



(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2011/09/16
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2012/03/29
(45) **Date de délivrance/Issue Date:** 2018/11/13
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2013/03/14
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** FR 2011/000504
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2012/038614
(30) **Priorité/Priority:** 2010/09/21 (FR10/03759)

(51) **Cl.Int./Int.Cl.** **C09K 11/06** (2006.01),
C07H 17/075 (2006.01), **C12Q 1/34** (2006.01),
G01N 21/64 (2006.01)

(72) **Inventeurs/Inventors:**
DREVELLE, ANTOINE, FR;
LADAME, SYLVAIN, GB;
NAJAH, MAJDI, FR;
MAYOT, ESTELLE, FR

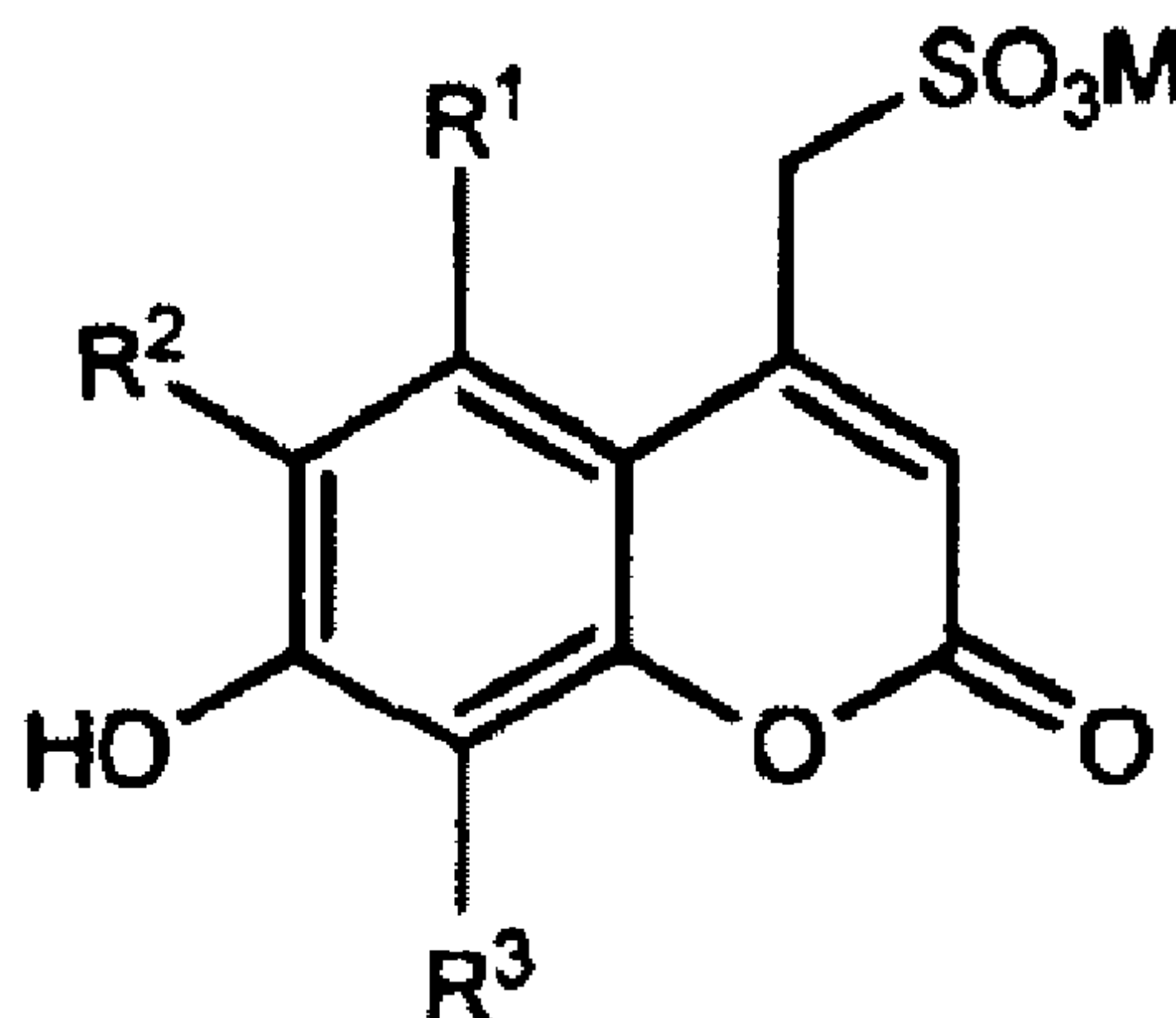
(73) **Propriétaires/Owners:**
ETS J. SOUFFLET, FR;
UNIVERSITE DE STRASBOURG, FR

(74) **Agent:** ROBIC

(54) **Titre : COUMARINES SULFONATEES, LEUR SYNTHÈSE, SUBSTRATS FLUOROGÉNIQUES RESULTANT D'UN GREFFAGE DE CES COUMARINES SUR DES SUCRES, LE PROCÉDÉ D'OBTENTION DE CES SUBSTRATS, AINSI QUE LEURS APPLICATIONS**

(54) **Title: SULFONATED COUMARINS, SYNTHESIS THEREOF, FLUOROGENIC SUBSTRATES RESULTING FROM GRAFTING SAID COUMARINS ONTO SUGARS, METHOD FOR PREPARING SAID SUBSTRATES, AND USES THEREOF**

(I)



(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne des coumarines sulfonatéees, leur synthèse, des substrats fluorogéniques résultant d'un greffage de ces coumarines sur des sucres, le procédé d'obtention de ces substrats, ainsi que leurs applications. Les coumarines sulfonatéees substituées sont de formule générale (I) dans laquelle : R₁ représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C₁ à C₆ substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou -COR⁴, ou -COOR⁴, ou -CONHR₄, R₂ représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C₁ à C₆ substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou -COR⁴, ou -COOR⁴, ou -CONHR₄, R₁ et R₂ pouvant former ensemble un cycle, tel qu'un aryle ou un furane, substitué ou non, R₃ représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C₁ à C₆ substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou -COR⁴, ou -COOR⁴, ou -CONHR₄, avec R⁴ étant H, ou un radical alkyle de C₁ à C₆ substitué ou non, linéaire ou ramifié ou un aryle, substitué ou non, M représente Na ou K. Les substrats sont obtenus par greffage de ces coumarines avec des sucres : cellobiose, xylobiose, maltose, saccharose, glucose, xylose, galactose, arabinose, xylane, glucane, xylotriose, maltotriose, cellotriose, xylotétraose ou un mélange de certains d'entre eux. Application à la détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/038614 A1

(43) Date de la publication internationale
29 mars 2012 (29.03.2012)

(51) Classification internationale des brevets :
C09K 11/06 (2006.01) *C12Q 1/34* (2006.01)
C07H 17/075 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/000504

(22) Date de dépôt international :
16 septembre 2011 (16.09.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
10/03759 21 septembre 2010 (21.09.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : ETS
J. SOUFFLET [FR/FR]; Quai Sarraill, F-10402 Nogent-
sur-Seine (FR). UNIVERSITE DE STRASBOURG
[FR/FR]; 4, rue Blaise-Pascal, F-67000 Strasbourg (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
DREVELLE, Antoine [FR/FR]; 7 rue de la motte,
F-10400 Fontaine Macon (FR). LADAME, Sylvain [GB/
GB]; 70A Tottenham Lane, Crouch End, London N87EE
(GB). NAJAH, Majdi [FR/FR]; 9 ter rue Lorin, F-10400
Fontaine- Macon (FR). MAYOT, Estelle [FR/FR]; 5
place Clément, F-67000 Strasbourg (FR).

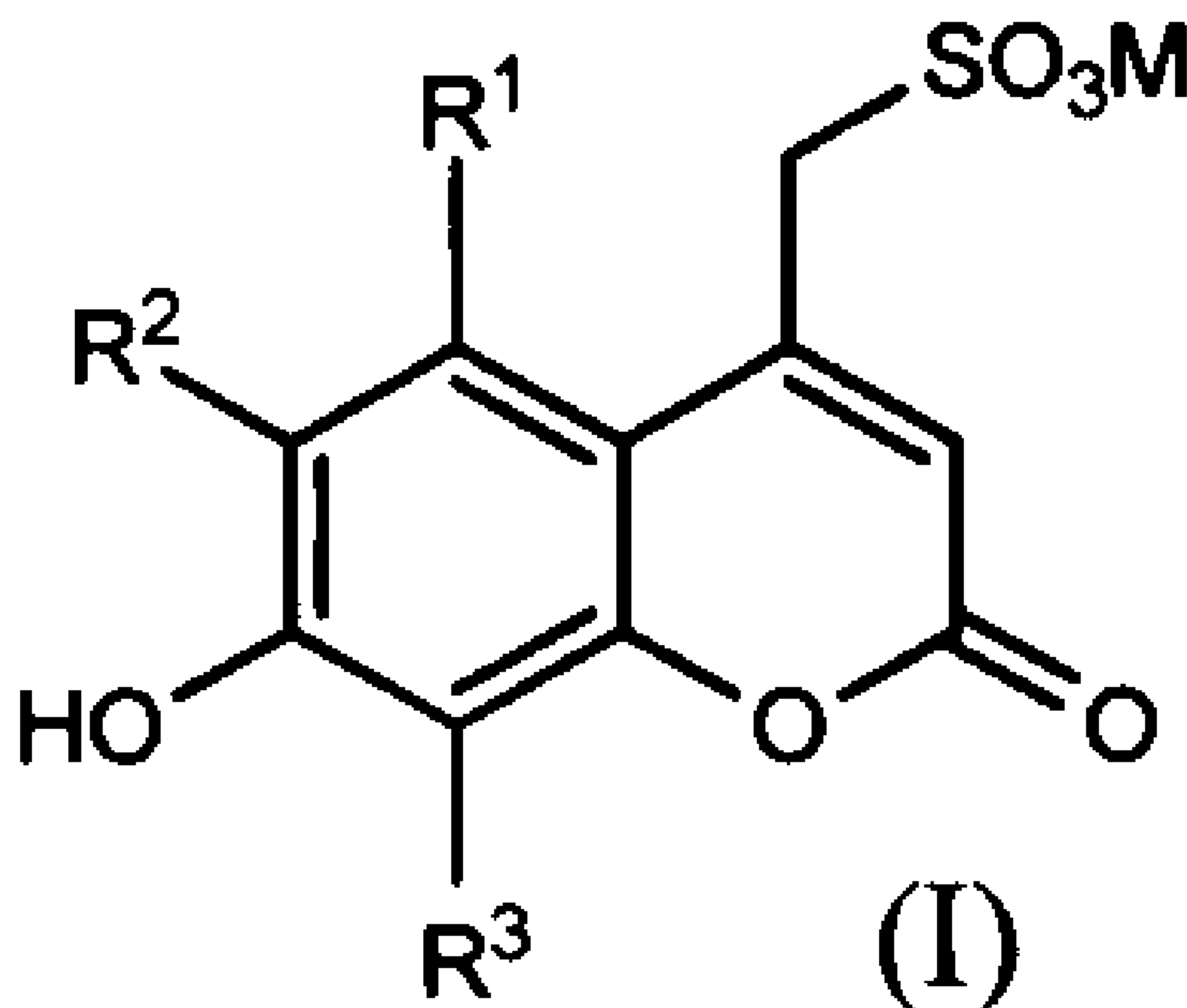
(74) Mandataire : GALLOCHAT, Alain; 39, rue du Clos de
Paris, F-95170 Deuil-la-Barre (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : SULFONATED COUMARINS, SYNTHESIS THEREOF, FLUOROGENIC SUBSTRATES RESULTING FROM GRAFTING SAID COUMARINS ONTO SUGARS, METHOD FOR PREPARING SAID SUBSTRATES, AND USES THEREOF

(54) Titre : COUMARINES SULFONATÉES, LEUR SYNTHÈSE, SUBSTRATS FLUOROGÉNIQUES RÉSULTANT D'UN GREFFAGE DE CES COUMARINES SUR DES SUCRES, LE PROCÉDÉ D'OBTENTION DE CES SUBSTRATS, AINSI QUE LEURS APPLICATIONS



(57) Abstract : The present invention relates to sulfonated coumarins, to the synthesis thereof, to fluorogenic substrates resulting from grafting said coumarins onto sugars, to a method for preparing said substrates, and to the uses thereof. The substituted sulfonated coumarins are expressed in general formula (I), where: R₁ is H, OH, or a substituted or unsubstituted, straight or branched C₁ to C₆ alkyl radical, or -COR⁴, -COOR⁴, or -CONHR⁴, R₂ is H or a halogen, in particular fluorine, or a substituted or unsubstituted, straight or branched C₁ to C₆ alkyl radical, or -COR⁴, -COOR⁴, or -CONHR⁴, R₁ and R₂ being capable of together forming a ring, such as a substituted or unsubstituted aryl or furan, R₃ is H or a halogen, particularly fluorine or a substituted or unsubstituted, straight or branched C₁ to C₆ alkyl radical, or -COR⁴, -COOR⁴, or -CONHR⁴, where R⁴ is H or a substituted or unsubstituted, straight or branched C₁ to C₆ alkyl radical, or a substituted or unsubstituted aryl, and M is Na or K. The substrates are prepared by grafting said coumarins with the following sugars: cellobiose, xylobiose, maltose, saccharose, glucose, xylose, galactose, arabinose, xylan, glucan, xylotriose, maltotriose, cellotriose, xylotetraose, or a mixture of some of said sugars. The invention is useful in detecting glycosidase (EC3.2.1) activity on purified or unpurified enzyme extracts, or on microorganisms or cells.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]

WO 2012/038614 A1

TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

La présente invention concerne des coumarines sulfonatéés, leur synthèse, des substrats fluorogéniques résultant d'un greffage de ces coumarines sur des sucres, le procédé d'obtention de ces substrats, ainsi que leurs applications. Les coumarines sulfonatéés substituées sont de formule générale (I) dans laquelle : R_1 représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$, R^2 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkylde de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$, R_1 et R_2 pouvant former ensemble un cycle, tel qu'un aryle ou un furane, substitué ou non, R^3 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$, avec R^4 étant H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié ou un aryle, substitué ou non, M représente Na ou K. Les substrats sont obtenus par greffage de ces coumarines avec des sucres : cellobiose, xylobiose, maltose, saccharose, glucose, xylose, galactose, arabinose, xylane, glucane, xylotriose, maltotriose, cellotriose, xylotétraose ou un mélange de certains d'entre eux. Application à la détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules.

WO 2012/038614 PCT/FR2011/000504
 Coumarines sulfonées, leur synthèse, substrats fluorogéniques résultant d'un greffage de ces
 coumarines sur des sucres, le procédé d'obtention de ces substrats, ainsi que leurs applications

La présente invention concerne des coumarines sulfonées, leur synthèse, des
 substrats fluorogéniques résultant d'un greffage de ces coumarines sur des sucres, le procédé
 d'obtention de ces substrats, ainsi que leurs applications.

Différentes méthodes de fabrication de telles coumarines sulfonées sont connues, par
 5 exemple par le brevet anglais GB9723365 au nom de MOLECULAR PROBES qui décrit la
 synthèse de dérivés de la 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarine.

C'est ainsi que ce brevet cite notamment la 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-
 méthanesulfonate de sodium (composé n° 37).

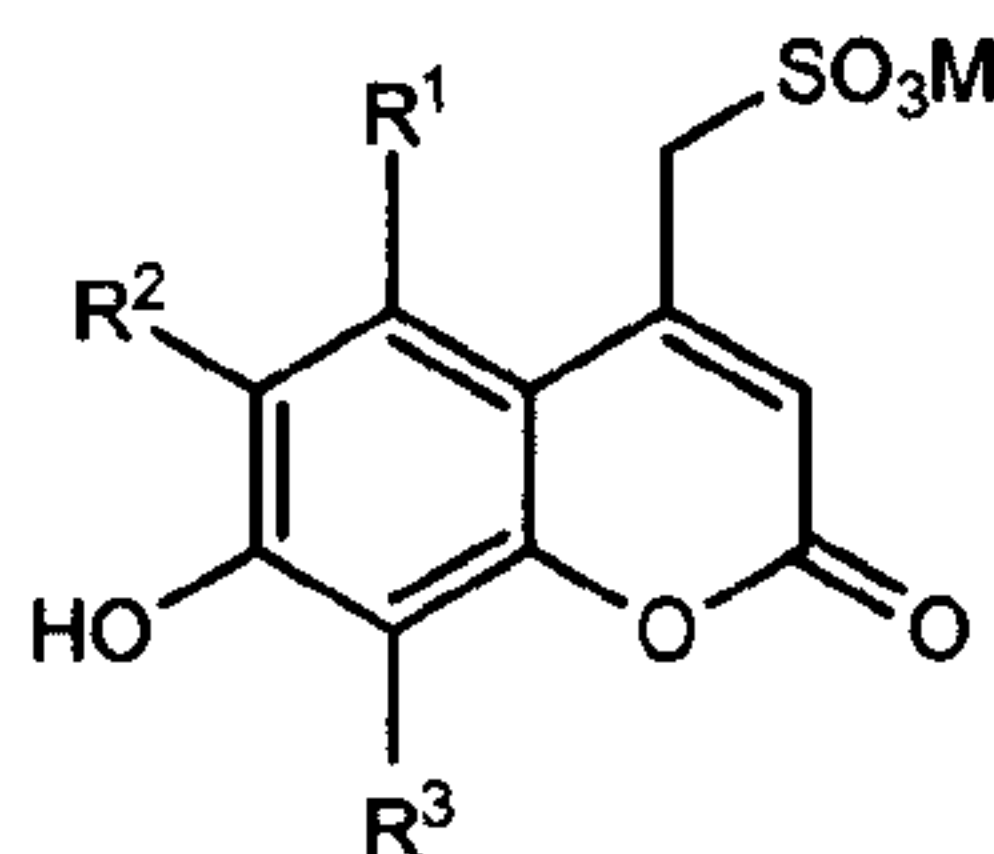
Le brevet GB9723365 décrit aussi des composés résultant d'un remplacement du
 10 groupe hydroxyle par un reste de sucre, ce dernier étant donc greffé sur la coumarine
 sulfonée. La reproduction du procédé de greffage décrit dans le brevet précité n'est pas
 valable pour les coumarines sulfonées car elles ne sont pas solubles dans les conditions
 décrites.

Un objectif de la présente invention est de synthétiser de nouvelles coumarines
 15 sulfonées substituées.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir des substrats fluorogéniques
 résultant d'un greffage de coumarines sulfonées substituées sur des sucres grâce à un
 procédé de greffage reproductible avec différents sucres et différentes coumarines sulfonées
 substituées. On entend dans la présente description par substrat fluorogénique un substrat non
 20 fluorescent dont l'hydrolyse de la liaison entre le sucre et la coumarine libère la coumarine,
 qui est en elle-même fluorescente.

Un autre objectif de la présente invention concerne une méthode de détection
 d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des
 microorganismes ou sur des cellules.

