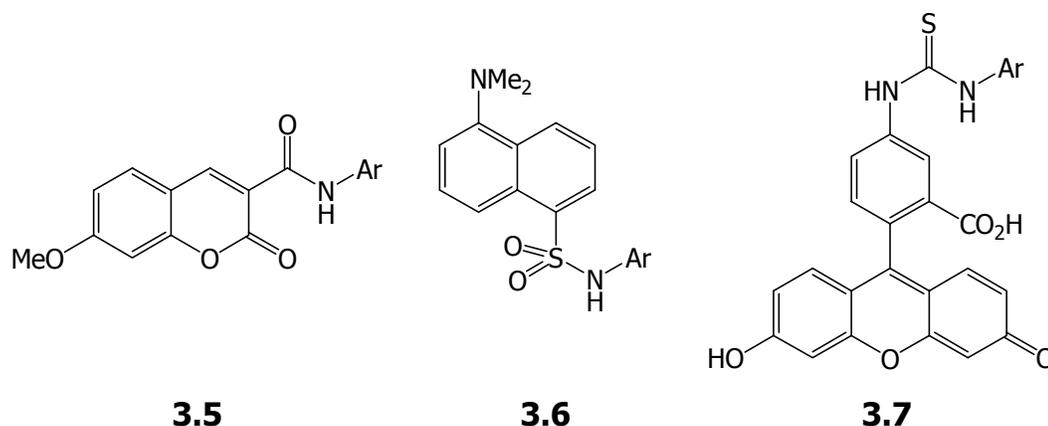


Figure 3.3. Composés contrôles pour l'étude de l'influence d'un substituant aromatique sur la fluorescence.

Ainsi, sur la base des résultats de cette étude contrôle, le nouveau fragment dimaléimide a donc été couplé au chlorure de dansyl pour donner le premier fluorogène de troisième génération. L'amine du synthon **3.4** étant peu nucléophile dû à la délocalisation dans le cycle aromatique, différentes conditions de couplage ont été tentées. Tel qu'illustré au Schéma 3.6, un premier essai a d'abord été réalisé simplement en présence d'une base, sans activation supplémentaire du chlorure de sulfonyle. Malgré les 18 heures de réaction à température ambiante, seuls les produits de départ ont été récupérés. Ainsi, des conditions de couplage pour une amine désactivée avec ce type d'électrophile ont été empruntées.⁷⁶ Effectivement, en présence de DMAP et de pyridine, une activation supplémentaire de la sulfone permet non

⁷⁶ Watzke, A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Kohn, M.; Wacker, R.; Schroeder, H.; Breinbauer, R.; Kuhlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C. M.; Goody, R. S.; Waldmann, H. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 6288-6306.

seulement le couplage de celle-ci avec le dimaléimide **3.4**, mais bien la double addition du chlorure de dansyle sur cette même amine, menant exclusivement au composé bis-dansyle **3.8**.

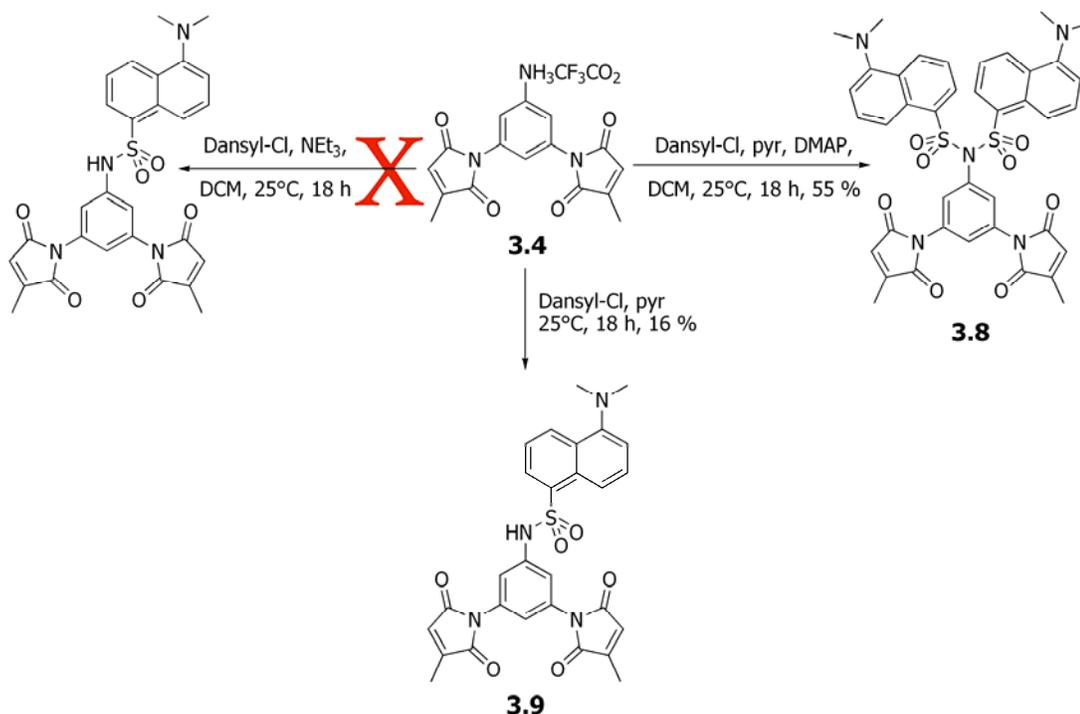


Schéma 3.6. Voie de synthèse du premier fluorogène de troisième génération.

Enfin, toujours dans l'optique de synthétiser le fluorogène mono-dansyle, un niveau d'activation intermédiaire a donc été visé en plaçant le dansyl-Cl et le dimaléimide en solution dans la pyridine, sans DMAP. Bien qu'un faible rendement de 16 % ait été obtenu pour ce couplage final, le fluorogène **3.9** a été isolé comme seul produit de la réaction. Il serait sûrement possible de d'augmenter le rendement de cette étape de synthèse en portant à reflux le milieu réactionnel. Les conditions réactionnelles ayant mené au composé **3.8** pourraient être empruntées de nouveau, en suivant

toutefois la réaction de près afin de minimiser la formation du produit de di-addition.

3.3.1. Marquage de protéines exprimées en faible quantité

Un marqueur fluorogène présentant deux unités fluorescentes, tel le composé bis-dansyle **3.8**, pourrait trouver une utilité certaine au niveau du marquage *in vivo* de protéines dont le niveau d'expression est connu pour être faible. Par exemple, les protéines effectrices de la salmonelle, une bactérie pathogène, ont pu être étudiées en appliquant une stratégie similaire, à l'aide du *FIAsH Labelling*.⁷⁷ Dans ce cas, trois marqueurs fluorogènes ont été rattachés à la protéine effectrice d'intérêt dans le but de produire un plus grand signal fluorescent et ainsi étudier de manière plus précise les cinétiques de sécrétion et de dégradation de cette protéine. Pour ce faire, la séquence de reconnaissance peptidique a été répétée à trois reprises afin d'accueillir trois marqueurs organoarsenates, tel qu'illustré à la Figure 3.6. Dans la même optique, la stratégie envisagée à partir des fluorogènes bis-dansyle permettrait de disposer, de manière sélective, plus d'un noyau fluorescent sur une seule unité de reconnaissance, dans ce cas précis une hélice dC10.

⁷⁷ VanEngelenburg, S. B.; Palmer, A. E. *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 619-628.

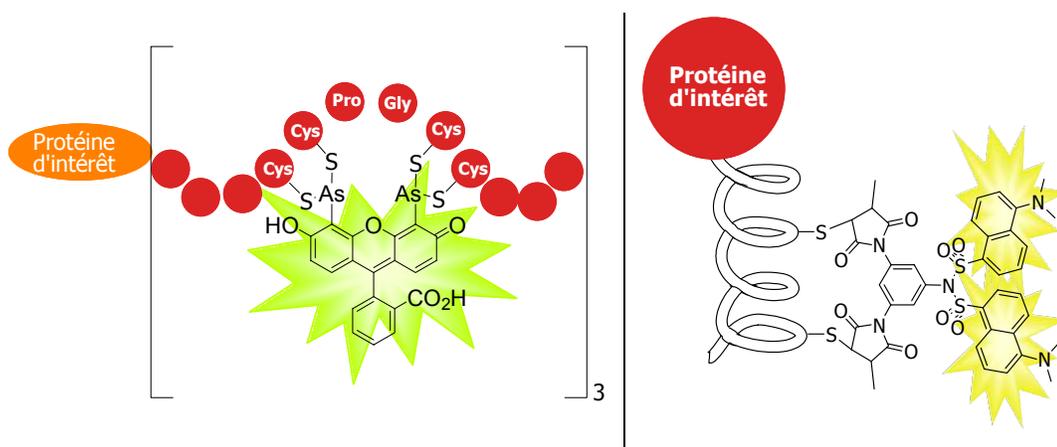


Schéma 3.7. Stratégies de marquage *in vivo* pour des protéines faiblement exprimées.

Bien que le fluorogène bis-dansyle **3.8** se soit avéré prometteur par rapport aux applications pratiques qui pourraient en découler, l'étude du caractère fluorogène de ce dernier a plutôt démontré le contraire. Tel que décrit au chapitre précédent, le facteur d'augmentation de la fluorescence de **3.8** a été déterminé en comparant les intensités de fluorescence initiale et finale, suite à la réaction avec l'acide 3-mercaptopropionique. De manière analogue aux fluorogènes de deuxième génération, la formation du produit d'addition a été confirmée par HRMS, ainsi que la disparition du produit de départ. Malgré une conversion complète des maléimides en leurs analogues succinimides, aucune augmentation de la fluorescence initiale, elle-même nulle, n'a été observée, suggérant que le *quench* de la fluorescence initiale n'est pas attribuable à la présence des maléimides.

Quelques hypothèses peuvent être apportées pour expliquer le *quench* de la fluorescence intramoléculaire décrit ci-haut. Tel que représenté à la Figure 3.4, les deux groupes dansyle tendent à s'empiler, ce qui est cohérent avec le phénomène d'*autoquench*, où à concentration trop élevée, des fluorophores planaires s'empilent, ce qui mène au *quench* de la fluorescence

l'un de l'autre. De plus, une telle conformation de ce fluorogène est favorisée par le faible degré de liberté au niveau de l'azote central, fixant les groupements dans l'un au dessus de l'autre.

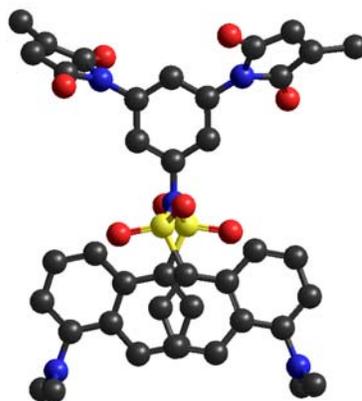


Figure 3.4. Représentation tridimensionnelle du composé bis-dansyl **3.8**
(voir partie expérimentale, section 7.3)

Afin de remédier à cette problématique et d'explorer un peu plus l'avenue des fluorogènes disubstitués, le composé modèle benzylique correspondant présenté à la Figure 3.5 a été synthétisé. Moins rigide que son analogue aniline, il a été supposé qu'un plus grand degré de liberté permettrait de distancer les groupements dansyle et réduire le *quench* intramoléculaire de la fluorescence. Bien qu'une augmentation de fluorescence ait été observée par rapport au composé **3.8** dithiolé, l'intensité enregistrée est néanmoins bien inférieure à celle de composés analogues de deuxième génération pour une même gamme de concentrations. Enfin, cette amélioration du système n'étant pas suffisante pour justifier le développement ultérieur de cette approche, ces derniers résultats ont toutefois permis de corroborer les premières hypothèses émises au niveau du *quench* intramoléculaire.

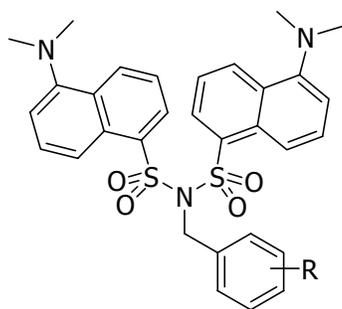
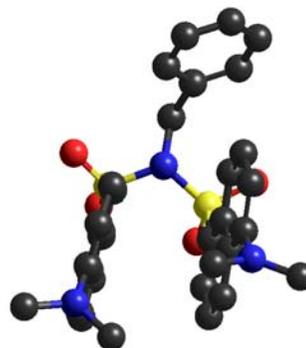
**3.10**

Figure 3.5. Représentation tridimensionnelle du composé contrôle bis-dansyl **3.10**. (voir partie expérimentale, section 7.3)

3.3.2. Caractérisation photophysique du premier fluorogène de troisième génération

Tout comme le composé bis-dansyle, le nouveau fluorogène **3.9** a été étudié en fluorescence en comparant les intensités initiale et finale, suivant l'addition de MPA, afin de déterminer son facteur d'augmentation de la fluorescence (FE). Le composé de départ étant à la fois très peu fluorescent et moins soluble en milieu aqueux, la variation linéaire de la fluorescence en fonction de la concentration n'a été déterminée que dans le DMSO pur. Effectivement, pour des concentrations allant jusqu'aux mM, les intensités de fluorescence sont inférieures à l'unité, entraînant une trop grande erreur pour qu'elles soient prises en compte. Cependant, dans le but de valider les FE calculées, les domaines de linéarité de fluorescence ont aussi été déterminés pour les composés finaux. Ces derniers étant beaucoup plus fluorescents, les erreurs sur les intensités enregistrées sont alors négligeables, permettant de tracer la tendance linéaire de la variation de la fluorescence dans chacun des systèmes de solvants. Le fluorogène **3.9** étant assez peu polaire, il n'est donc pas surprenant que la limite de la linéarité soit plus faible en milieu aqueux que dans le DMSO. Ainsi, il a été possible de déterminer les facteurs d'augmentation de la fluorescence jusqu'à des concentrations de 250 μM dans le DMSO alors qu'un maximum de 80 μM devait être respecté dans l'eau. Tel que mentionné un peu plus haut, la fluorescence initiale de ce fluorogène est remarquablement peu élevée et il est donc préférable de calculer le FE à la concentration la plus élevée afin de minimiser l'erreur sur la mesure.

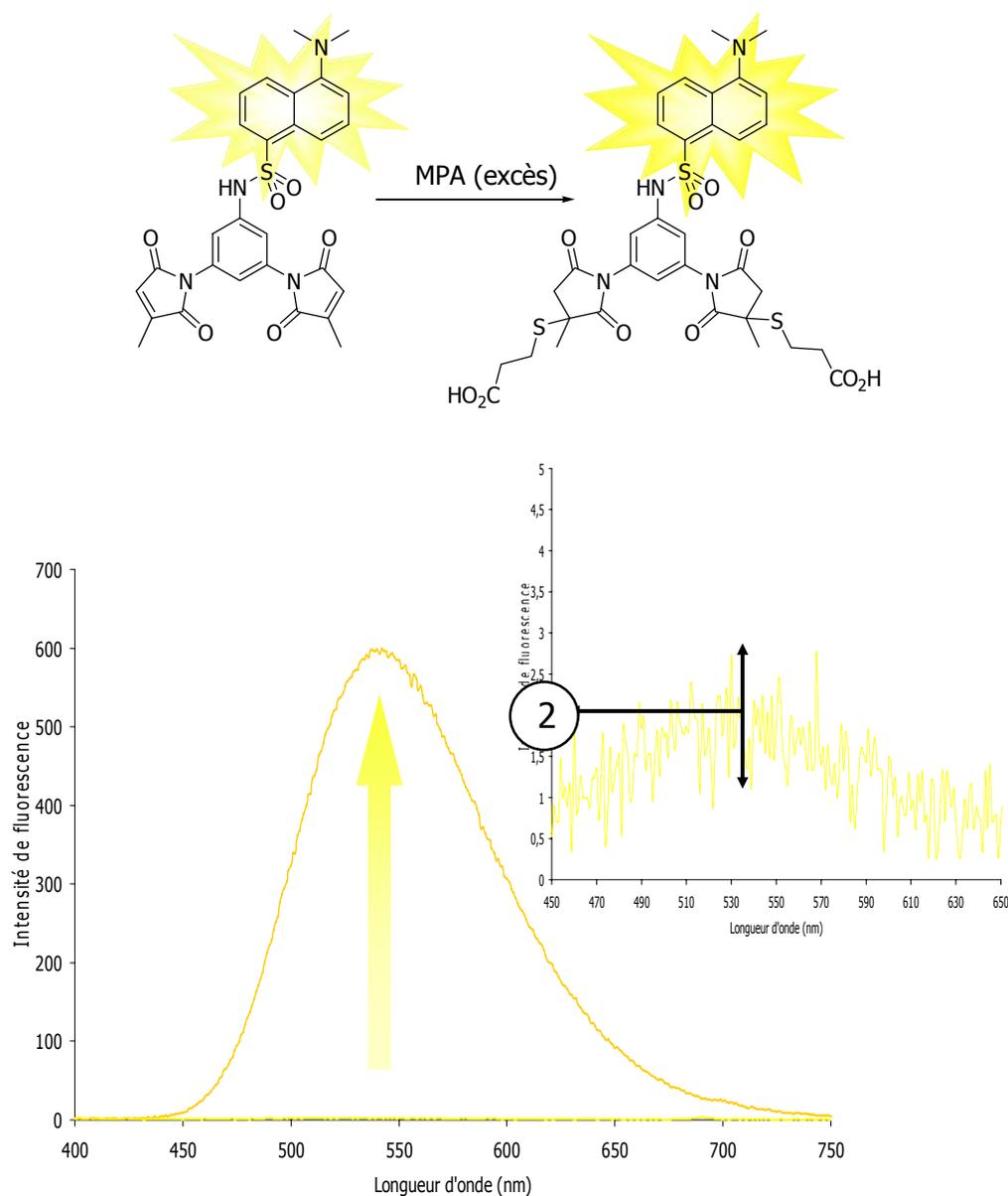


Figure 3.6. Caractérisation du caractère fluorogène du composé **3.9** avec un excès de MPA. ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, DMSO)

La limite de linéarité dans le DMSO étant plus élevée qu'en milieu aqueux, il n'a été possible de déterminer une intensité initiale de fluorescence que pour ce système de solvant. Effectivement, tel qu'illustré à la Figure 3.6, une intensité de fluorescence d'approximativement 2 a été enregistrée pour le fluorogène **3.9** avant réaction avec les thiols. L'incertitude sur d'aussi

faibles intensités de fluorescence étant relativement importante, il n'a donc pas été possible de déterminer une valeur initiale précise en milieu aqueux. Tel que mentionné plus haut, la limite de linéarité en fluorescence est beaucoup plus basse pour ce système de solvants, l'intensité de fluorescence mesurée à la limite de ce domaine est comprise dans le bruit du signal. Ainsi, un facteur d'augmentation de la fluorescence de 293 a été calculé dans le DMSO alors qu'il a été statué que le FE en milieu aqueux est simplement supérieur à 175, soit l'intensité de fluorescence résultant de l'addition de thiols à la limite du domaine de linéarité dans l'eau, ici 80 μM .

Tableau 3.2. Caractéristiques spectroscopiques du fluorogène **3.9**.

Solvant	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	FE
DMSO	350	540	293
HEPES/DMSO 5%	325	520	>175

Tel qu'il avait été conclu suite à la précédente étude de l'influence conformationnelle sur l'efficacité du *quench*, les présents résultats corroborent l'hypothèse selon laquelle la rigidité et la proximité entre les parties fluorophore et dimaléimide favorisent un meilleur transfert électronique. Effectivement, le fluorogène **3.9** présente assez peu de degré de liberté, le groupement sulfonamide jouant ici le rôle d'espaceur pour relier le quencheur au fluorophore. Enfin, le premier fluorogène de troisième génération est parvenu rétablir la principale caractéristique perdue entre la première et deuxième génération de fluorogènes. De plus, le facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) mesuré pour ce nouveau marqueur protéique est, à notre connaissance, le plus important observé.

3.4. DÉVELOPPEMENT D'UN DIMALÉIMIDE BENZYLIQUE

3.4.1. Synthèse linéaire versus synthèse convergente

Au cours de la synthèse du premier fluorogène de troisième génération, il avait été observé que la présence d'un substituant anilide sur la coumarine entraînait une perte quasi-totale de la fluorescence. Les dérivés de coumarine ayant une importance certaine pour l'élaboration d'une librairie de fluorogènes, il était donc impératif de remédier à cette problématique et de trouver un moyen d'inclure les coumarines dans la troisième génération. Ainsi, puisque la présence d'un substituant méthyle ne semble pas gêner la fluorescence du noyau coumarine (Tableau 3.1), il a été pensé que le nouveau fragment dimaléimide pourrait être reproduit à partir d'une structure benzylamine plutôt qu'aniline. Avant de repenser au design du dimaléimide, le composé contrôle **3.11** a été synthétisé puis étudié en fluorescence. Tel qu'illustré à la Figure 3.1, l'insertion d'une unité méthylène distançant le groupement phényle de la coumarine permet de restaurer la fluorescence de ce noyau. Ce dernier résultat indique donc qu'il serait possible de relier la coumarine directement avec un fragment dimaléimide, lequel serait construit à partir d'un dérivé de benzylamine plutôt qu'aniline.

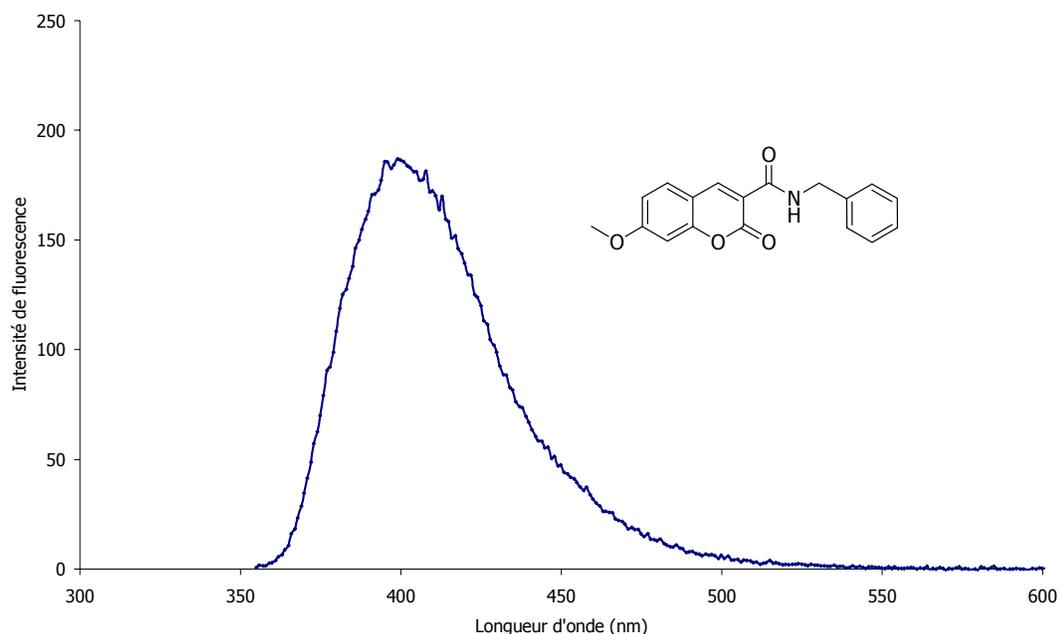


Figure 3.7. Étude de l'influence d'un substituant benzylique sur la fluorescence de la coumarine. (**3.11**) ($\lambda_{\text{ex}} = 347 \text{ nm}$, HEPES/DMSO 5%)

De manière analogue au fragment dimaléimide **3.4**, la synthèse du dérivé benzylique a été amorcée à partir de l'acide 3,5-dinitrobenzoïque pour donner l'alcool benzylique correspondant avec un rendement de 67 % suite à la réduction de l'acide carboxylique en présence de NaBH_4 et de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$.⁷⁸ Il est à noter que la réduction de l'acide carboxylique et de l'amide ont toutes deux été tentées en présence de LAH, mais que ces voies ont rapidement été abandonnées puisqu'une dégradation importante était observée. Cette sensibilité du substrat est corroborée par une diminution du rendement de réaction en fonction du temps de réaction, dans les conditions réactionnelles retenues pour cette étape. L'alcool benzylique ainsi obtenu a ensuite été converti en l'amine benzylique **3.13** correspondante en appliquant les

⁷⁸ a) Gill, A. L.; Frederickson, M.; Cleasby, A.; Woodhead, S. J.; Carr, M. G.; Woodhead, A. J.; Walker, M. T.; Congreve, M. S.; Devine, L. A.; Tisi, D.; O'Reilly, M.; Seavers, L. C. A.; Davis, D. J.; Curry, J.; Anthony, R.; Padova, A.; Murray, C. W.; Carr, R. A. E.; Jhoti, H. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 414-426. b) Cho, S.-D.; Park, Y.-D.; Kim, J.J.; Falck, J.R.; Yoon, Y.-J. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2004**, *25*, 407-409.

conditions de Mitsunobu.⁷⁹ Ici encore, la sensibilité de l'alcool **3.12** vis-à-vis des conditions fortement basiques n'a pas permis d'effectuer cette transformation en présence du phthalimide de potassium, de l'azidure de sodium ou de l'ammoniac. Le dérivé **3.14** a ensuite été obtenu, en deux étapes, en déprotégeant le dérivé phthalimide à l'aide d'un excès d'hydrazine, catalysé par l'acide *p*-toluènesulfonique avec un rendement global de 80 %.⁸⁰ Les conditions optimales pour la réduction des groupements nitro avec le complexe de $\text{Co}_2(\text{CO})_8$ dans la DME⁸¹ a mené à la diamine **3.15** avec un rendement de 51 %, où la perte de rendement est probablement attribuable à la purification sur gel de silice. Bien que l'acide amique correspondant soit obtenu quantitativement, la cyclisation de ce dernier demeure quant à elle problématique, où seulement des traces du produit final désiré ont été observées par MS avec différentes conditions de cyclisation des maléimides connues telles que DCC/HOBt, *p*TsOH et $\text{ZnCl}_2/\text{HMDS}$.

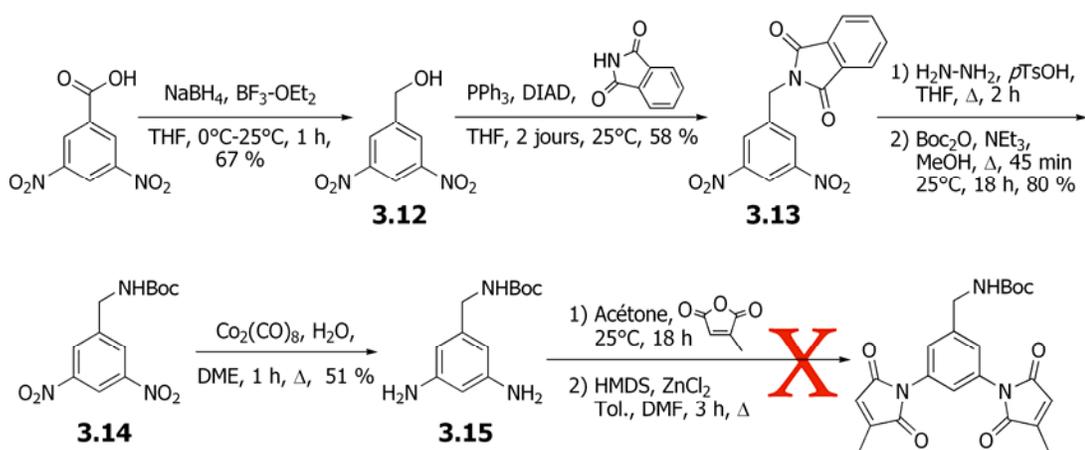


Schéma 3.8. Voie de synthèse pour le fragment dimaléimide benzylique.

⁷⁹ a) Martinez-Viturro, C. M.; Dominguez, D. *Tet. Letters*, **2007**, *48*, 1023-1026. b) Franchini, C.; Carocci, A.; Catalano, A.; Cavalluzzi, M. M.; Corbo, F.; Lentini, G.; Scilimati, A.; Tortorella, P.; Camerino, D. C.; De Luca, A. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5238-5248.

⁸⁰ Katayama, S.; Ae, N.; Kodo, T.; Masumoto, S.; Hourai, S.; Tamamura, C.; Tanaka, H.; Nagata, R. *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 691-701.