De façon plus précise, la présente invention concerne une famille de coumarines
 25 sulfonées substituées de formule générale (I)

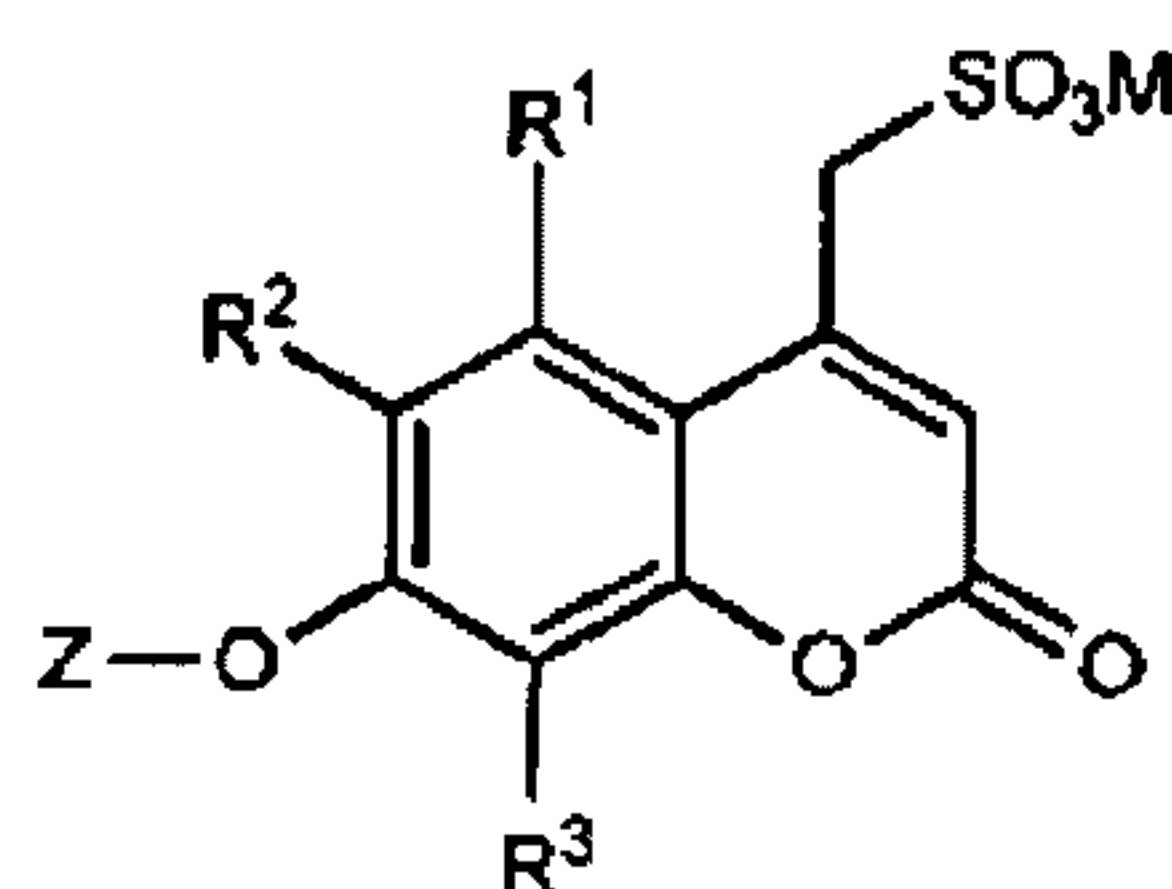


dans laquelle :

- R¹ représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C₁ à C₆ substitué ou non, linéaire ou
 30 ramifié, ou -COR⁴, ou -COOR⁴, ou -CONHR⁴

- R^2 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
- R^1 et R^2 pouvant former ensemble un cycle, tel qu'un aryle ou un furane, substitué ou non
- R^3 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
- avec R^4 étant H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié ou un aryle, substitué ou non
- M représente Na ou K.

La présente invention concerne également de nouveaux substrats ayant pour formule générale (II)



dans laquelle :

- R^1 représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
- R^2 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
- R^1 et R^2 pouvant former ensemble un cycle, tel qu'un aryle ou un furane, substitué ou non
- R^3 représente H, ou un halogène, notamment le fluor, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
- avec R^4 étant H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié ou un aryle, substitué ou non
- M représente Na ou K

- Z représente un sucre choisi parmi les sucres suivants : cellobiose, xylobiose, maltose, saccharose, glucose, xylose, galactose, arabinose, xylane, glucane, xylotriose, maltotriose, cellotriose, xylotétraose ou un mélange de certains d'entre eux
- et dans laquelle Z ne pouvant être le galactose lorsque R^1 est H, R^2 et R^3 sont F et M est Na.

Un autre objet de la présente demande concerne un procédé de préparation de la coumarine tel défini ci-joint caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans de l'acide méthanesulfonique du 4 chloroacétoacétate d'éthyle sur du 2-méthylrésorcinol, puis à faire agir du sulfite de sodium sur le produit ainsi obtenu.

Un autre objet de la présente demande concerne un procédé d'obtention de la coumarine tel que défini ci-joint, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans de l'acide méthanesulfonique du 4-chloroacétoacétate d'éthyle sur du 1,3-dihydroxynaphtalène, puis à faire agir du sulfite de sodium sur le produit ainsi obtenu.

Un autre objet concerne également un procédé d'obtention d'un substrat défini ci-joint caractérisé par le greffage d'un sucre sur une coumarine sulfonée dans du DMF.

Un autre objet concerne également la détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules, caractérisée en ce que ladite détection se fait grâce à l'un des substrats fluorogéniques définis aux présentes.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : Détection d'activités enzymatiques sur l'extrait soluble d'enzymes A avec les substrats 10, 12 et 14.

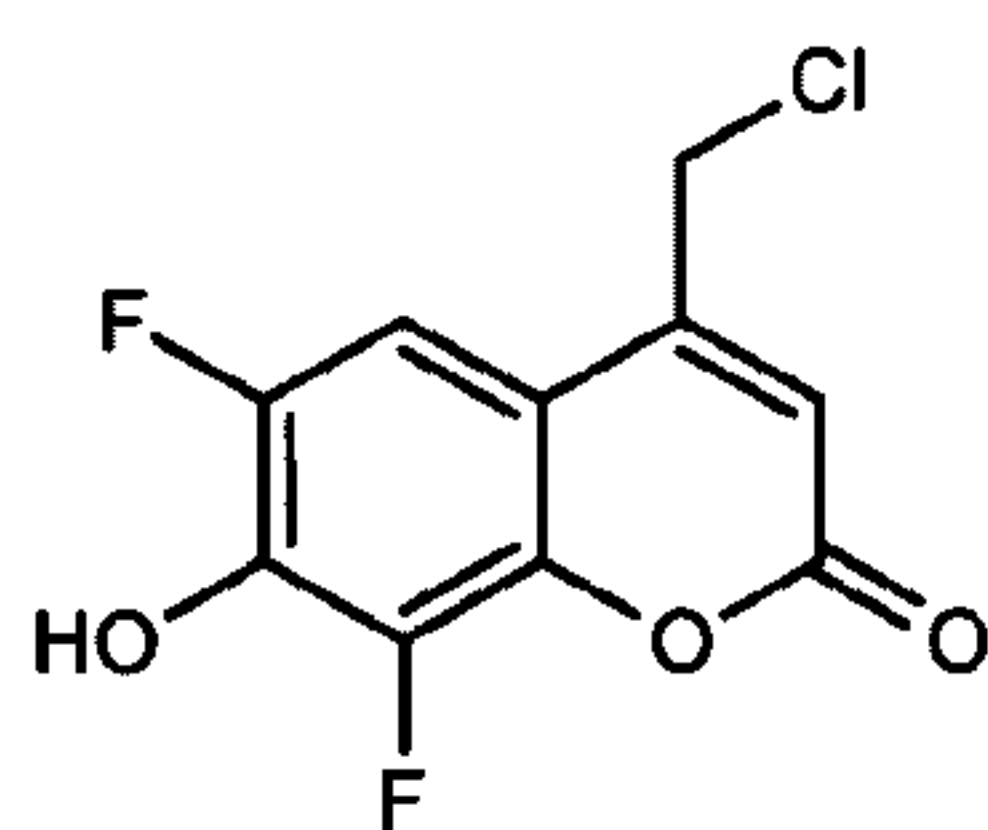
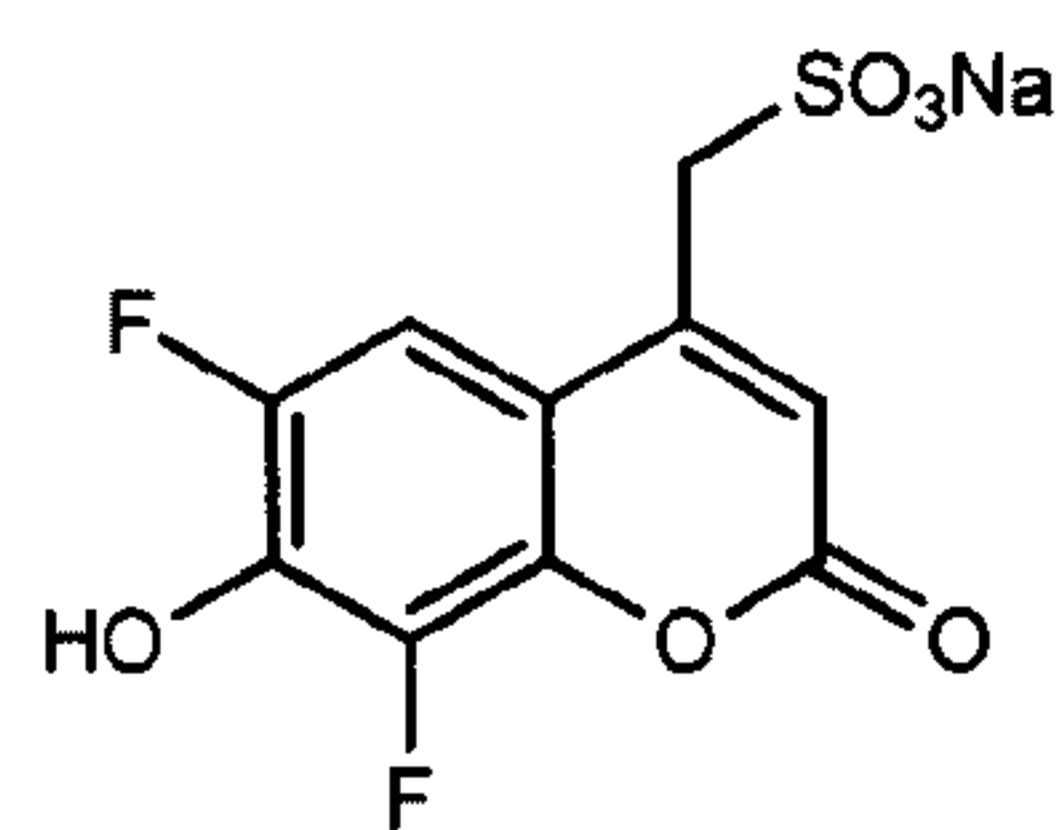
Figure 2 : Détection d'activités enzymatiques sur des extraits solubles d'enzymes avec le substrat 18.

Figure 3 : Mesure d'activité β -glucosidase sur microorganismes avec le substrat fluorogénique 10.

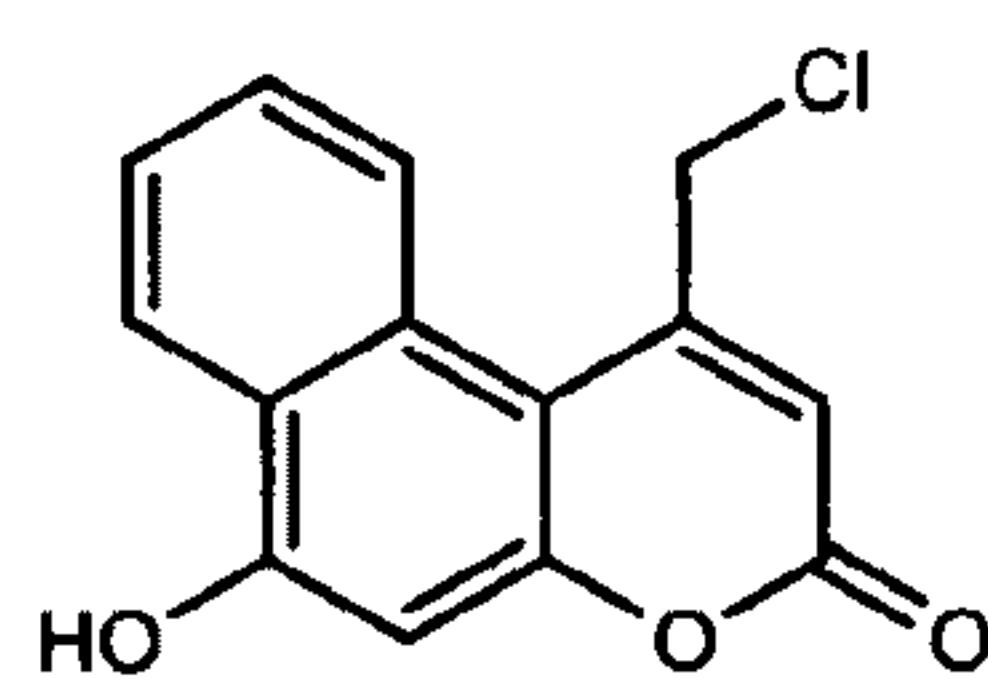
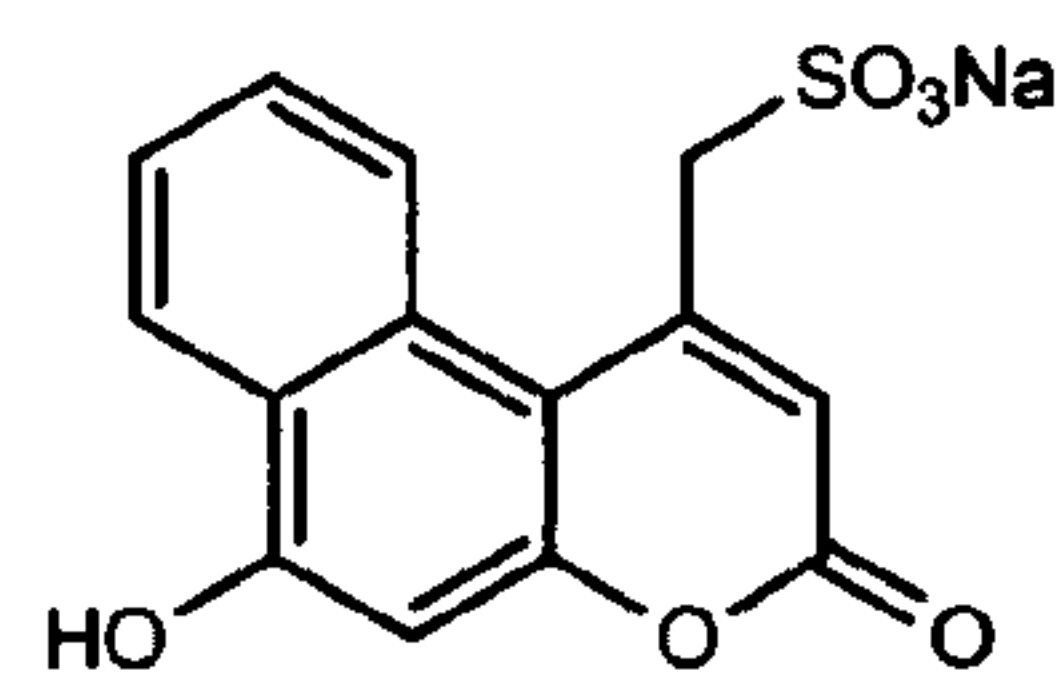
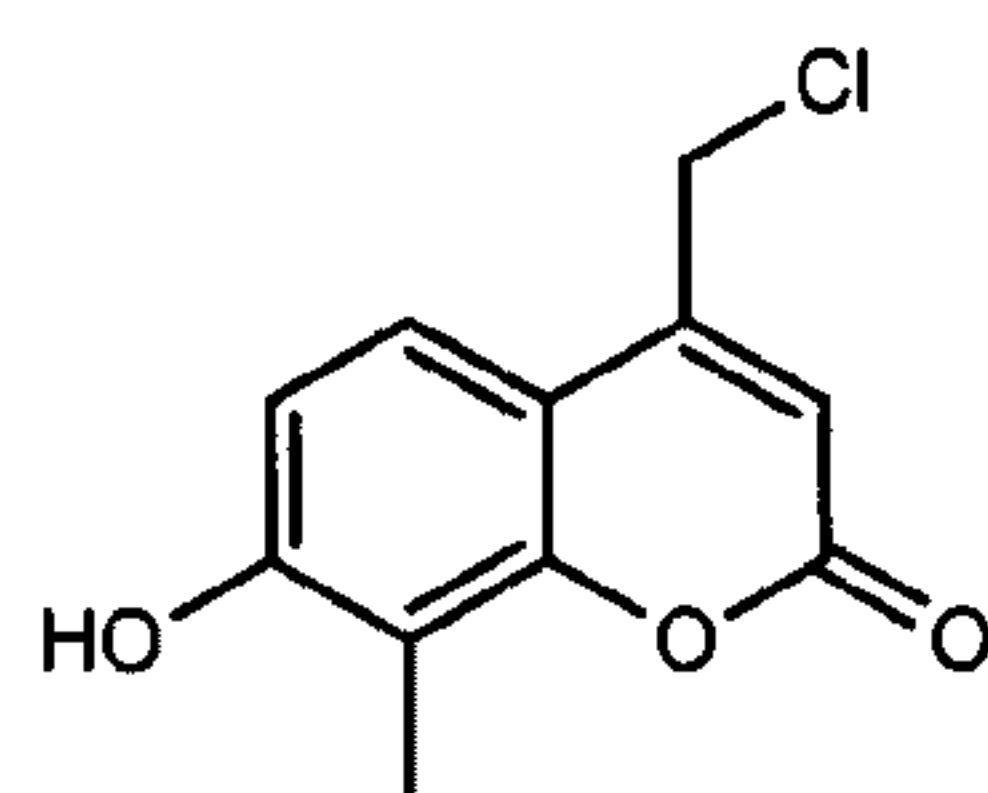
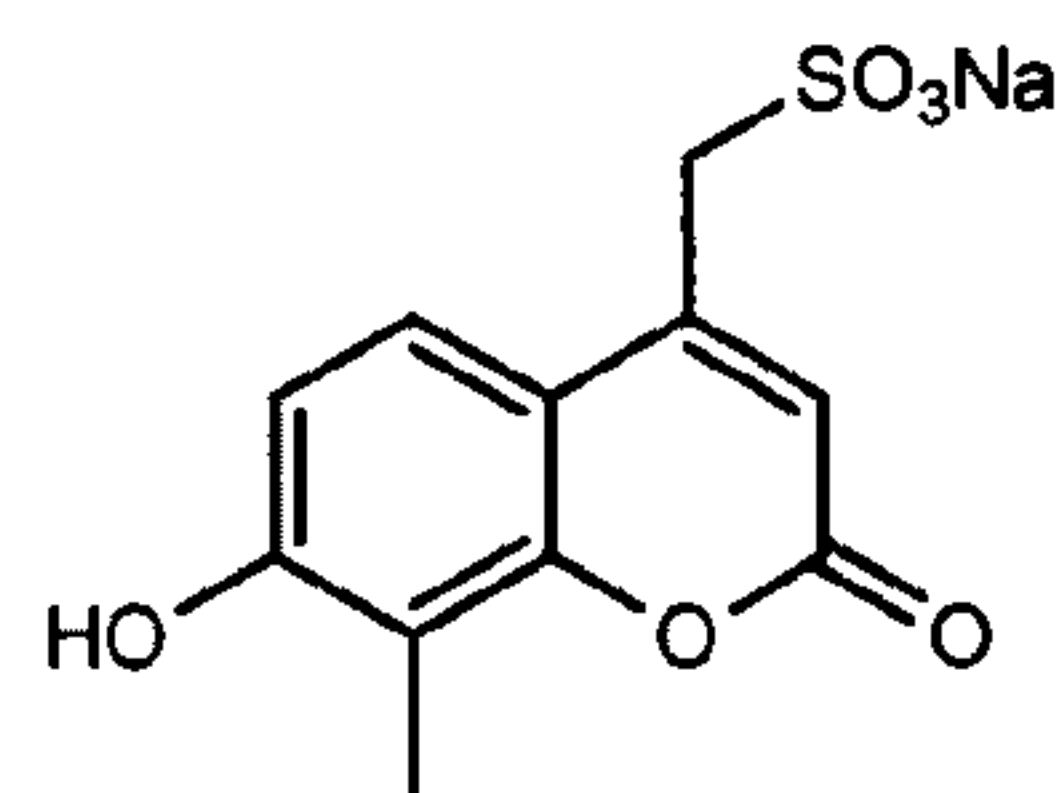
Figure 4 : Mesure d'activité cellulase sur microorganismes avec le substrat fluorogénique 8.