⁸¹ Lee, H.-Y.; An, M. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2004**, *25*, 1717-1719.

Devant les difficultés rencontrées au niveau de l'étape de cyclisation des maléimides du fragment dimaléimide benzylique, une voie de synthèse dite linéaire a donc été abordée. Effectivement, plutôt que de coupler le fragment dimaléimide final à la coumarine, la synthèse des maléimides est plutôt réservée à la fin de la synthèse du fluorogène. Ainsi, le même fragment **3.14** a été couplé quantitativement à la coumarine suite à la déprotection du Boc avec un excès de TFA. La réduction des groupements nitro a été effectuée par hydrogénation catalytique dans la DMF. Il est à noter que l'utilisation d'autres solvants tels que THF ou MeOH mène à la réduction de la double liaison de la coumarine.⁸² Enfin le fluorogène **3.18** a été obtenu en appliquant les conditions préalablement établies pour la formation des groupements maléimides.

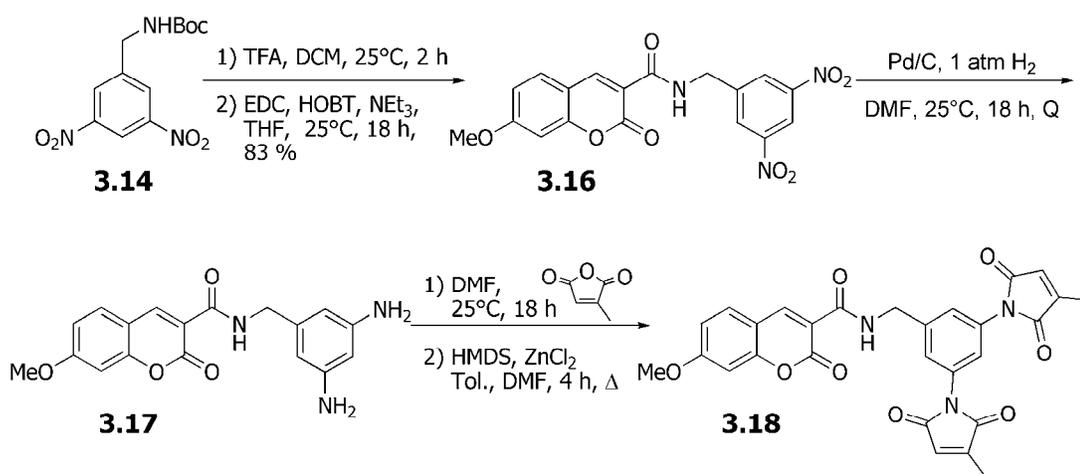


Schéma 3.9. Voie de synthèse linéaire pour le fluorogène dérivé de coumarine **3.18**.

⁸² Yu, J.; Tang, L.; Yang, Y.; Ji, R. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 2428-2435.

3.4.2. Caractérisation photophysique du fluorogène 3.18

Le caractère fluorogène du composé **3.18** a été déterminé dans les mêmes conditions que les autres fluorogènes étudiés et présentés précédemment. Ainsi, un facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) de 6.4 a été obtenu, soit une valeur légèrement supérieure à celle obtenue pour les composés de deuxième génération étudiés au chapitre 2. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que la distance qui sépare les maléimides de la coumarine est plus courte pour le composé **3.18** par rapport à ses analogues de deuxième génération.

Tableau 3.3. Caractéristiques spectroscopiques du fluorogène **3.18**

Solvant	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	FE
HEPES/DMSO 5%	347	404	6.4

Cette valeur est néanmoins nettement inférieure à celle obtenue pour le premier fluorogène de cette nouvelle génération. Effectivement, le dérivé dansyl issu de la synthèse convergente avec le nouveau fragment dimaléimide présentait un FE supérieur à 175, comparativement à 6.4 pour le fluorogène présentement à l'étude.

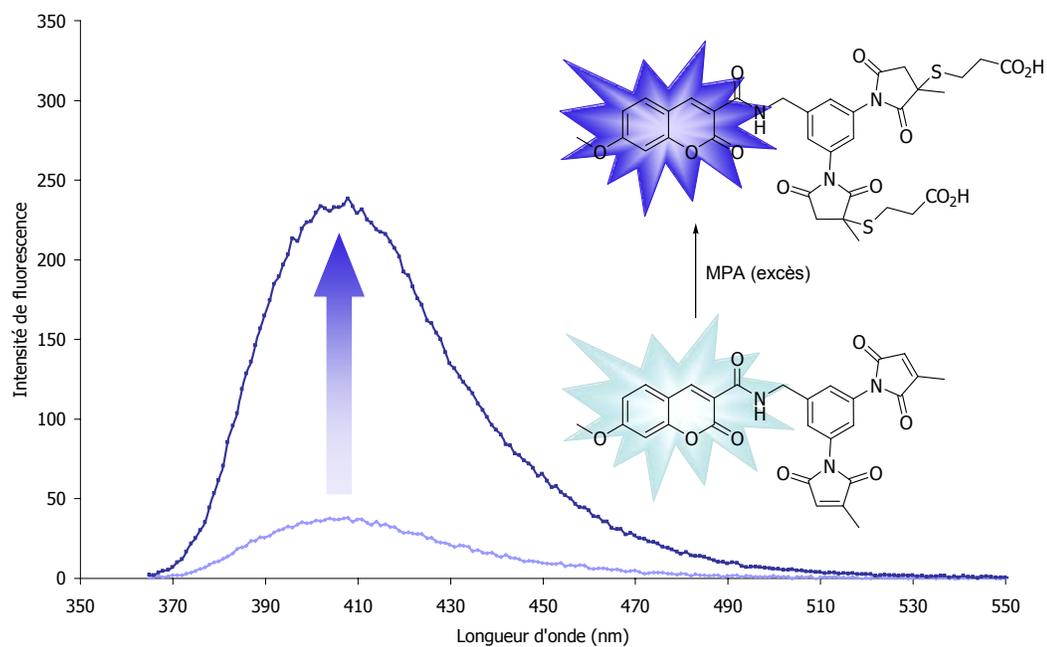


Figure 3.8. Détermination du facteur d'augmentation (FE) de fluorescence du fluorogène **3.18**. ($\lambda_{\text{ex}} = 347 \text{ nm}$)

3.5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude de l'influence conformationnelle sur l'efficacité du *quench* de la fluorescence présentée au chapitre 2 a d'abord permis d'observer une variation du facteur d'augmentation de la fluorescence en fonction de l'espaceur reliant les deux parties du fluorogènes. Devant ces résultats, il a été raisonné qu'il y aurait possiblement intérêt à réduire davantage la distance qui sépare le *quencher* du fluorophore en supprimant l'espaceur des fluorogène de deuxième génération. De cette idée sont née la troisième génération de fluorogènes, où le dérivé dansyl **3.9** présente un facteur d'augmentation de la fluorescence supérieur à 175, ce qui est un des plus grand FE observé à ce jour. Le caractère fluorogène moins prononcé du dérivé de coumarine étant contrastant par rapport à celui du dansyl-dM10, il serait aisé d'associer cette divergence à la différence de connectivité entre ces deux fluorogènes. Effectivement, les liens benzamide et sulfonamide étant respectivement planaire et tétraédrique, il apparaîtrait que cette dernière entraîne une géométrie plus intéressante en maintenant le fragment dimaléimide à proximité du fluorophore, expliquant le plus grand FE observé.

CHAPITRE 4

MARQUAGE ORTHOGONAL DE PROTÉINES

4.1. INTRODUCTION : MARQUAGE ORTHOGONAL BASÉ SUR LA FUSION DE PROTÉINES FLUORESCENTES

Le marquage simultané de plusieurs protéines représente encore à ce jour un défi de taille. Tout comme le marquage simple de protéine, la méthode la plus couramment utilisée aujourd'hui est encore la fusion de protéines fluorescentes (FPs). Effectivement, suite à la découverte de la GFP et de son utilisation en tant que protéine de fusion, des FPs de différentes couleurs ont été développées par mutagenèse dirigée dans les laboratoires de Tsien et ont trouvé bon nombre d'applications en tant que protéines de fusion (Figure 4.1). De plus, le développement d'une telle palette de FPs a assurément ouvert la porte au marquage orthogonal de protéines.⁸³ La spécificité du marquage représentant le principal avantage de la fusion de FPs en tant que méthode de marquage protéique, cette même caractéristique, jumelée à la disponibilité de FPs de différentes couleurs, a permis de marquer, de manière spécifique, plus d'une protéine par différentes couleurs.

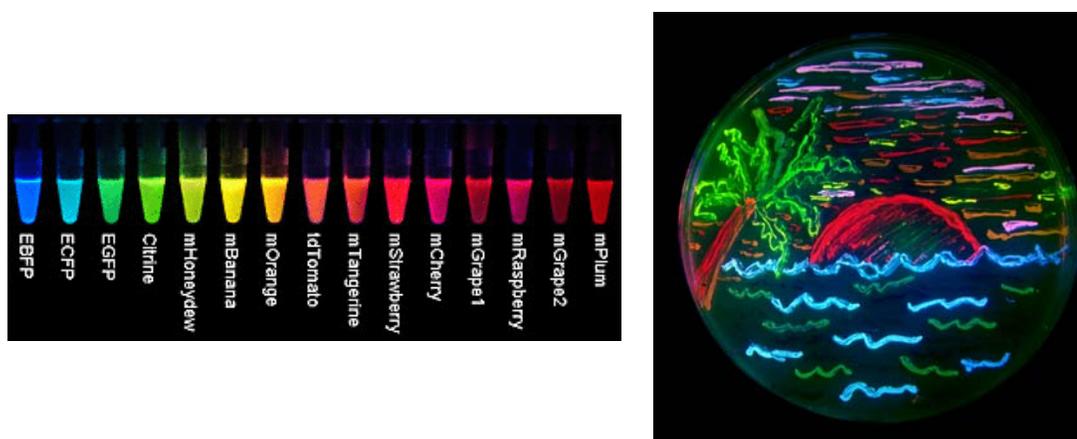


Figure 4.1. Librairie de mutants de la GFP développée par Tsien.⁸⁴

⁸³ Shaner, N. C.; Steinbach, P. A.; Tsien, R. Y. *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 905-909.

⁸⁴ Site officiel du groupe Tsien : <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm> (08/11/2009)

Bien que pouvant être appliquée à une panoplie de systèmes différents, le marquage orthogonal de protéines repose en grande partie sur un même phénomène physique connu sous le nom de FRET (*Forster resonance energy transfer* ou *Fluorescence resonance energy transfer*).⁸⁵ En effet, le FRET est un transfert énergétique ayant lieu à partir de l'état excité d'un premier fluorophore, dit donneur, à un second fluorophore, appelé accepteur, se trouvant à proximité du premier, soit à une distance maximale de 80 Å.⁸⁶ Pour qu'un tel phénomène soit possible, la paire de fluorophores doit répondre à certains critères, dont les principaux sont le recouvrement de la bande d'émission du donneur avec la bande d'excitation de l'accepteur et l'absence de recouvrement entre les bandes d'absorption de cette même paire. Ainsi, il est possible d'observer une proximité spatiale de la paire de fluorophores en observant les intensités d'émission de fluorescence des fluorophores donneur et accepteur en irradiant uniquement à la longueur d'onde du premier.

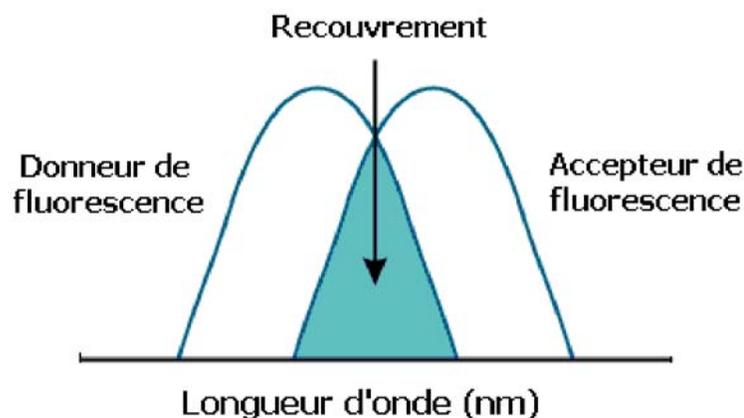


Figure 4.2. Recouvrement des bandes d'absorption et d'émission d'une paire de FRET.⁸⁷

⁸⁵ Förster, T. *Ann. Phys.*, **1948**, 2, 55-75.

⁸⁶ Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. *Nature*, **2002**, 3, 906-918.

⁸⁷ Site *Invitrogen*: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer-FRET.html> (08/11/2009)

Le marquage individuel des protéines dans leur milieu cellulaire menant, entre autre, à l'étude spatiotemporelle de celles-ci, le marquage orthogonal permet quant à lui l'étude d'une panoplie de processus enzymatiques et dynamiques. Bien que la première paire de FPs à avoir été utilisée pour des expériences de FRET soit composée de la BFP (*blue fluorescent protein*) et de la GFP, la tendance au photoblanchiment et la faible émission lumineuse de la BFP ont rapidement mené à son remplacement par la CFP (*Cyan Fluorescent Protein*), laquelle est appariée avec la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) pour mener à un FRET efficace.^{86,88} L'utilisation de cette paire de FPs est maintenant répertoriée à différents niveaux, où plusieurs exemples sont présentés à la Figure 4.3.^{86,89} L'efficacité du FRET inter- et intramoléculaire a ainsi permis l'étude d'une panoplie de processus biologiques tel que les interactions protéine-protéine où, deux protéines sont fusionnées aux CFP et YFP. L'interaction de ces protéines induisant un rapprochement entre les fluorophores, l'efficacité du FRET s'en voit alors aussi augmentée. De manière analogue, il est aussi possible d'observer une augmentation de l'efficacité du FRET entre la CFP et la YFP en fusionnant celles-ci aux extrémités d'une protéine ou d'un senseur. Tel qu'illustré à la Figure 4.3 B-C, la complexation d'un ligand ou une réaction enzymatique peut induire un changement conformationnel résultant en une plus courte distance entre les FPs et donc une meilleure efficacité de FRET.⁹⁰ Enfin, de manière opposée aux derniers exemples cités, une diminution de l'efficacité du FRET peut être engendrée en réponse à la réaction d'une protéase clivant un peptide qui relie les deux FPs.⁹¹

⁸⁸ a) Chan, F. K. M.; Siegel, R. M.; Zacharias, D.; Swofford, R.; Holmes, K. L.; Tsien, R. Y.; Lenardo, M. J. *Cytometry*, **2001**, *44*, 361-368.

⁸⁹ VanEngelenburg, S. B. ; Palmer, A. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 60-65.

⁹⁰ a) Nikolaev, V. O.; Gambaryan S.; Lohse, M. J. *Nat Methods*, **2006**, *3*, 23-25. b) Kunkel, M. T.; Ni, Q.; Tsien, R. Y.; Zhang, J.; Newton, A. C. *J. Biol Chem*, **2005**, *280*, 5581-5587.

⁹¹ Ward, M. W.; Rehm, M.; Duesmann, H.; Kacmar, S.; Concannon, C. G.; Prehn, J. H. *J. Biol Chem*, **2006**, *281*, 5837-5844.

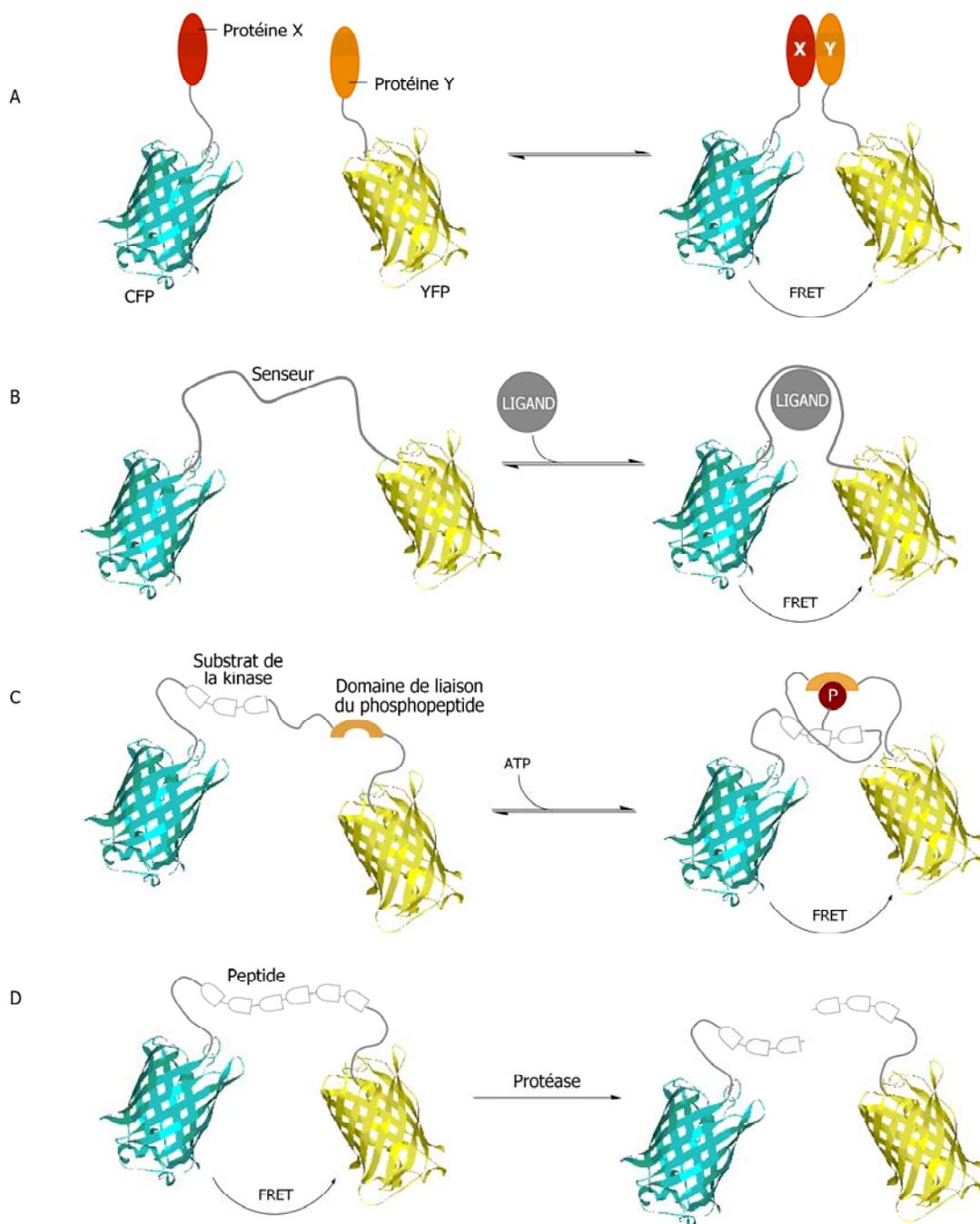


Figure 4.3. Design de différentes sondes fluorescentes reposant sur le FRET.

4.2. MARQUAGE ORTHOGONAL DE PROTÉINES DANS LE GROUPE KEILLOR

4.2.1. Origine et précédents du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor

Au cours du développement de la méthode de marquage au sein du groupe Keillor, soit l'élaboration de la première génération de fluorogènes, une certaine discrimination cinétique avait alors été observée entre deux fluorogènes, selon la distance séparant leurs groupements maléimides. Effectivement, les maléimides des fluorogènes **1.1** et **1.2** (Figure 4.4) étant séparés par 10 et 15 Å respectivement, ils présentent ainsi des vitesses de réactions légèrement différentes avec la protéine diCys-Fos.⁹² Sur la base de cette faible sélectivité, il a été pensé qu'il serait possible de tirer avantage et d'accentuer cette discrimination cinétique afin de relever le défi que représente encore aujourd'hui le marquage orthogonal de protéines.

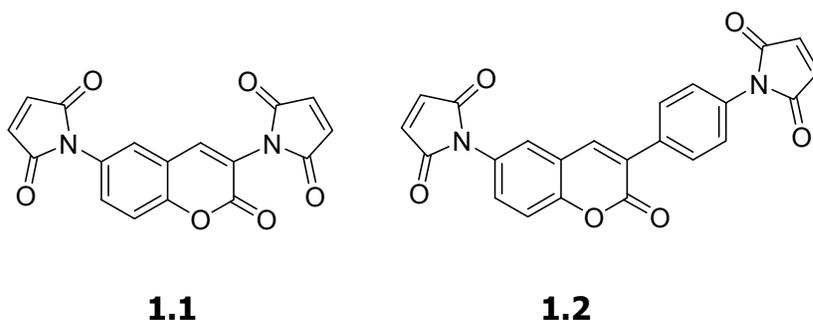


Figure 4.4. Fluorogènes de première génération.

Le caractère orthogonal de la méthode de marquage protéique du groupe Keillor est régit par deux volets distincts, soit le développement de séquences peptidiques dont les cystéines sont séparées par différentes distances ainsi que la synthèse de fluorogènes dont la distance entre les

⁹² Girouard, S., Thèse Ph. D., Université de Montréal, 2004.

maléimides est aussi variée (Figure 4.5). De manière analogue à la séquence dC10 présentée à la section 1.3.3, les hélices- α dC5, dC16 et dC22 ont été conçues par Dre Nathalie Campos-Reales et Dre Roselyne Castonguay, où 1, 3 et 4 tours d'hélice- α , soit 5, 16 et 22 Å, respectivement, séparent les résidus cystéine. Comme pour la séquence dC10, les dC5, dC16 et dC22 ont été fusionnées à la MBP pour en faire des protéines tests qui seront utilisées ultérieurement pour les études de sélectivité.

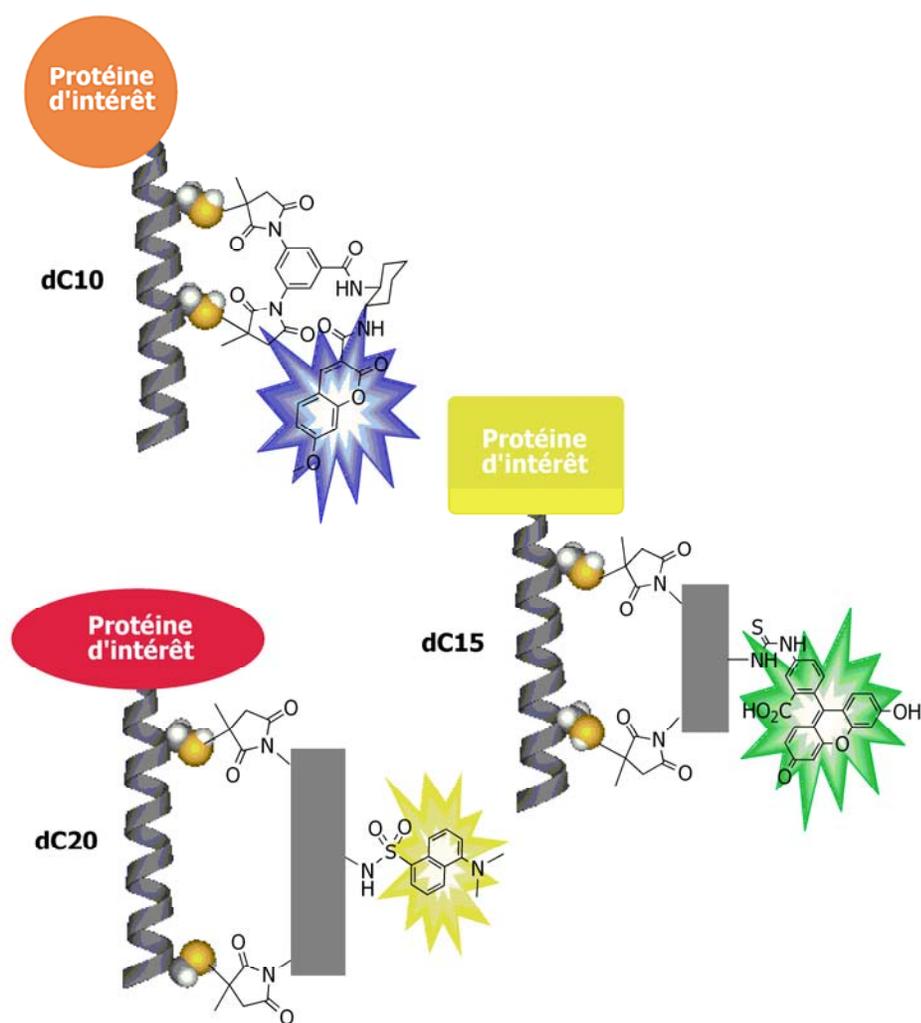


Figure 4.5. Développement du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor.

Avant même que la synthèse de nouveaux fragments dimaléimides n'ait été amorcée, une expérience de sélectivité envers les hélices- α a été réalisée antérieurement dans le groupe afin de valider l'approche envisagée pour le marquage orthogonal. Pour ce faire, un fluorogène inspiré de la première génération a été synthétisé (**A**), où les maléimides, qui sont directement liés au fluorophore, sont séparés de 14 Å. Afin d'évaluer la possibilité de marquer sélectivement deux protéines à l'aide du fluorogène A et du fluorogène-dM10 de deuxième génération **2.9**, chacun d'entre eux a préalablement été placé en présence des protéines tests MBP-dC5 et MBP-dC10. Bien que la réaction du fluorogène A ne soit observée qu'avec la seconde protéine, aucune discrimination n'a été observée entre les MBP-dC5 et MBP-dC10 avec le fluorogène **2.9**. Alors, dans le but de marquer sélectivement chacune de ces protéines dans un même pot, une approche dite séquentielle a donc été favorisée. Ainsi, tel qu'illustré à la Figure 4.6, un équivalent de fluorogène A est d'abord additionnée à un mélange d'un équivalent de chacune des protéines MBP-dC5 et MBP-dC10. La réaction de **A** avec la MBP-dC10 est suivie à 470 nm, pendant 30 minutes pour mener à la formation d'un plateau. Il est ainsi nécessaire d'attendre la fin de ce premier marquage avant d'ajouter le second fluorogène pour qu'il ne réagisse qu'avec la MBP-dC5. De manière analogue au fluorogène A, un plateau est observé après 30 minutes de réaction, mais plutôt à 525 nm (Figure 4.1).

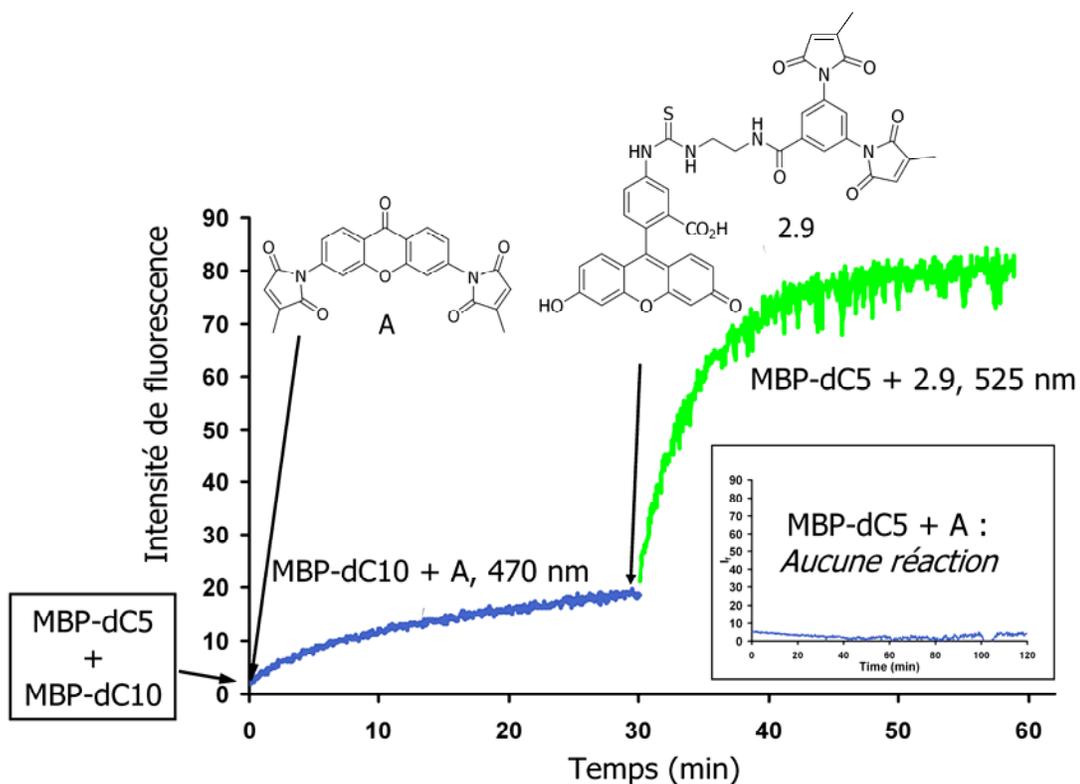


Figure 4.6. Limitation actuelle du marquage orthogonal de protéines dans le groupe Keillor.

4.2.2. Développement d'une première famille de dimaléimides

La conception des nouveaux fragments dimaléimides a tout d'abord été inspirée du premier dimaléimide synthétisé pour la deuxième génération de fluorogènes. Tel que présenté à la Figure 4.7, le squelette aromatique est toujours substitué aux positions 1, 3 et 5, par les deux groupements maléimides et l'espaceur, permettant la connexion avec le fluorophore. Afin de varier la distance qui sépare les maléimides l'un de l'autre, il a été choisi de greffer, à partir du fragment dM10, une ou deux unités éthynylaniline, pour donner les fragments dM16 et dM21. Ces unités alcynes ont été sélectionnées puisqu'ils répondent à trois critères primordiaux de la conception des nouveaux fragments dimaléimides, soit l'accessibilité

synthétique, la distance générée entre les groupements maléimides et la rigidité de la structure finale. Effectivement, ces deux dernières caractéristiques sont essentielles afin d'assurer la sélectivité du marquage simultané de plusieurs protéines. Tel que mentionné plus haut, la sélectivité de la méthode repose sur la cinétique de réaction entre la séquence peptidique diCys et le fragment dimaléimide du marqueur fluorogène. Il est donc d'une importance certaine que la structure portant les maléimides soit la plus rigide possible afin de maintenir fixe la distance entre les maléimides. De cette manière, la variation de la distance entre les maléimides est minimisée et dépend principalement de la rotation de ces groupements autour du lien C-N (Figure 4.7). À titre d'exemple, les distances maximales et minimales séparant les maléimides ont été déterminées, où la moyenne de celles-ci est à l'origine des noms dM10, dM16 et dM21.

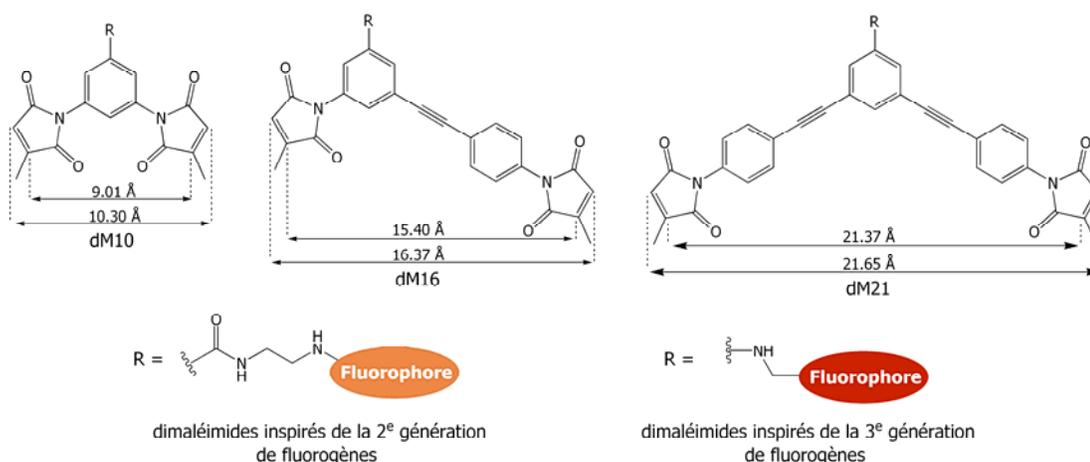


Figure 4.7. Structures de la première famille de fragments dimaléimides.

La synthèse du fragment dM21 a été priorisée par rapport à celle du dM16 puisqu'il présente plus de potentiel pour compléter, avec le dM10, une paire de fluorogènes orthogonale. Effectivement, la différence des distances intermaléimides étant plus importante entre le dM10 et le dM21 qu'entre ce premier et le dM16, il est donc aisé de croire qu'une plus grande discrimination envers les hélices sera observé, et ainsi, une meilleure

sélectivité au niveau du marquage en multiplex. Ainsi, la synthèse du dM21 à été amorcée par le couplage de Sonogashira⁹³ entre la *p*-éthynylaniline et un dérivé de l'acide 3,5-dibromobenzoïque ayant préalablement été couplé avec l'éthylènediamine-Boc. Enfin, les maléimides ont été formés selon le protocole en deux étapes préalablement établis pour les fluorogènes de deuxième et troisième générations (Schéma 4.1)

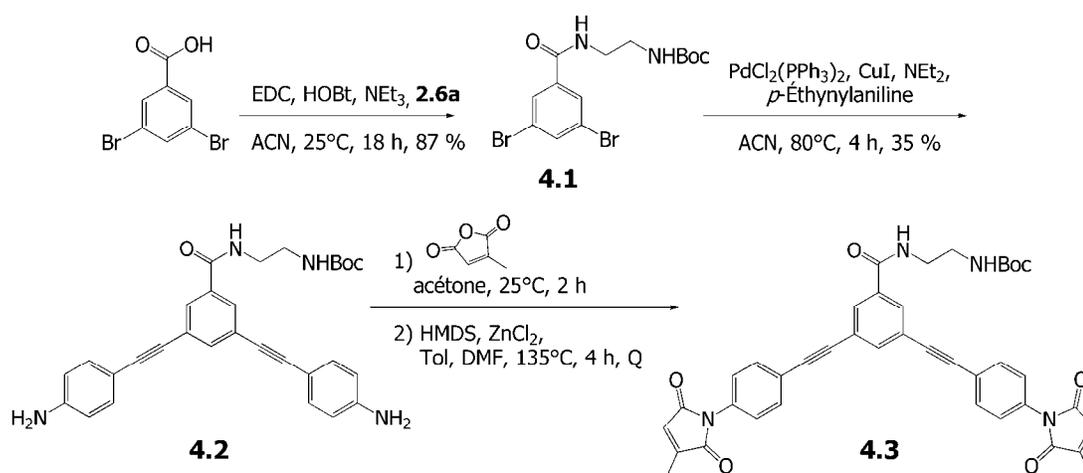


Schéma 4.1. Voie de synthèse pour le fragment dM21, selon la première famille de dimaléimides conçus.

Bien que le nouveau fragment dM21 ait été obtenu, il aurait été nécessaire de reprendre la synthèse de ce dernier afin de compléter le fluorogène, en raison de la faible quantité isolée. Ce projet ayant été mené en parallèle avec l'étude d'efficacité de *quench* présentée au chapitre 2, les résultats de cette dernière ont ainsi directement influencé le développement des nouveaux fragments dimaléimides dM16 et dM21. Effectivement, les résultats des fluorogènes de troisième génération confirmant les observations rapportées au deuxième chapitre, il a alors été pensé qu'une perte de *quench* plus importante pourrait être observée avec les dM16 et dM21 initialement

⁹³ a) Elangovan, A.; Wang, Y.-H.; Ho, T.-I. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1841-1844. b) Maeda, H.; Maeda, T.; Mizuno, K.; Fujimoto, K.; Shimizu, H.; Inouye, M. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 824-831.

conçus. Effectivement, venant s'ajouter à la distance de l'espaceur éthylènediamine, les maléimides des dM16 et dM21 sont aussi éloignés du fluorophore par la structure du fragment lui-même.

4.2.3. Développement d'une deuxième famille de fragments dimaléimides

Ainsi, afin de réduire la distance totale entre les *quencher*s et le fluorophore, il a été pensé de substituer l'espaceur par une simple benzylamine, à l'image des fluorogènes de troisième génération. Bien que cette astuce permette de réduire la distance due à l'espaceur, il n'en reste pas moins que les groupements maléimides des fragments dM16 et dM21 sont aussi distancés du fluorophore par l'unité éthynylbenzène. Effectivement, ce dernier ayant été introduit dans la structure des dimaléimides pour cette même rigidité, elle peut néanmoins représenter un désavantage au niveau de l'efficacité de *quench*. En effet, contrairement à l'éthylènediamine, il est impossible pour l'éthynylbenzène de permettre un repliement du fluorogène sur lui-même pour permettre un rapprochement des maléimides et du fluorophore, et du même coup un meilleur *quench*. Devant les limitations potentielles de cette famille de dimaléimides, il a donc été nécessaire de revoir la conception de ces fragments, menant à l'élaboration d'une deuxième famille de fragments présentant deux groupements maléimides.

Dans le but de tirer avantage de la rigidité de la structure au niveau de la sélectivité de la méthode sans en payer le prix du côté de l'efficacité de *quench*, la conception des fragments dimaléimides dM16 et dM21 a donc été repensée. Ainsi, il a été raisonné qu'en modifiant simplement la disposition des substituants sur l'anneau aromatique central, il serait possible de réduire considérablement la distance entre les groupements maléimides et le

fluorophore. Effectivement, plutôt que de placer les groupements maléimides et le fluorophore aux positions 1,3,5 de l'aromatique central, il a été pensé qu'il serait plus avantageux, au niveau du *quench* de la fluorescence, de placer le fluorophore entre les deux maléimides, soit de disposer les trois substituants en positions 1,2,3 de l'anneau phénylène. Tel qu'illustré à la Figure 4.8, ce nouveau concept conserve sa rigidité, mais fixe plutôt le fluorophore entre les deux maléimides, à une distance comparable aux fluorogènes de 2^e et 3^e générations, permettant d'envisager un caractère fluorogène satisfaisant pour cette nouvelle famille de fluorogènes.

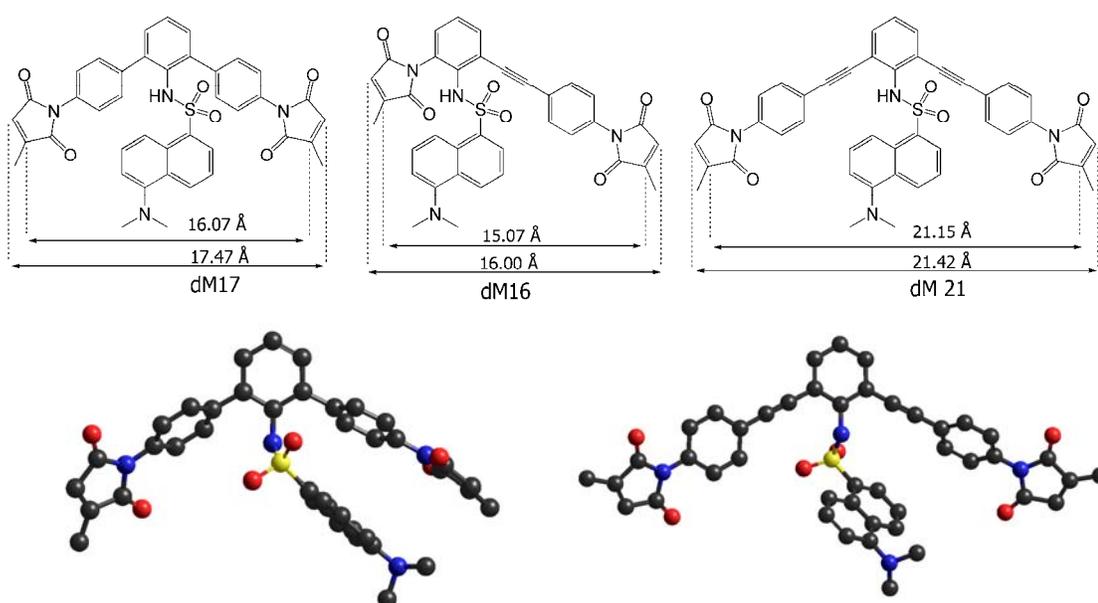


Figure 4.8. Structures de la deuxième famille de fragments dimaléimides et représentation 3D des fluorogènes dansyl-dM16 et dansyl-dM21 (voir partie expérimentale, section 7.3).

4.2.4. Synthèse et évaluation d'un composé modèle

Avant d'entreprendre la synthèse des dimaléimides présentés à la Figure 4.8, l'effet de la distance générée par le bloc éthylnylbenzène, à la base de la première famille de dM16 et dM21, sur l'efficacité de *quench* à

d'abord été étudiée afin de valider la nécessité pour une deuxième famille de fragments dimaléimides. Pour ce faire, le composé modèle **4.7** a été synthétisé, lequel ne présente qu'un seul maléimide (Schéma 4.2). La synthèse linéaire de ce composé modèle est amorcée par le couplage du chlorure de dansyl avec la *m*-éthynylaniline en présence d'un équivalent de DMAP et de pyridine, menant au composé **4.4** avec un rendement de 53 % (Schéma 4.2). Le composé **4.5** est ensuite obtenu suite au couplage de Sonogashira quantitatif de **4.4** avec le *p*-iodo-nitrobenzène. Le composé modèle est enfin obtenu suite à la réduction du groupement nitro dans les conditions classiques au chlorure d'étain⁹⁴ et à la formation du maléimide selon les conditions préalablement décrites.

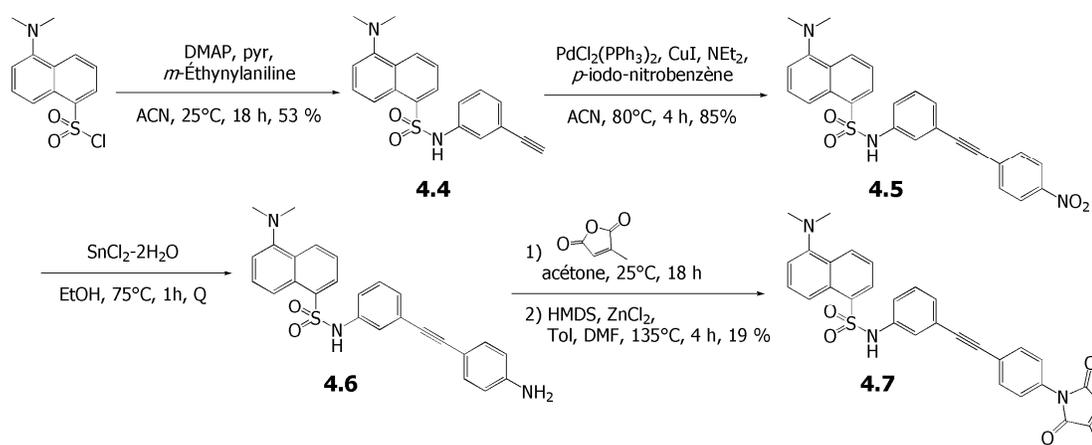


Schéma 4.2. Voie de synthèse linéaire du composé modèle **4.7**.

De manière analogue aux fluorogènes de deuxième et troisième générations, le caractère fluorogène du composé modèle **4.7** a été étudié suite à sa réaction avec un excès de MPA. Les intensités de fluorescence initiale et finale sont présentées à la Figure 4.9, où il est possible de voir qu'une faible augmentation de fluorescence a été enregistrée, soit un FE de 1.23. Tel qu'envisagé, la distance entre le maléimide et le fluorophore

⁹⁴ a) Benin, V.; Pink, P. K.; Young, V. G. Jr. *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 6388-6397. b) Andreani, R.; Bombelli, C.; Borocci, S.; Lah, J.; Mancini, G.; Mencarelli, P.; Vesnaver, G.; Villani, C. *Tet.-Asymmetry*, **2004**, *15*, 987-994.

engendrée par l'unité éthynylbenzène est maintenant telle que l'efficacité du *quench* de la fluorescence est drastiquement diminuée.

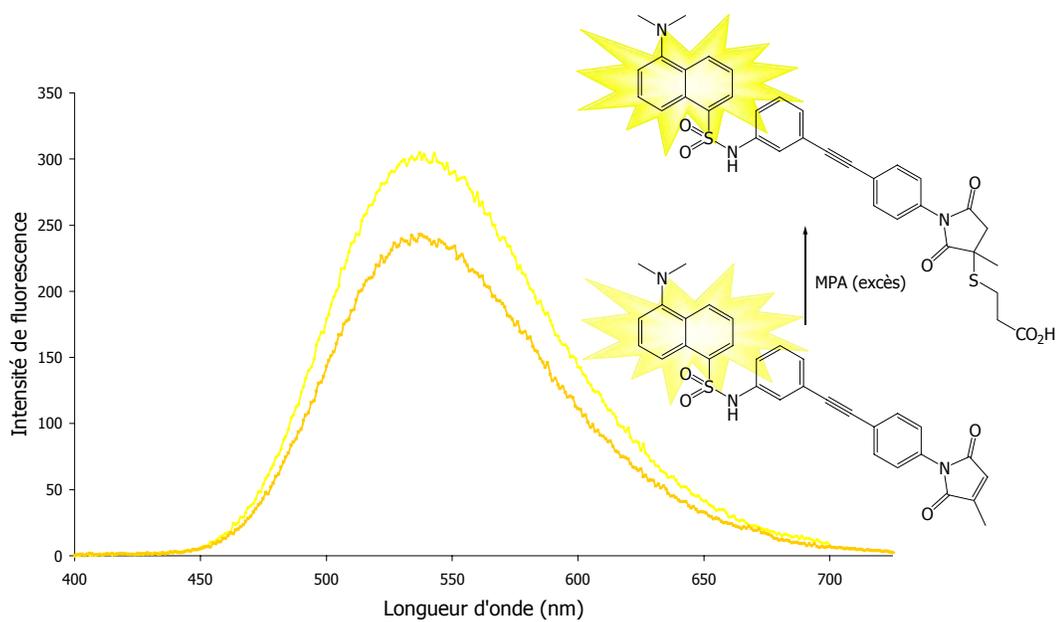


Figure 4.9. Détermination du facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) du composé modèle **4.7**. ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$, DMSO).

4.3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Avant que la synthèse du premier fluorogène-dM20 n'ait été complétée, les résultats des études d'efficacité de *quench* présentées aux chapitres 2 et 3 ont suggéré que la structure de la première famille de fragments dimaléimides pourrait nuire significativement à l'efficacité de *quench*. Ainsi, une deuxième famille de fragments dimaléimides a été conçue de manière à réduire la distance séparant les maléimides du fluorophore. Avant d'entreprendre la synthèse de ceux-ci, un composé modèle à l'image des fluorogènes de troisième génération a d'abord été synthétisé et confirme que l'efficacité de *quench* d'un tel fluorogène sera à peu près nulle, ce qui justifie donc la nécessité de la deuxième famille de fragments dimaléimides.

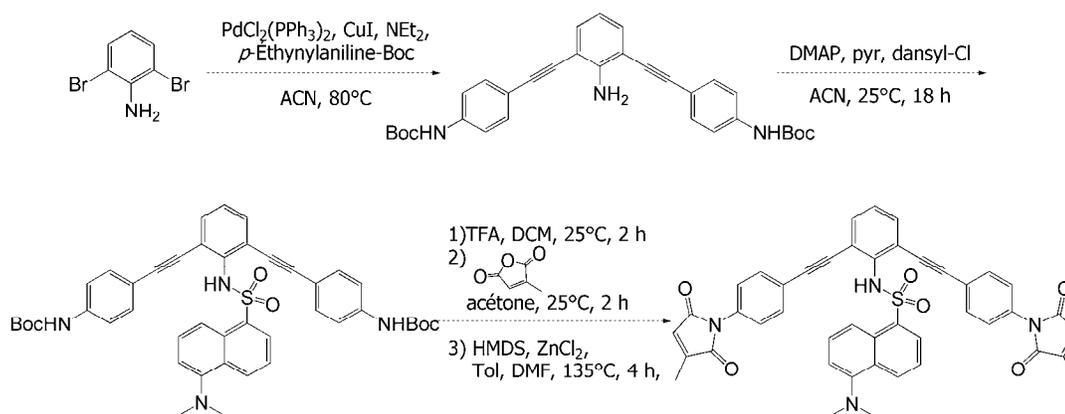


Schéma 4.3. Voie de synthèse envisagée pour le fluorogène dansyl-dM21.

Le nouveau fragment dM21 présenté à la Figure 4.8 pourra être obtenu de manière linéaire à partir de composés commerciaux tel que le 2,6-dibromoaniline et la *p*-éthynylaniline. Pour y parvenir, une voie synthétique en quatre étapes a déjà été établie, où chacune d'entre elles a été empruntée précédemment dans le groupe ou est présentée dans la littérature (Schéma

4.3). Il est à noter que le couplage de Sonogashira⁹⁵ pourra être réalisé selon le protocole discuté plus haut, où la purification sera simplifiée du fait des groupements Boc de l'éthynylaniline. Effectivement, l'addition simple ou double de l'éthynylbenzène n'étant pas proportionnelle au nombre d'amine libre sur le fragment, la séparation de ces deux produits sur silice s'en verra assurément simplifiée.

Contrairement à la première famille de dimaléimides, il a été envisagé de préserver une symétrie pour le fragment dM17, afin d'assurer la sélectivité du marquage. Effectivement, puisque l'efficacité de *quench* repose sur la distance qui sépare le fluorophore des maléimides, il est donc préférable qu'elle soit la même pour chacun des deux maléimides afin que l'augmentation de fluorescence résultant d'une addition de thiol sur un des maléimides soit indépendante du maléimide ayant réagit. Plus précisément, si l'efficacité de *quench* d'un maléimide était supérieure à celle du second, il pourrait en résulter une perte importante au niveau de la sélectivité de la méthode de marquage.

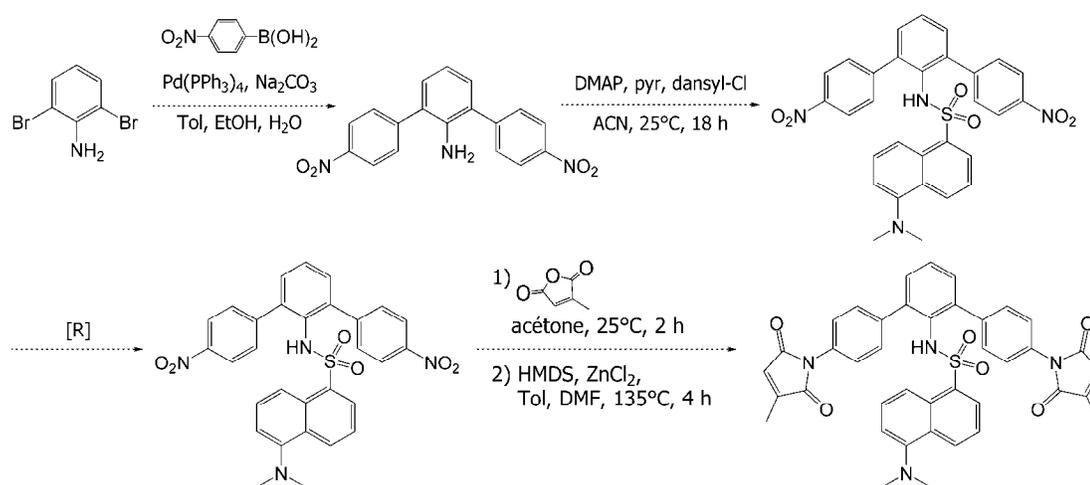


Schéma 4.4. Voie de synthèse envisagée pour le fluorogène dansyl-dM17.

⁹⁵ a) Lim, Y.-K.; Jiang, X.; Bollinger, J. C.; Lee, D. *J. Mater. Chem.*, **2007**, *17*, 1969-1980 b) Lim, Y.-K.; Jiang, X.; Bollinger, J. C.; Lee, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 11732-11733.

Ainsi, la synthèse du nouveau fragment dM17 pourra être effectuée selon une voie de synthèse similaire à celle envisagée pour le dM21, où la différence majeure réside en le couplage de Sonogashira ici devenu un couplage de Suzuki-Miyaura, donnant accès à la structure triphénylène du fragment. Comme pour le couplage de Sonogashira, une telle double addition de Suzuki-Miyaura est répertoriée dans la littérature pour ce même substrat, suggérant des conditions classiques en présence de Na_2CO_3 aqueux, dans un mélange de toluène/éthanol avec de bons rendements.⁹⁶ Les étapes subséquentes ayant été utilisées préalablement dans le groupe, le nouveau fragment dM17 pourra sans doute être obtenu en suivant les quatre étapes présentées au Schéma 4.4. Bien qu'une plus grande différence entre les distances intermaléimides soit favorable pour un marquage orthogonal, le fluorogène-dM17 pourrait tout de même être avantageux par rapport au fluorogène-dM21. Effectivement, malgré le fait qu'une moins grande discrimination entre le dM10 et le dM16 soit envisagée, ce dernier pourrait néanmoins présenter des avantages photophysiques et cinétiques par rapport à son analogue dM21. Ainsi, pour fins de comparaison, le fluorogène-dM17 sera synthétisé parallèlement au fluorogène-dM21.

Une fois la synthèse des nouveaux fluorogène dansyl-dM17 et dansyl-M20, les tests de discrimination cinétique pourront alors être menés. Pour ce faire, les constantes de vitesse d'addition des fluorogènes -dM17 et -dM21 seront déterminées pour chacune des protéines tests MBP-dC10, MBP-dC15 et MBP-dC20. Ainsi, il sera possible de d'assembler fluorogènes et hélices- α selon les constantes de vitesse afin d'identifier des paires de marqueurs fluorogènes orthogonales.

⁹⁶ a) Meinhard, D.; Wegner, M.; Kipiani, G.; Hearley, A.; Reuter, P.; Fischer, S.; Marti, O.; Rieger, B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9182-9191. b) Bastero, A.; Francio, G.; Leitner, W.; Mecking, S. *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 6110-6116.

CHAPITRE 5

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE MARQUAGE

Au cours des derniers mois, différentes collaborations ont pris formes au sein du groupe Keillor, permettant d'entrevoir les possibilités d'application de la méthode de marquage protéique fluorogène développée dans le groupe. Ainsi, trois de ces collaborations sont présentées ci-dessous, chacune ayant trait à des problématiques différentes. Effectivement, l'application de la présente méthodologie à l'étude de l'orientation spatiale d'une protéine avec le Pr Zenisek à *Yale University*, l'évaluation de la cinétique de sécrétion de protéines effectrices avec la Pr Palmer à *University of Colorado*, ainsi que l'étude du repliement d'une protéine avec la Pr Dasantila Golemi-Kotra à *York University* démontrent bien la nécessité d'une telle méthode de marquage, mais aussi la versatilité de la dite méthode. Enfin, puisque ces collaborations n'ont pris forme que tout récemment, aucun résultat n'a encore été obtenu. Néanmoins, une brève présentation de chacune d'entre elles suivent dans les prochaines pages.

5.1. MARQUAGE FLUOROGÈNE D'UNE PROTÉINE : ÉTUDE DE L'ORIENTATION DES PROTÉINES PAR FLUORESCENCE POLARISÉE

5.1.1. Intérêts de recherche du groupe Zenisek⁹⁷

Les intérêts de recherche du groupe Zenisek se concentrent autour de l'étude de la fonction présynaptique, plus précisément la compréhension du rôle de l'élément présynaptique dans le phénomène de sécrétion des neurotransmetteurs. Comme une grande majorité des cellules eucaryotes, les neurones sécrètent, par exocytose entre autre, différentes molécules. Les neurones se démarquent cependant du lot par leur grande vitesse de sécrétion et par leur aptitude à réguler l'orientation spatiale de celle-ci. Ainsi, le principal objectif du groupe Zenisek est de mettre en lumière le mécanisme derrière les capacités hors pair de ces terminaisons présynaptiques.

De manière plus concrète, la méthodologie de marquage protéique mise au point dans le groupe Keillor rejoint les intérêts du groupe Zenisek au niveau de l'étude du changement d'orientation de protéines membranaires, intracellulaires et extracellulaires. Dans le but d'appliquer la fluorescence polarisée (TIRFM) à une telle étude, la protéine d'intérêt est d'abord marquée par un des fluorogènes développés dans notre groupe, puis irradiée, selon différentes orientation, par un faisceau de lumière polarisée. Ainsi, en fonction de l'émission fluorescente en provenance du marqueur protéique, il serait possible de déduire l'orientation spatiale de ce dernier et donc celle de la protéine.⁹⁸

⁹⁷ Site du groupe Zenisek :

<http://visionresearch.med.yale.edu/Ophthalmology/people/david.html> (08/11/2009)

⁹⁸ Zenisek, D.; Steyer, J. A.; Feldman, M. E.; Almers, W. *Neuron*, **2002**, *35*, 1085-1087.