Figure 5 : Tests d'activité cellulase sur microorganismes en émulsion avec le substrat 8.

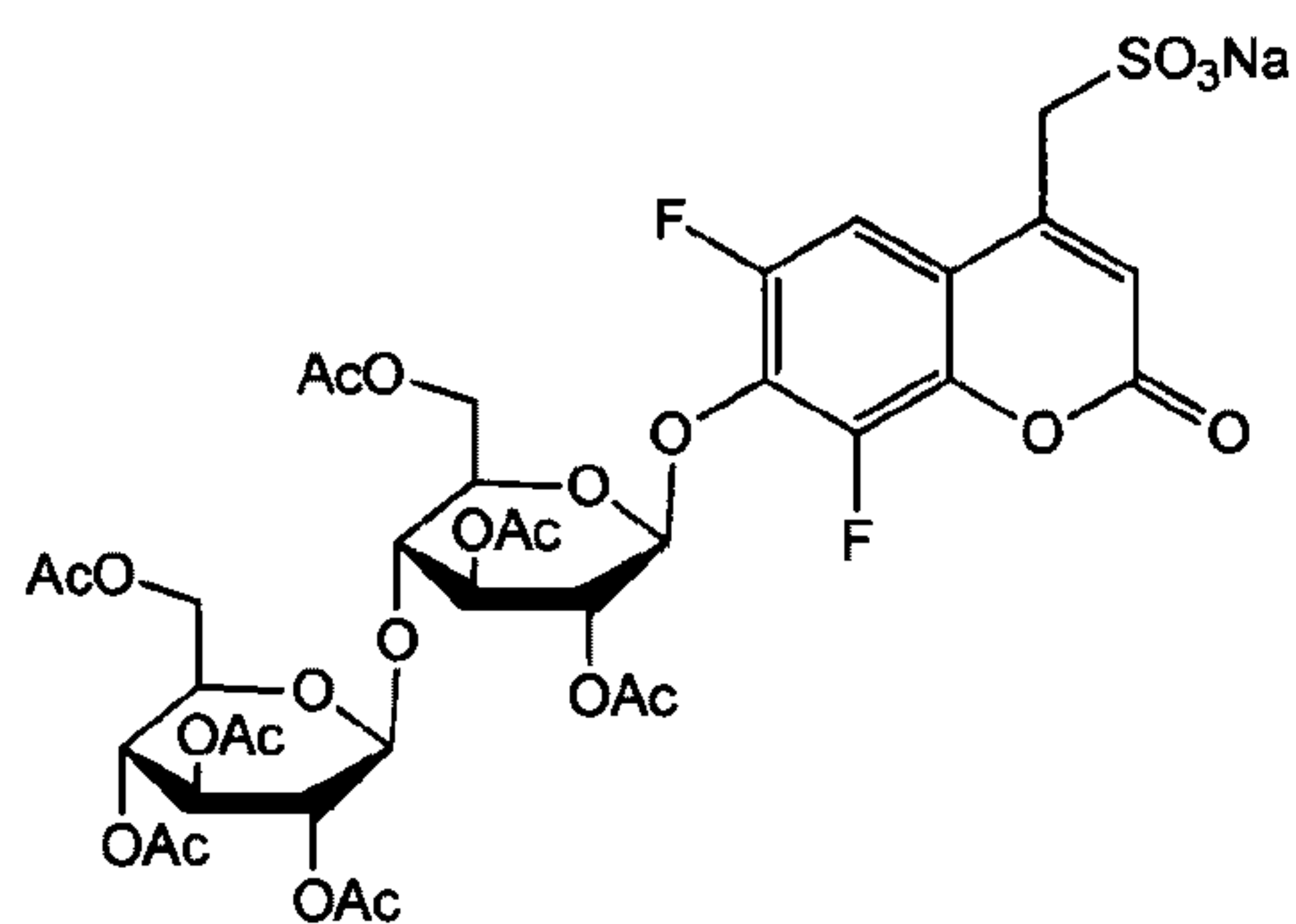
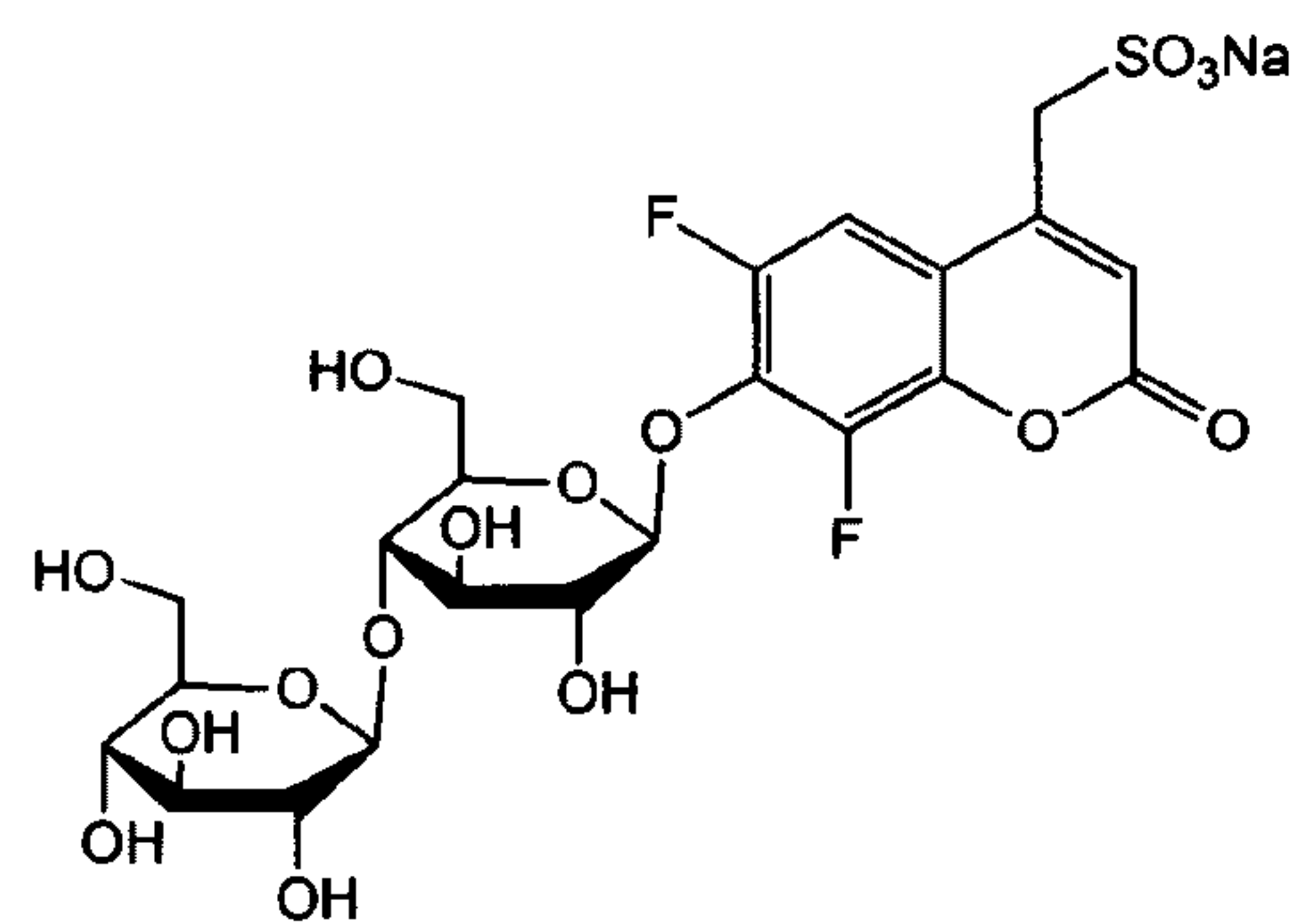
L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, référence étant faite aux composés numérotés 1 à 24 suivants :

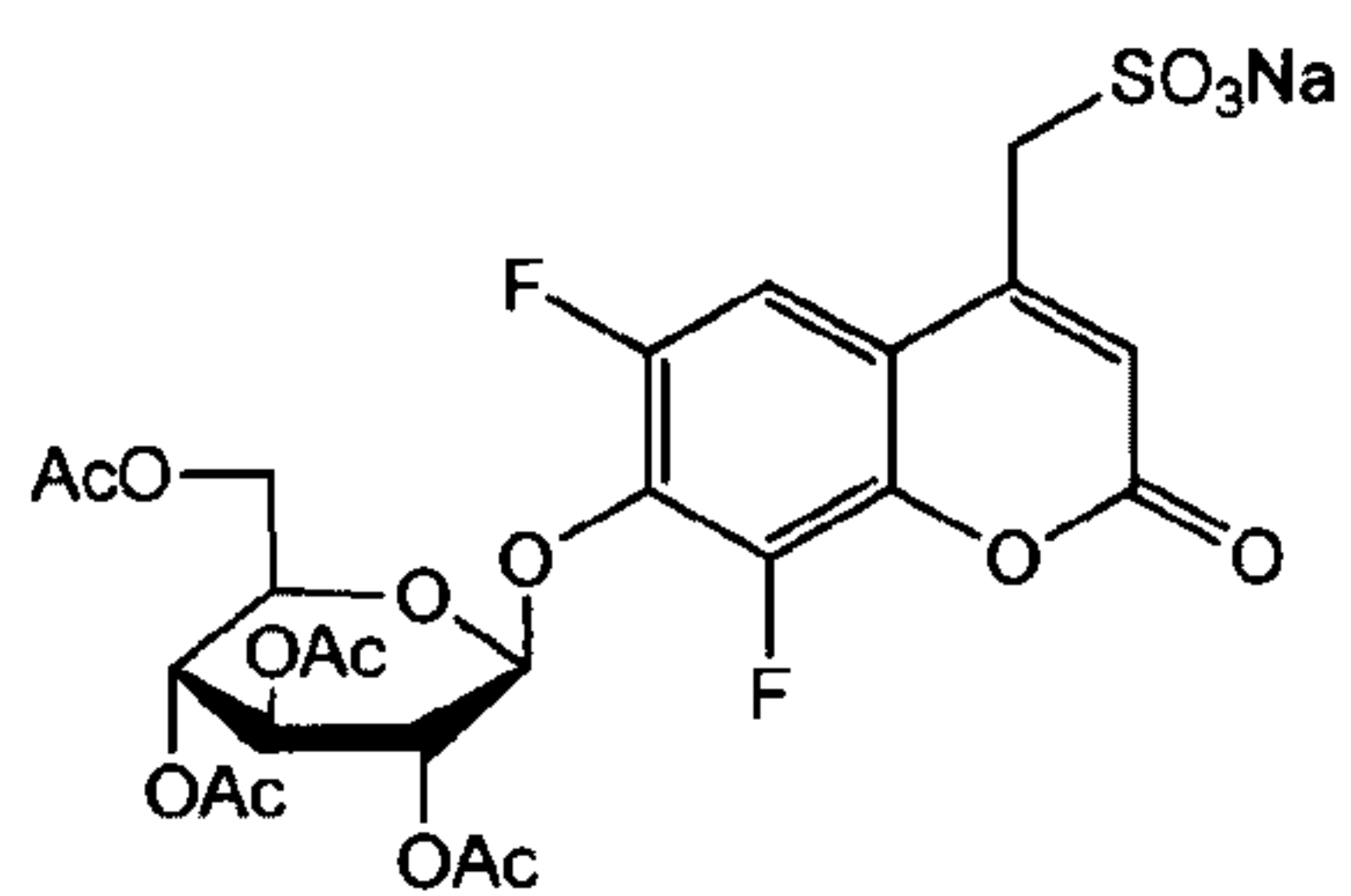
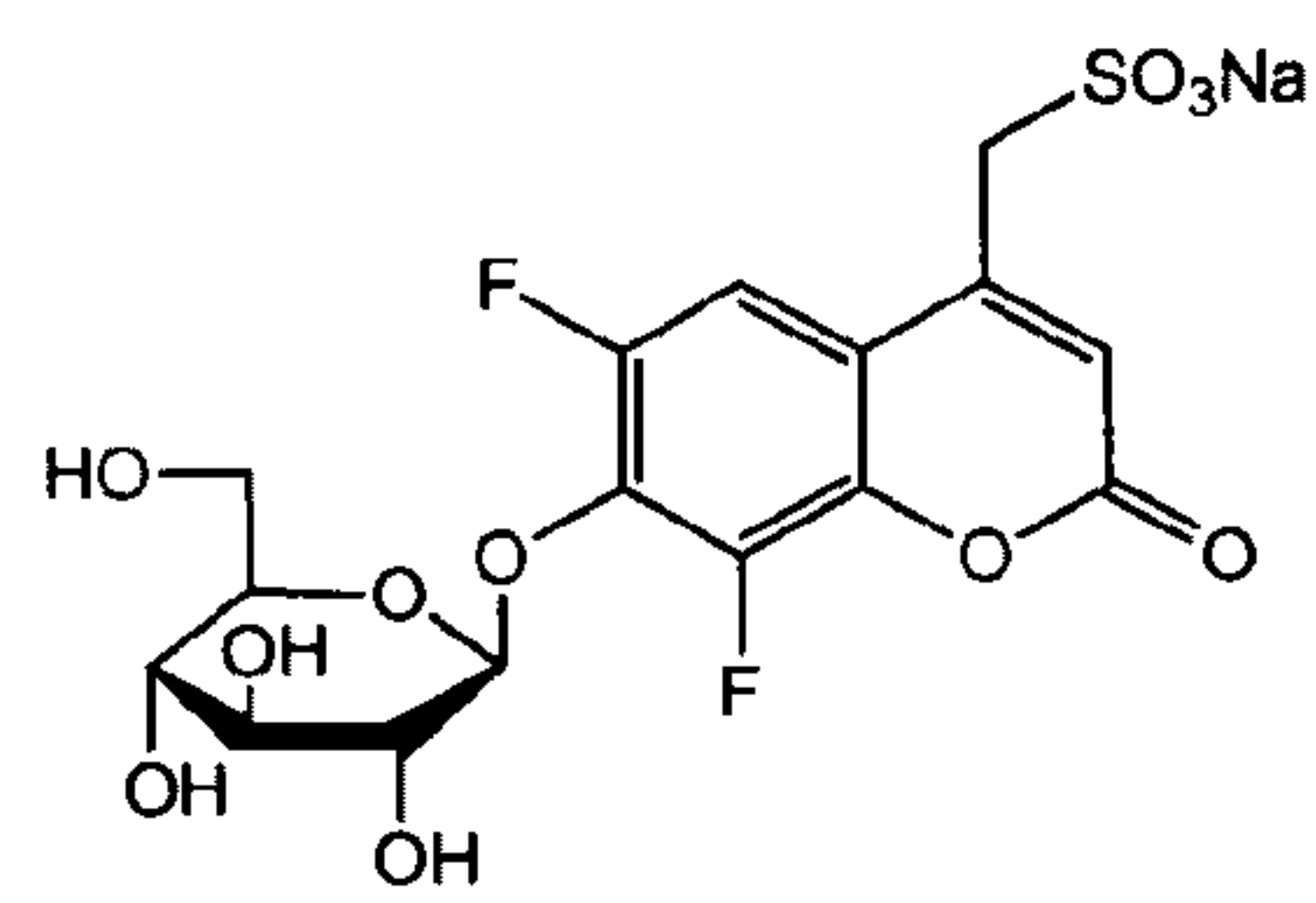
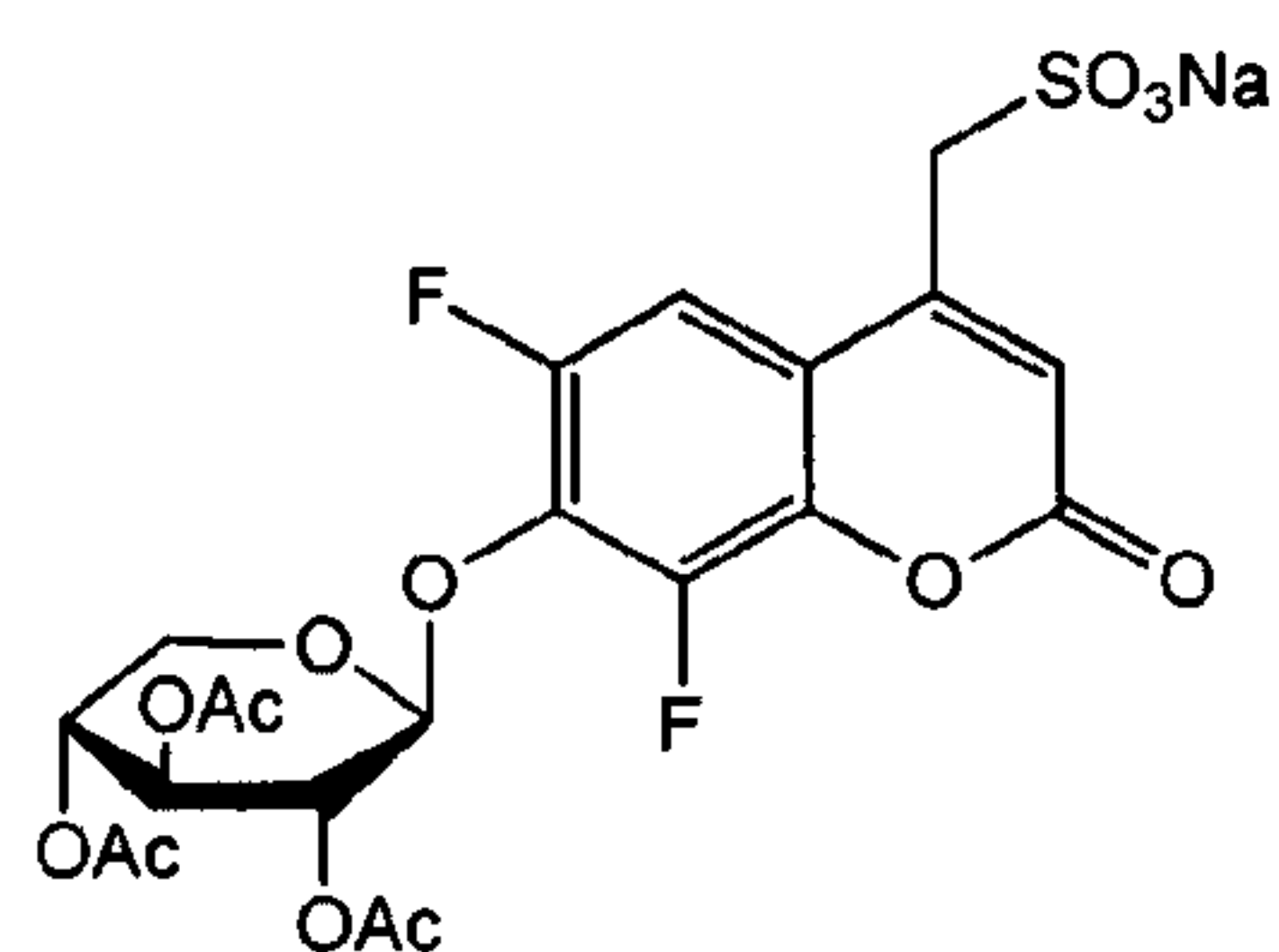
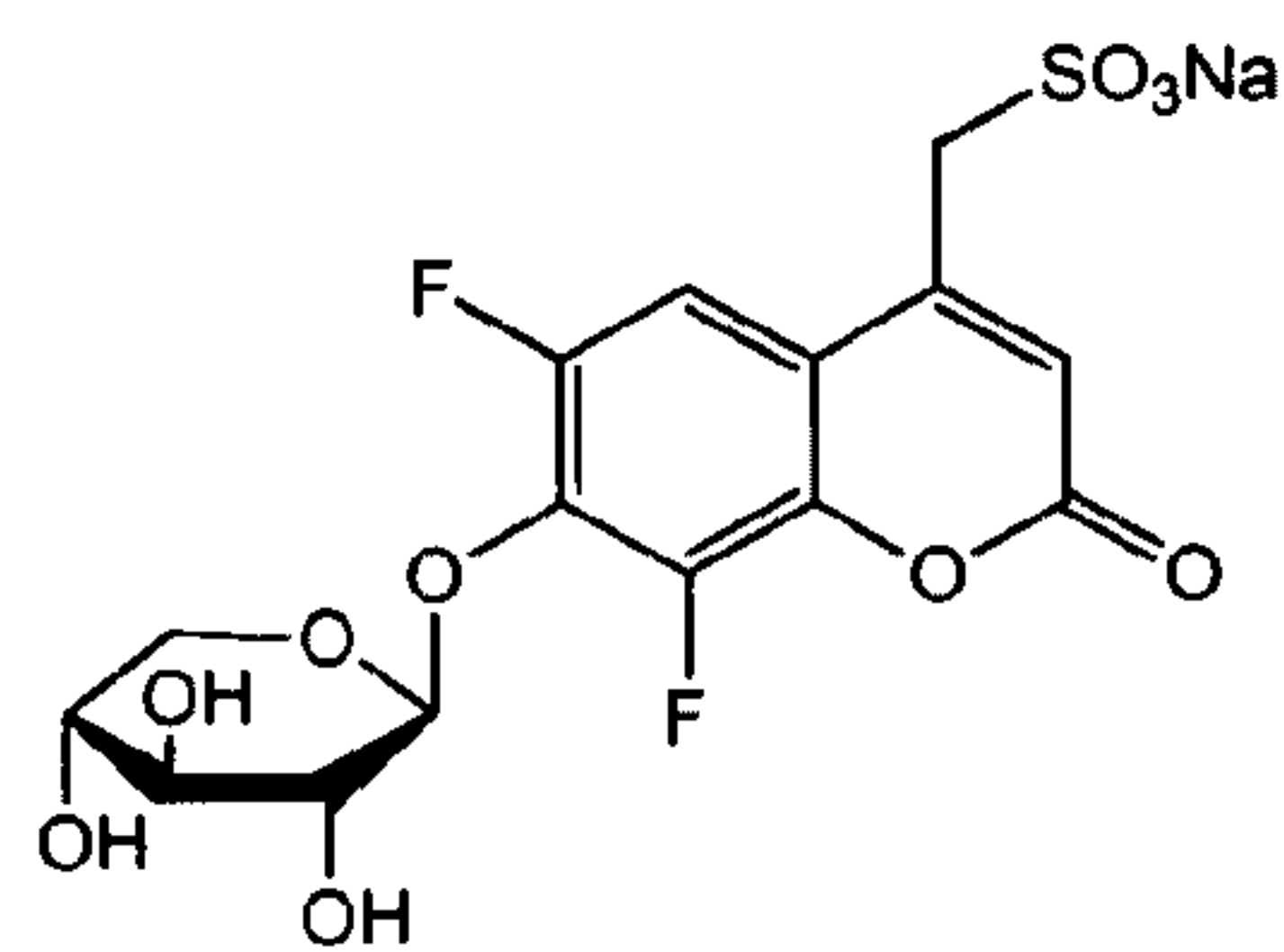
**1****2**