5.1.2. Collaboration entre les groupes Zenisek et Keillor

Bien que d'autres méthodes de marquage protéique par fluorescence soient disponibles, telles que la fusion de la GFP ou bien le SnapTag, elles ont en commun le désavantage de ne présenter qu'un seul point d'attache très peu rigide, permettant une liberté de mouvement pouvant nuire à la présente étude. Effectivement, puisque l'orientation du marqueur fluorescent sera l'indication principale de l'orientation de la protéine à l'étude, les deux points d'ancrage que présentent les fluorogènes du groupe Keillor présentent non seulement la clé du marquage sélectif des protéines, mais aussi un avantage certain au niveau de la rigidité et de l'orientation du marqueur fluorescent.

Ainsi, devant une meilleure compréhension de la problématique, un premier fluorogène est présentement utilisé au sein du groupe Zenisek, soit le dérivé de dansyl **3.9**, issu de la troisième génération (Figure 5.1). Tel que discuté au chapitre 3, le lien sulfonamide reliant la partie dimaléimide au fluorophore dans le composé **3.9** présente une certaine rigidité conformationnelle pouvant expliquer l'efficacité du *quench* observée précédemment. Bien que l'efficacité de *quench* du fluorogène ne soit pas critique dans le cas présent, la rigidité de ce dernier représente néanmoins un atout pour la technique utilisée.

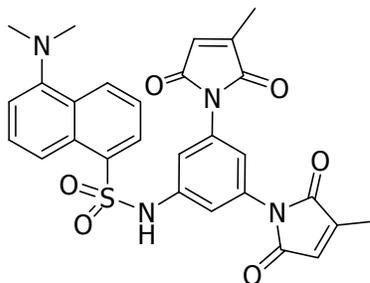


Figure 5.1. Fluorogène **3.9** issu de la troisième génération.

Puisque le critère de première importance des fluorogènes utilisés en fluorescence polarisée est la rigidité, un nouveau fluorogène plus rigide que le composé **3.9** a été développé dans le groupe. Tel que présenté à la figure 5.2, il est possible de condenser deux groupements pyrrole sur un chlorure d'acyle ou un aldéhyde pour donner, suite à la réduction et la complexation avec le $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$, une gamme de fluorophores connus sous le nom de BODIPY (*Boron di Pyrrole*).⁹⁹ Outre ses caractéristiques photophysiques forts intéressantes, le dérivé de BODIPY présenté ci-dessous a l'avantage d'être lié à l'anneau phényle du dimaléimide par un lien C-C, conférant un degré de liberté quasi-nul au fluorophore. Ainsi, bien qu'une rotation libre autour de ce lien C-C soit possible, cette dernière n'influencera en rien l'orientation de l'émission de fluorescence polarisée, faisant de ce fluorogène un marqueur des plus intéressants pour cette application précise.

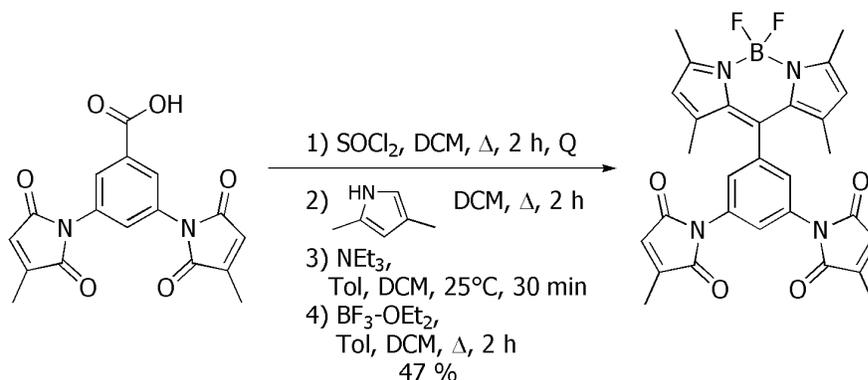


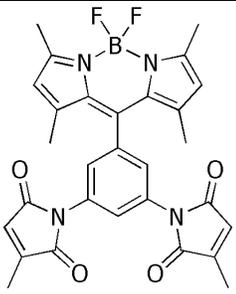
Schéma 5.1. Voie de synthèse du fluorogène (**5.1**) dérivé du BODIPY.

Le caractère fluorogène du composé **5.1** a été étudié de manière analogue aux fluorogènes présentés aux chapitres précédents. Bien que la bande d'excitation à 502 nm ne permette pas la comparaison des aires sous la courbe pour le calcul du FE, il a cependant été possible de comparer les

⁹⁹ a) Matsumoto, T.; Urano, Y.; Shoda, T.; Kojima, H.; Nagano, T. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 3375-3377. b) Amat-Guerri, F.; Irias, M.; Carrascoso, M. L.; Satre, R. *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77, 577-584.

intensités de fluorescence initiale et finale à 514 nm (Figure 5.2) pour trouver un FE de 3.5. Bien que cette valeur soit inférieure à celle du fluorogène **3.8**, l'augmentation de fluorescence est néanmoins suffisante pour pouvoir être utilisée dans l'application décrite ci-haut.

Tableau 5.1. Caractéristiques photophysiques du fluorogènes **5.1**.

	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{ém}}$ (nm)	Facteur FE
	502	514	3.5

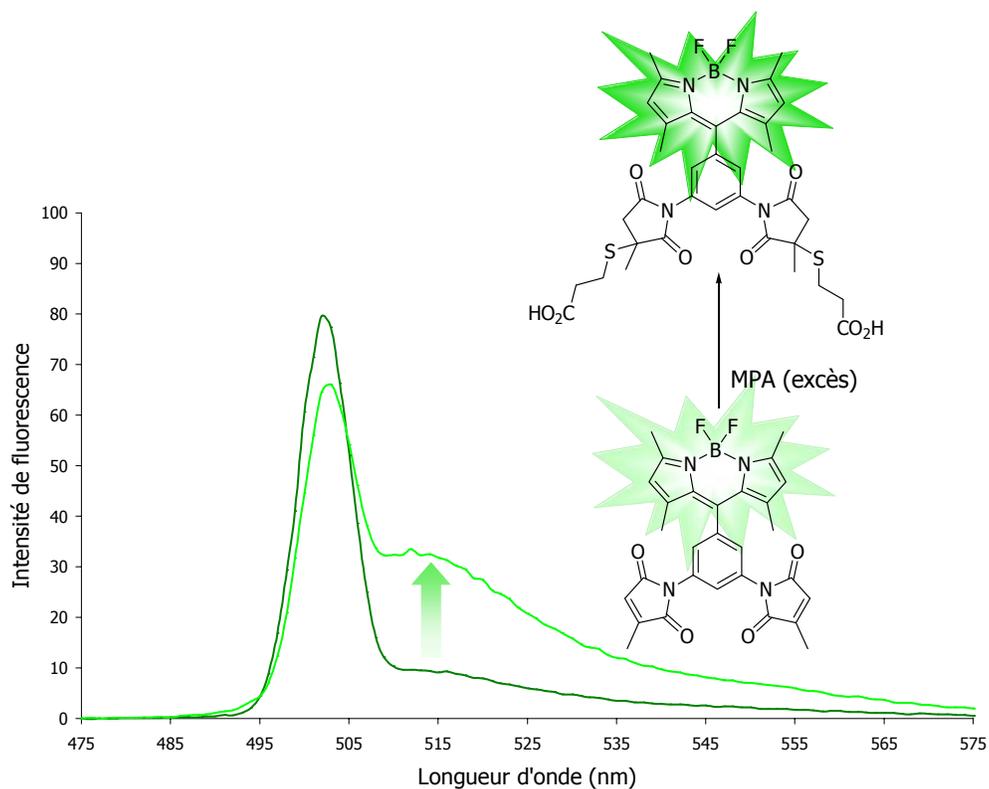


Figure 5.2. Détermination du facteur d'augmentation (FE) du fluorogène **5.1** ($\lambda_{\text{ex}} = 502$ nm; $\lambda_{\text{ém}} = 514$ nm).

5.2. MARQUAGE D'UNE PROTÉINE EFFECTRICE : ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE D'INFECTION D'UNE CELLULE MAMMIFÈRE

5.2.1. Intérêts de recherche du groupe Palmer¹⁰⁰

Les intérêts du groupe Palmer gravitent autour du mécanisme d'invasion des cellules mammifères par les bactéries à Gram négatif, tel que la *Salmonella*. Cet intérêt particulier s'explique par l'évolution du mécanisme d'invasion de ces bactéries, lequel implique une gamme de protéines effectrices. Ces dernières traversent d'abord la membrane pour se lier aux protéines de la cellule mammifère et ainsi prendre le contrôle de la cellule. Dans cette optique, les activités de recherche du groupe Palmer se concentrent sur le développement de méthode d'imagerie de ces processus d'invasion afin de comprendre le rôle des différentes protéines effectrices impliquées dans un tel phénomène.

La cinétique d'infection d'une cellule par les protéines effectrices bactériennes est couramment étudiée par immunobuvardage ou bien par immunofluorescence, lesquels ont cependant peu de résolution temporelle. Il est aussi possible de procéder indirectement par des expériences enzymatiques (*enzymatic assays*), bien que seule une faible résolution spatiale en soit tirée. Enfin, le marquage direct des effecteurs par des protéines fluorescentes ne peut être envisagé en raison de la gêne stérique qu'ils entraînent. Ainsi, le groupe Palmer s'est tourné vers le *FIAsh Labelling* pour marquer les protéines effectrices d'intérêt et ainsi étudier, en direct, la translocation de ces protéines bactériennes en suivant la disparition de celles-ci.¹⁰¹

¹⁰⁰ Site du groupe Palmer : <http://www.colorado.edu/chemistry/palmerlab/Research.html> (08/11/2009)

¹⁰¹ VanEngelenburg, S. B.; Palmer, A. E. *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 619-628.

5.2.2. Collaboration entre les groupes Palmer et Keillor

Tel que discuté au chapitre 1, le *FIAsH Labelling* présente plusieurs avantages, mais aussi bon nombre d'inconvénients non négligeables, tel que la toxicité de l'arsenic, la nécessité d'utiliser des solutions antidotes pour laver l'excès de marqueur, s'additionnant à la réversibilité du marquage. Suite aux premiers résultats positifs obtenus en appliquant cette méthode, le groupe Palmer s'est ensuite intéressé à appliquer la méthode de marquage développée dans le groupe Keillor. Puisque le critère le plus important pour l'application présentée ci-haut est la minimisation du bruit de fond, le fluorogène **3.8** a donc été choisi.

5.3. ÉTUDE DU REPLIEMENT D'UNE PROTÉINE À L'AIDE D'UNE RÉACTION FLUOROGÈNE SPÉCIFIQUE

5.3.1. Intérêts de recherche du groupe Golemi-Kotra¹⁰²

Les intérêts du groupe Golemi-Kotra se situent au niveau des infections virales et bactériennes. Ce type d'infections reposant souvent sur l'interaction entre différentes biomolécules, le groupe de recherche se concentre donc, dans un premier temps, sur les interactions protéines-protéines impliquées lors de l'infection d'une cellule mammifère humaine par le VIH (*human immunodeficiency virus*). Dans un autre ordre d'idées, le groupe Golemi-Kotra s'intéresse au mécanisme d'induction du facteur de résistance aux antibiotiques. La stratégie d'une classe d'antibiotiques, regroupant les β -lactames et la vancomycine, pour lutter contre l'infection bactérienne consiste en l'inhibition de la biosynthèse des peptidoglycans, l'unité de base de la paroi cellulaire des bactéries. Ainsi, le groupe Golemi-Kotra s'intéresse au mécanisme de résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*. La réponse de *S. aureus* face à une attaque antibiotique semble être coordonnée par une voie de signalisation impliquant les protéines VraS (*response regulator protein*) et VraR (*histidine protein kinase*). Cette dernière ayant été associée à la coordination de cette réponse, le groupe s'intéresse donc à la dynamique, ou plus précisément au repliement d'une région hélicoïdale de VraR.

¹⁰² Site du groupe Golemi-Kotra: <http://www.yorku.ca/dgkotra/> (08/11/2009)

5.3.2. Collaboration entre les groupes Golemi-Kotra et Keillor

Pour ce faire, ils ont fait la mutation de deux résidus de l'hélice- α comprise dans VraR pour y insérer deux résidus cystéine. Ces derniers ont été disposés de manière à ce qu'ils soient distancés par 10 Å dans la forme repliée de l'hélice- α . Ainsi, la distance entre les résidus cystéine étant supérieure à 10 Å dans la forme dépliée de l'hélice- α , seule la forme repliée serait réactive vis-à-vis un fluorogène-dM10, permettant alors la détection de cette conformation.¹⁰³

L'étude conformationnelle présentée ci-haut reposant sur une réponse fluorogène, il a donc été choisi d'utiliser le composé ayant le plus grand facteur d'augmentation de la fluorescence, soit le fluorogène **3.9**.

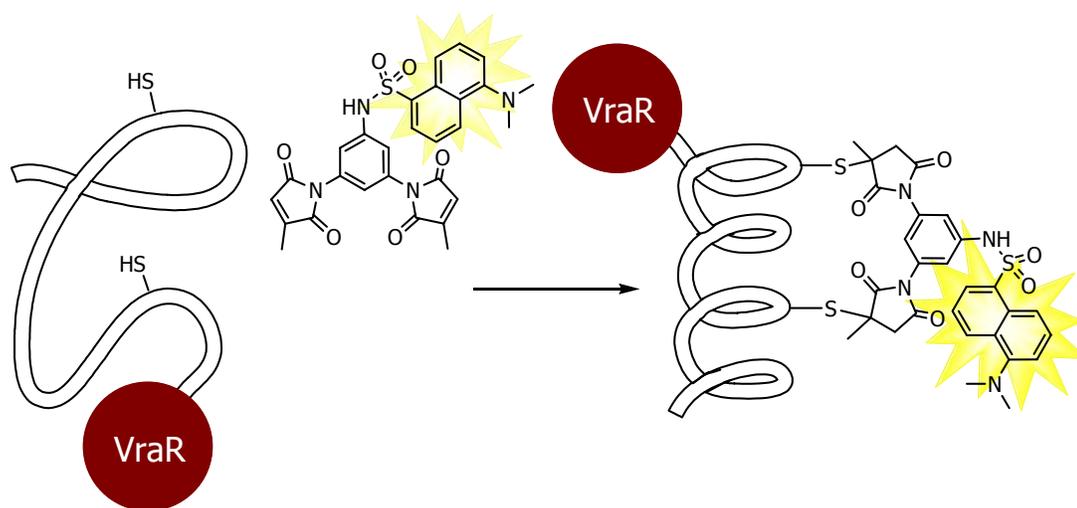


Figure 5.3. Étude du repliement de la région hélicoïdale de VraR, à l'aide de la méthode de marquage du groupe Keillor.

¹⁰³ Belcheva, A.; Golemi-Kotra, D.; *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 12354-12364.

CHAPITRE 6

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6.1. CONCLUSION

6.1.1. Étude de l'influence conformationnelle sur l'efficacité du *quench*

L'étude de l'influence de la conformation induite par l'espaceur sur l'efficacité du *quench* de la fluorescence a permis de corroborer l'hypothèse émise suite à l'élucidation du mécanisme de *quench* de la fluorescence par les maléimides. Effectivement, bien qu'il ait été suggéré que le PET (*Photoinduced Electron Transfer*) se produise préférentiellement dans l'espace plutôt qu'à travers les liens chimiques d'une molécule, les résultats de l'étude présentée au chapitre 2 corroborent cette idée.

De plus, l'élaboration de la série de fluorogènes dérivés de coumarine a permis d'améliorer l'efficacité du *quench* de la fluorescence pour cette catégorie de fluorogènes. En plus d'avoir permis l'ajout des fluorogènes à base de coumarine à la deuxième génération de fluorogènes, cette étude a aussi mené au développement d'une troisième génération plus prometteuse de fluorogènes.

6.1.2. Fluorogènes de troisième génération

Dans le but de diminuer le bruit de fond de la méthode de marquage protéique, donc d'améliorer le *quench* de la fluorescence initiale des marqueurs, une troisième génération de fluorogènes a été développée. Sur la base des résultats obtenus au chapitre 2, il a été choisi d'éliminer complètement l'espaceur pour relier directement les fragments dimaléimides au fluorophore. De cette idée ont découlé deux nouveaux fluorogènes dont la différence entre les facteurs d'augmentation de la fluorescence (FE) suggère un avantage structurel de la géométrie tétraédrique des

sulfonamides. Enfin, à notre connaissance, un des plus grands facteurs d'augmentation de la fluorescence pour un tel système a été observé avec le fluorogène **3.9**, plaçant ce dernier dans une classe à part.

6.1.3. Perspectives

À ce jour, deux fluorogènes de troisième génération ont été synthétisés et caractérisés, dont un seul se démarque considérablement au niveau de son facteur d'augmentation de la fluorescence. Un des objectifs futurs serait alors d'élaborer cette nouvelle génération de fluorogènes afin d'avoir sous la main une série de composés dont le FE est aussi significativement supérieur à ceux des fluorogènes de deuxième génération.

De manière analogue au dérivé de BODIPY présenté au chapitre 5, il serait possible de synthétiser un fluorogène BODIPY-dM10 ou le fluorophore est placé en *ortho* des deux groupements maléimides, tel qu'illustré à la figure 6.1. Sur la base des résultats obtenus au chapitre 5 et de résultats figurant dans la littérature, ce marqueur fluorogène de protéine a le potentiel de présenter un FE de l'ordre de celui obtenu pour le composé **3.9**.

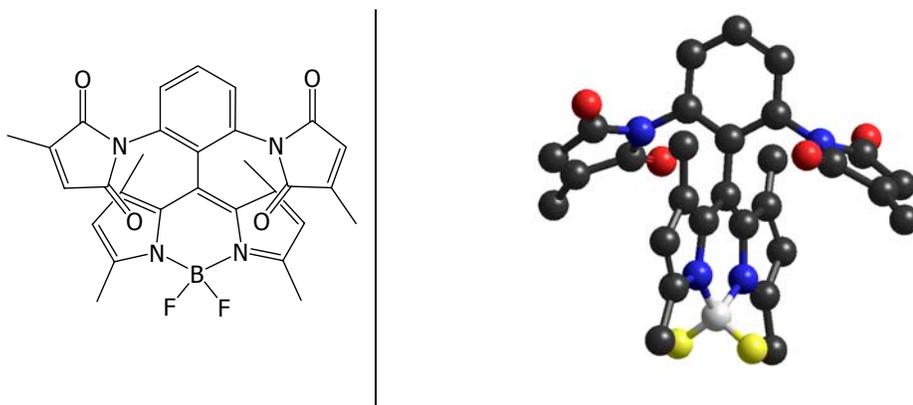


Figure 6.1. Analogue du fluorogène BODIPY-dM10 **5.1**.

(voir partie expérimentale, section 7.3)

Tel que mentionné au chapitre 4, les fragments dimaléimides dM17 et dM21 seront synthétisés afin de créer des paires de fluorogènes orthogonales permettant le marquage de plus d'une protéine simultanément. La synthèse et l'évaluation du composé modèle **4.7** ayant démontré les limitations conceptuelles de la première famille de fragments dimaléimides, une deuxième famille de fragments situant le fluorophore entre les deux maléimides a donc été conçue. Les voies de synthèse établies à partir d'étapes synthétiques connues dans le groupe ou répertoriées dans la littérature rendent l'obtention de ces nouveaux fragments possibles.

Enfin, des projets de collaborations appliquant la méthodologie développée dans le groupe ont pris naissance au cours des derniers mois, permettant d'entrevoir une fraction des possibilités pour une telle méthode de marquage protéique. Les développements de ces projets étant à ce jour à l'état initial, il n'en reste pas moins que l'intérêt démontré par des groupes issus de différentes disciplines est un bon indicateur du besoin grandissant pour une telle technique. Les résultats découlant de telles collaborations pourront assurément mettre en évidence les points forts, mais aussi les lacunes de la méthode de marquage permettant ainsi son optimisation.

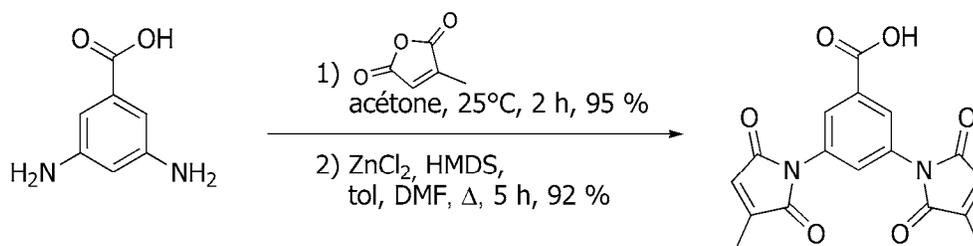
CHAPITRE 7

PARTIE EXPÉRIMENTALE

7.1. GÉNÉRALITÉS

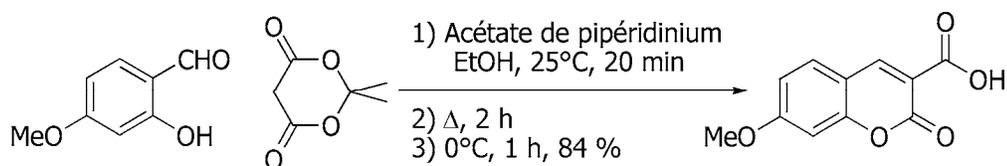
Les produits ont été achetés chez Sigma aldrich et VWR et ont été utilisés tel quel, sans purification supplémentaire. Les solvants ont été séchés à l'aide du *GlassContour System Column* (Irvine, CA). Les réactions nécessitant une atmosphère inerte se sont déroulées sous atmosphère d'azote. Les spectres du proton et du carbon ont été enregistrés à l'aide des spectromètres AMXR400 et AMX300. Les spectres de masse ont été effectués par ionisation ESI à l'aide d'un spectromètre AutoSpec Q au centre Régional de spectroscopie de masse de l'Université de Montréal. Les points de fusion (non-corrigés) ont été déterminés à l'aide d'un appareil EZ-Melt (SRS).

7.1.1. Synthèses organiques : Chapitre 2



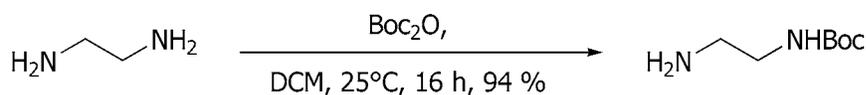
Acide 3,5-di-(2-méthylmaléimido)-benzoïque (2.1) : À une solution d'acide 3,5-diaminobenzoïque (1.0 g, 6.58 mmol) dans l'acétone (40 mL) est additionné l'anhydride citraconique (1.8 mL, 19.74 mmol) après quoi le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 2 heures. Le solvant est évaporé à sec et le solide obtenu est trituré dans Et₂O et filtré sous pression réduite menant à l'acide amique correspondant sous la forme d'un solide poudreux beige (2.34 g, 6.22 mmol, 95 %) qui est utilisé tel quel sans purification supplémentaire. L'acide amique (500 mg, 1.33 mmol) est solubilisé dans la DMF (5 mL), puis le toluène (40 mL) est ajouté, suivi de ZnCl₂ (544 mg, 3.99 mmol) et HMDS (1.13 mL, 5.98 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 5 heures après quoi les solvants sont évaporés. Un solide blanc cassé (417 mg, 1.22 mmol, 92 %) est précipité de l'huile obtenue en ajoutant une solution de HCl 1 M (30 mL).

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.94 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.62 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.83 (q, *J* = 1.8 Hz, 2H), 2.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 6H); **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 170.4, 169.5, 166.2, 146.2, 132.8, 132.2, 128.2, 127.8, 126.0, 11.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₇H₁₃N₂O₆ [M+H]⁺: 341.0768. Trouvée : 341.0770. **p.f.** 254°C (dec)



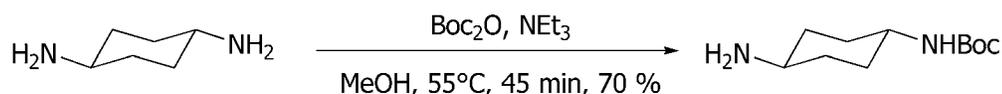
Acide 7-méthoxycoumarine-3-carboxylique (2.2) : Le 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde (3.0 g, 20 mmol) et le 2,2-diméthyl-1,3-dioxane-4,6-dione (2.89 g, 20 mmol) sont mis en solution dans l'éthanol (10 mL), suivis de l'acétate de pipéridium (58 mg, 0.4 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 20 minutes, puis 2 heures à reflux avant d'être agité à 0°C pendant 1 heure après quoi les cristaux blanc cassé obtenus sont filtrés sous pression réduite (3.71 g, 16.9 mmol, 84 %).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.72 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 3.89 (s, 3H); **RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6)** δ 165.9, 165.5, 158.5, 158.2, 150.4, 115.1, 114.6, 112.9, 101.5, 57.5; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 243.0266. Trouvée : 243.0264. **p.f.** 169°C



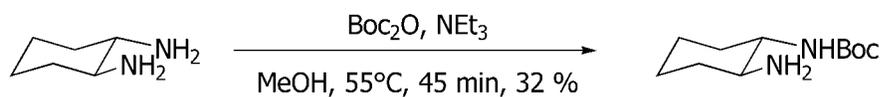
tert-butyl 2-aminoéthylcarbamate (2.6 a) : À une solution d'éthylène diamine (10 mL, 150 mmol) dans le DCM distillé (50 mL) est additionné une solution de Boc_2O (327 mg, 15 mmol) dans le DCM distillé (10 mL). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 16 heures après quoi la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na_2CO_3 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec pour donner **3a** sous la forme d'huile incolore (2.24 g, 14 mmol, 94 %).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5.09 (s (l), 1H), 3.12 (dd, $J_1 = J_2 = 5,8$ Hz, 2H), 2.74 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 1.61 (s, 2H), 1.38 (s, 9H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 156.3, 79.2, 43.3, 41.8, 28.4; **MS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 161.12. Trouvée : 161.13.



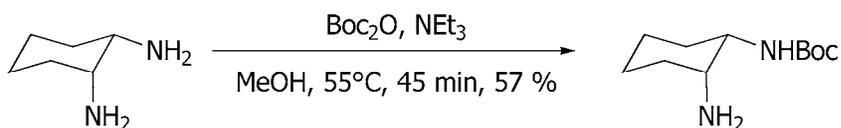
trans-tert-butyl-2-aminocyclohexylcarbamate (2.6 b) : À une solution du 1,4-diaminocyclohexane (600 mg, 5.25 mmol) dans le MeOH (50 mL) sont additionnés une solution de Boc_2O (1.14 g, 5.25 mmol) dans le MeOH (10 mL), puis la NEt_3 (2.42 mL, 17.3 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 55 °C pendant 40 minutes après quoi le solvant est évaporé. L'huile obtenue est reprise dans une solution de NaH_2PO_4 1 M (pH 4.2) et la phase aqueuse est extraite à l'éther, puis amenée à pH 9 avec une solution saturée en Na_2CO_3 avant d'être extraite de nouveau avec CHCl_3 . La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis évaporée à sec pour donner **2.6 b** sous la forme d'une pâte blanche (786 mg, 3.67 mmol, 70 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.37 (s (l), 1H), 3.39 (s (l), 1H), 2.21-2.28 (m, 1H), 1.99-1.89 (m, 2H), 1.69-1.66 (m, 2H), 1.41 (s (l), 9H), 1.38-1.33 (m, 5H) ; **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 156.1, 80.0, 50.8, 49.8, 36.2, 33.0, 32.9, 29.2. **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215.1754. Trouvée : 215.1754.



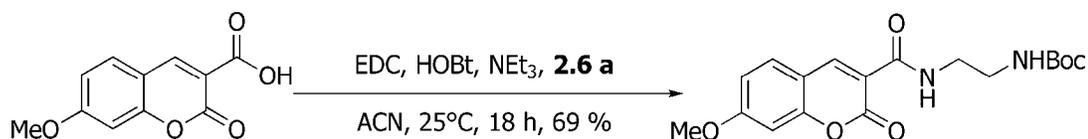
trans-tert-butyl-2-aminocyclohexylcarbamate (2.6 c) : Voir procédure expérimentale pour **2.6 b**. Une pâte jaune est obtenue (400 mg, 0.186 mmol, 32 %)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.49 (s, 1H), 3.12 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.44 (s, 9 H), 1.22 (m, 6H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 157.0, 80.1, 58.6, 56.4, 36.0, 33.7, 29.2, 26.0, 25.9; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₁H₂₂N₂O₂ [M+H]⁺: 215.1754. Trouvée : 215.1762.