5

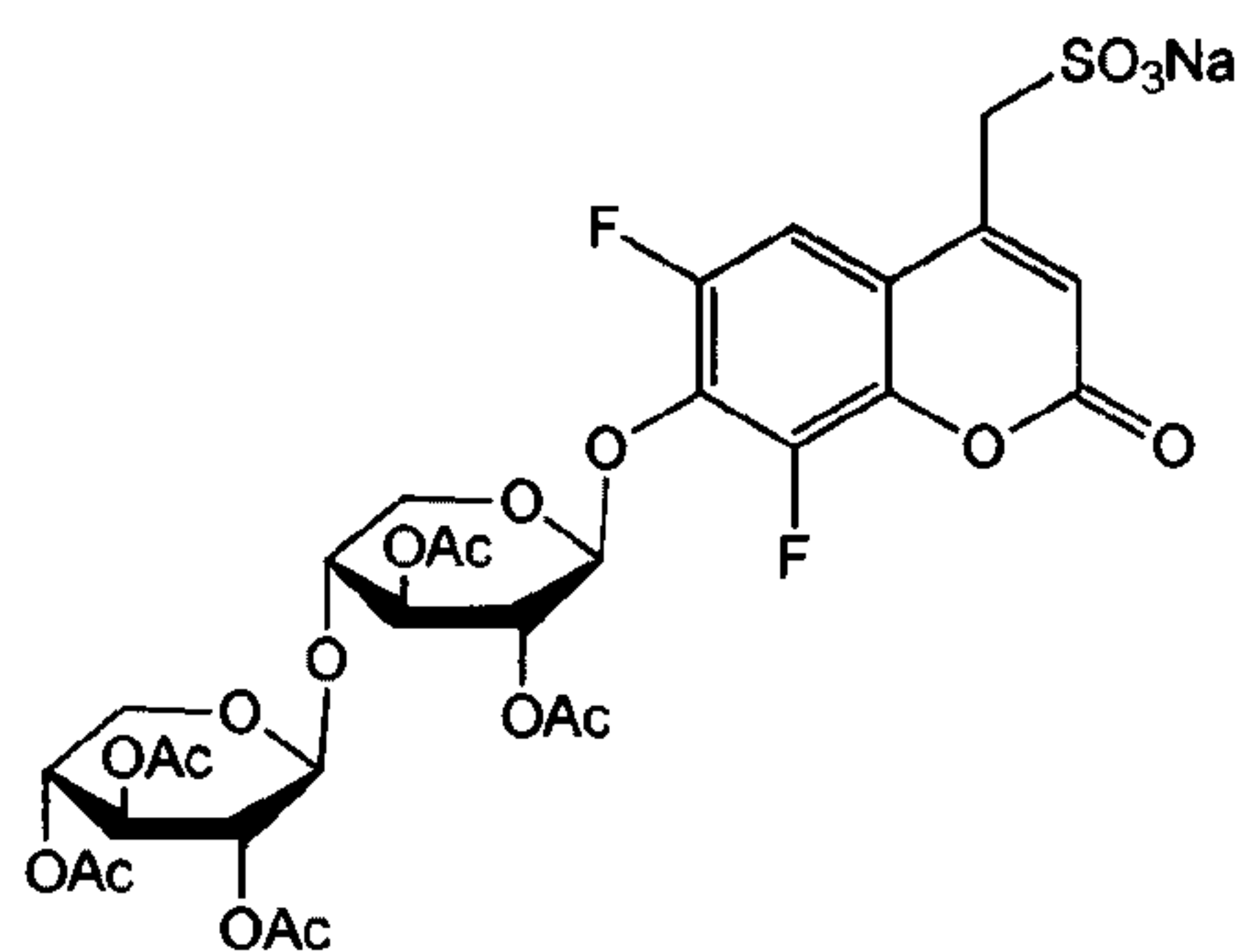
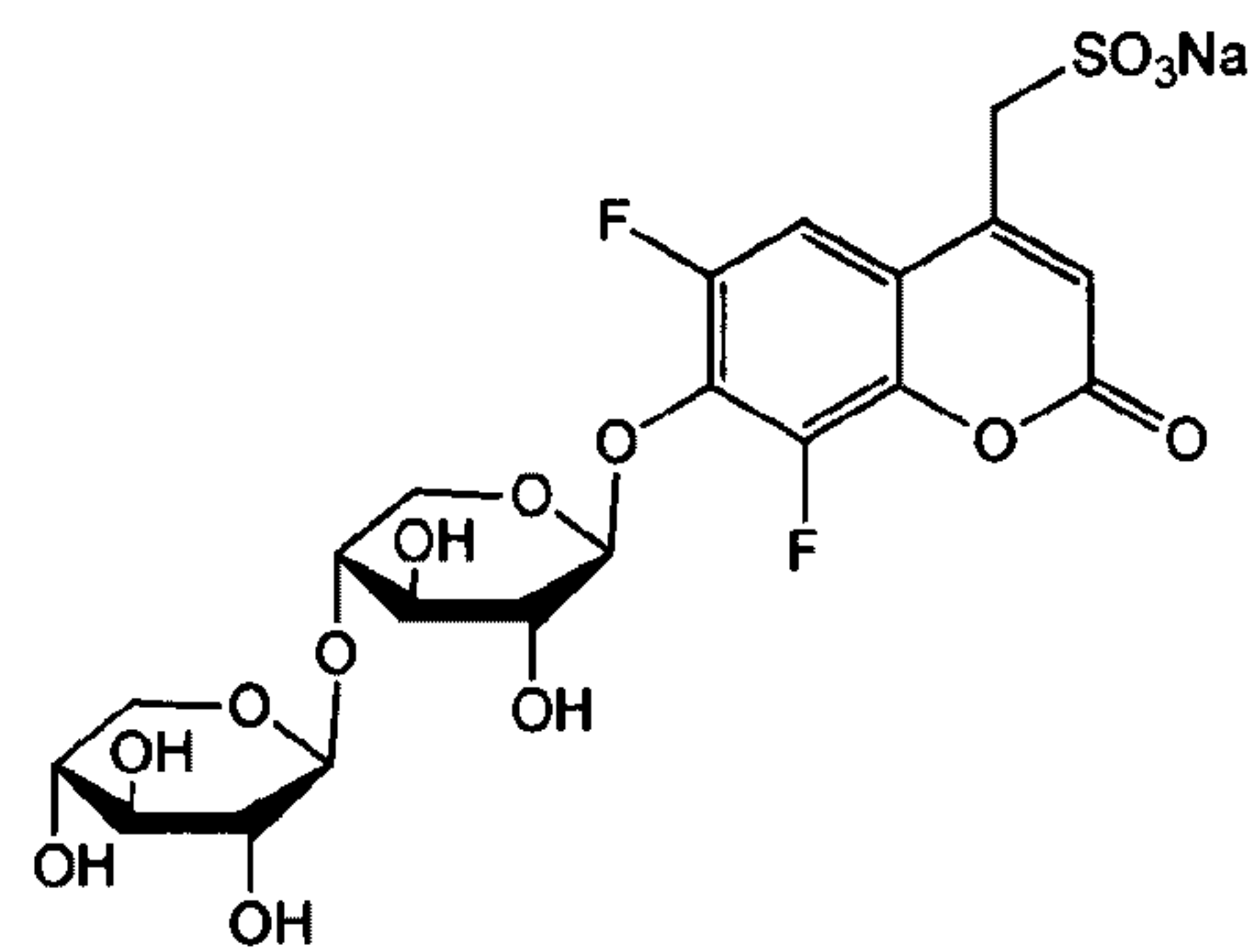
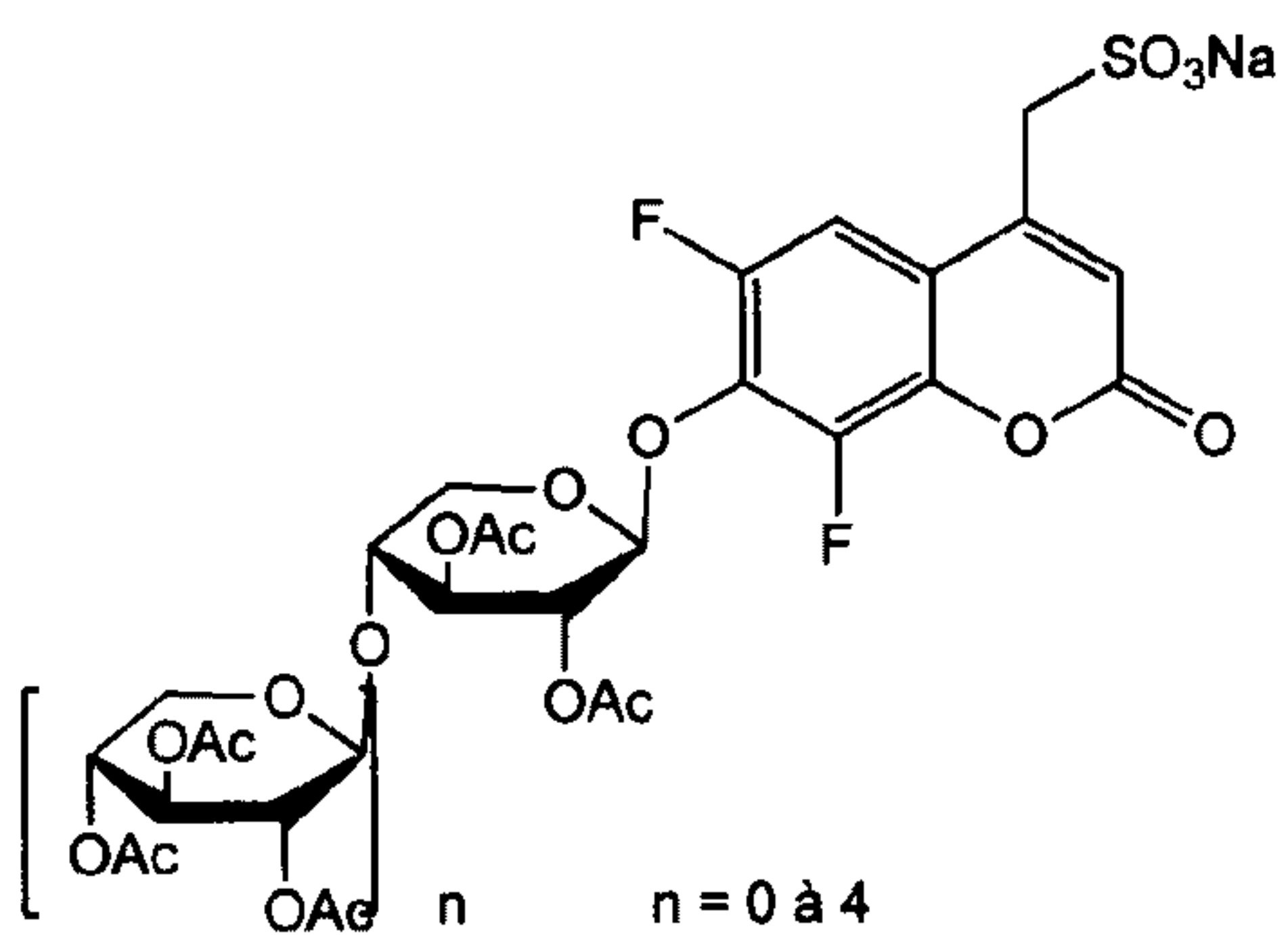
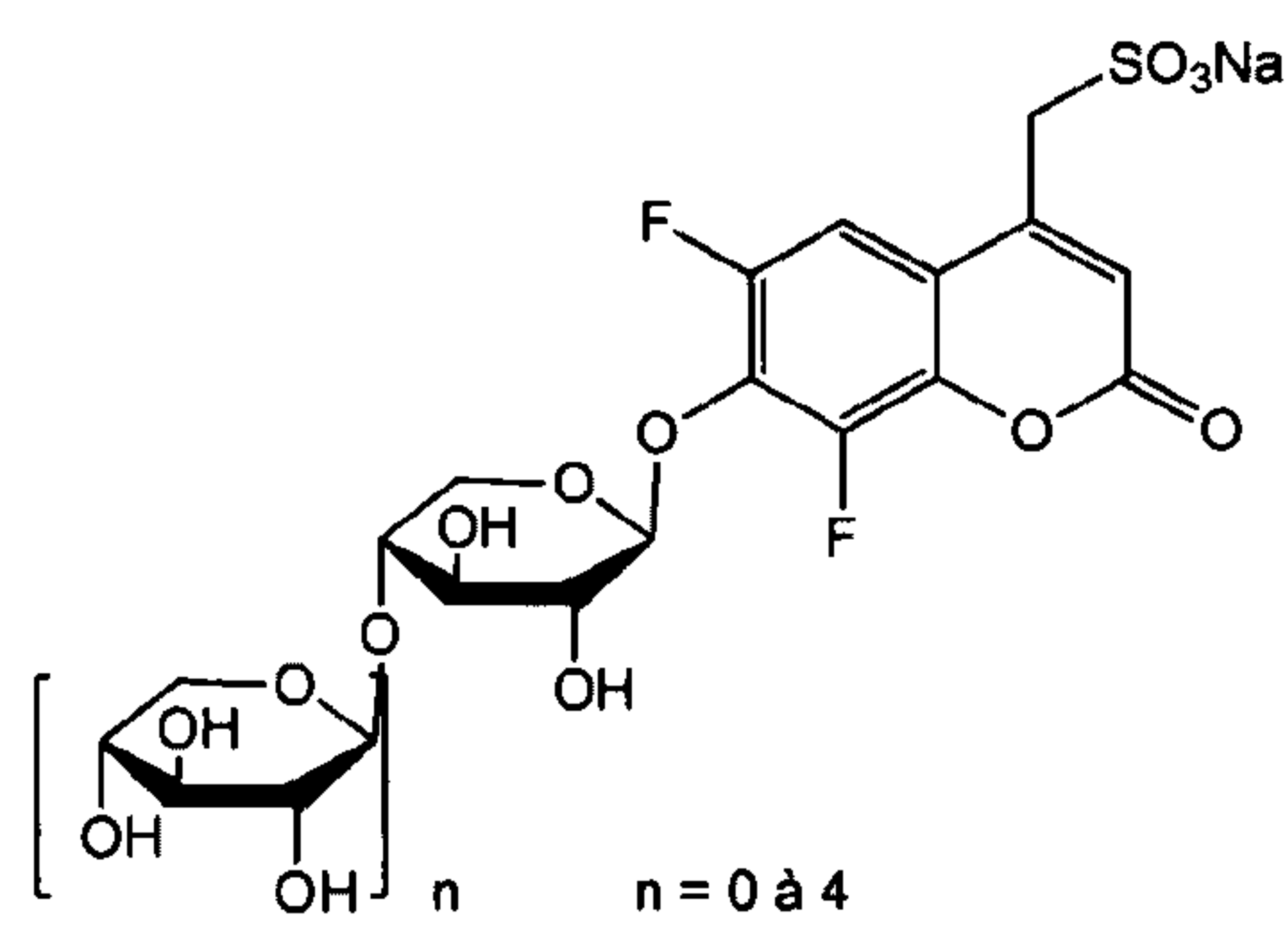
**3****4****5****6**