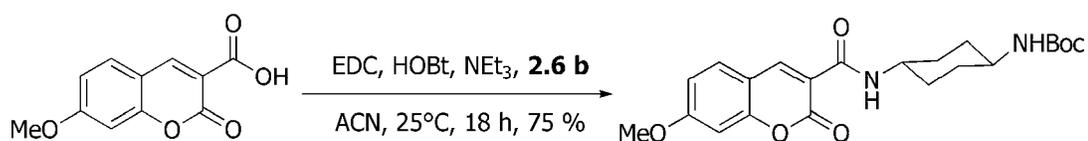
cis-tert-butyl-2-aminocyclohexylcarbamate (2.6 d) : Voir procédure expérimentale pour **2.6 b**. Une pâte blanche est obtenue (397 mg, 0.185 mmol, 57 %)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.98 (s, 1H), 3.60 (s, 2H), 3.00 (m, 2H), 1.58 (m, 5H), 1.43 (s, 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 156.5, 79.8, 52.5, 50.7, 32.9, 29.2, 28.8, 23.8, 21.6; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₁H₂₃N₂O₂ : 215.1754. Trouvée : 215.1756.



3-(2-*tert*-butoxycarbonylaminoéthyl)-aminocarbonyl-7-méthoxycoumarine (2.7 a) : À une suspension d'acide 7-méthoxycoumarine-3-carboxylique **2.2** (585 mg, 2.66 mmol) dans ACN sont additionnés la NEt_3 (0.44 mL, 3.19 mmol), EDC (612 mg, 3.19 mmol) et HOBT (431 mg, 3.19 mmol), suivis d'une solution de **2.6 a** (638 mg, 3.99 mmol) dans ACN (5 mL). Le milieu réactionnel est agité à 25 °C pendant 16 h après quoi le solvant est évaporé. Le produit brut est repris dans CHCl_3 et la phase organique est lavée successivement avec une solution saturée en Na_2CO_3 , puis HCl 0.1 M et ensuite séchée sur MgSO_4 et évaporée à sec pour donner **2.7 a** sous forme d'un solide blanc cassé (660 mg, 1.82 mmoles, 69 %).

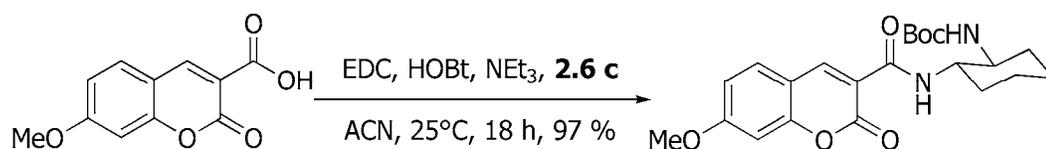
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.94 (s (l), 1H), 8.84 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.95 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.98, (s (l), 1H), 3.92 (s, 3H), 3.58 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.38 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.44 (s (l), 9H); **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)** δ 164.7, 162.6, 161.5, 156.5, 155.9, 148.2, 130.8, 114.4, 113.9, 112.1, 100.1, 79.2, 55.9, 40.5, 39.7, 28.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 363.1551. Trouvée : 363.1548.



***trans*-1-*tert*-butoxycarbonylamino-4-(7-méthoxycoumarine-3-carbonylamino)-cyclohexane (2.7 b) :** Voir procédure expérimentale pour **2.7 a**. Un solide blanc cassé est obtenu (282 mg, 0.677 mmoles, 75 %)

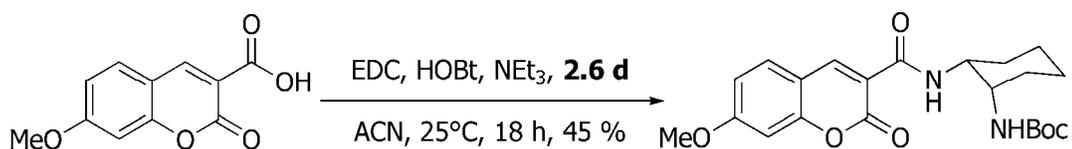
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.82 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.43 (s (l), 1H), 3.91 (s (l), 3H), 3.47 (s (l), 1H), 2.09-2.07 (m, 4H), 1.62 (s, 1H), 1.45 (s (l), 9H), 1.39-1.26 (m, 5H);

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 165.6, 162.6, 162.1, 157.4, 156.1, 149.0, 131.7, 115.6, 114.9, 113.2, 101.1, 80.0, 56.8, 49.7, 48.9, 32.9, 32.8, 32.3, 29.2; **HRMS (ESI)** : Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 439.1840. Trouvée : 439.1841.



trans-1-tert-butoxycarbonylamino-2-(7-méthoxycoumarine-3-carbonylamino)-cyclohexane (2.7 c) : Voir procédure expérimentale pour **2.7 a**. Un solide blanc cassé est obtenu (612 mg, 1.47 mmol, 97 %)

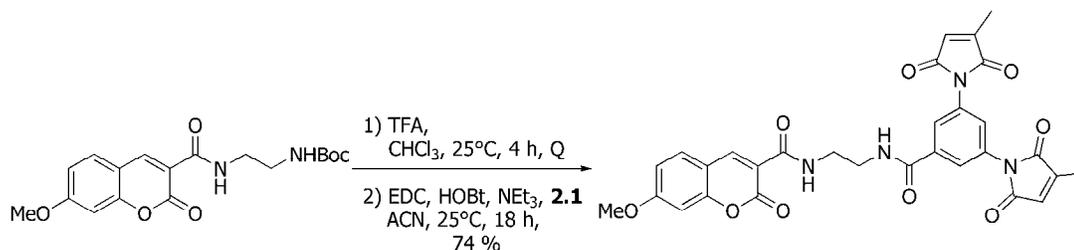
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.82 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.47 (m, 1H), 2.13 (m, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.41 (m, 4H), 1.33 (s, 9H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 165.6, 163.3, 162.2, 157.5, 156.6, 149.0, 131.7, 115.5, 114.8, 113.2, 101.2, 79.8, 56.8, 56.1, 54.0, 33.7, 33.2, 29.1, 25.7, 25.5; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 417.2020. Trouvée : 417.2032. **p.f.** 141°C



cis-1-tert-butoxycarbonylamino-2-(7-méthoxycoumarine-3-carbonylamino)-cyclohexane (2.7 d) : Voir procédure expérimentale pour **2.7 a**. Un solide blanc cassé est obtenu (256 mg, 0.615 mmol, 45 %)

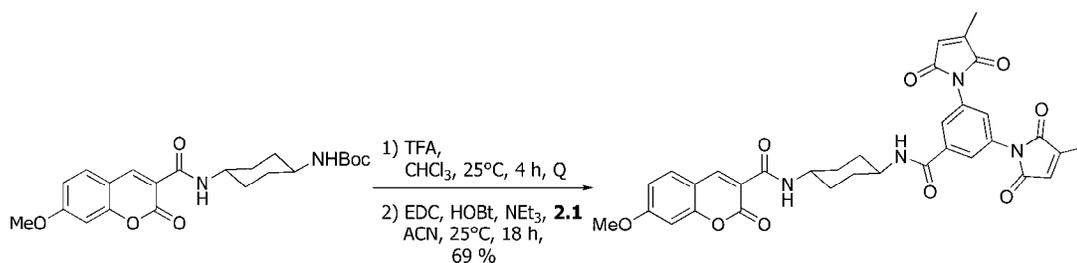
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 9.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.85 (s, 1H); 7.59 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J_1 = 2.4$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 5.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.39 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.71 (m, 2H), 1.56 (m, 5H), 1.43 (s, 9 H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 165.66, 162.83, 162.77, 157.47, 156.30, 149.20, 131.76, 115.64, 114.89, 113.24, 101.09, 80.16, 77.51,

77.45, 56.85, 50.02, 31.77, 30.17, 29.72, 29.22; **HRMS (ESI)** Calculée pour $C_{22}H_{29}N_2O_6$ $[M+H]^+$: 417.2020. Trouvée: 417.2020. **p.f.** 213°C



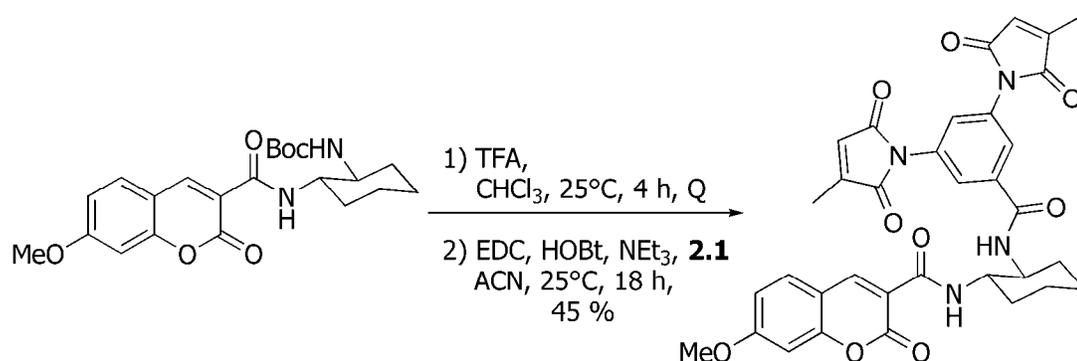
3-(2-(3,5-di-(2-méthoxymaléimido)-benzoylaminoéthylaminocarbonyl)-7-méthoxycoumarine (2.8 a): À une solution de **2.7 a** (435 mg, 1.20 mmol) dans le $CHCl_3$ est additionné le TFA (3.69 mL, 48 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 4 heures après quoi le solvant est évaporé. L'huile obtenue est triturée dans Et_2O pour donner le sel de TFA de l'amine correspondante qui est utilisée sans purification supplémentaire (Rdt Q). À une solution de **2.1** (489 mg, 1.44 mmol) dans ACN sont additionés EDC (277 mg, 1.44 mmoles), HOBT (195 mg, 1.44 mmol), NEt_3 (0.20 mL, 1.32 mmol) et une solution du sel de TFA dans ACN (5 mL) et NEt_3 (0.20 mL, 1.32 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi le solvant est évaporé et le solide obtenu est repris dans $CHCl_3$. La phase organique est lavée successivement avec une solution saturée de Na_2CO_3 puis de HCl 0.1 M avant d'être séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée à sec pour donner **2.8 a** sous forme d'un solide beige (521 mg, 0.892 mmol, 74 %).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.19 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.73 (s (l), 1H), 7.62-7.60 (m, 2H), 6.94 (dd, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.77-3.74 (m, 2H), 3.70-3.67 (m, 2H), 2.19 (s, 6H); **RMN ^{13}C (75 MHz, $DMSO-d_6$)** δ 171.5, 170.6, 166.1, 165.7, 163.2, 161.9, 157.5, 149.2, 147.2, 137.0, 133.9, 133.6, 132.8, 128.9, 125.8, 116.1, 114.9, 113.4, 101.5; **HRMS (ESI)** Calculée pour $C_{30}H_{25}N_4O_9$ $[M+H]^+$: 585.1616. Trouvée : 585.1610. **p.f.** 125°C



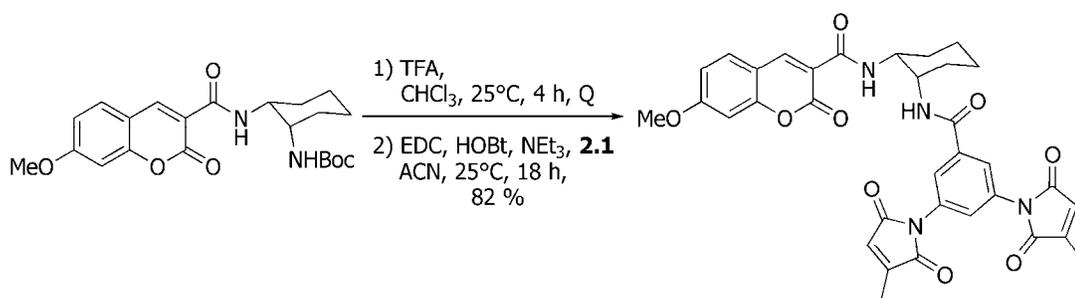
***trans*-1-*tert*-butoxycarbonylamino-4-(7-méthoxycoumarine-3-carbonyl-amino)-cyclohexane (2.8 b)** : Voir procédure expérimentale pour **2.8 a**. Un solide beige est obtenu (217 mg, 0.340 mmol, 69 %)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.82 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.4 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 6.06 (s (l), 1H), 4.02-3.99 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 2.19-2.17 (m, 8H), 1.48-1.41 (m, 6H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 170.8, 169.7, 165.9, 165.6, 162.6, 162.1, 157.4, 149.0, 146.9, 137.5, 133.4, 131.8, 128.6, 125.8, 125.6, 115.5, 114.9, 113.2, 101.0, 68.8, 56.9, 49.2, 49.0, 32.3, 26.4, 12.1, 12.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₃₄H₃₁N₄O₉ [M+H]⁺: 639.2086. Trouvée : 639.2079. **p.f.** 194°C



***trans*-1-*tert*-butoxycarbonylamino-2-(7-méthoxycoumarine-3-carbonyl-amino)-cyclohexane (2.8 c)** : Voir procédure expérimentale pour **2.8 a**. Un solide beige est obtenu (122 mg, 0.191 mmol, 47 %)

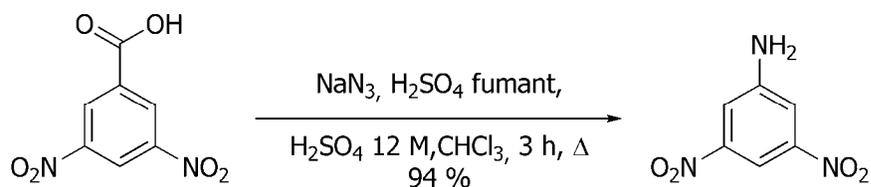
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (s, 1H), 8.88 (d, *J* = 7.80 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.45 (m, 1H), 6.85 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.7 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.45 (m, *J* = 1.8 Hz, 2H), 3.98 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.31 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 2.13 (s, 6H), 2.03 (m, 2H), 1.45 (m, 6H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 170.8, 169.7, 165.7, 165.4, 164.9, 162.5, 157.6, 150.5, 146.8, 137.2, 133.3, 133.2, 132.0, 128.4, 126.2, 124.4, 114.9, 113.4, 100.9, 58.2, 56.8, 53.0, 33.0, 32.7, 25.8, 25.1, 12.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₃₄H₃₁N₄O₉ [M+H]⁺: 639.2086. Trouvée : 639.2087. **p.f.** 212°C



***cis*-1-*tert*-butoxycarbonylamino-2-(7-méthoxycoumarine-3-carbonylamino)-cyclohexane (2.8 d)** : Voir procédure expérimentale pour 2.8 a. Un solide beige est obtenu (287 mg, 0.450 mmol, 82 %)

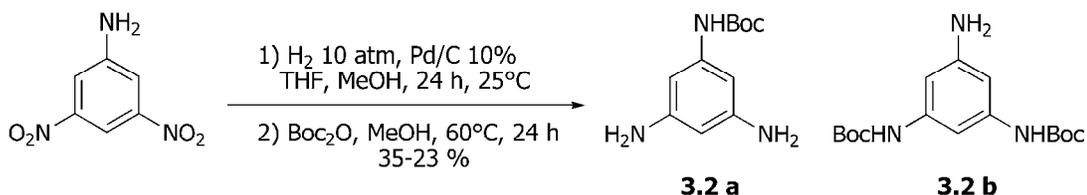
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 9.35 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 9.04 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.98 (m, 1H), 7.90 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.63-7.60 (m, 3H), 6.99 (dd, *J*₁ = 1.8, *J*₂ = 8.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.47 (s (l), 2H), 4.53 (s (l), 1H), 3.92 (s (l), 3H), 3.11 (s (l), 1H), 2.19 (s (l), 6H), 2.06-1.75 (m, 8H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 170.8, 169.7, 166.1, 165.9, 164.5, 162.9, 157.6, 150.2, 146.8, 137.5, 133.2, 131.8, 128.4, 125.6, 123.9, 115.1, 115.1, 113.3, 101.1, 56.9, 54.7, 50.1, 30.7, 27.8, 24.8, 21.5, 12.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₃₄H₃₁N₄O₉ [M+H]⁺: 639.2086. Trouvée : 639.2084. **p.f.** 165°C

7.1.2. Synthèses organiques : Chapitre 3



3,5-dinitroaniline (3.1) : À une solution d'acide 3,5-dinitrobenzoïque (4.0 g, 18.9 mmol) dans un mélange d'acide sulfurique concentré (6 mL), d'acide sulfurique fumant 30% (18 mL) et de CHCl_3 (25 mL) est additionné l'azidure de sodium (1.4 g, 21.7 mmol) par petites fractions. Le mélange réactionnel est porté à reflux (80°C) pendant 3 heures puis ramené à 25°C avant d'être versé sur glace. Un solide orange est obtenu après filtration sous pression réduite (3.25 g, 17.7 mmol, 94 %).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 4.39 (s (l), 2H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 151.9, 150.1, 113.1, 105.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_3\text{O}_4$ [M-H]⁻ : 182.0195. Trouvée: 182.0207. **p.f.** 113°C



tert-butyl-3,5-diaminophenylcarbamate et 3,5-di-tert-butoxycarbonylamino-aniline (3.2 a-b) : Une solution de la 3,5-dinitroaniline (2.3 g, 12.56 mmol) dans THF/MeOH (30/5 mL) en présence de Pd/C 10 % (50% m/m H_2O) est agitée sous 10 atm d'hydrogène pendant 2 heures. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et la phénylènetriamine ainsi obtenue est utilisée telle quelle sans purification supplémentaire. Le volume de la solution est amené à 200 mL puis une solution de Boc_2O (2.7 g, 12.56 mmol) dans le THF (20 mL) y est additionné goutte à goutte sur une période de 30 minutes. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 16 heures après quoi les solvants sont évaporés et le produit brut est

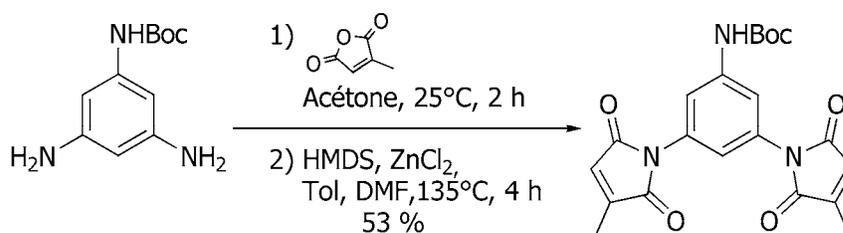
purifié par chromatographie sur gel de silice avec un gradient d'éluion DCM/Hex (8:2) à DCM/MeOH (49:1) pour donner **3.2 a** (958 mg, 4.29 mmol, 35 %) et **3.2 b** (947 mg, 2.93 mmol, 23 %) sous la forme de solides blanc cassé.

3.2 a :

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.18 (d, *J* = 2 Hz, 2H), 5.95 (s (l), 1H), 5.73 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.57 (s (l), 4H), 1.50 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 152.5, 148.0, 140.1, 96.8, 96.0, 80.1, 28.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₁H₁₇N₃O₂Na [M+Na]⁺: 246.1218. Trouvée: 246.1214.

3.2 b :

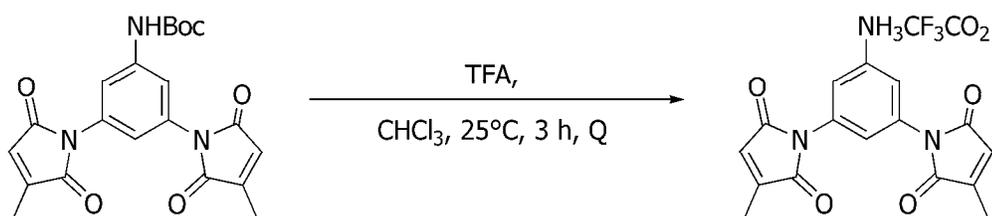
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 6.63 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 1.8Hz, 2H), 6.34 (s (l), 2H), 3.64 (s (l), 2H), 1,46 (s (l), 18H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 152.8, 152.7, 147.5, 139.7, 139.6, 99.9, 99.0, 80.2, 28.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₆H₂₆N₃O₄ [M+H]⁺: 324.1924. Trouvée: 324.1918. **p.f.** 179°C



tert-butyl-3,5-di-(2-méthylmaléimido)-carbamate (3.3) : À une solution de **3.2 a** (1.3 g, 5.82 mmol) dans le CHCl₃ (20 mL) est additionnée l'anhydride citraconique (1.56 mL, 17.47 mmol) et le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 3 heures après quoi le solvant est évaporé. Le produit brut est trituré dans Et₂O et filtré sous pression réduite pour donner l'acide amique correspondant sous la forme d'une poudre beige (2.59 g, 5.80 mmol, Q) qui est utilisée à l'étape suivante sans purification supplémentaire. L'acide amique (400 mg, 0.894 mmol) et ZnCl₂ (365 mg, 2.68 mmol) sont mis en solution dans un mélange toluène/DMF (40:5 mL), puis une dilution de HMDS (0.84 mL, 4.02 mmol) dans le toluène (5 mL) y est additionné sur une période de 20 minutes. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à reflux pendant 4 heures après quoi les solvants sont évaporés. L'huile obtenue est

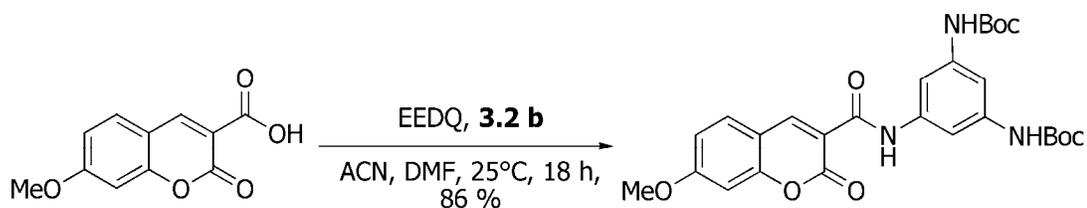
reprise dans AcOEt et lavée successivement avec HCl 0.1 M et une solution saturée de Na₂CO₃. Le produit brut est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (Tol/AcOEt 5%) pour donner **3.3** sous forme d'un solide blanc cassé (780 mg, 1.90 mmol, 53 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.12 (t, *J* = 2.4 Hz), 6.59 (s (l), 1H), 6.43 (q, *J* = 2.4 Hz, 2H), 2.12 (q, *J* = 2.4 Hz, 6H), 1.47 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 170.0, 168.9, 152.2, 145.7, 139.5, 132.5, 127.4, 116.5, 114.1, 80.9, 28.1, 11.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₁H₂₁N₃O₆Na [M+Na]⁺: 434.1331. Trouvée: 434.1323. **p.f.** 179°C



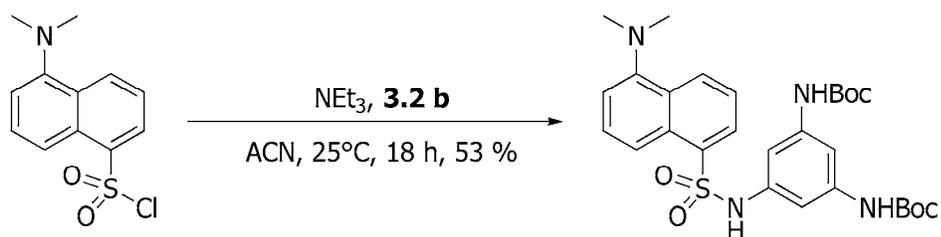
***tert*-butyl-3,5-di(2-méthylmaléimido)-anilinium de trifluoroacétate (3.4) :**

À une solution de **3.3** (780 mg, 1.90 mmol) dans le CHCl₃ est additionné le TFA (5.9 mL, 76 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 3 heures après quoi les solvants sont évaporés au maximum. Un solide blanc cassé est ensuite précipité de l'huile avec Et₂O (805 mg, 1.89 mmol, Q). Le sel de TFA **3.4** est ensuite utilisé tel quel à la prochaine étape sans purification supplémentaire.



3,5-di-*tert*-butoxycarbonylamino-phénylamino-carbonyl-7-méthoxycoumarine (3.5) : À une solution de la coumarine (227 mg, 0.1.03 mmol) dans ACN/DMF (20:3 mL) sont additionnés EEDQ (281 mg, 1.14 mmol) et une solution de **3.2 b** (400 mg, 1.24 mmol) dans ACN (5 mL). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés et l'huile obtenue est reprise dans AcOEt. La phase organique est lavée successivement avec HCl 1 M et une solution saturée en Na₂CO₃, puis séchée sur MgSO₄ pour donner **3.5** sous forme d'un solide jaune (463 mg, 0.880 mmol, 86 %).

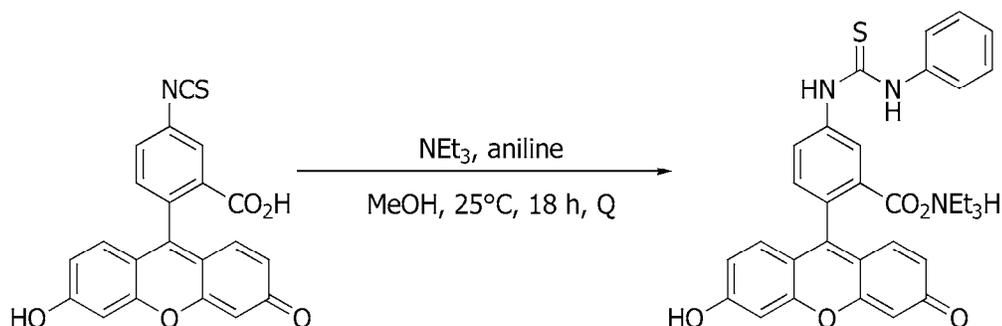
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10.75 (s (l), 1H), 8.91 (s, 1H), 7.61 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H), 7.39 (s (l), 1H), 6.96 (dd, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 8.8 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.56 (s (l), 2H), 3.93 (s, 3H), 1.51 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 165.0, 161.8, 159.9, 156.6, 152.4, 148.8, 139.4, 138.7, 131.0, 114.6, 114.1, 112.3, 104.8, 104.4, 100.2, 80.4, 55.9, 28.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₇H₃₂N₃O₈ [M+H]⁺: 526.2202. Trouvée: 526.2184.