10

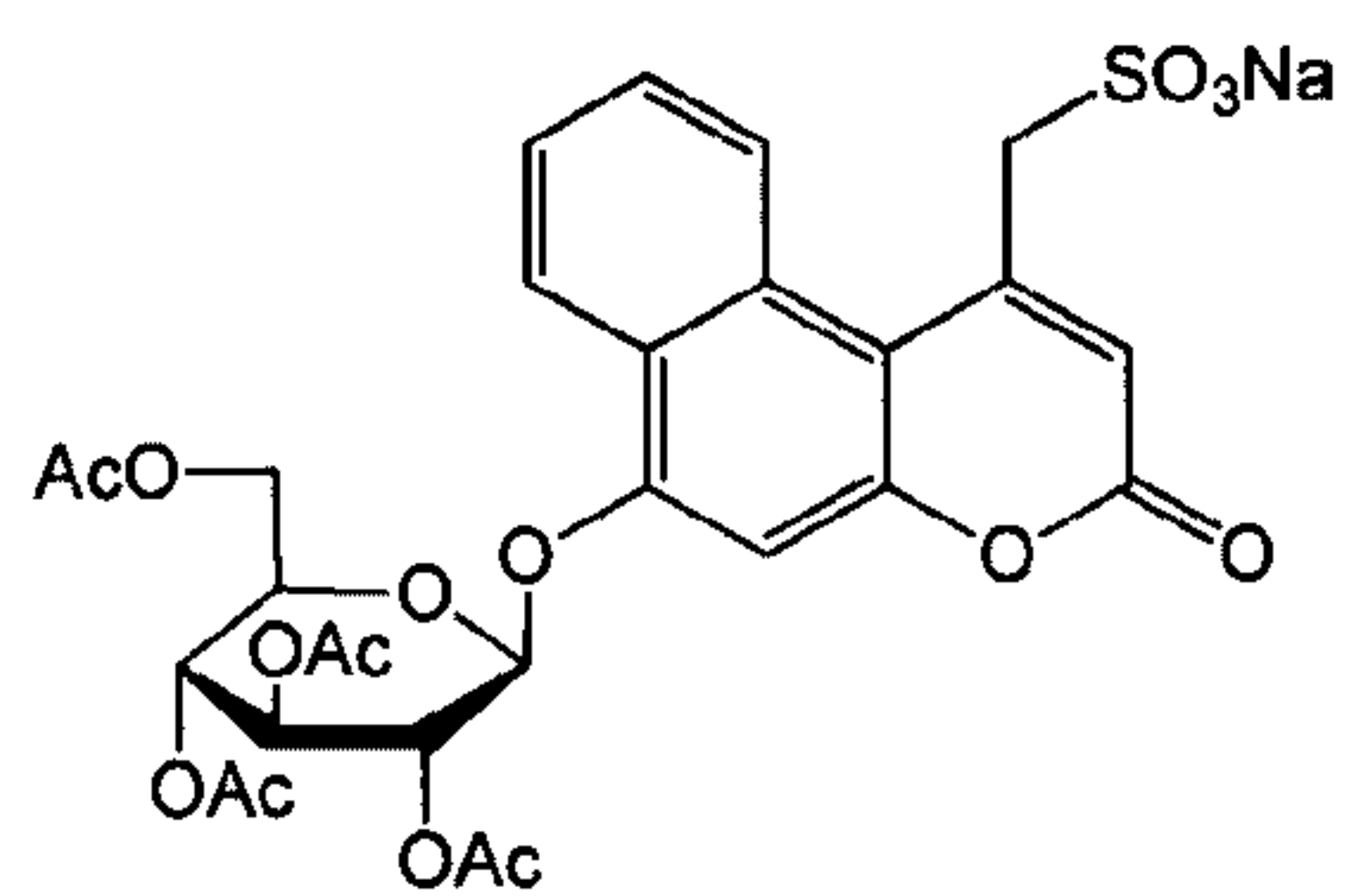
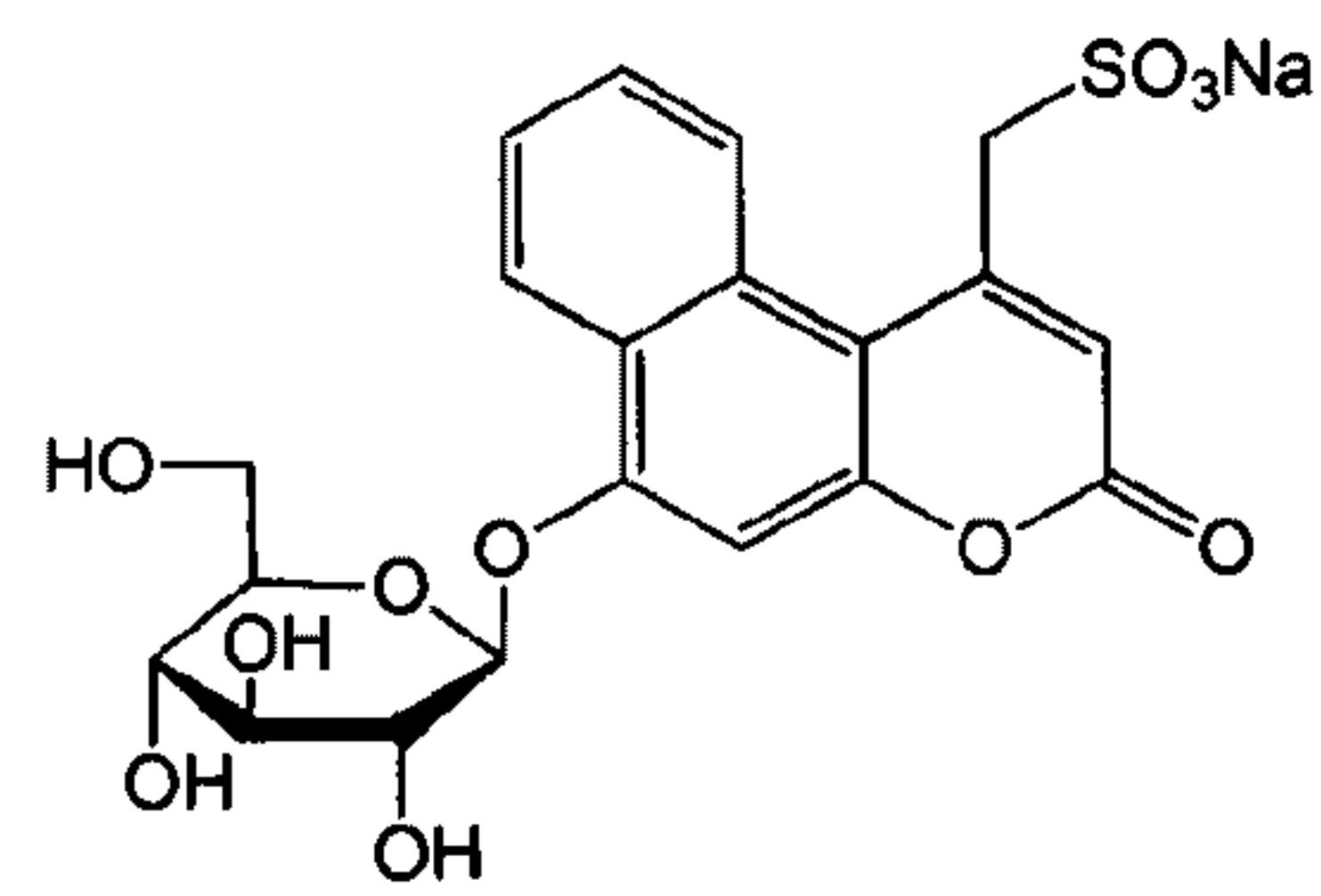
**7****8**

**9****10****11****12**

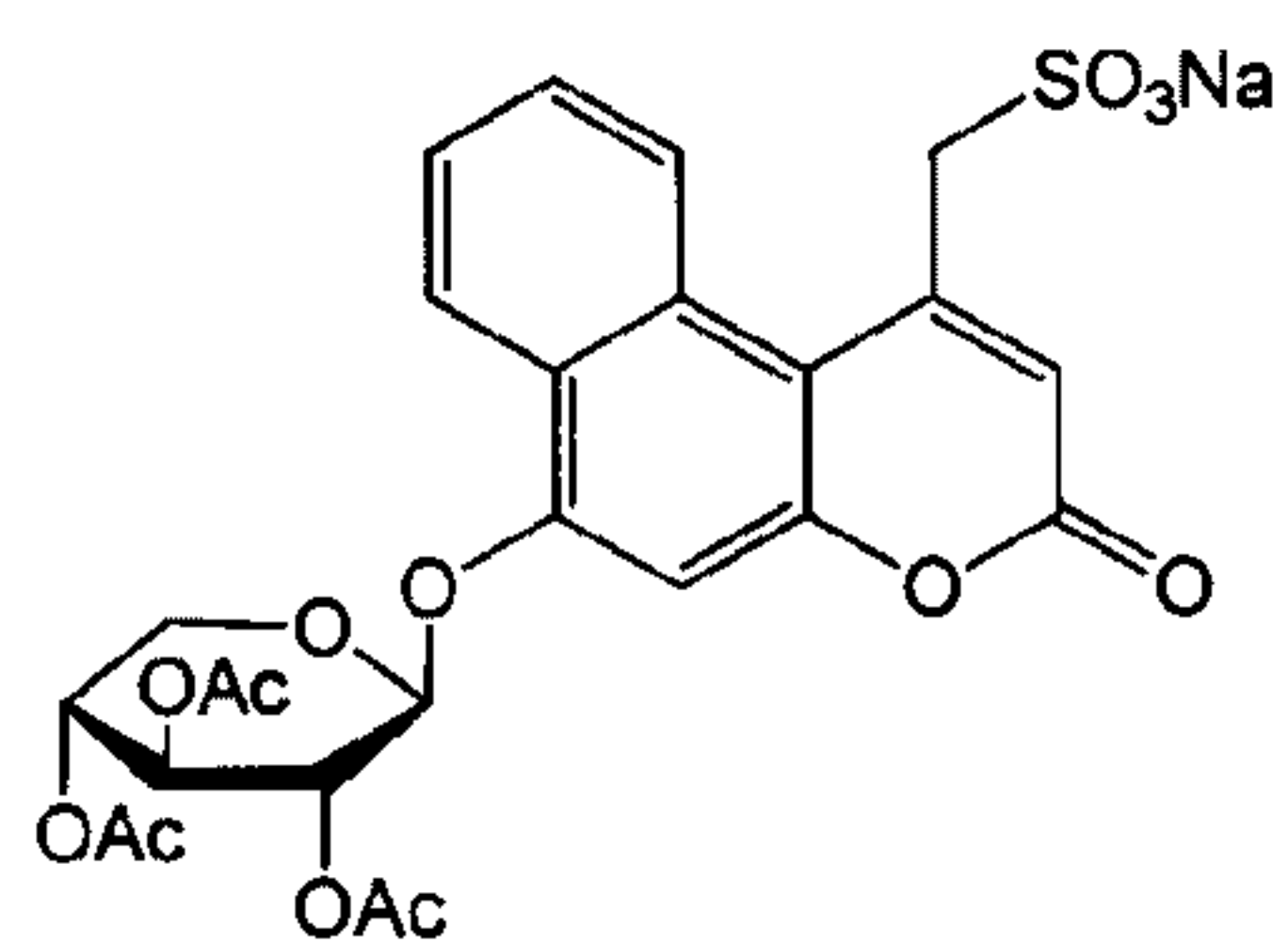
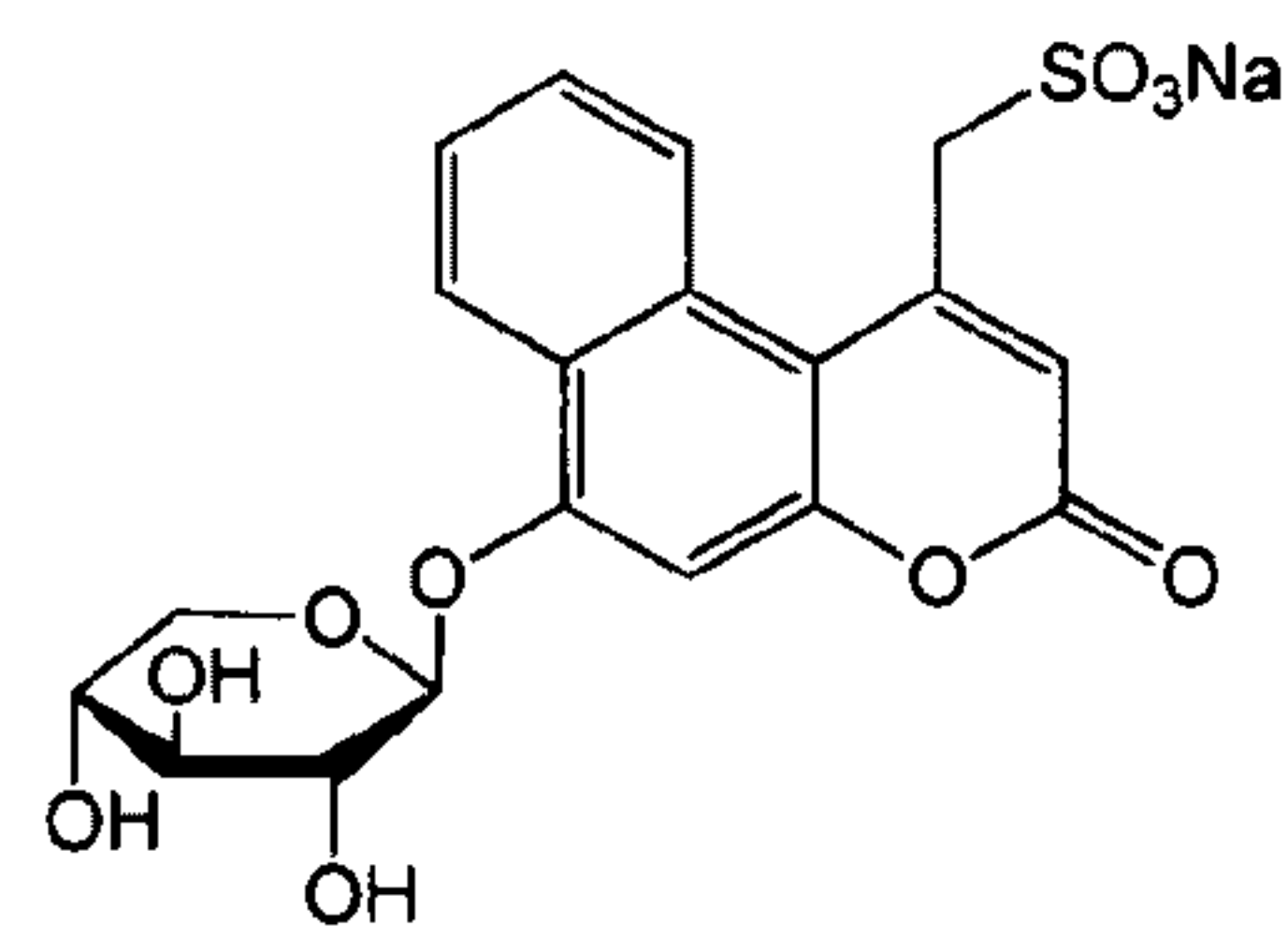
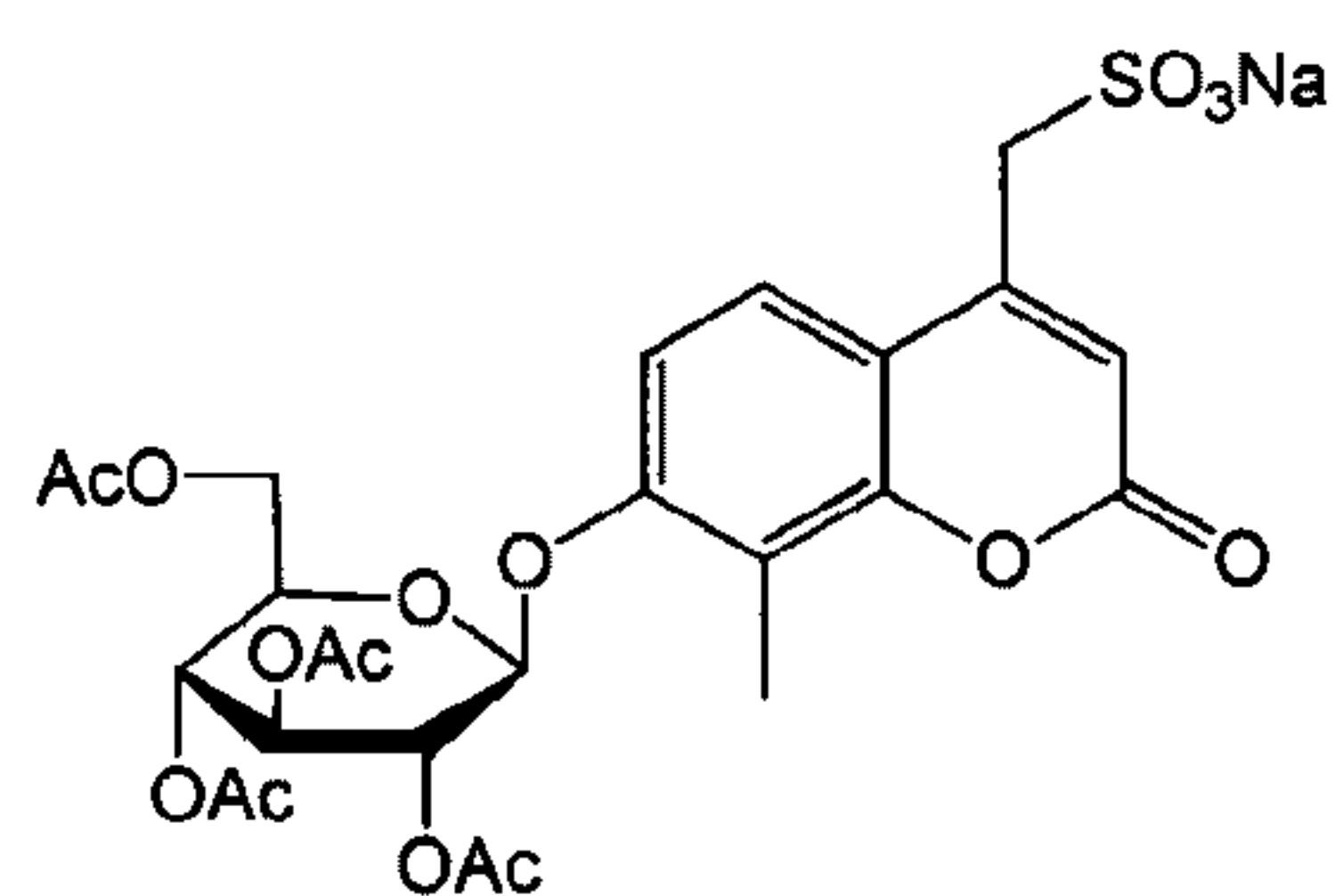
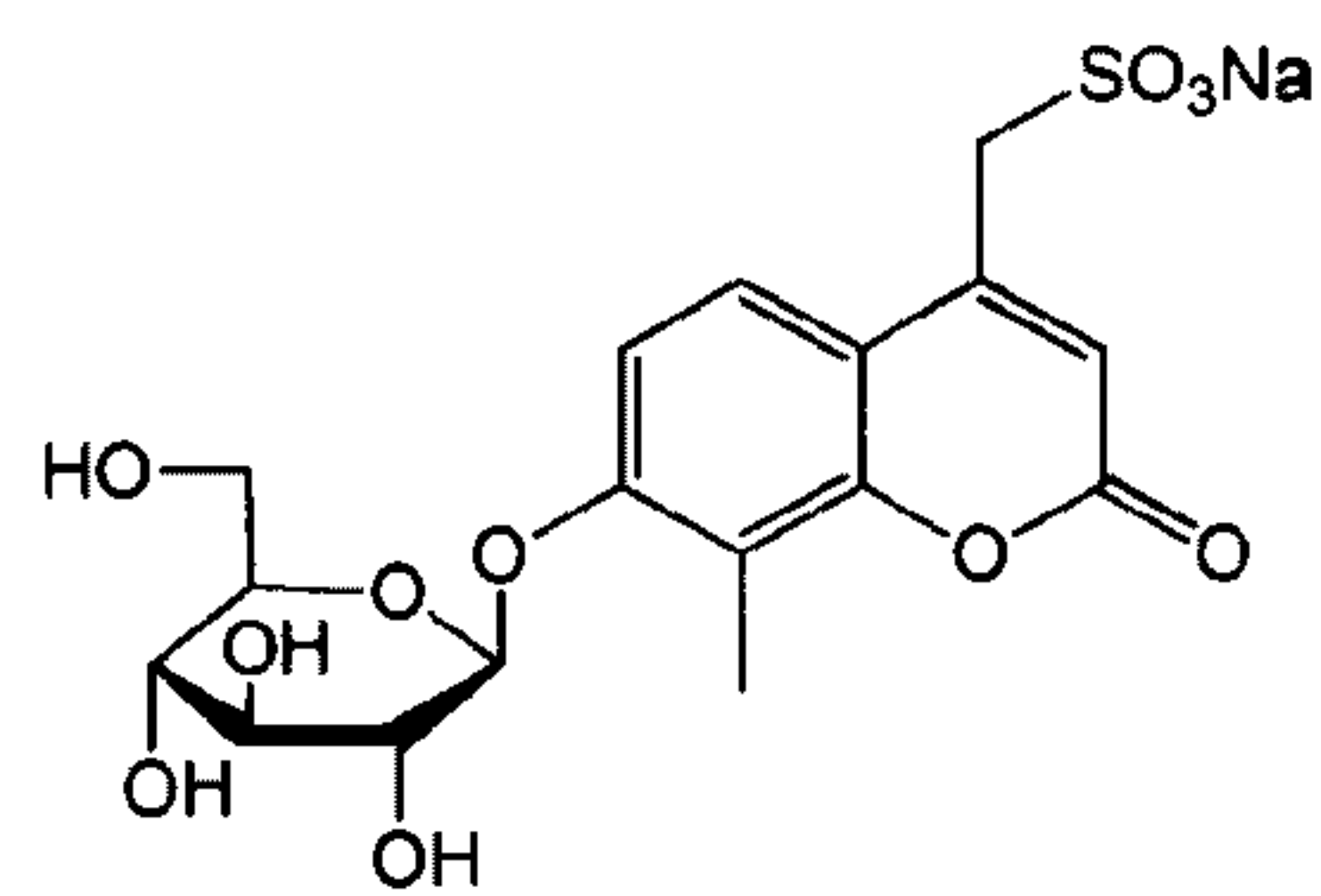
5