***N*-3,5-di-*tert*-butoxycarbonylamino-phényl-dansylamide (3.6)** : À une solution du chlorure de dansyl (250 mg, 0.928 mmol) dans ACN (15 mL) est additionnée une solution de la **3.2 a** (300 mg, 0.928 mmoles) suivie de la NEt₃ (0.15 mL, 1.11 mmoles). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés et produit brut est purifié par chromatographie sur

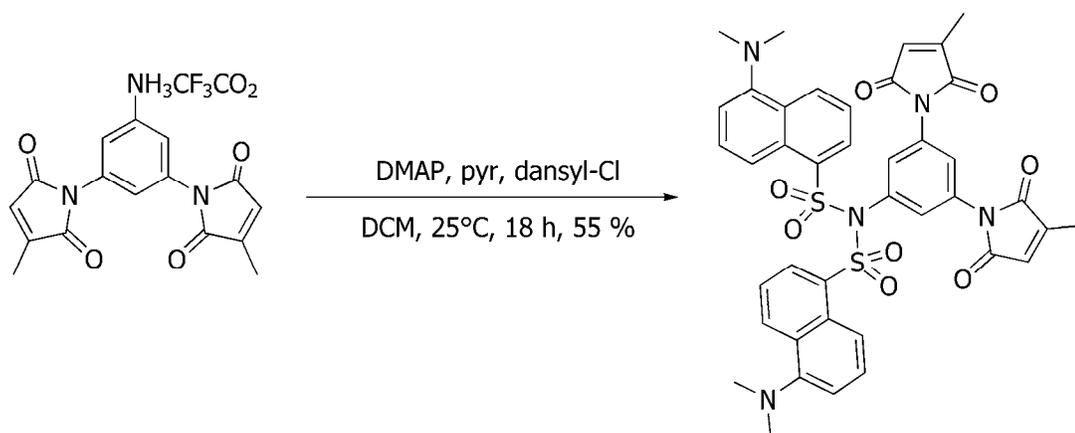
gel de silice (Tol/AcOEt 5%) pour donner **3.6** sous forme d'un solide jaune (280 mg, 0.50 mmol, 54 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.50 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J*₁ = 7.6 Hz, *J*₂ = 7.6 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.20 (s (l), 1H), 7.16 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.98 (s (l), 1H), 6.73 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.42 (s (l), 2H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 152.2, 151.9, 139.6, 137.7, 134.0, 130.7, 130.1, 129.7, 129.4, 128.5, 123.0, 118.4, 115.1, 104.1, 80.6, 45.3, 28.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₈H₃₆N₄O₆SNa [M+Na]⁺ : 579.2251. Trouvée : 579.2248. **p.f.** 128°C



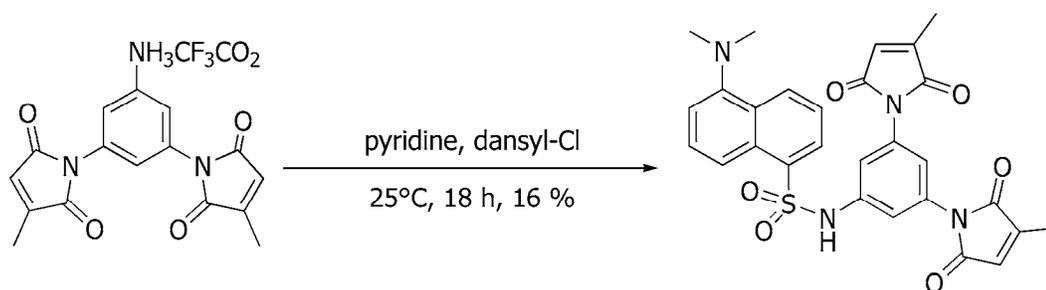
***N*-[2-(5-fluoresceinthiocarbamoyl)-aniline (3.7)]** : À une solution de FITC (75 mg, 0.19 mmol) dans MeOH (10 mL) est additionné la NEt₃ (0.05 mL, 0.38 mmol) suivi de l'aniline (0.04 mL, 0.38 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C. pendant 18 heures après quoi le solvant est évaporé et un solide orange est précipité de l'huile obtenue avec un mélange de MeOH/EtO₂ (90 mg, 0.188 mmol, Q).

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ 8.04 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 2.0, 9.2 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.46 (s (l), 1H), 7.38 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.22-7.18 (m, 2H), 7.06 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.66 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.62 (dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz, 2H), 3.10 (q, *J* = 7.2 Hz, 6H), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H); **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₇H₁₉N₂O₅S [M+H]⁺ : 483.1011. Trouvée : 483.1009.



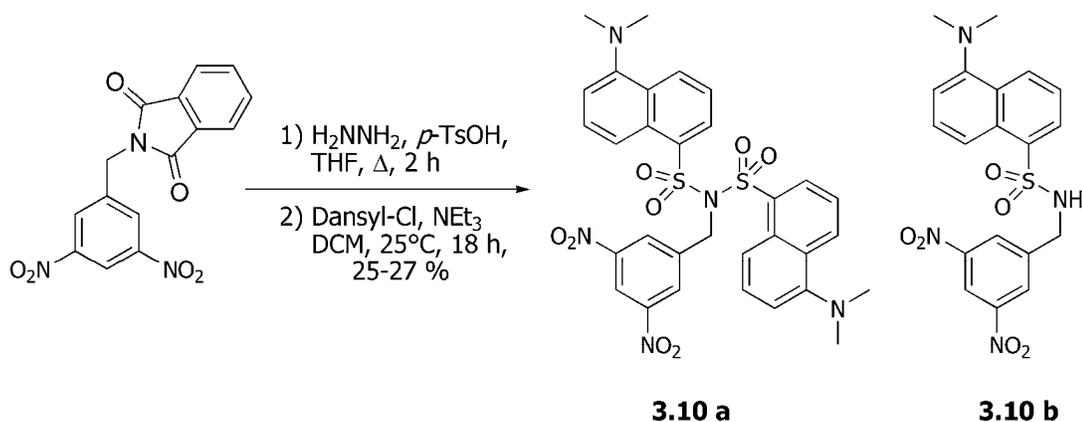
***N,N*-di-dansyl-3,5-di-(2-méthylmaléimido)-aniline (3.8)** : À une solution du chlorure de dansyl (412 mg, 1.53 mmol) dans le CHCl_3 (20 mL) sont additionnés la DMAP (62 mg, 0.50 mmol), la pyridine (0.25 mL, 3.06 mmol) et une solution de **3.4** (392mg, 1.02 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés et le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (CHCl_3) pour donner **3.8** sous forme d'un solide poudreux jaune (322 mg, 0.414 mmol, 55 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.63 (dd, $J = 0.8, 8.4$ Hz, 2H), 8.40 (dd, $J = 1.2, 7.6$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.57 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.25, (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 7.12 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 2.89 (s, 12H), 2.12 (d, $J = 2.0$ Hz, 6H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 169.2, 168.1, 151.1, 145.7, 134.0, 133.6, 132.7, 132.3, 132.1, 130.0, 129.6, 128.7, 127.3, 123.0, 122.8, 119.0, 115.2, 45.4, 11.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 778.2001. Trouvée : 778.2000. **p.f.** 145°C.



***N*-dansyl-3,5-di-(2-méthylmaléimido)-aniline (3.9)** : À une solution de **3.4** (200 mg, 0.517 mmol) dans la pyridine (3 mL) est additionnée une solution du chlorure de dansyl (139 mg, 0.517 mmol) dans la pyridine. Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés. L'huile obtenue est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na₂CO₃, séchée sur MgSO₄ puis évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (Tol/AcOEt 10%) pour donner **3.9** sous forme d'un solide vert pâle (40 mg, 0.074 mmol, 16 %).

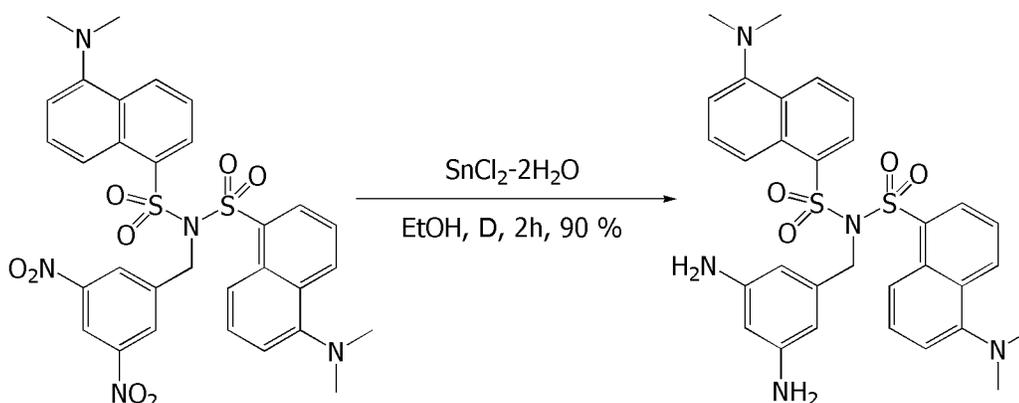
RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 9.71 (s, 1H), 8.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.39 (dd, *J*₁ = 1.2 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz, 1H), 7.62-7.58 (td, *J* = 1.2, 7.2 Hz, 2H), 7.28-7.27 (m, 3H), 7.11 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.63-6.61 (m, 2H); **RMN ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 171.3, 170.4, 152.8, 135.4, 134.0, 131.7, 131.5, 130.3, 130.2, 129.6, 128.7, 124.9, 119.8, 119.6, 116.6, 115.9, 46.3, 12.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₈H₂₅N₄O₆S [M+H]⁺ : 545.1516. Trouvée : 545.1489. **p.f.** 230°C



***N,N*-di-dansyl-3,5-dinitrobenzylamine (3.10 a-b)** : À une solution de **3.13** (750 mg, 2.29 mmol) dans THF (30 mL) sont additionnés $\text{H}_2\text{NNH}_2\text{-H}_2\text{O}$ (0.90 mL, 18.33 mmol) et *p*TsOH (44 mg, 0.23 mmol). Le milieu réactionnel est ensuite agité à reflux pendant 2 heures avant qu'une solution saturée en Na_2CO_3 soit additionnée. La phase aqueuse est extraite avec DCM, puis la phase organique est séchée et évaporée à sec pour donner l'amine benzylique sous la forme d'un solide jaune qui est utilisée telle quelle sans purification supplémentaire. L'amine benzylique est reprise dans ACN (20 mL) puis une solution de dansyl-Cl (618 mg, 2.29 mmol) est additionnée, suivie de la NEt_3 (0.32 mL, 2.29 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures, après quoi le solvant est évaporé et produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice avec DCM, puis DCM/THF (95/5) pour donner **3.10 a** sous la forme d'un solide jaune (412 mg, 0.62 mmol, 27 %) et **3.10 b** (243 mg, 0.57 mmol, 25 %).

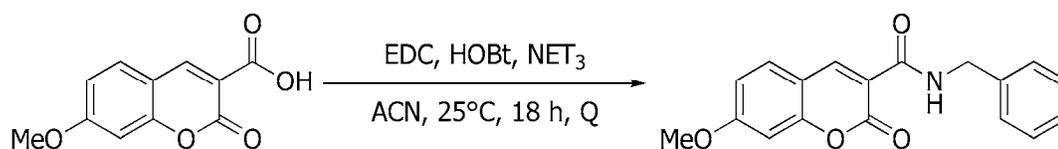
3.10 a

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (s (l), 1H), 8.45 (s (l), 1H), 8.40 (dd, $J = 1.2, 7.6$ Hz, 2H), 8.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 7.50-7.41 (m, 4H), 7.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 5.28 (s, 2H), 2.85 (s, 12H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 152.8, 147.8, 139.7, 134.2, 133.3, 130.4, 130.3, 130.1, 128.3, 124.0, 118.9, 118.3, 116.2, 51.7, 46.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 664.1541. Trouvée : 664.1530. **p.f.** 210°C



***N,N*-di-dansyl-(3,5-diaminobenzyl)amine (3.10 c)** : À une suspension de **3.10 a** (65 mg, 0.098 mmol) dans EtOH (10 mL) est additionné SnCl₂•2H₂O (220 mg, 0,975 mmol) après quoi le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 heures. Une solution de Na₂CO₃ saturée est ensuite additionnée et la phase aqueuse est extraite avec DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec pour donner **3.10 b** sous la forme d'un solide jaune (53 mg, 0.088 mmol, 90 %).

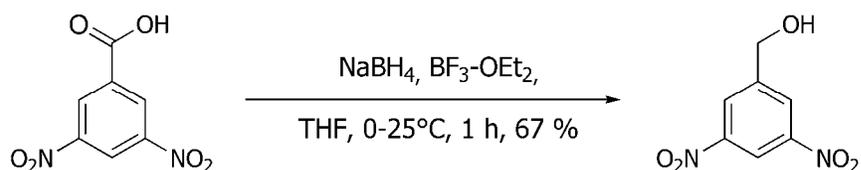
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.99 (dd, *J* = 1.2, 7.6 Hz, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.44 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.21 (t, *J* = 8.4 Hz, 3H), 7.13 (s, 2H), 7.11 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.37 (s (l), 4H), 2.80 (s, 12H); **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 152.2, 149.8, 137.2, 134.3, 132.1, 129.7, 129.2, 124.0, 118.7, 118.6, 116.1, 104.3, 100.3, 53.9, 45.9; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₃₁H₃₄N₄O₄S₂ [M+H]⁺: 604.2028. Trouvée : 604.2047. **p.f.** 93°C



7-méthoxy-3-benzylaminocarbonylcoumarine (3.11) : À une suspension de la coumarine **2.2** (100 mg, 0.454 mmol) dans ACN (15 mL) sont additionnés la NET₃ (0.13 mL, 0.908 mmol), EDC (104 mg, 0.545 mmol), HOBT (74 mg, 0,545 mmol), puis la benzylamine (0.06 mL, 0.545 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C

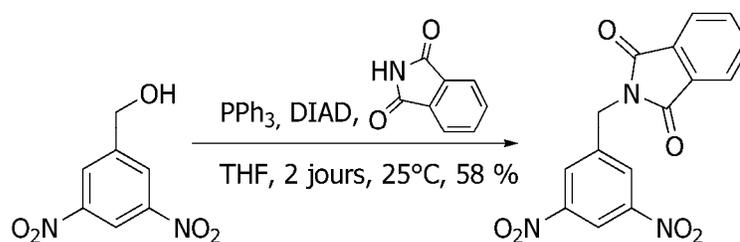
pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés et le solide obtenu est mis en suspension dans HCl 1.0 M, filtré, puis lavé avec une solution saturée en Na₂CO₃ pour donner un solide gris pâle (139 mg, 0.450 mmol, Q).

RMN ¹H (400 MHz, (DMSO-*d*₆) δ 8.23 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.47-7.46 (m, 5H), 6.96-6.92 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.86 (s, 2H); **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₈H₁₆NO₄ [M+H]⁺ : 310.1067. Trouvée : 310.1074.



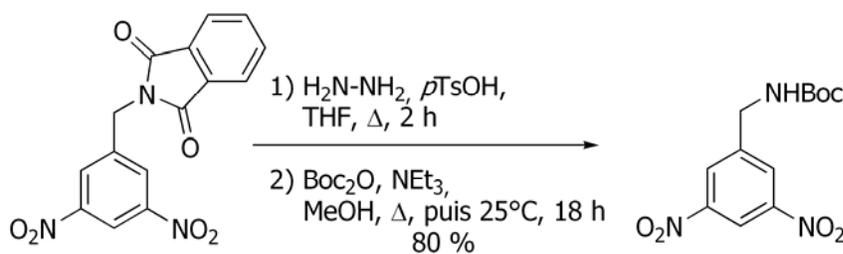
(3,5-dinitrophényl)méthanol (3.12) : À une suspension de NaBH₄ (2.85 g, 75.4 mmol) dans le THF (40 mL) refroidi dans un bain de glace est additionné une solution de l'acide 3,5-dinitrobenzoïque (8.0 g, 37.7 mmol) dans le THF (20 mL) suivi du BF₃•OEt₂ (12.5 mL, 98.0 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 1 heure. L'excès de NaBH₄ est neutralisé avec une solution de HCl 1 M et la phase aqueuse est extraite au DCM après quoi la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na₂CO₃, séchée puis évaporée à sec pour donner **3.12** sous forme d'un solide orange (5.01 g, 25.3 mmol, 67 %).

RMN ¹H (400 MHz, ((CD₃)₂CO) δ 8.91 (t, *J* = 0.4 Hz, 1H), 8.57 (dd, *J* = 1.2, 2.0 Hz, 2H), 4.93 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.57 (s (l), 1H); **RMN ¹³C (75 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 149.4, 148.4 (2C), 127.0 (2C), 117.6, 62.8; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₇H₅N₂O₅ [M-H]⁻ : 197.0204. Trouvée : 197.0200. **p.f.** 89°C



***N*-(3,5-dinitrophényl)méthylphthalimide (3.13)** : À une solution de l'alcool benzylique (**3.12**) (1.38 g, 6.94 mmol), la triphénylphosphine (2.19 g, 8.33 mmol) et le phthalimide (1.23 g, 8.33 mmoles) dans le THF (40 mL) sous atmosphère d'azote est additionné la DIAD (1.64 mL, 8.33 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 48 heures après quoi les solvants sont évaporés. Le mélange brut est additionné d'AcOEt puis filtré sous pression réduite permettant d'isoler **3.13** sous forme d'un solide beige (1.33 g, 4.05 mmol, 58 %).

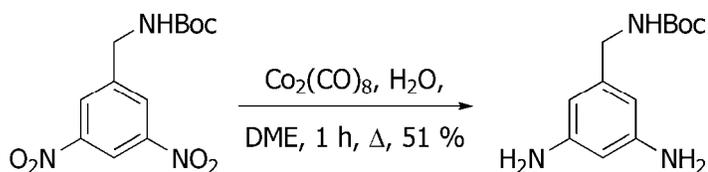
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.98 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), (8.61 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.93-7.89 (m, 2H), 7.81-7.77 (m, 2H), 5.05 (s, 2H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 168.5, 168.4, 149.6, 141.3, 135.5, 132.5, 129.6, 124.7, 119.3, 41.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₅H₁₀N₃O₆ [M+H]⁺ : 328.0564. Trouvée : 328.0568. **p.f.** 171°C



***tert*-butyl-3,5-dinitrophénylcarbamate (3.14)** : À une solution de **3.13** (960 mg, 2.93 mmol) dans le THF (20 mL) sont additionnés l'hydrazine (1.14 mL, 23.4 mmol) et l'acide *p*-nitrotoluènesulfonique (280 mg, 1.47 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 2 heures puis ramené à 25°C pour être additionné d'une solution saturée en Na₂CO₃. La phase aqueuse est extraite au CHCl₃ et la phase organique est séchée sur MgSO₄ puis évaporée à sec pour donner l'amine benzylique correspondante qui est utilisée sans purification supplémentaire. L'amine

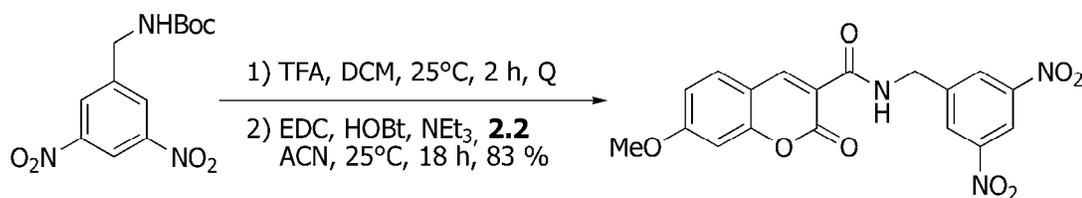
benzylique est mise en solution dans MeOH (20 mL) puis une solution de Boc₂O (1.28 g, 5.86 mmol) dans le MeOH (5 mL) lui est additionnée, suivie de la NEt₃ (0.62 mL, 4.40 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 45 minutes, puis 1 heures à 25°C avant que le solvant soit évaporé. L'huile obtenue est reprise dans CHCl₃ et la phase organique est lavée avec HCl 0.1 M, séchée sur MgSO₄ et le solide obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec DCM/Hex (8:2) pour donner **3.14** sous forme d'un solide blanc cassé (945 mg, 2.34 mmol, 80 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.93 (s (l), 1H), 8.49 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 5.28 (s (l), 1NH), 4.52 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.47 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 155.8, 148.4, 144.2, 127.1, 117.5, 80.6, 43.4, 28.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₂H₁₅N₃O₆ [M]⁻ : 297.0963. Trouvée : 297.0966. **p.f.** 94°C



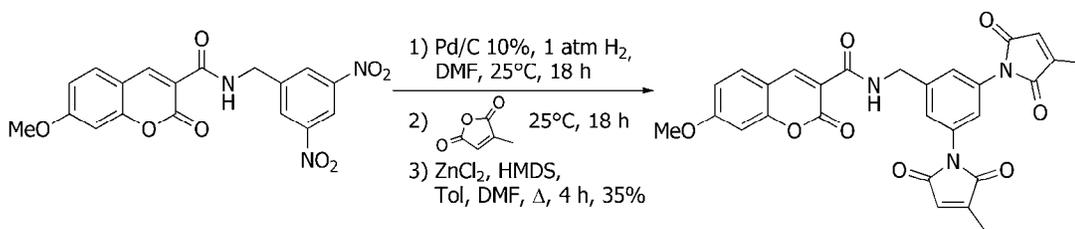
tert-butyl-3,5-diaminobenzylcarbamate (3.15) : À une solution de **3.14** (600 mg, 2.02 mmol) dans la DME (20 mL) sont additionnés le Co₂(CO)₈ (2.76 g, 8.07 mmol) et H₂O (1.45 mL, 8.07 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 heure après quoi DCM (20mL) est additionné et la phase organique est lavée avec H₂O avant d'être séchée sur MgSO₄. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (DCM/Hex 10% + 0.25 % NEt₃ à DCM/MeOH 0.5% + 0.25 % NEt₃) pour donner **3.15** sous forme d'un solide brun (245 mg, 1.03 mmol, 51 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.96 (s (l), 2H), 5.86 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.95 (s (l), 1NH), 4.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61 (s (l), 4H), 1.43 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 155.8, 147.7, 141.0, 104.8, 100.6, 79.1, 44.5, 28.3; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₁₂H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺ : 238.1546. Trouvée : 238.1550.



7-méthoxy-3-(3,5-dinitrobenzyl)aminocarbonylcoumarine (3.16) : L'amine benzylique **3.14** (267 mg, 0.898 mmol) est mise en solution dans DCM (10 mL) puis TFA (2.77 mL, 36 mmol) est additionné. Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 2 heures puis les solvants sont évaporés. Un solide blanc est précipité de l'huile obtenue avec Et₂O, lequel est utilisé tel quel sans purification supplémentaire. Le sel de TFA est repris dans ACN (10 mL) avant d'être additionné à une solution de la coumarine (218 mg, 0.988 mmol), EDC (189 mg, 0.988 mmol), HOBT (134 mg, 0.988 mmol) et NEt₃ (0.26 mL, 1.89 mmol) dans ACN (20 mL). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés. Le produit brut est repris dans CHCl₃ et la phase organique est lavée successivement avec une solution saturée en Na₂CO₃ et HCl 0.1 M avant d'être séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner **3.16** sous forme d'un solide beige (298 mg, 0.747 mmol, 83 %).

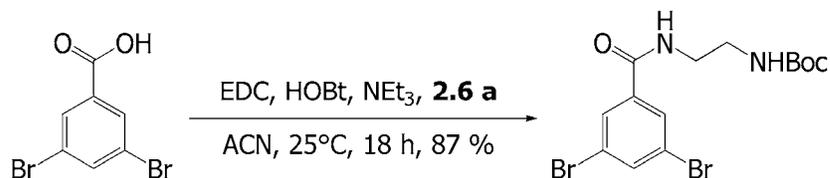
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.41 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.72 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H) 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H); **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 165.0, 162.7, 161.1, 156.8, 148.8, 148.4, 144.6, 132.1, 128.7, 117.7, 115.0, 114.1, 112.6, 100.8, 56.8, 31.2; **HRMS (ESI)** Calculée pour, C₁₈H₁₃N₃O₈Na [M+Na]⁺: 422.0589. Trouvée : 422.0595. **p.f.** 233°C



7-méthoxy-3-(3,5-di-(2-méthylmaléimido)benzyl)aminocarbonylcoumarine (3.18) : À une suspension de **3.16** (80 mg, 0.203 mmol) dans la DMF (8 mL) est additionné le Pd/C 10% (50% m/m H₂O) avant d'être agité pendant 18 heures sous 1 atm d'H₂. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite puis l'anhydride citraconique est additionné (0.06 mL, 0.609 mmol) et le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures. Le milieu réactionnel est ensuite additionné de toluène (20 mL) puis ZnCl₂ (83 mg, 0.609 mmol) et HMDS (0.13 mL, 0.609 mmol) sont additionnés. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4 heures après quoi les solvants sont évaporés. L'huile obtenue est reprise dans AcOEt puis la phase organique est lavée avec HCl 0.1 M et une solution saturée en Na₂CO₃, puis séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner **3.18** sous la forme d'un solide beige foncé (38 mg, 0.072 mmol, 35 %).

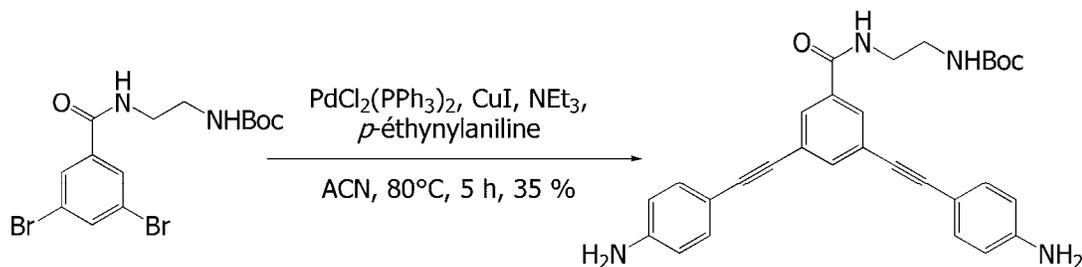
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.20 (s (l), 1NH), 8.86 (s, 1H), 7.95-7.91 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.07 (s, 6H); **RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆)** δ 171.6, 170.7, 165.8, 163.0, 162.0, 157.5, 149.4, 147.1, 142.3, 133.6, 132.9, 128.8, 126.0, 124.6, 1156.0, 115.0, 113.4, 101.6, 57.5, 43.5, 12.1 ; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₈H₂₂N₃O₈ [M+H]⁺: 528.1421. Trouvée : 528.1401.

7.1.3. Synthèses organiques : Chapitre 4



***N*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)éthyl-3,5-dibromobenzamide (4.1)** : À une solution de l'acide 3,5-dibromobenzoïque (270 mg, 0.965 mmol) dans ACN (10 mL) sont additionnés NEt_3 (0.15 mL, 1.06 mmol), EDC (203 mg, 1.06 mmol), HOBt (143 mg, 1.06 mmol) et **2.6 a** (170 mg, 1.06 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés à sec. Le solide obtenu est repris dans CHCl_3 et la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na_2CO_3 et HCl 0.1 M et séchée sur MgSO_4 pour donner **4.1** sous forme d'un solide poudreux beige (356 mg, 0.843 mmol, 87%).

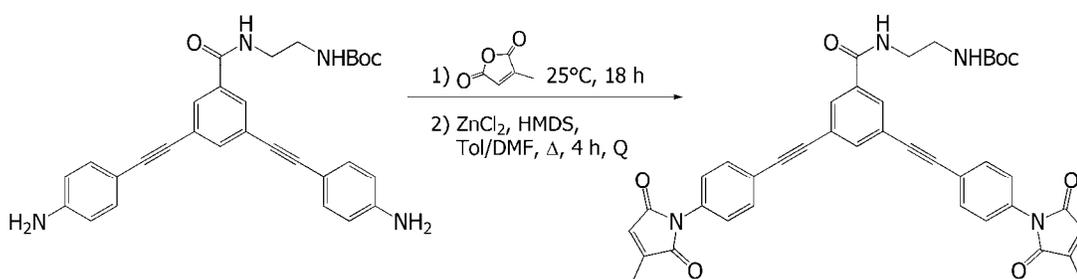
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 7.78 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.53 (s (l), 1 NH), 4.99 (s (l), NH), 3.55-3.52 (m, 2H), 3.44-3.41 (m, 2H), 1.46 (s (l), 9H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 164.8, 157.9, 137.2, 136.6, 128.9, 123.0, 80.4, 42.7, 39.5, 28.3; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 442.9576. Trouvée : 442.9583. **p.f.** 147 °C



***N*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)éthyl-3,5-di-(4-aminophényléthynyl)-benzamide (4.2)** : Le $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (66 mg, 0.095 mmol), CuI (9 mg, 0.048 mmol) et **4.1** (1.0 g, 2.37 mmol) sont placés dans un bicol équipé d'un réfrigérant après

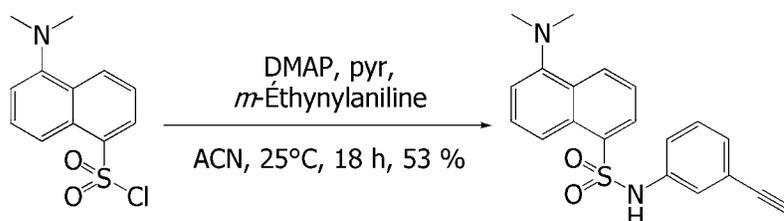
quoi le système est purgé avec un mélange de N_2/H_2 . Les solides sont ensuite mis en suspension dans la NEt_3 (2.0 mL, 14.22 mmol) préalablement dégazée, laquelle est chauffée à $80^\circ C$ avant d'y additionnée une solution de la *p*-éthynylaniline (555 mg, 4.74 mmol) dans ACN (50 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 5 heures avant d'être filtré sur célite et évaporé à sec. L'huile obtenue est purifiée sur gel de silice (gradient DCM; DCM/MeOH 1%) pour donner **4.2** sous forme d'un solide jaune pâle (409 mg, 0.827 mmol, 35%).