**13****14****15****16**

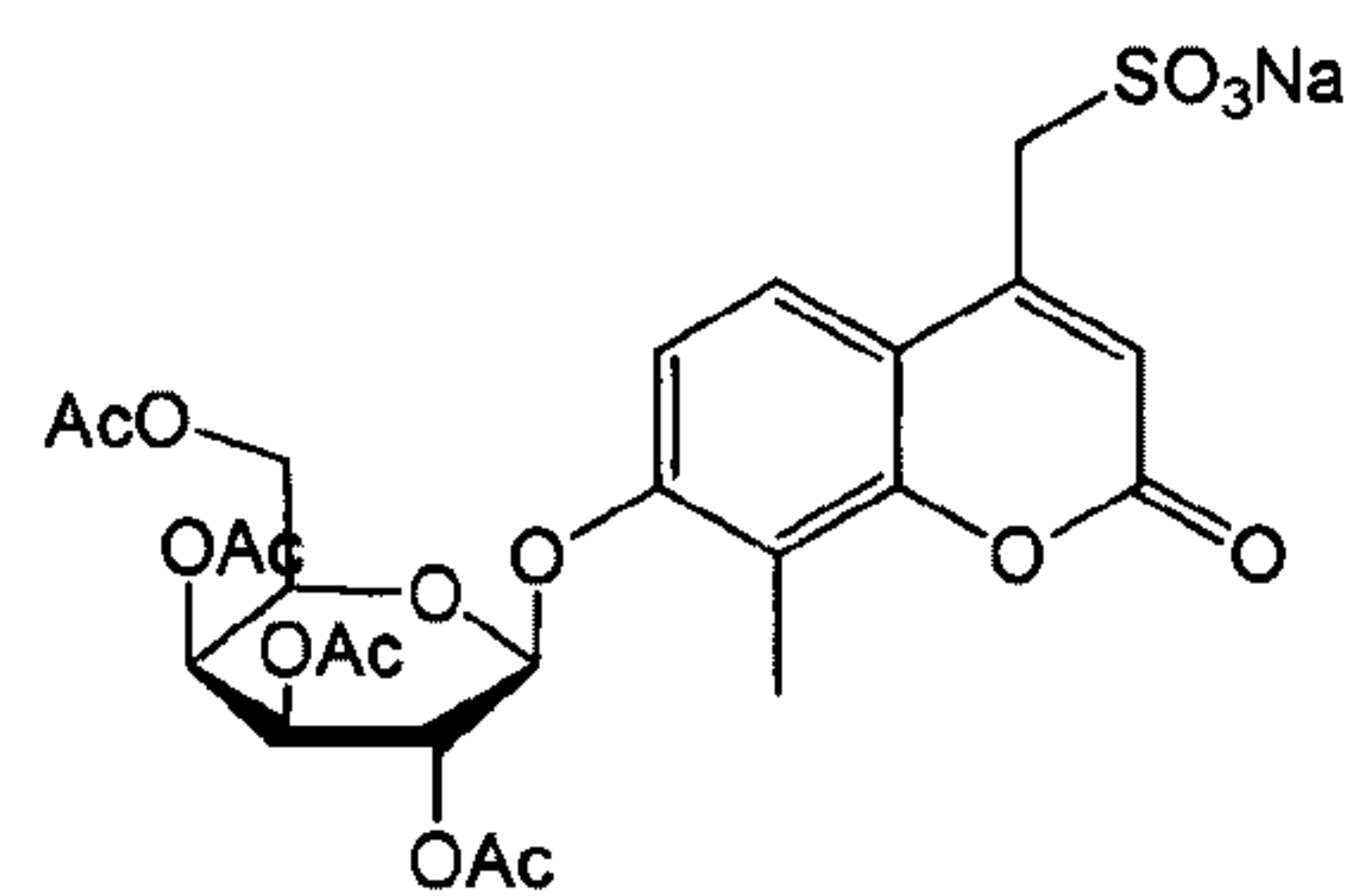
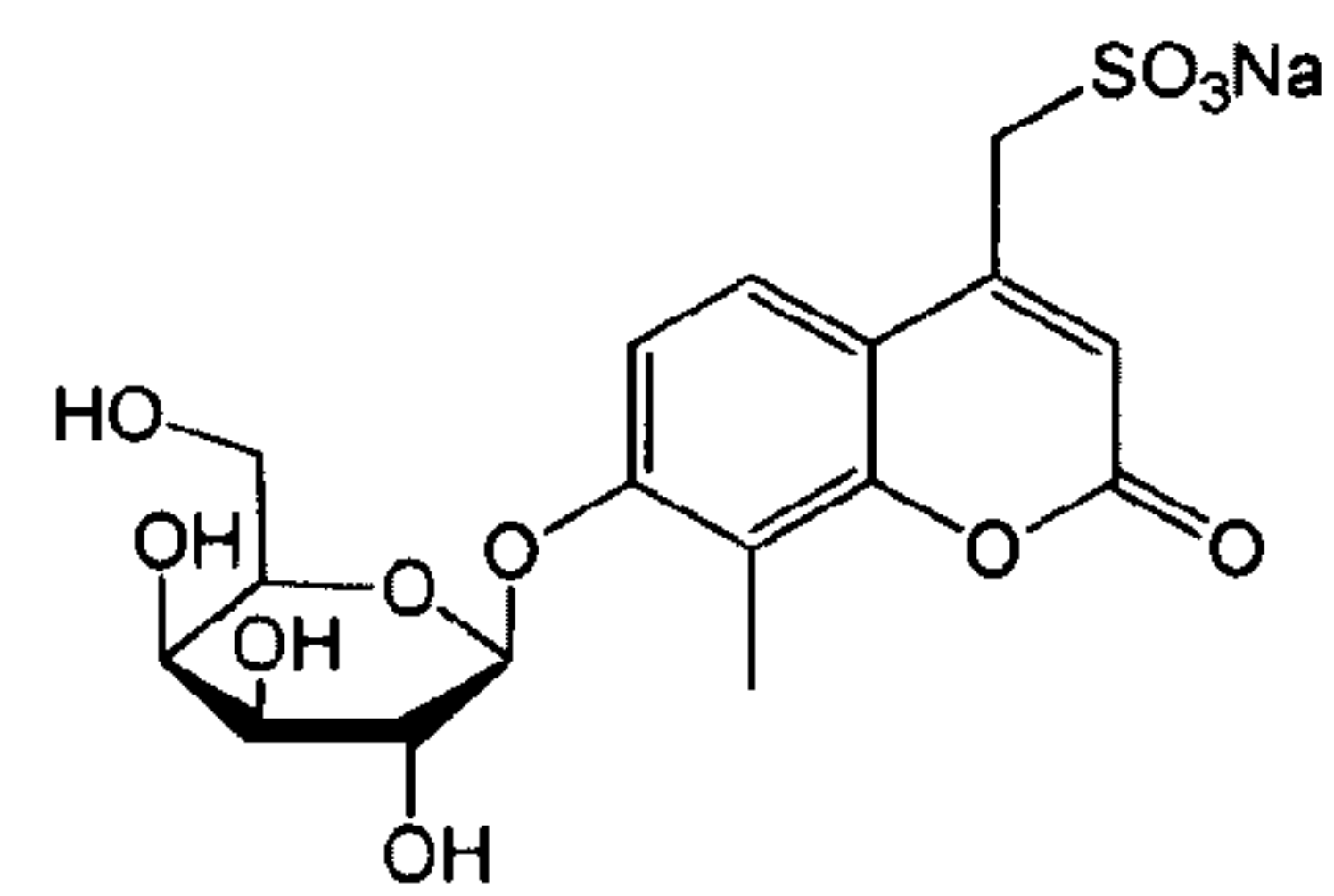
10

**17****18**

5

**19****20****21****22**

10

**23****24**

parmi lesquels les composés **2**, **4** et **6** sont des coumarines sulfonées substituées entrant dans la formule générale (I) et où les composés **8**, **10**, **12**, **14**, **16**, **18**, **20**, **22** et **24** sont des exemples de substrats entrant dans la formule générale (II).

Différents exemples de synthèse de ces coumarines et substrats vont maintenant être
5 donnés, à titre indicatif et nullement limitatif.

Exemple 1. Synthèse de 4-chlorométhyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarine (1)

Une solution de 2,4-difluororésorcinol (0,8 g) dans 8 ml d'acide méthylsulfonique est introduit dans un ballon puis 1,3 équivalent (963 µl) de 4-chloroacétoacétate d'éthyle sont ajoutés goutte à goutte. Après 3h d'agitation à température ambiante, le mélange est refroidi à 0°C
10 puis 100 ml d'eau sont additionnés. Le résidu est alors filtré, séché puis lavé à l'éther diéthylique pour donner 0,34 g (25%) du composé **1**.

RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,42 (d, 1H) ; 6,05 (s, 1H) ; 4,81 (s, 2H).

Exemple 2. Synthèse de 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (2)

15 Une solution de 320 mg du composé **1** dissous dans 25 ml d'éthanol est introduite dans un ballon, puis une solution de sulfite de sodium (1,1 équivalent, 185 mg) dans 6 ml d'eau est additionnée. Le mélange est porté à reflux et l'évolution de la réaction est suivie par CCM (Chromatographie sur Couche Mince). Après 40h de chauffage, le mélange est refroidi à 0°C. La solution est filtrée puis le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner un solide
20 jaune.

Le solide obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom* C18) puis ensuite avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : eau pure, cartouche SNAP C18 120 g, débit d'élution : 25 ml/min).

25 Après évaporation de l'eau sous pression réduite, le produit **2** est obtenu pur avec un rendement de 40%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,28 (d, 1H) ; 6,18 (s, 1H) ; 4,32 (s 2H).

RMN ¹³C (D₂O) δ (ppm) 163,7 ; 153,1 (dd) ; 150,5 (t) ; 149,0 ; 142,2 (dd) ; 140,7 (m) ; 109,2 ; 105,3 (d) ; 103,6 (d) ; 52,7.

30 Maximum excitation/émission = 370/470 nm (10 µM dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Exemple 3. Synthèse de 5,6-benzo-4-chlorométhyl-7-hydroxycoumarine (3)

Une solution de 1,3-dihydroxynaphtalène (1 g) dans 10 ml d'acide méthanesulfonique est introduit dans un ballon puis 1,3 équivalent (1,10 ml) de 4-chloroacétoacétate d'éthyle sont ajoutés goutte à goutte. Après 4 jours d'agitation à température ambiante, le mélange est refroidi à 0°C puis 50 ml d'eau sont additionnés. Le résidu est alors filtré, lavé à l'eau et séché pour donner 1,30 g (80%) du composé **3**.

RMN ¹H (DMSO) δ (ppm) 8,47 (d, 1H) ; 8,32 (d, 1H) ; 7,75 (t, 1H) ; 7,60 (t, 1H) ; 6,88 (s, 1H) ; 6,58 (s, 1H) ; 5,33 (s, 2H).

Exemple 4. Synthèse de 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (4)

Une solution de 0,7 g du composé **3** dissous dans 50 ml d'éthanol est introduite dans un ballon, puis une solution de sulfite de sodium (1,1 équivalent, 370 mg) dans 13 ml d'eau est additionnée. Le mélange est porté à reflux et l'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après 20h de chauffage, le mélange est refroidi à 0°C. La solution est filtrée sur un entonnoir Büchner puis le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **4** brut sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 77%.

Le solide obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) puis ensuite avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : 10% acétonitrile / 90% eau, cartouche SNAP C18 120 g, débit d'élution : 25 ml/min).

Après évaporation des solvants sous pression réduite, le produit **4** est obtenu pur avec un rendement de 31%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 8,26 (d, 1H) ; 8,02 (d, 1H) ; 7,56 (t, 1H) ; 7,44 (t, 1H) ; 6,32 (s, 1H) ; 6,11 (s, 1H) ; 4,45 (s, 2H).

Maximum excitation/émission = 420/510 nm (100 μM dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Exemple 5. Synthèse de 4-chlorométhyl-7-hydroxy-8-méthylcoumarine (5)

Une solution de 2-méthylrésorcinol (1 g) dans 10 ml d'acide méthylsulfonique est introduit dans un ballon puis 1,3 équivalent (1,42 ml) de 4-chloroacétoacétate d'éthyle sont ajoutés goutte à goutte. Après 1 nuit d'agitation à température ambiante, le mélange est refroidi à 0°C puis 50 ml d'eau sont additionnés. Le résidu est alors filtré, séché puis lavé à l'éther diéthylique pour donner 1,63 g (90%) du composé **5**.

RMN ^1H (DMSO) δ (ppm) 7,52 (d, 1H) ; 6,90 (d, 1H) ; 6,41 (s, 1H) ; 4,93 (s, 2H) ; 2,16 (s, 3H).

RMN ^{13}C (DMSO) δ (ppm) 160,8 ; 159,7 ; 153,6 ; 151,7 ; 123,5 ; 112,3 ; 111,6 ; 111,1 ; 109,8 ; 41,9 ; 8,4.

Exemple 6. Synthèse de 4-chlorométhyl-7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (6)

Une solution de 1 g du composé **5** dissous dans 90 ml d'éthanol est introduite dans un ballon, puis une solution de sulfite de sodium (1,1 équivalent, 617 mg) dans 22 ml d'eau est additionnée. Le mélange est porté à reflux. Après 20h de chauffage, le mélange est refroidi à 0°C. La solution est filtrée sur un entonnoir Büchner, le résidu beige obtenu est lavé à l'éthanol, quant au filtrat, il est évaporé sous pression réduite pour donner un solide jaune. Ce solide est lavé à l'éthanol et à l'éther diéthylique. Les deux solides obtenus sont rassemblés pour donner 1 g (80%) de composé **6** brut.

Le composé **6** brut est ensuite purifié par plusieurs chromatographies sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) successives pour donner le produit **6** pur avec un rendement de 23%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 7,32 (d, 1H) ; 6,69 (d, 1H) ; 6,15 (s, 1H) ; 4,19 (s, 2H) ; 1,97 (s, 3H).

RMN ^{13}C (D_2O) δ (ppm) 164,2 ; 158,5 ; 148,9 ; 123,9 ; 112,6 ; 112,2 ; 111,8 ; 111,3 ; 52,4 ; 7,3.

Maximum excitation/émission = 340/485 nm (10 μM dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Exemple 7. Synthèse du substrat β -D-cellobioside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (8)

Bromation du sucre protégé :

Sous atmosphère d'azote, 1 g d'acéto- α -D-cellobiose et 12,5 ml de DCM (dichlorométhane) anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 15 ml d'une solution d'acide bromhydrique en solution à 33% dans l'acide acétique sont ajoutés goutte à goutte. Après 5h de réaction à 0°C, 25 ml de DCM sont additionnés, puis le mélange est encore agité pendant 10min. Une solution de carbonate de potassium est ensuite ajoutée précautionneusement jusqu'à disparition du dégagement de CO_2 , le milieu est laissé sous agitation pendant 20min. Après décantation, la phase organique est récupérée, la phase

aqueuse est extraite 3 fois au DCM, puis les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. L'acétobromo- α -D-cellobiose est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 62%. Le produit ainsi obtenu est instable, et il convient soit de l'utiliser directement, soit de le conserver à -20°C .

RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) 6,67 (m, 1H) ; 5,55 (t, 1H) ; 5,13 (m, 2H) ; 4,95 (t, 1H) ; 4,78 (m, 1H) ; 4,55 (m, 2H) ; 4,38 (m, 1H) ; 4,20 (m, 2H) ; 4,07 (m, 1H) ; 3,84 (m, 1H) ; 3,68 (m, 1H) ; 2,09 (m, 21H).

Greffage du sucre sur la coumarine :

Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 40 mg de coumarine 2 dilués dans 5 ml de DMF (diméthylformamide) anhydre et 150 mg de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 4 équivalents d'acétobromo- α -D-cellobiose (350 mg) sont dissous dans 10 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée très lentement au mélange précédent. Après une nuit d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur céliteTM et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 20%

MeOH / 80% DCM). Le composé 7 est obtenu avec un rendement de 4,8%.

Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 40 mg du composé 7 et 7,5 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis une solution de 16 mg de méthylate de sodium dans 5 ml de méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après 1h d'agitation, le milieu est neutralisé par addition d'une solution diluée d'acide citrique. Après une agitation supplémentaire de 20 min, le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner une huile jaune translucide.

Le résidu obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) puis ensuite avec une HPLC (*High-Pressure Liquid Chromatography*).

Méthode HPLC : • 0 min $\rightarrow$ 10 min ; 1,5 ml/min : 100% eau

• 10 min $\rightarrow$ 19 min ; 1,5 ml/min : 90% eau / 10% acétonitrile

• 19 min $\rightarrow$ 23 min ; 1,5 ml/min : 100% acétonitrile

• 23 min $\rightarrow$ 25 min ; 1,5 ml/min : 100% eau

Caractéristiques de la colonne : Colonne Hypersil ; Gold Phenyl ; Thermofisher 5 ; longueur 250 mm ; diamètre 4,6 mm

Les injections sont de 80 µl et le produit sort uniquement dans la phase eau dans l'intervalle : 0min → 10min, suivi de très près par la coumarine libre présente en solution.

Après lyophilisation, le produit **8** est obtenu pur sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 30%.

- 5 RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,55 (d, 1H) ; 6,60 (s, 1H) ; 5,17 (d, 1H) ; 4,45 (d, 1H) ; 4,38 (s, 2H) ; 3,9-3,2 (m, 12H).

Exemple 8. Synthèse du substrat β-D-glucoside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (10)

Greffage du sucre sur la coumarine :

- 10 Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 100 mg de coumarine **2** dilués dans 5 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 5 équivalents d'acétobromo-α-D-glucose sont dissous dans 5 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée très lentement au mélange précédent. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après une nuit d'agitation à température ambiante, la solution est
- 15 filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 20% MeOH / 80% DCM). Le composé **9** est obtenu avec un rendement de 37%.

RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,73 (d, 1H) ; 6,63 (s, 1H) ; 5,4-5,1 (m, 4H) ; 4,4-4,1 (m, 2H) ; 4,34 (s, 2H) ; 4,04 (m, 1H) ; 2,1 (m, 12H).

- 20 Déprotection des fonctions de type acétal :

- Sous atmosphère d'azote, 45 mg du composé **9** et 10 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 350 µl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après 2h30 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à
- 25 neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite.

- Le résidu obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) puis ensuite avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : eau pure, cartouche SNAP C18 12 g,
- 30 débit d'élution : 5 ml/min).

Après lyophilisation, le produit **10** est obtenu pur avec un rendement de 54%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 7,52 (d, 1H) ; 6,54 (s, 1H) ; 5,11 (d, 1H) ; 4,32 (s, 2H) ; 3,78 (m, 1H) ; 3,63 (m, 1H) ; 3,6-3,4 (m, 4H).

Exemple 9. Synthèse du substrat β -D-xyloside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (12)

5 Bromation du sucre protégé :

Sous atmosphère d'azote, 500 mg d'acéto- β -D-xylopyranose et 10 ml de DCM sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 5 équivalents d'acide bromhydrique en solution à 33% dans l'acide acétique sont ajoutés au goutte à goutte. Après 24h de réaction, 15 ml de DCM sont additionnés, le mélange est refroidi à 0°C puis 20 ml d'eau glacée sont
10 ajoutés. Après séparation des deux phases, la phase organique est lavée 3 fois avec une solution saturée en NaHCO_3 puis 3 fois avec de l'eau. Après séchage sur MgSO_4 et filtration, le filtrat est évaporé sous pression réduite. L'acétobromo- α -D-xylose obtenu est ensuite directement introduit dans l'étape suivante.

Greffage du sucre sur la coumarine :

15 Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 100 mg de coumarine 2 dilués dans 8 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 5 équivalents d'acétobromo- α -D-xylose sont dissous dans 6 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée très lentement au mélange précédent. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après une nuit d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite
20 et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 20% MeOH / 80% DCM). Le composé 11 est obtenu pur avec un rendement de 34%.

RMN ^1H ($\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$) δ (ppm) 7,70 (d, 1H) ; 6,66 (s, 1H) ; 5,46 (d, 1H) ; 5,25 (m, 2H) ; 5,04 (m, 1H) ; 4,37 (s, 2H) ; 4,32 (m, 1H) ; 3,70 (m, 1H) ; 2,13 (m, 9H).

25 Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 62 mg du composé 11 et 15 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 500 μl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après 1h30 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à
30 neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom* C18) puis ensuite avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : eau pure, cartouche SNAP C18 30 g, débit d'élution : 15 ml/min).

5 Après lyophilisation, le produit **12** est obtenu pur avec un rendement de 62%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,64 (d, 1H) ; 6,66 (s, 1H) ; 5,14 (d, 1H) ; 4,43 (s, 2H) ; 4,02 (m, 1H) ; 3,5-3,7 (m, 3H) ; 3,35 (m, 1H).

Exemple 10. Synthèse du substrat β-D-xylobioside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (14)

10 Bromation du sucre protégé :

Les conditions opératoires sont identiques à celles utilisées dans l'exemple 9 en utilisant l'acéto-D-xylobiose comme produit de départ. L'acétobromo-α-D-xylobiose obtenu est ensuite directement introduit dans l'étape suivante.

Greffage du sucre sur la coumarine :

15 Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 60 mg de coumarine **2** dilués dans 5 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 3 équivalents d'acétobromo-α-D-xylobiose sont dissous dans 5 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée très lentement au mélange précédent. Après une nuit d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression
20 réduite.

Le solide obtenu est purifié deux fois successivement par chromatographie sur colonne de silice (éluant : gradient de 10% MeOH à 20% MeOH dans du DCM). Le composé **13** est obtenu pur avec un rendement de 18%.

25 RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,70 (d, 1H) ; 6,61 (s, 1H) ; 5,38 (d, 1H) ; 5,16 (m, 3H) ; 4,92 (m, 1H) ; 4,78 (m, 2H) ; 4,32 (s, 2H) ; 4,18 (m, 1H) ; 4,10 (m, 1H) ; 4,03 (m, 1H) ; 3,54 (m, 2H) ; 2,09 (m, 15H).

Déprotection des fonctions de type acétal :

30 Sous atmosphère d'azote, 27 mg du composé **13** et 7 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 200 µl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après 3h30 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression

réduite. Le résidu est repris dans de l'eau puis la solution est filtrée à 0,45 μm , le filtrat est de nouveau évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est purifié avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : 5% acétonitrile dans l'eau pure, cartouche SNAP C18 12 g, débit d'élution : 3 ml/min).

- 5 Après évaporation des solvants, le produit **14** est obtenu pur avec un rendement de 40%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 7,56 (d, 1H) ; 6,58 (s, 1H) ; 5,11 (d, 1H) ; 4,40 (d, 1H) ; 4,36 (s, 2H) ; 4,10 (m, 1H) ; 3,91 (m, 1H) ; 3,82 (m, 1H) ; 3,7-3,5 (m, 3H) ; 3,40 (m, 2H) ; 3,21 (m, 2H).

Exemple 11. Synthèse du substrat β -D-xylopolyoside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (16)

Acétylation du xylopolyose, à savoir un mélange de xylobiose, xylotriose, ... :

- Sous atmosphère d'azote, 300 mg de xylopolyose, quelques grains de 4-diméthylaminopyridine, 28 ml de DCM anhydre et 9 ml de pyridine anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 3 ml d'anhydride d'acétique sont additionnés goutte à goutte. Le milieu est ensuite laissé sous agitation pendant une nuit. Le mélange est ensuite lavé 3 fois à l'eau, séché sur MgSO_4 puis évaporé sous pression réduite. L'analyse par LC/MS montre que le mélange est constitué d'acéto-xylopolyose avec $n = 1$ à 5.

Bromation du sucre protégé :

- Les conditions opératoires sont identiques à celles utilisées dans l'exemple 9 en utilisant 102 mg d'acéto-xylopolyose comme produit de départ. L'acétobromo- α -D-xylopolyose obtenu est ensuite directement introduit dans l'étape suivante.

Greffage du sucre sur la coumarine :

- Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 60 mg de coumarine **2** dilués dans 5 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 106 mg d'acétobromo-xylopolyose sont dissous dans 5 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée très lentement au mélange précédent. Après 36h d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

- Le solide obtenu est enfin purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 20% MeOH / 80% DCM).

L'analyse par LC/MS montre que le mélange est constitué du composé **15** avec $n = 0$ à 4.

Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 10 mg du composé **15** et 5 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 100 µl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. Après quelques heures d'agitation de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite pour donner le composé **16**.

Exemple 12. Synthèse du substrat β -D-glucoside 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (18)

Greffage du sucre sur la coumarine :

Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 80 mg de coumarine **4** dilués dans 6 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent sont introduits dans un ballon. 5 équivalents d'acétobromo- α -D-glucose sont dissous dans 5 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée en 45 min au mélange précédent. Après 24h d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 10% MeOH / 90% DCM). Le composé **17** est obtenu pur avec un rendement de 37%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 8,04 (d, 1H) ; 7,50 (d, 1H) ; 7,25 (m, 2H) ; 6,56 (s, 1H) ; 6,31 (s, 1H) ; 5,30 (m, 2H) ; 5,08 (m, 1H) ; 4,96 (d, 1H) ; 4,56 (d, 1H) ; 4,26 (m, 1H) ; 4,21 (s, 2H) ; 4,03 (m, 1H) ; 2,10 (m, 12H).

Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 60 mg du composé **17** et 15 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 450 µl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par LC/MS. Après 2h50 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau puis la solution est filtrée à 0,45 µm, le filtrat est de nouveau évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est purifié avec un appareil de purification *Biotage-IsoleraOne* (éluant : 5% acétonitrile dans l'eau pure, cartouche SNAP C18 30 g, débit d'élution : 10 ml/min).

Après évaporation des solvants, le produit **18** est obtenu pur avec un rendement de 33%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 8,24 (d, 1H) ; 8,18 (d, 1H) ; 7,53 (m, 2H) ; 6,80 (s, 1H) ; 6,24 (s, 1H) ; 5,25 (d, 1H) ; 4,49 (m, 2H) ; 4,0-3,5 (m, 6H).

Exemple 13. Synthèse du substrat β -D-xyloside 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (20)

Greffage du sucre sur la coumarine :

Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 55 mg de coumarine **4** dilués dans 4 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent (0,3 g) sont introduits dans un ballon. 5 équivalents d'acétobromo- α -D-xylose (obtenu comme décrit dans l'exemple 9) sont dissous dans 4 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée lentement au mélange précédent. Après 20h d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 10% MeOH / 90% DCM). Le composé **19** est obtenu pur avec un rendement de 42%.

RMN ^1H (MeOD/D₂O) δ (ppm) 8,57 (d, 1H) ; 8,00 (d, 1H) ; 7,68 (t, 1H) ; 7,55 (t, 1H) ; 6,89 (s, 1H) ; 6,52 (s, 1H) ; 5,53 (m, 1H) ; 5,31 (m, 2H) ; 5,08 (m, 1H) ; 4,61 (m, 2H) ; 4,23 (m, 1H) ; 3,78 (m, 1H) ; 2,17 (m, 9H).

Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 40 mg du composé **19** et 11 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 500 μl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. Après 2h15 de réaction, 400 μl de la solution de méthylate de sodium sont de nouveau ajoutés. Après 3h30 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : 10% acétonitrile dans l'eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) pour donner le composé **20** avec un rendement de 35%.

RMN ^1H (D₂O) δ (ppm) 8,09 (d, 1H) ; 7,99 (d, 1H) ; 7,46 (m, 1H) ; 7,38 (m, 1H) ; 6,51 (s, 1H) ; 6,16 (s, 1H) ; 4,98 (m, 1H) ; 4,37 (m, 2H) ; 4,01 (m, 1H) ; 3,8-3,4 (m, 4H).

Exemple 14. Synthèse du substrat β -D-glucoside 7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (22)

Greffage du sucre sur la coumarine :

Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 80 mg de coumarine **6** dilués dans 7 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent (377 mg) sont introduits dans un ballon. 5 équivalents (563 mg) d'acétobromo- α -D-glucose sont dissous dans 7 ml de DMF

anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée lentement au mélange précédent. Après 20h d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 10% MeOH / 90% DCM) puis par chromatographie sur colonne de silice inverse pré-packée (éluant : gradient de 0% à 50% d'acétonitrile dans l'eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*). Le composé **21** est ainsi obtenu pur avec un rendement de 17%.

RMN ¹H (MeOD) δ (ppm) 7,85 (d, 1H) ; 7,67 (d, 1H) ; 6,47 (s, 1H) ; 5,47 (m, 2H) ; 5,30 (t, 1H) ; 5,16 (t, 1H) ; 4,4-4,1 (m, 5H) ; 2,25 (s, 3H) ; 2,08 (m, 12H).

10 Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 18 mg du composé **21** et 5 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 100 µl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après 1h30 d'agitation, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à
15 neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le composé **22** est obtenu avec un rendement de 34%.

RMN ¹H (D₂O) δ (ppm) 7,53 (d, 1H) ; 7,06 (d, 1H) ; 6,26 (s, 1H) ; 5,15 (d, 1H) ; 4,24 (m, 2H) ; 3,90 (m, 1H) ; 3,73 (m, 1H) ; 3,6-3,4 (m, 4H) ; 2,13 (s, 3H).

20 **Exemple 15. Synthèse du substrat β-D-galactoside 7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthanesulfonate de sodium (24)**

Greffage du sucre sur la coumarine :

Sous atmosphère d'azote et protection de la lumière, 80 mg de coumarine **6** dilués dans 5 ml de DMF anhydre et 5 équivalents de carbonate d'argent (377 mg) sont introduits dans un
25 ballon. 5 équivalents (563 mg) d'acétobromo-α-D-galactose sont dissous dans 5 ml de DMF anhydre. Cette solution est ensuite ajoutée lentement au mélange précédent. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après 40h d'agitation à température ambiante, la solution est filtrée sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

Le solide obtenu est purifié une première fois par chromatographie sur colonne de silice
30 inverse pré-packée (éluant : gradient de 0% à 50% d'acétonitrile dans l'eau pure, cartouche *Puriflash Interchrom C18*) puis par chromatographie sur colonne de silice (éluant : 10% MeOH / 90% DCM). Le composé **23** est ainsi obtenu pur avec un rendement de 42%.

RMN ^1H (MeOD) δ (ppm) 7,81 (d, 1H) ; 7,65 (d, 1H) ; 6,45 (s, 1H) ; 5,49 (m, 3H) ; 5,37 (m, 1H) ; 4,37 (m, 3H) ; 4,20 (m, 2H) ; 2,23 (s, 3H) ; 2,19 (s, 3H) ; 2,12 (s, 3H) ; 2,08 (s, 3H) ; 2,03 (s, 3H).

RMN ^{13}C (MeOD) δ (ppm) 170,80 ; 170,65 ; 170,08 ; 169,97 ; 161,57 ; 157,33 ; 152,52 ;
5 148,64 ; 124,58 ; 114,82 ; 114,41 ; 114,15 ; 110,77 ; 98,48 ; 70,93 ; 70,67 ; 68,60 ; 67,39 ; 61,29 ; 52,61 ; 19,41 ; 19,37 ; 19,19 ; 19,18 ; 7,03.

Déprotection des fonctions de type acétal :

Sous atmosphère d'azote, 45 mg du composé **23** et 20 ml de méthanol anhydre sont introduits dans un ballon. Le mélange est refroidi à 0°C puis 300 μl d'une solution de méthylate de sodium à 1% (g/g) dans le méthanol est ajoutée goutte à goutte. L'évolution de la réaction est
10 suivie par CCM. Après 1h30 d'agitation, la réaction n'est pas totale, 300 μl de la solution de méthylate sont de nouveau ajoutés. Après 3h de réaction, de l'Amberlite IR120 est ajouté jusqu'à neutralisation du milieu. Après filtration de l'Amberlite, le filtrat est évaporé sous pression réduite.

15 Le composé **24** est obtenu avec un rendement de 36%.

RMN ^1H (D_2O) δ (ppm) 7,51 (d, 1H) ; 7,07 (d, 1H) ; 6,24 (s, 1H) ; 5,09 (d, 1H) ; 4,0-3,6 (m, 8H) ; 2,13 (s, 3H).

Les substrats ainsi obtenus trouvent notamment leur application pour la détection
20 d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules.

Il sera par exemple possible d'effectuer le dosage fluorescent d'activités xylanase et/ou cellulase et/ou cellobiase et/ou glucosidase et/ou xylosidase et/ou galactosidase d'extraits enzymatiques, ou bien d'effectuer le criblage par fluorescence selon leurs activités
25 glycosidases (EC3.2.1) d'enzymes ou de microorganismes ou des cellules.

De façon plus particulière, les nouveaux substrats selon l'invention permettront la détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules compartimentés dans des gouttelettes aqueuses en suspension dans une phase huile (émulsion) produites par agitation mécanique. Il sera ainsi
30 possible de réaliser le criblage par FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) selon leurs activités xylanase et/ou cellulase et/ou cellobiase et/ou glucosidase et/ou xylosidase et/ou galactosidase d'enzymes ou de microorganismes ou de cellules compartimentés dans des gouttelettes aqueuses en suspension dans une phase huile.

De façon encore plus particulière, les substrats selon l'invention permettront la détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules compartimentés dans des gouttelettes aqueuses en suspension dans une phase huile (émulsion) produites par un dispositif microfluidique. Dans
5 cette hypothèse, il sera possible de réaliser par exemple le criblage selon leurs activités xylanase et/ou cellulase et/ou cellobiase et/ou glucosidase et/ou xylosidase et/ou galactosidase d'enzymes ou de microorganismes ou de cellules compartimentés dans des gouttelettes aqueuses en suspension dans une phase huile créée par un dispositif microfluidique.

Différents exemples de détections d'activités enzymatiques à l'aide des substrats
10 fluorogéniques décrits vont maintenant être donnés, à titre indicatif et nullement limitatif.