RMN 1H (400 MHz, MeOD) δ 7.81 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.62 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 2.0, 6.4$ Hz, 4H), 6.67 (dd, $J = 2.0, 6.4$ Hz, 4H), 3.10-3.05 (m, 4H), 1.44 (s (l), 9H); **RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD)** δ 164.5, 155.3, 134.9, 134.1, 132.3, 128.0, 123.6, 113.2, 107.1 92.2, 84.9, 77.2, 39.8-38.1 (2C sous MeOD), 27.7.



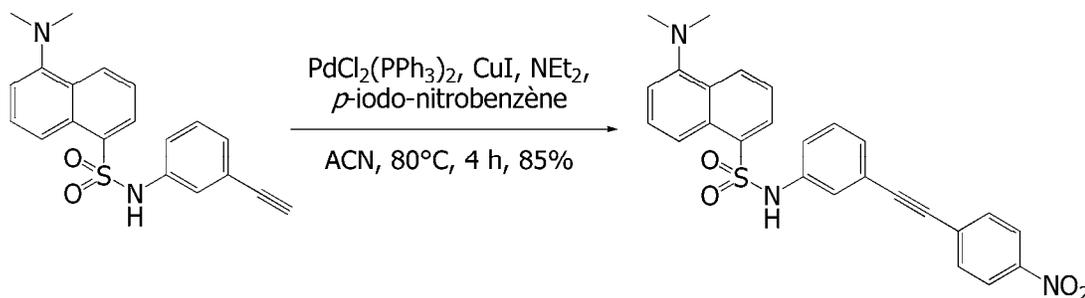
***N*-2-(*tert*-butoxycarbonylamino)éthyl-3,5-di-(4-(2-méthylmaléimido)-phényléthynyl)-benzamide (4.3)** : À une solution de **4.2** (65 mg, 0.131 mmol) dans un mélange acétone/MeOH (10/2 mL) est additionné l'anhydride citraconique (0.03 mL, 0.328 mmol). Le milieu réactionnel est agité à $25^\circ C$ pendant 2 heures après quoi les solvants sont évaporés à sec. L'acide amique est repris dans un mélange toluène/DMF, puis $ZnCl_2$ (65 mg, 0.477 mmol) et HMDS (0.15 mL, 0.716 mmol) sont additionnés. Le milieu réactionnel est porté à reflux ($135^\circ C$) pendant 4 heures après quoi AcOEt est additionné et la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na_2CO_3 et HCl 0.1 M. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée pour donner une huile de laquelle est précipité un solide jaune poudreux suite à l'ajout hexanes (89 mg, 0.130 mmol, Q).

RMN ¹H (300 MHz, MeOD) δ 7.90 (s (l), 2H), 7.74 (s (l), 1H), 7.56 (dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, 4H), 7.36 (dd, *J* = 2.1, 8.4 Hz, 4H), 6.45 (t, *J* = 1.8 Hz, 2H), 5.04 (s (l), 1 NH), 3.53-3.50 (m, 2H), 3.39-3.37 (m, 2H), 2.14 (s (l), 6H), 1.46 (s (l), 9H); **RMN ¹³C (75 MHz, MeOD)** δ 170.2, 169.1, 166.2, 157.0, 145.8, 136.7, 132.2, 131.7, 129.8, 127.5, 125.3, 123.8, 121.7, 114.6, 89.9, 88.4, 80.1, 42.2, 39.6, 28.3, 11.0.



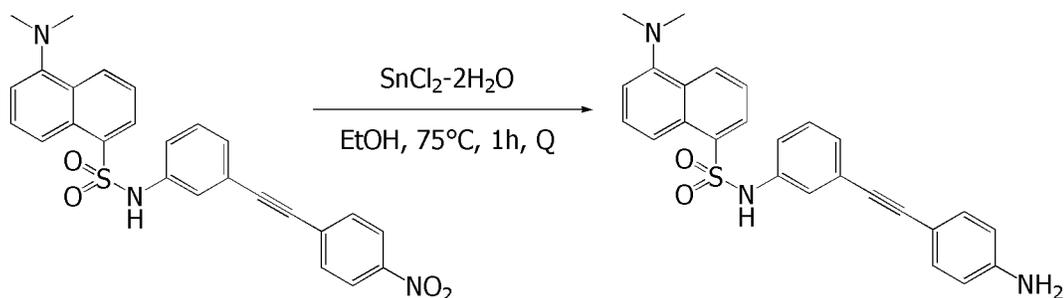
***N*-(3-éthynylphényl)-dansylamide (4.4)** : À une solution de dansyl-Cl (300 mg, 1.11 mmol) dans DCM (15 mL) sont additionnés la DMAP (40 mg, 0.33 mmol), la pyridine (0.27 mL, 3.33 mmol) puis la *m*-éthynylaniline (0.12 mL, 1.11 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi les solvants sont évaporés à sec. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (tol; tol/DCM 5%) pour donner **4.4** sous forme d'un solide mousseux vert lime (218 mg, 0.622 mmol, 56%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.75 (s, 1 NH), 7.56 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.46 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.19-7.11 (m, 3H), 7.06-7.02 (m, 2H), 3.01 (s, 1H), 2.87 (s (l), 6H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 152.4, 137.2, 134.3, 131.5, 130.8, 130.2, 130.0, 129.6, 128.9, 124.5, 123.5, 123.4, 121.6, 118.9, 115.8; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₀H₁₉N₂O₂S [M+H]⁺: 351.1160. Trouvée : 351.1162. **p.f.** 126°C



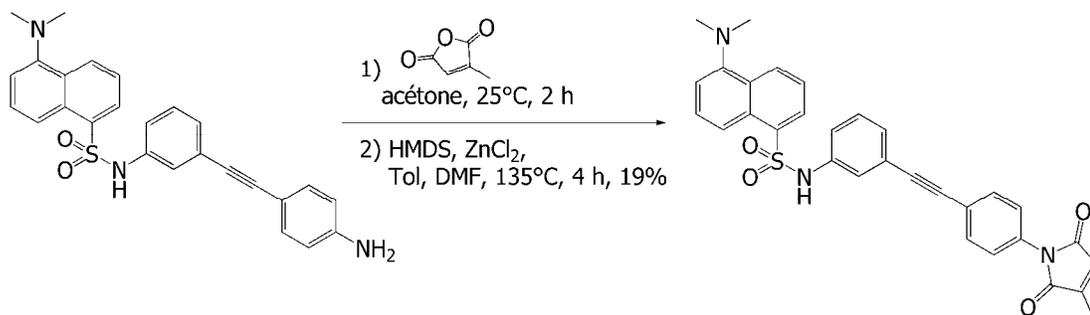
***N*-(3-(4-nitrophényl)éthynylphényl)-dansylamide (4.5)** : Le PdCl₂(PPh₃)₂ (8 mg, 0.012 mmol), CuI (1.2 mg, 0.006 mmol) et **4.4** (200 mg, 0.570 mmol) sont placés dans un bicol équipé d'un réfrigérant après quoi le système est purgé avec un mélange de N₂/H₂. Les solides sont mis en suspension dans la NEt₃ (0.24 mL, 1.71 mmol) préalablement dégazée, laquelle est chauffée à 80°C avant d'y additionnée une solution de la *p*-nitro-iodobenzène (142 mg, 0.570 mmol) dans ACN (5 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures avant d'être filtré sur célite et évaporé à sec. L'huile obtenue est purifiée sur gel de silice (100% DCM) pour donner **4.5** sous forme d'un solide jaune (229 mg, 0.486 mmol, 85%).

RMN ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO) δ 9.56 (s (l), 1 NH), 8.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.47 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.62 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (s (l), 1H), 7.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.26-7.24 (m, 2H), 2.86 (s, 6H); **RMN ¹³C (100 MHz, (CD₃)₂CO)** δ 152.5, 147.8, 138.7, 135.3, 132.9, 131.0, 130.6, 130.2, 130.0, 129.9, 128.7, 127.8, 124.1, 123.6, 123.2, 122.7, 121.1, 119.3, 115.8, 110.6, 88.0, 45.1; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₂₆H₂₂N₃O₄S [M+H]⁺: 472.1322. Trouvée : 472.1326. **p.f.** 169°C.



***N*-(3-(4-aminophényl)éthynylphényl)-dansylamide (4.6)** : À une solution de **4.5** (220 mg, 0.467 mmol) dans un mélange de EtOH/THF (10/2 mL) est additionné le $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (421 mg, 1.87 mmol). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 2 heures après quoi une solution de NaH_2PO_4 1.0 M (pH 4.2) est additionnée. La phase aqueuse est extraite avec DCM, puis la phase organique est séchée sur MgSO_4 et évaporée à sec pour donner **4.6** sous forme d'un solide mousseux jaune orangé (205 mg, 0.466 mmol, Q).

RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 9.37 (s (l), 1 NH), 8.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.58-7.49 (m, 2H), 7.23-7.14 (m, 3H), 7.04 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.98-6.91 (m, 2H), 7.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.26-7.24 (m, 2H), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 2.81 (s, 6H); **RMN ^{13}C (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)** δ 154.1, 152.6, 138.6, 138.3, 135.9, 133.6, 131.9, 131.1, 131.0, 130.5, 130.4, 129.7, 128.9, 126.2, 126.0, 124.1, 121.4, 120.0, 118.4, 116.1, 113.8, 68.1, 45.6; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 442.1593. Trouvée : 442.1584. **p.f.** 91°C

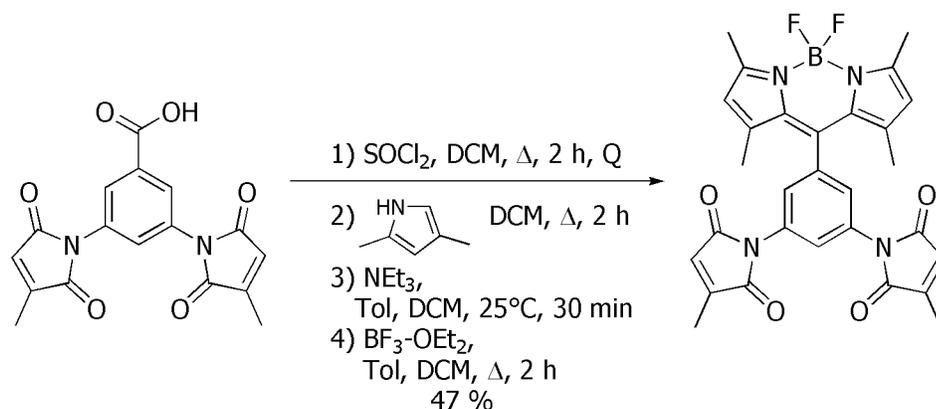


***N*-(3-(4-(2-méthylmaléimido)phényl)éthynylphényl)-dansylamide (4.7) :** À

une solution de **4.6** (200 mg, 0.454 mmol) dans l'acétone (6 mL) est additionné l'anhydride citraconique (0.08 mL, 0.908 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi le solvant est évaporé. L'acide amique est repris dans un mélange toluène/DMF (15/4 mL) puis ZnCl₂ (124 mg, 0.908 mmol) et HMDS (0.19 mL, 0.908 mmol) sont additionnés, puis le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 4 heures. Les solvants sont évaporés et le produit brut est repris dans AcOEt et la phase organique est lavée avec une solution saturée en Na₂CO₃ et séchée sur MgSO₄. Le solide jaune est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec DCM/Tol (9/1) jusqu'à DCM/THF (98/2) pour donner **4.7** sous forme d'un solide orange (45 mg, 0.087 mmol, 19 %).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s (l), 1H), 8.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.23 (dd, *J* = 1.6, 7.6 Hz, 1H), 7.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.48-7.46 (m, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.12 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.52 (q, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.35 (quint, *J* = 1.6 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H) 2.20 (s, 3H); **RMN ¹³C (100 MHz, (CDCl₃)** δ 172.1, 171.0, 170.8, 169.7, 147.2, 146.4, 137.2, 132.6, 132.0, 131.3, 130.7, 130.0, 129.6, 129.1, 128.8, 128.7, 128.0, 125.8, 124.4, 124.2, .123.7, 122.5, 121.4, 115.8, 89.6, 89.5, 45.9, 11.6; **HRMS (ESI)** Calculée pour C₃₁H₂₆N₃O₄S [M+H]⁺: 536.1641. Trouvée : 536.1639. **p.f.** 91°C

7.1.4. Synthèses organiques : Chapitre 5



(5.1) : À une solution de l'acide **2.1** (80 mg, 0.235 mmol) dans DCM (15 mL) est additionné le chlorure de thionyle (3 mL). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 2 heures après quoi les solvants sont évaporés et le solide obtenu est repris dans DCM et réévaporé à 3 reprises. Le chlorure d'acyle ainsi obtenu est utilisé tel quel sans purification supplémentaire. Le chlorure d'acyle est repris dans DCM (20 mL) puis le 1,3-diméthylpyrrole est additionné. Le milieu réactionnel est agité à 50°C pendant 2 heures après quoi les solvants sont évaporés. Le solide obtenu est repris dans un mélange DCM/Tol (5/20 mL) et la NEt_3 (0.20 mL, 1.41 mmol) est additionné. Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 30 minutes après quoi le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.06 mL, 0.470 mmol) est additionné et le milieu réactionnel est agité à 70°C pendant 2 heures. Les solvants sont évaporés et le milieu réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice DCM/THF pour donner un solide rose foncé (60 mg, 0.111 mmol, 47 %).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.66 (s (l), 2H), 7.35 (s (l), 1H), 6.48 (s (l), 2H), 5.98 (s (l), 1H), 5.87 (s (l), 1H), 2.53 (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 1.55 (s, 6H); **RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)** δ 183.5, 170.8, 169.7, 156.9, 146.9, 144.3, 142.1, 137.1, 134.1, 133.2, 132.0, 128.5, 124.8, 124.7, 124.6, 122.4, 114.1, 15.5, 14.8, 12.0; **HRMS (ESI)** Calculée pour $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543.2031. Trouvée : 543.2010. **p.f.** 118°C

7.2. DÉTERMINATION DES FACTEURS D'AUGMENTATION DE LA FLUORESCENCE

Les spectres d'absorption ont été enregistrés à 25°C, à l'aide d'un spectromètre Cary-100. Les spectres d'émission et les mesures d'intensité de fluorescence ont été enregistrés à 25°C à l'aide d'un fluorimètre Cary Eclipse. Les fentes d'excitation et d'émission étaient fixées à 5 nm.

PROTOCOLE :

À une solution de 1 à 4 mM du fluorogène d'intérêt dans le DMSO est additionné l'acide 3-mercaptopropionique (50 éq). Le milieu réactionnel est agité à 25°C pendant 18 heures après quoi l'intensité de fluorescence d'une dilution dans l'HEPES est enregistrée. L'intensité finale de fluorescence est ensuite divisée par l'intensité initiale de fluorescence à une même concentration de fluorogène pour donner le facteur d'augmentation de la fluorescence (FE) pour ce fluorogène.

7.2.1. Détermination des FE : Chapitre 2

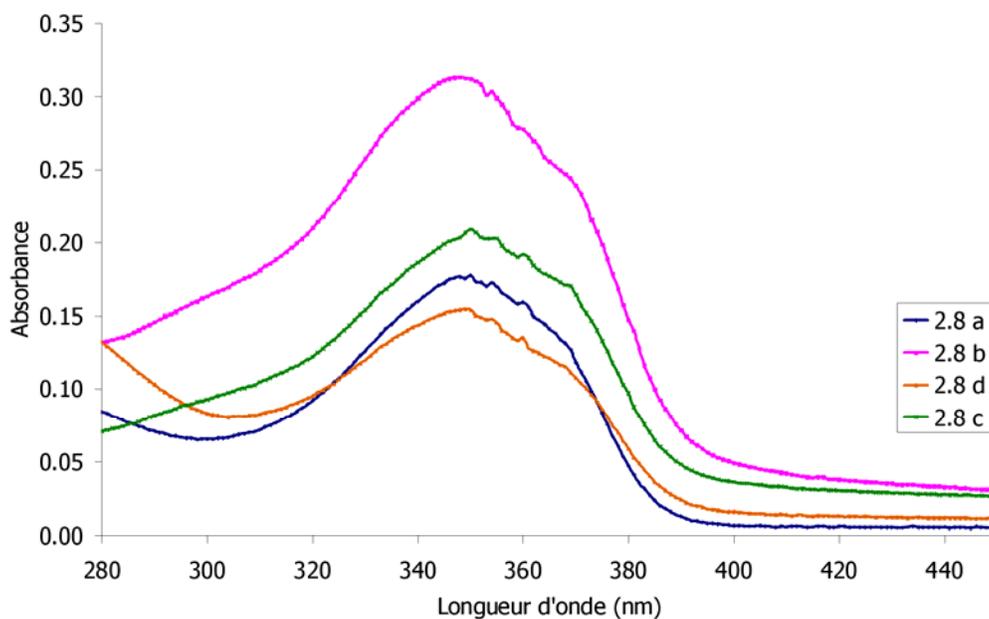


Figure 7.1. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10 (HEPES/DMSO 5%, 50 μ M).

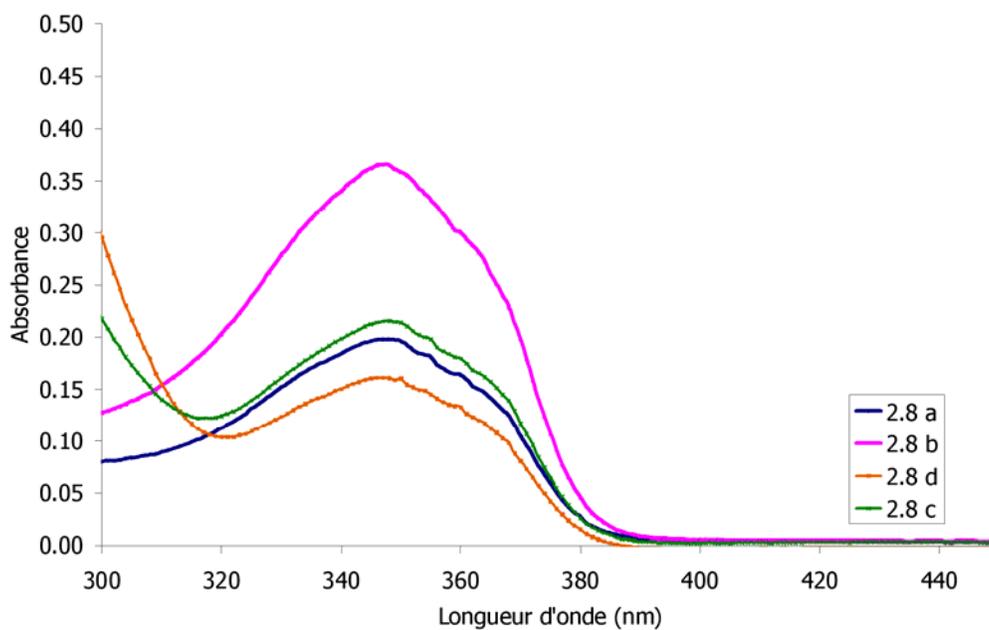


Figure 7.2. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10 (DMSO, 50 μ M).

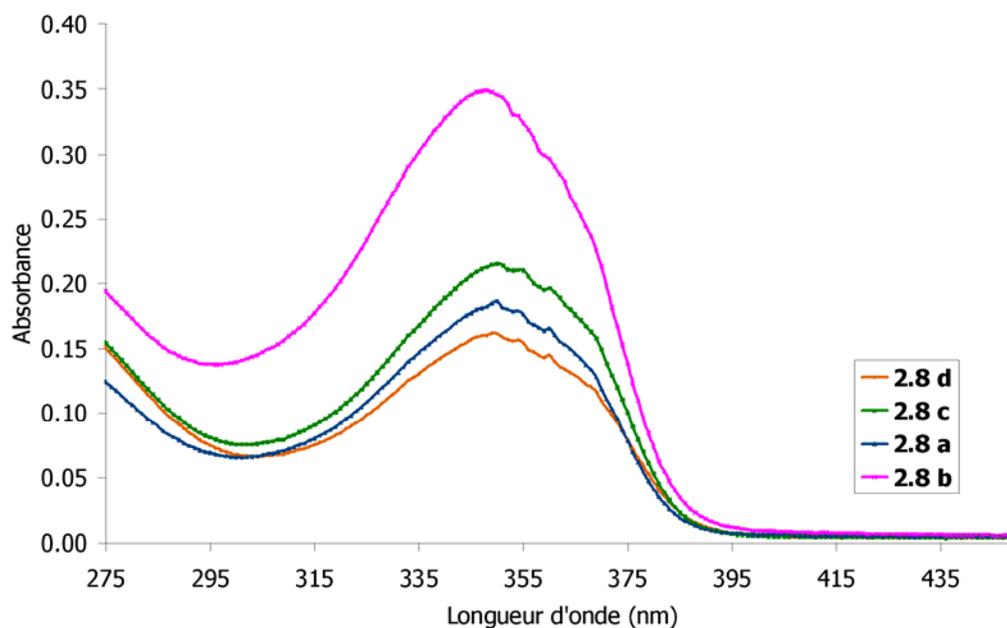


Figure 7.3. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA (HEPES/DMSO 5%, 50 μ M).

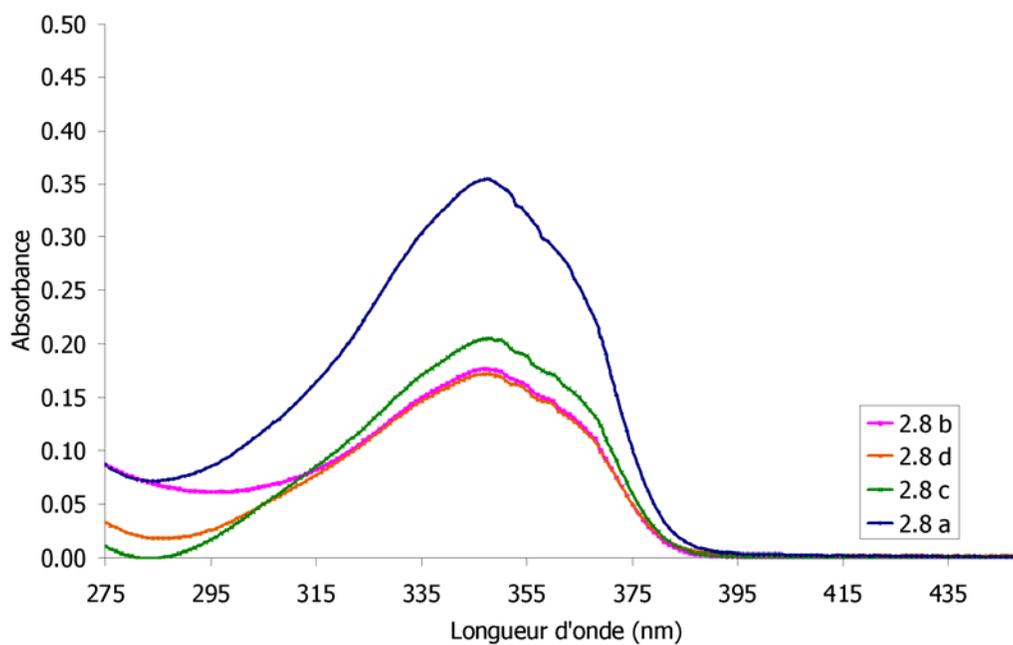


Figure 7.4. Détermination des maxima d'absorbance pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA (DMSO, 50 μ M).

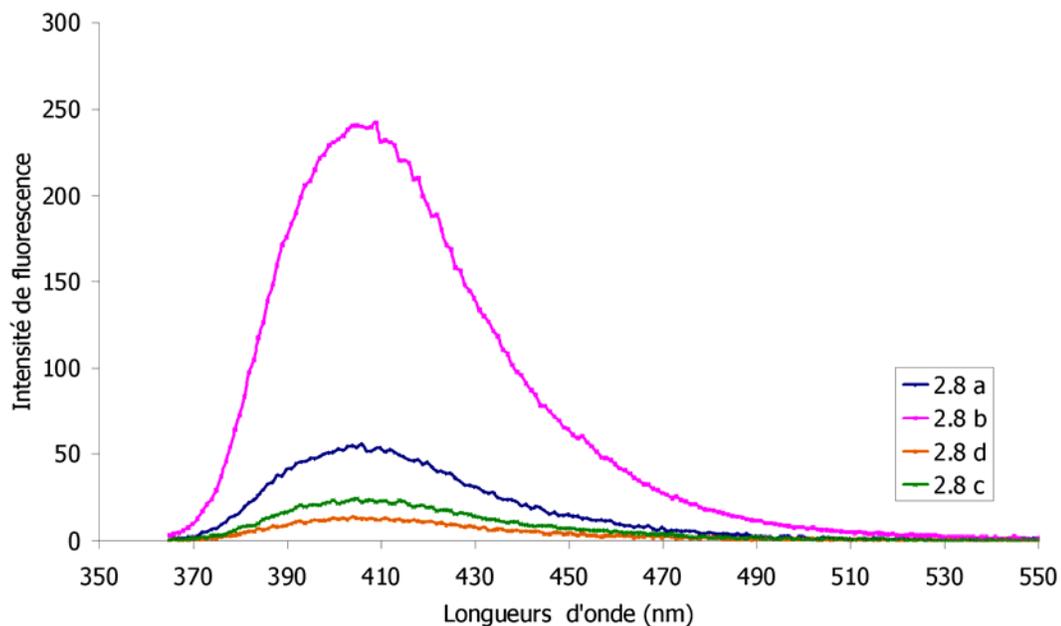


Figure 7.5. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, (HEPES/DMSO 5%, 4 μM, $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm).

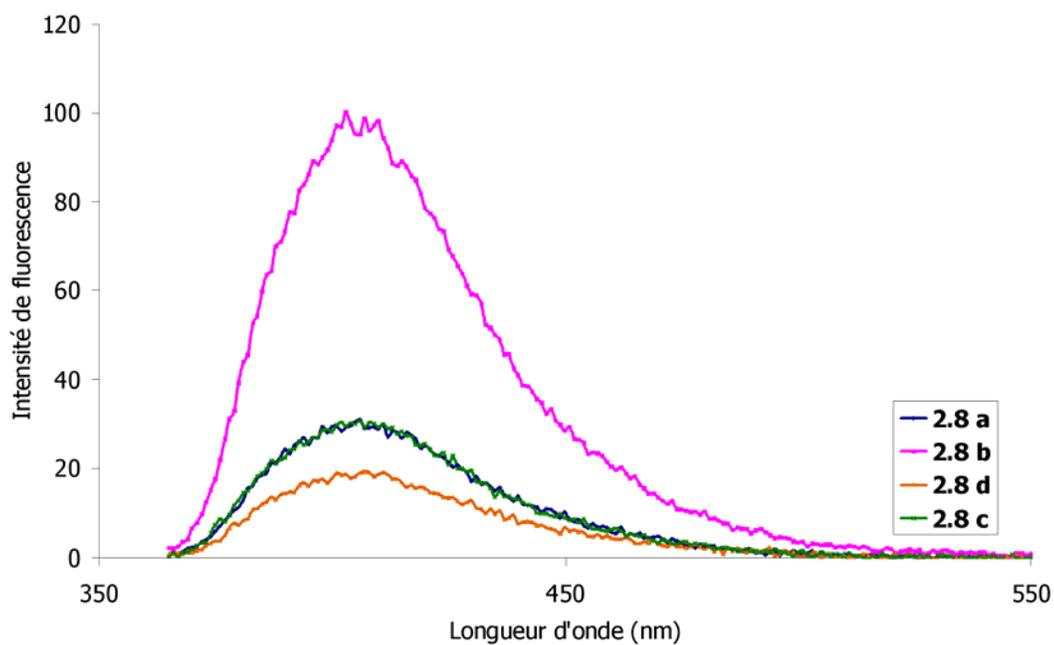


Figure 7.6. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, (DMSO, 4 μM, $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm).

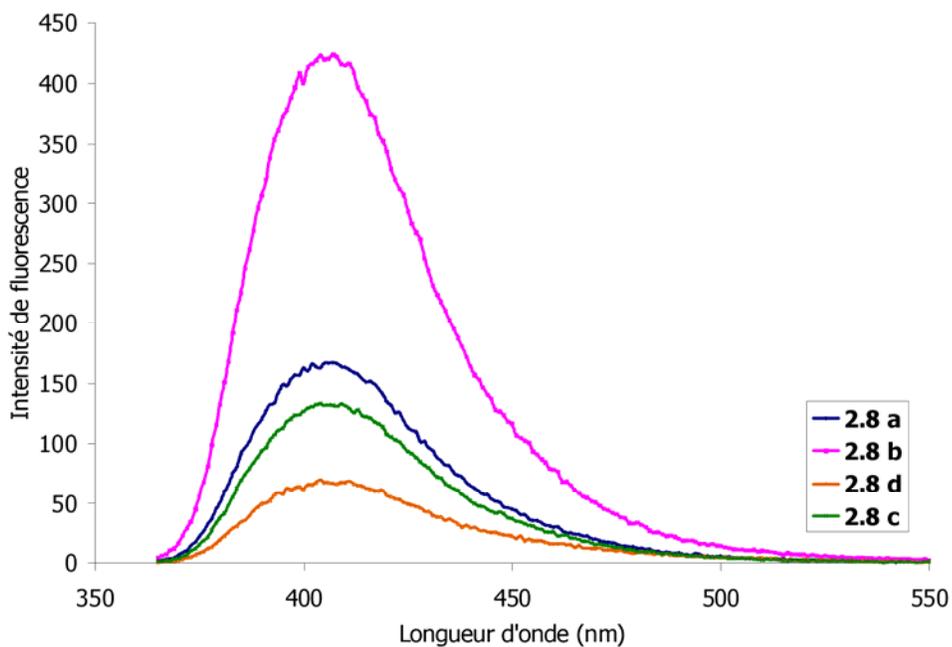


Figure 7.7. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, après réaction avec MPA, (HEPES/DMSO 5%, 4 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm).

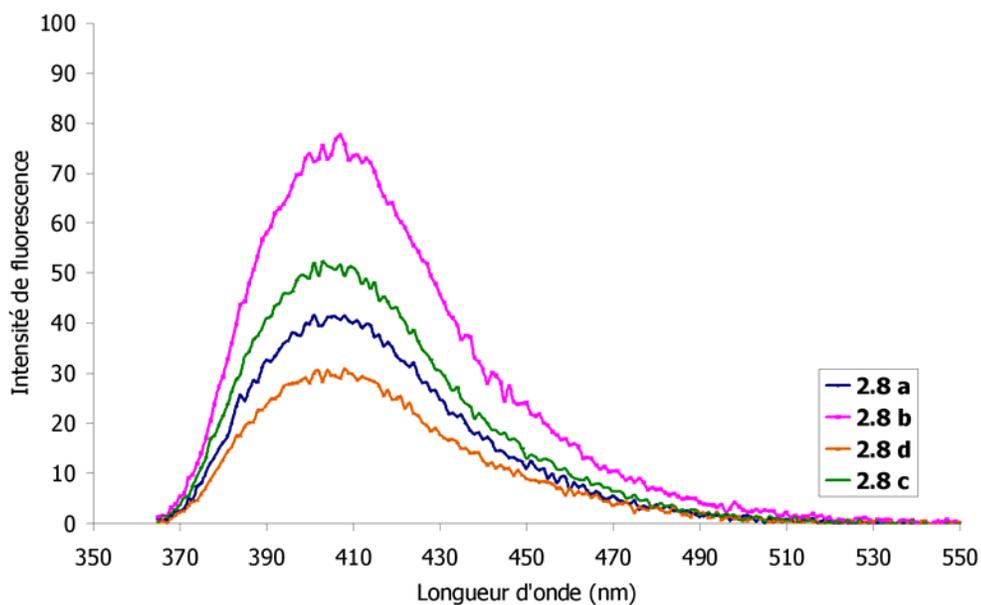


Figure 7.8. Détermination des maxima d'émission de fluorescence pour la série coumarine-dM10, après réaction avec le MPA, (DMSO, 4 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm).

Tableau 7.1. Corroboration de la double addition de Michael en HRMS pour la série coumarine-dM10.

Fluorogène	Masse attendue pour l'adduit dithiolé [M+H] ⁺	Masse trouvée
2.8 a (C ₃₆ H ₃₇ N ₄ O ₁₃ S ₂)	797.1800	797.1790
2.8 b (C ₄₀ H ₄₃ N ₄ O ₁₃ S ₂)	851.2250	851.2260
2.8 c (C ₄₀ H ₄₃ N ₄ O ₁₃ S ₂)	851.2250	851.2260
2.8 d (C ₄₀ H ₄₃ N ₄ O ₁₃ S ₂)	851.2250	851.2260

7.2.2. Détermination des FE : Chapitre 3

Tableau 7.2. Caractéristiques photophysiques des composés **3.9** et **3.18**.

Fluorogène	$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{ém}} \text{ (nm)}$			
	DMSO	HEPES/DMSO 5%	Après réaction avec MPA DMSO	Après réaction avec MPA HEPES/DMSO 5%
3.9	345 / 540	325 / 520	350 / 540	325 / 520
3.18	---	347 / 404	---	347 / 404

Tableau 7.3. Corroboration de la double addition de Micheal par MPA en HRMS pour les fluorogènes de troisième génération.

Fluorogène	Masse attendue pour l'adduit dithiolé $[M+H]^+$	Masse trouvée
3.8 ($C_{46}H_{49}N_5O_{13}S_4$)	990.2158	990.2177
3.9 ($C_{34}H_{37}N_4O_{10}S_3$)	757.1670	757.1670
3.18 ($C_{34}H_{34}N_3O_{12}S_2$)	740.1586	740.1578

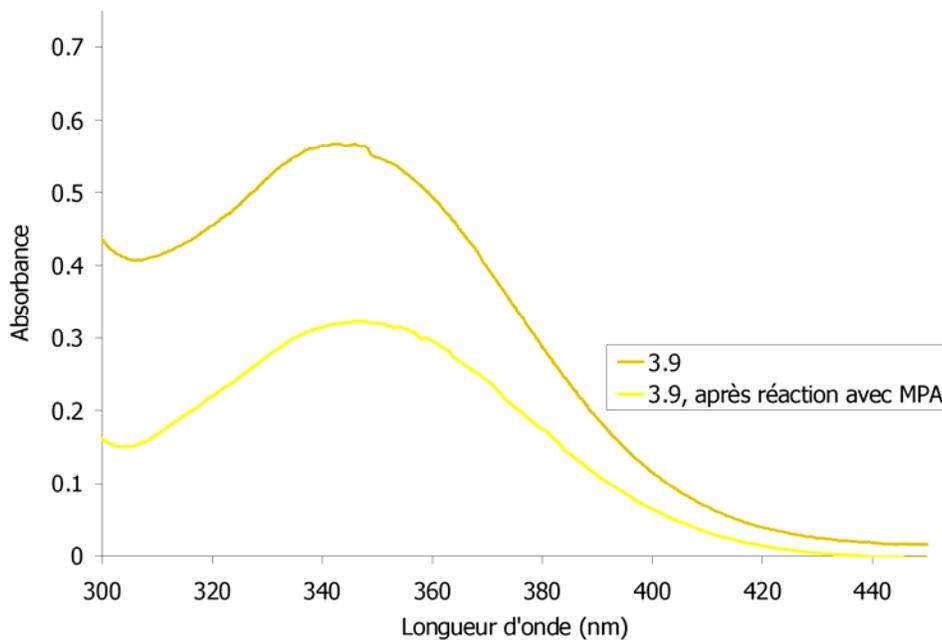


Figure 7.9. Détermination des maxima d'absorbance du fluorogène **3.9** (DMSO, 500 μ M).

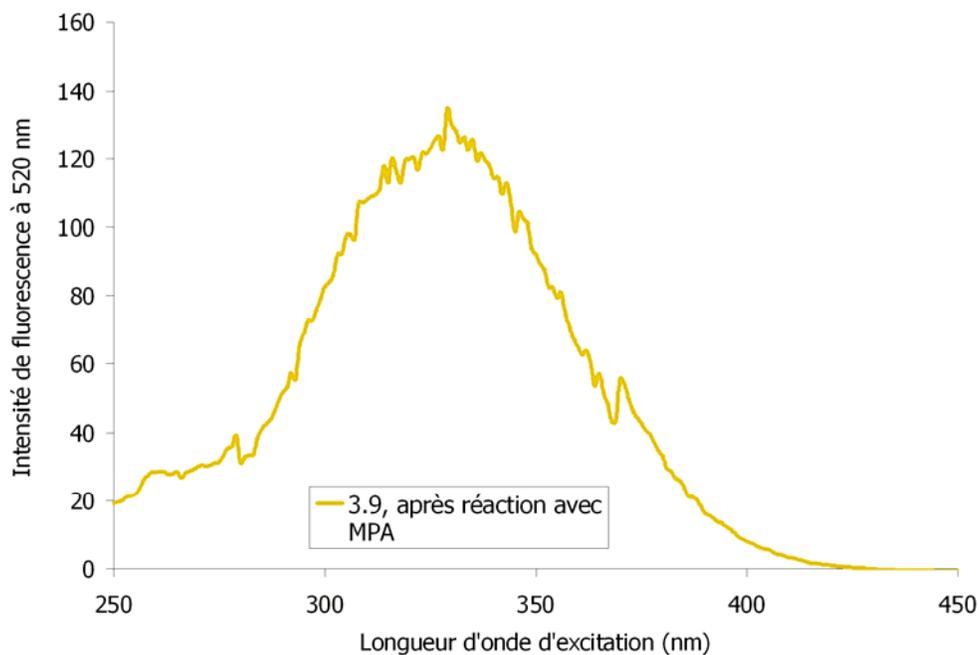


Figure 7.10. Détermination des maxima d'excitation du fluorogène **3.9** après réaction avec le MPA (HEPES/DMSO 5%, 200 μ M, $\lambda_{\text{ém}} = 520$ nm).

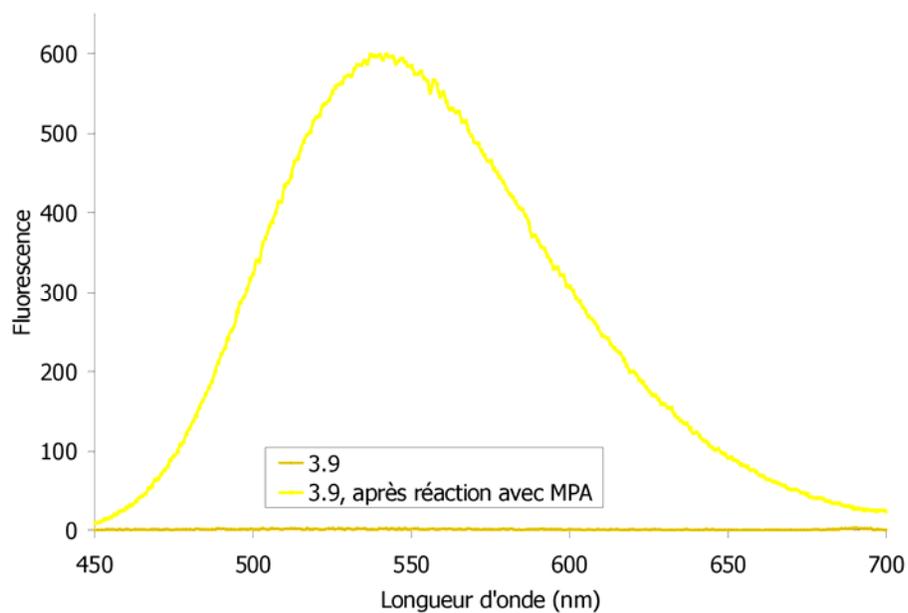


Figure 7.11. Détermination des maxima d'émission de fluorescence du fluorogène **3.9** (DMSO, 250 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm).

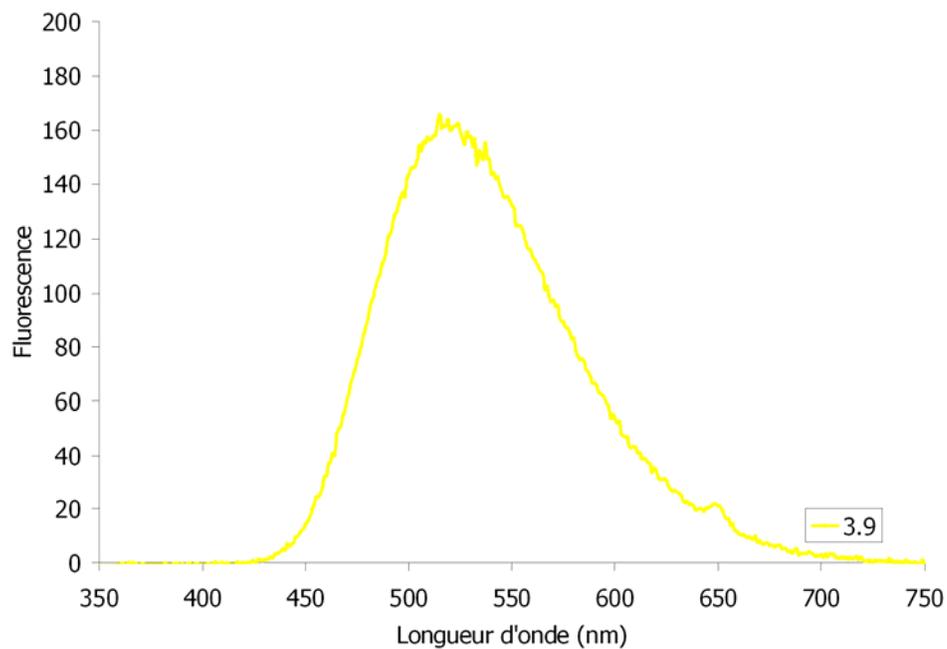


Figure 7.12. Détermination du maxima d'émission de fluorescence du fluorogène **3.9** (HEPES/DMSO 5%, 100 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 325$ nm).

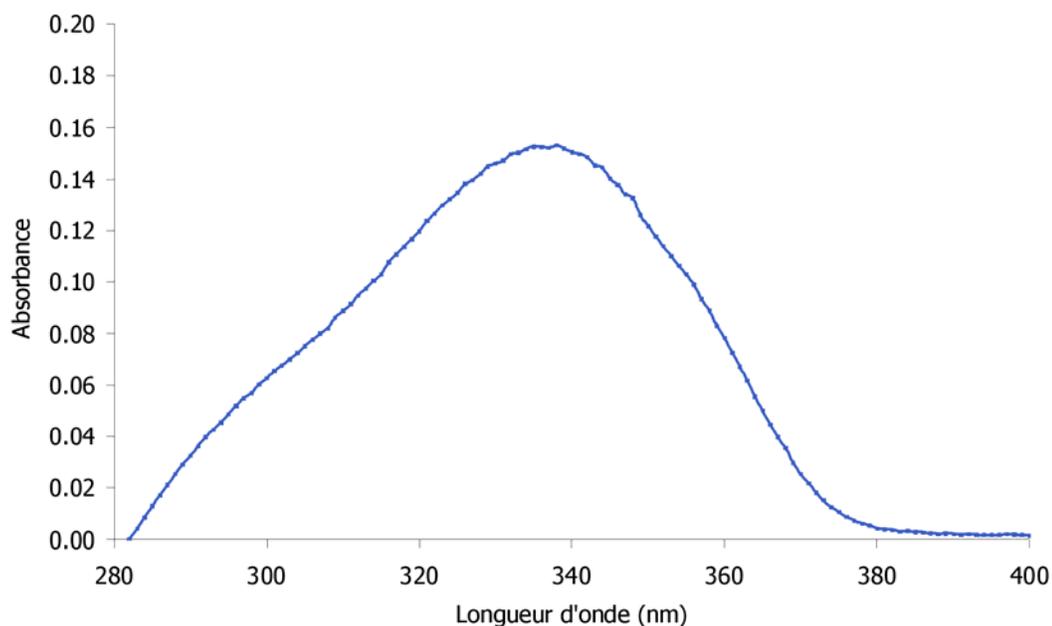


Figure 7.13. Détermination du maxima d'absorbance pour le fluorogène **3.18** (HEPES/DMSO 5 %, 50 μ M).

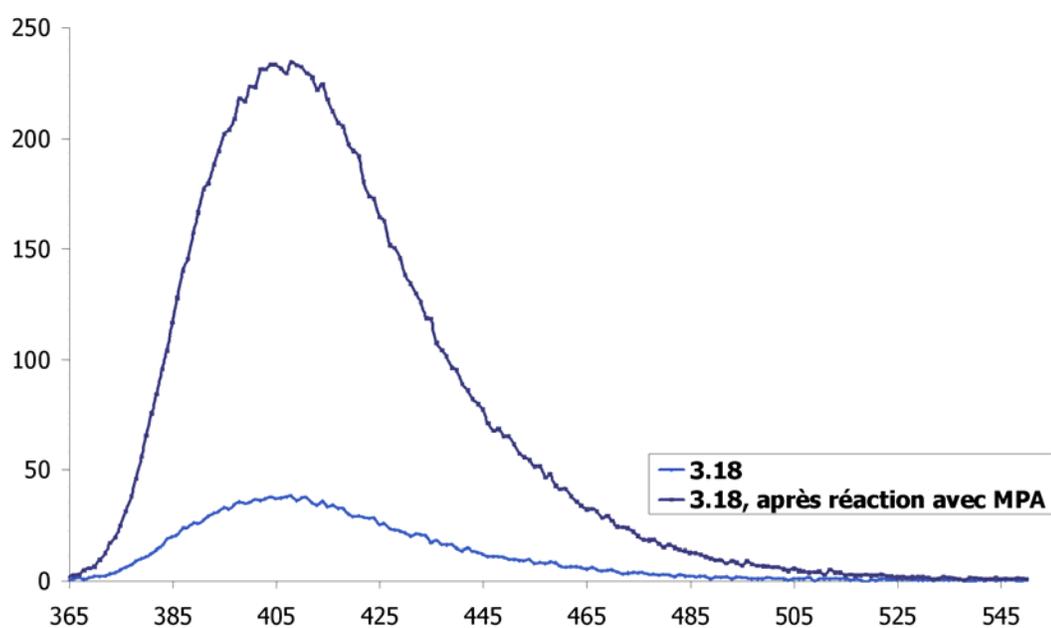


Figure 7.14. Détermination du maximum d'émission de fluorescence du fluorogène **3.18** (HEPES/DMSO 5 %, 4 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 347$ nm).

7.2.3. Détermination du FE : Chapitre 4

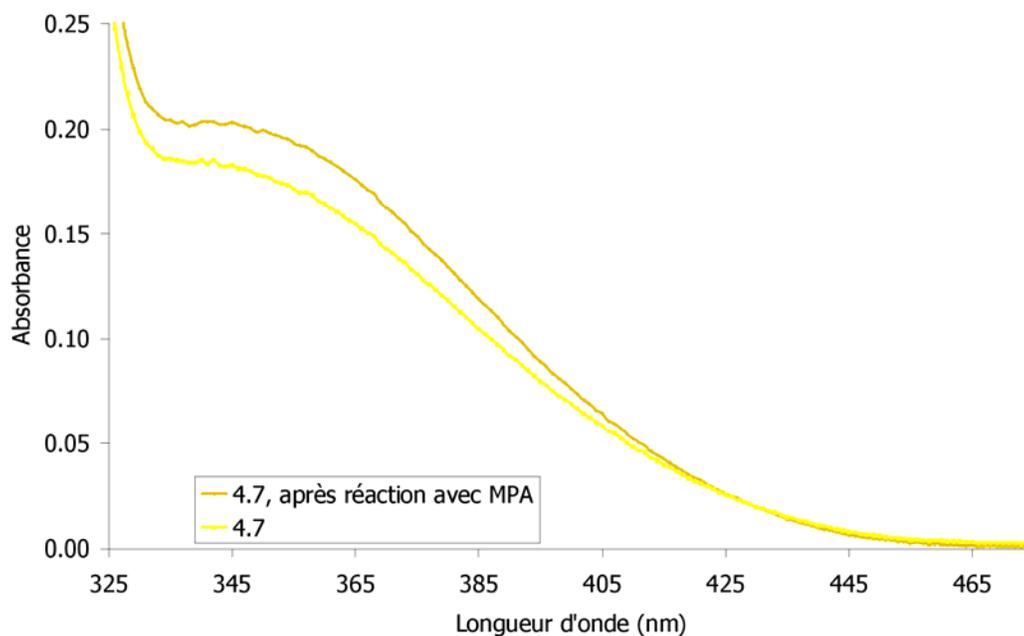


Figure 7.15. Détermination des maxima d'absorbance du composé modèle **4.7** (DMSO, 200 μ M).

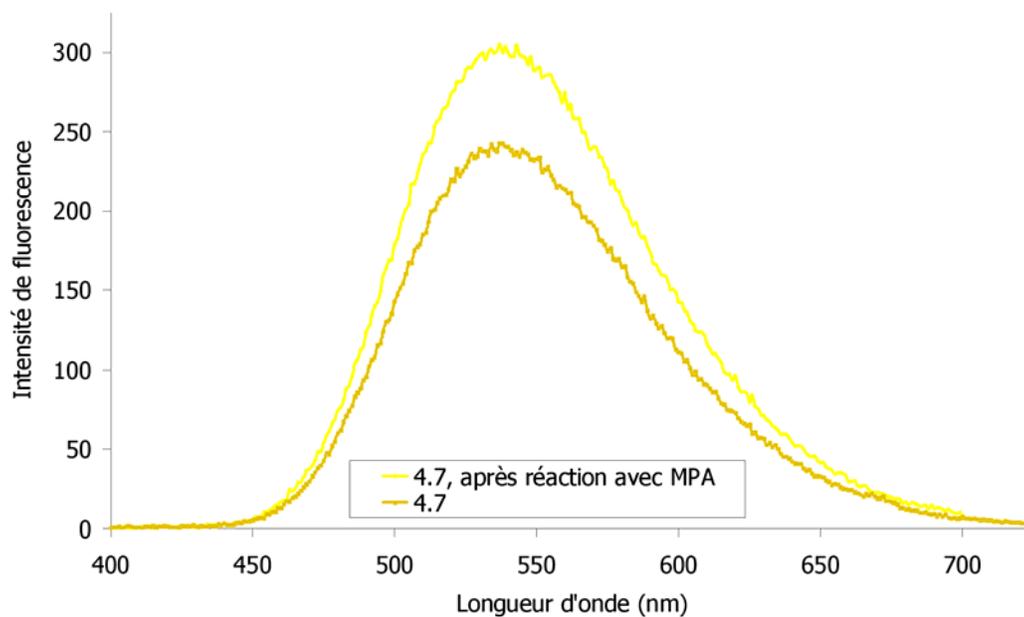


Figure 7.16. Détermination des maxima d'émission de fluorescence du composé modèle **4.7** (DMSO, 160 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm).

Tableau 7.4. Corroboration de l'addition de Michael par MPA en HRMS pour le composé modèle **4.7**.

Fluorogène	Masse attendue pour l'adduit dithiolé [M+H] ⁺	Masse trouvée
4.7 (C ₃₄ H ₃₂ N ₃ O ₆ S ₂)	642.1731	642.1727

Tableau 7.5. Corroboration de l'addition de Michael par le MPA en HRMS pour le fluorogène **5.1**.

Fluorogène	Masse attendue pour l'adduit dithiolé [M+H] ⁺	Masse trouvée
5.1 (C ₃₅ H ₃₇ BF ₂ N ₄ O ₈ S ₂)	777.2006	777.2006

7.2.4. Détermination des FE : Chapitre 5

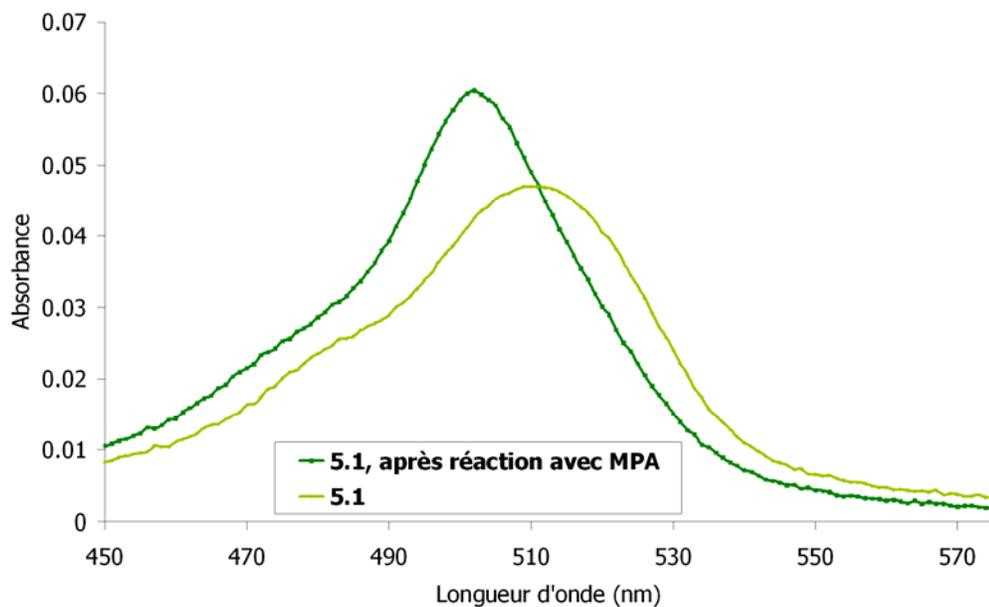


Figure 7.17. Détermination du maximum d'absorbance du fluorogène **5.1** (HEPES/DMSO 5%, 20 μ M).

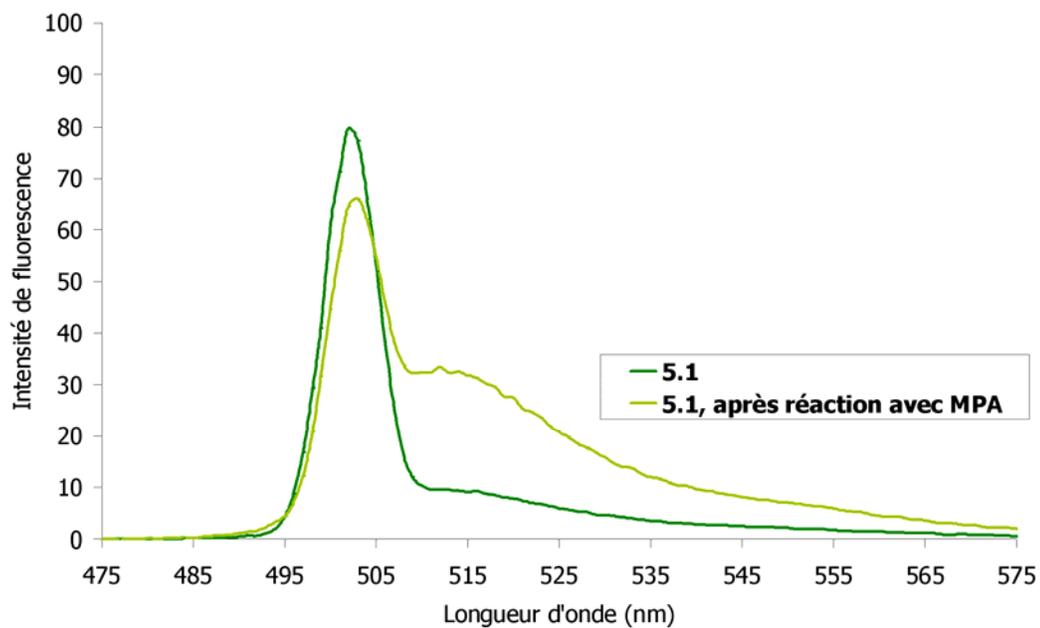


Figure 7.18. Détermination du maximum d'émission de fluorescence du fluorogène **5.1** (HEPES/DMSO 5%, 1 μ M, $\lambda_{\text{ex}} = 502$ nm).

7.3 MINIMISATIONS ÉNERGÉTIQUES DES FLUOROGÈNES

Les minimisations énergétiques des fluorogènes ont été effectuées via calcul semi-empirique à l'aide d'AM1 (champs de force) dans le vide, en utilisant comme algorithme de calcul un gradient conjugué de type Polak-Ribiere jusqu'à l'obtention de la convergence du gradient RMS à une valeur d'au plus 0.1 kcal/ (Å mol). Le tout a été effectué à l'aide de la version professionnelle d'*Hyperchem 7.5*.