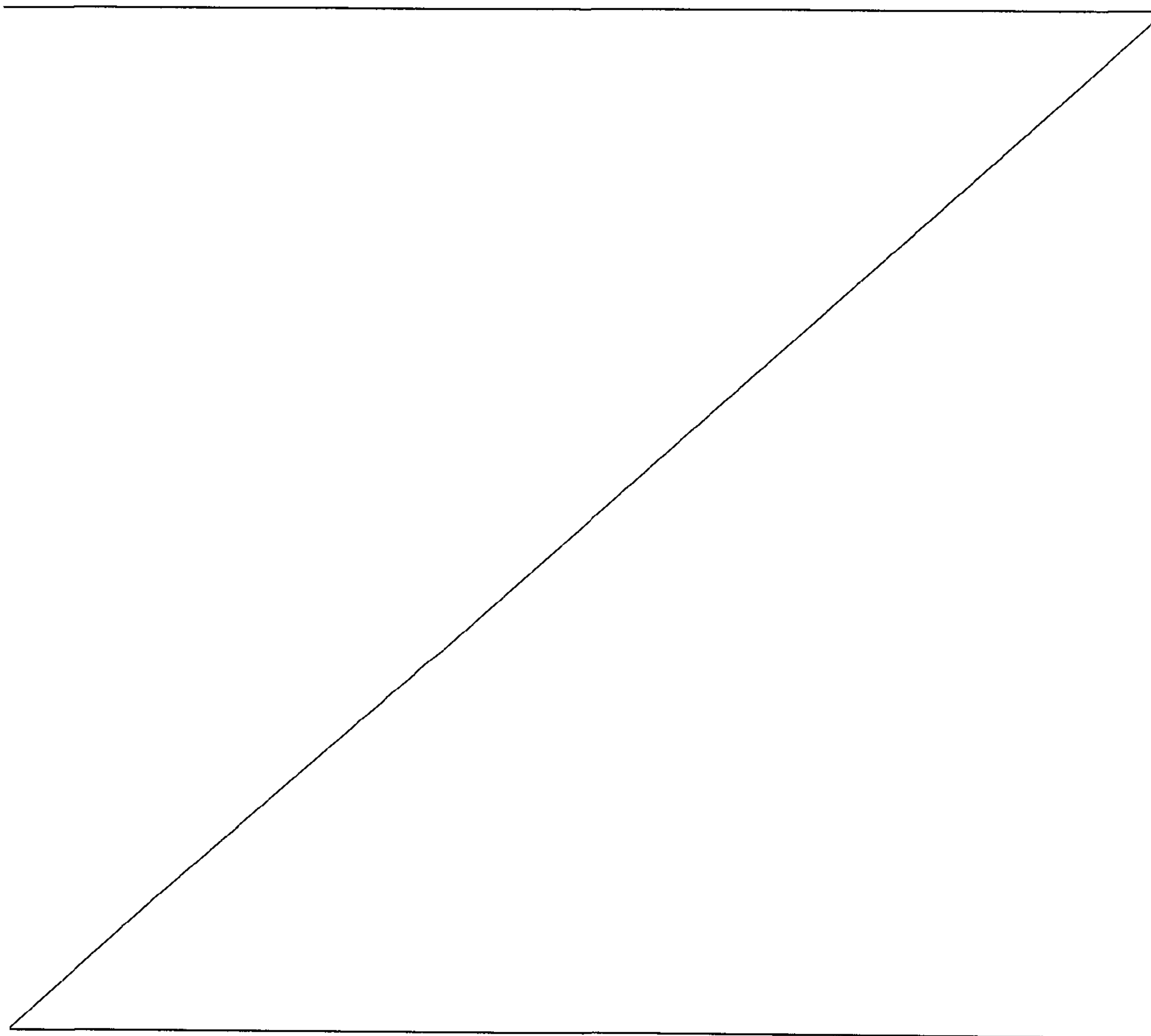
Exemple 16. Détection d'activités enzymatiques sur extraits enzymatiques solubles avec les substrats 10, 12, 14 et 18

Les cinétiques enzymatiques sont réalisées en microplaque sur des extraits enzymatiques solubles (A, B, C et D) riches en activités de type cellulase et xylanase. Ces extraits sont
15 dilués 10 fois (substrat 18, Figure 1) ou 100 fois (substrat 10, 12 et 14, Figure 2) dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5. Un volume de 20 µL d'extrait enzymatique dilué est ajouté à 20 µL de substrat fluorogénique (10, 12, 14 ou 18) à 0,25 mM dans du tampon phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5. Les cinétiques sont réalisées à
20 30°C. L'hydrolyse enzymatique des différents substrats fluorogéniques est suivie pendant 120 minutes par mesure de la fluorescence avec des longueurs d'excitation et d'émission de : 339 nm et 452 nm pour les substrats 10, 12 et 14 ; 375 nm et 510 nm pour le substrat 18.

Les résultats obtenus (Figures 1 et 2) montrent que les substrats fluorogéniques testés permettent de détecter des activités enzymatiques de type β -glucosidase (substrat 10 et 18), β -xylosidase (substrat 12) et xylanase (substrat 14) dans les extraits enzymatiques utilisés.

Exemple 17. Détection d'activités enzymatiques sur microorganismes avec les substrats fluorogéniques 8 et 10

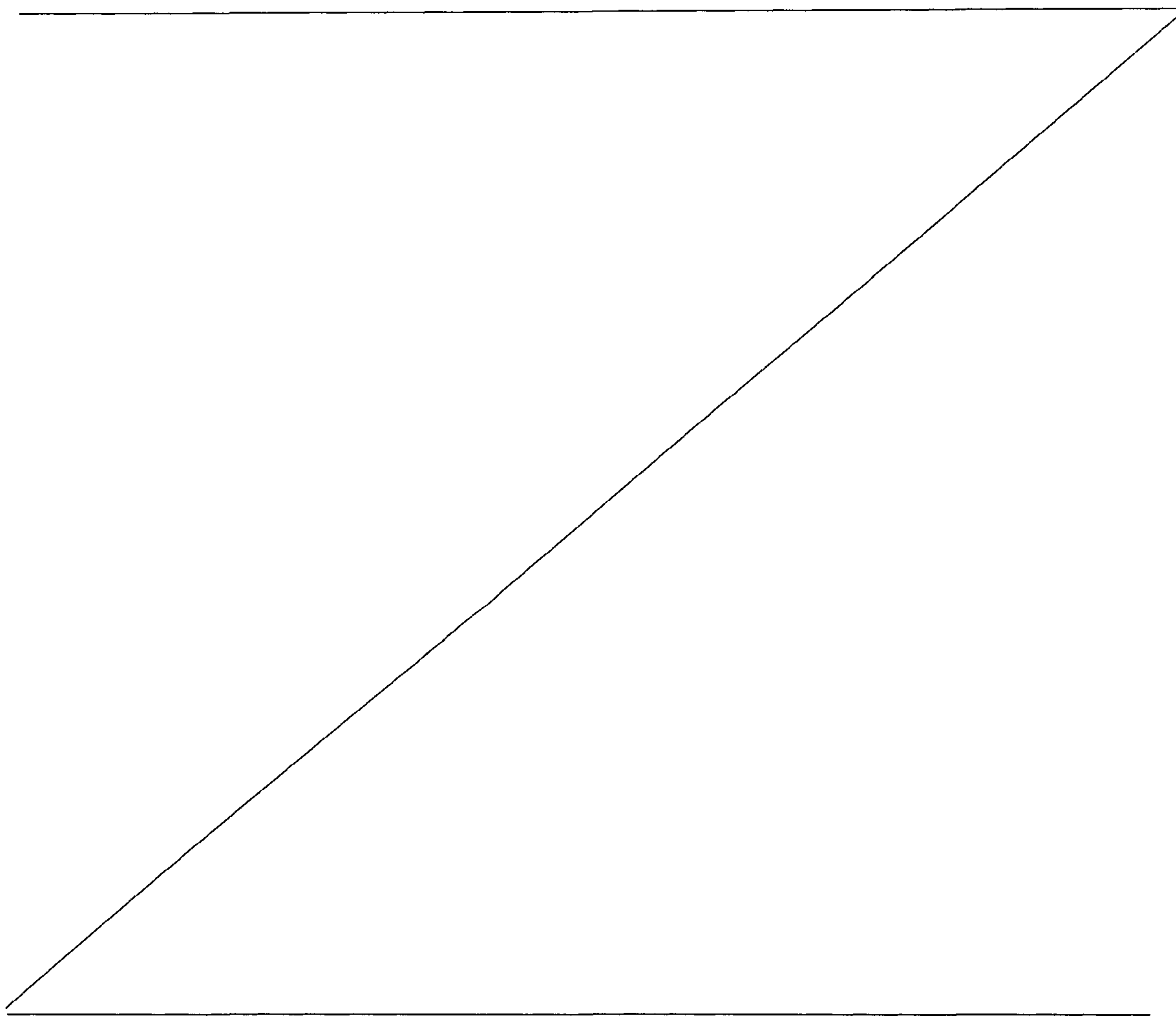
Différentes souches témoins sont mises en culture en milieu LB à 30°C sous agitation (240 rpm) pendant 18h. Pour chaque souche, la culture est centrifugée (2 500 g, 5 min) et le culot de cellules est lavé deux fois dans 5 ml de milieu LB (centrifugation à 2 500 g, 5 min). Ce culot est utilisé pour inoculer à DO = 0,005 une culture en milieu inducteur (milieu Dubos à 2,5 g/L de carboxyméthyl-cellulose) contenant le substrat fluorogénique (**8** ou **10**) à 0,25 mM. La culture est incubée à 30°C sans agitation pendant 24h. Des échantillons de surnageant de culture sont prélevés à différents temps d'incubation pour pouvoir suivre



l'apparition des activités cellulase ou β -glucosidase dans le milieu de culture. L'apparition de ces activités est suivie par mesure de la fluorescence sur les surnageants de culture en microplaques avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 388 nm et 455 nm.

Les résultats obtenus (Figures 3 et 4) montrent que les substrats fluorogéniques testés permettent de détecter des activités enzymatiques de type β -glucosidase (substrat **10**) et cellulase (substrat **8**) sur des cultures de microorganismes.

Exemple 18. Détection d'activité cellulase sur microorganismes en émulsion avec le substrat 8



Deux souches témoins sont utilisées : l'une présentant une activité cellulase (*Bacillus subtilis* NCIM 2724) l'autre n'en présentant aucune (*Escherichia coli* BL21). Les deux souches sont mises en culture en milieu LB à 30°C sous agitation (240 rpm) pendant 18h. Pour chaque souche, la culture est centrifugée (2 500 g, 5 min) et le culot de cellules est lavé deux fois
5 dans 5 ml de milieu LB (centrifugation à 2 500 g, 5 min). Ce culot est utilisé pour inoculer à DO = 0,005 une culture en milieu inducteur (milieu Dubos à 2,5 g/L de carboxyméthyl-cellulose) contenant le substrat fluorogénique 8 et 2,5 µM (*B.subtilis* NCIM 2724) ou 10 µM (*E.coli* BL21) de sulforhodamine. Ces deux suspensions de cellules sont utilisées avec de l'huile perfluorée pour produire une émulsion composée de deux populations de gouttelettes
10 contenant chacune l'une des suspensions décrites. Les fluorescences bleue et rouge des gouttelettes sont mesurées individuellement, sur un échantillon de l'émulsion, lors de la production (t = 0h) et de la réinjection après avoir incubé l'émulsion 24h à 30°C.

Les graphiques a et b, présentés Figure 5, sont les histogrammes à deux dimensions des intensités de fluorescence rouge (en abscisse, RFU) et bleue (en ordonnée, RFU) mesurées sur l'émulsion lors de sa production (a) et de sa réinjection après incubation pendant 24 h à 30°C (b). La densité de population est représentée par un code couleur variant du rose (1 gouttelette) au rouge (>1000 gouttelettes) selon une échelle logarithmique. Deux populations de gouttelettes sont observables : l'une à faible fluorescence rouge contenant *Bacillus subtilis* NCIM 2724 (souche active) et 2,5 µM de sulforhodamine, l'autre à fluorescence rouge intense contenant *Escherichia coli* BL21 (souche inactive) et 10 µM de sulforhodamine). L'analyse statistique de ces histogrammes est présentée dans le Tableau 1.

	[sulforhodamine]	2,5 µM	10 µM
	Identité des souches	<i>B.subtilis</i> NCIM 2724	<i>E.coli</i> BL21
Production (t=0h)	Nombre de gouttes analysées	16083	
	Fluorescence rouge moyenne (RFU)	6 434 ±387	25 775 ±825
	Fluorescence bleue moyenne (RFU)	18,78 ±1,19	
	Seuil de détection des gouttelettes positives (RFU)	37,56	
Réinjection (t=24h)	Nombre de gouttes analysées	15 869	
	% de gouttelettes positives	27,61 %	0,26%

Tableau 1 : Analyse statistique des populations de gouttelettes lors du test d'activité cellulase sur microorganismes en émulsion avec le substrat 8

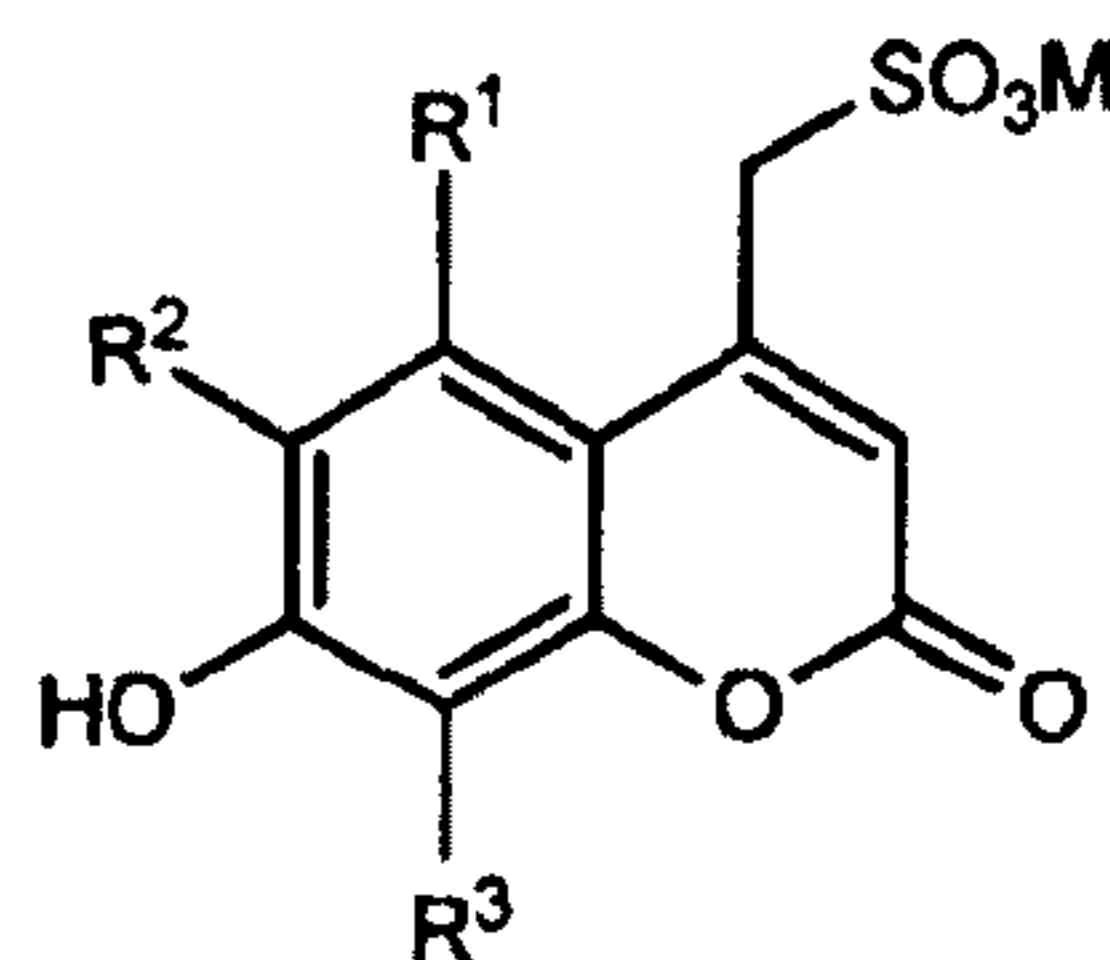
Les gouttelettes contenant la souche active (*Bacillus subtilis* NCIM 2724) voient leur fluorescence bleue significativement augmentée après 24h d'incubation (Figure 5). À

l'inverse les gouttelettes contenant la souche inactive (*Escherichia coli BL21*) ne présentent aucune augmentation de leur fluorescence bleue. Pour la souche active (*Bacillus subtilis NCIM 2724*), 27% des gouttelettes sont identifiées comme positive, contre 0,29% pour la souche inactive (*Escherichia coli BL21*). En conclusion, le substrat 8 permet de détecter une

5 activité de type cellulase sur des microorganismes au sein d'une émulsion générée par un système microfluidique.

REVENDICATIONS

1. Coumarine sulfonatée substituée de formule générale (I)

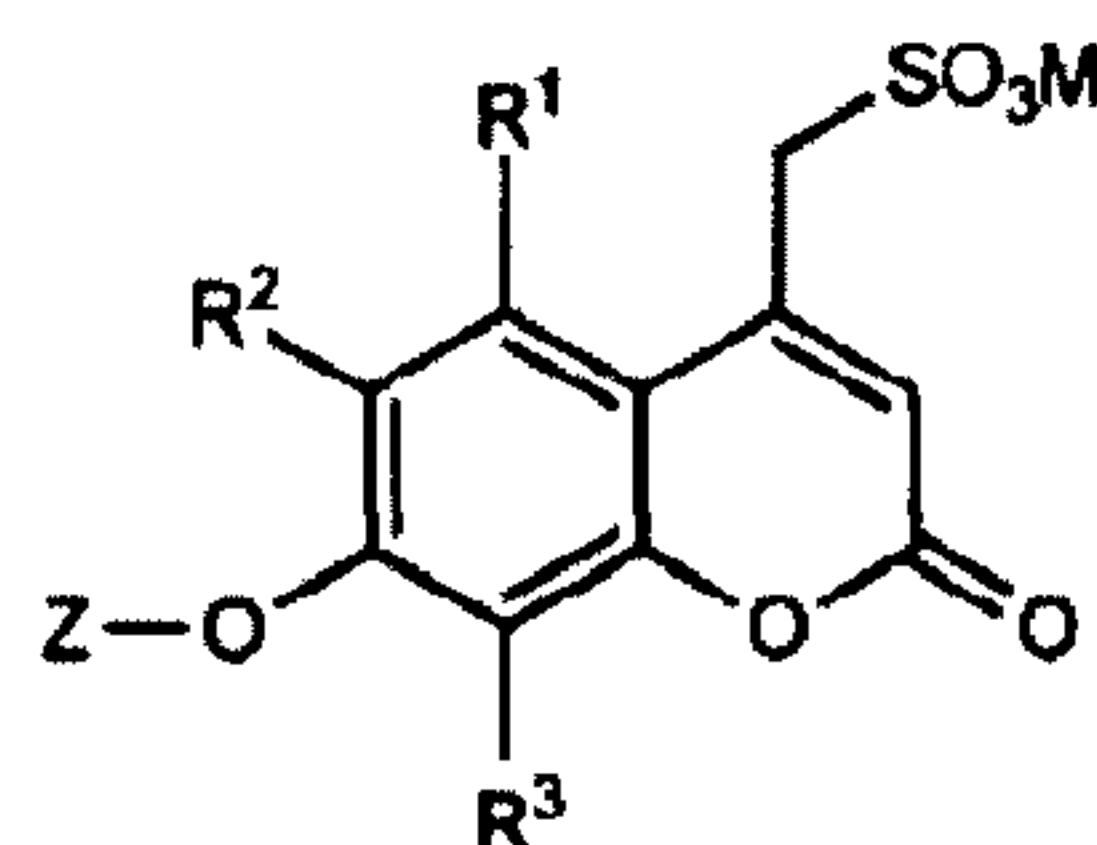


dans laquelle :

- R^1 représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié,
 - R^2 représente H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié,
 - R^1 et R^2 pouvant former ensemble un cycle, substitué ou non
 - R^3 représente H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié,
 - M représente Na ou K.
2. Coumarine selon la revendication 1, caractérisée en ce que R^1 et R^2 forment ensemble un aryle ou un furane, substitué ou non.
3. Coumarine selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite coumarine est la 7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthansulfonate de sodium.
4. Coumarine selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite coumarine est la 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthansulfonate de sodium.
5. Procédé de préparation de la coumarine telle que définie dans la revendication 3, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans de l'acide méthanesulfonique du 4-chloroacétoacétate d'éthyle sur du 2-méthylrésorcinol, puis à faire agir du sulfite de sodium sur le produit ainsi obtenu.
6. Procédé d'obtention de la coumarine telle que définie dans la revendication 4, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir dans de l'acide méthanesulfonique du 4-chloroacétoacétate d'éthyle sur du 1,3-dihydroxynaphtalène, puis à faire agir du sulfite de sodium sur le produit ainsi obtenu.

7. Procédé d'obtention d'une coumarine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par une étape de purification de la coumarine par chromatographie d'absorption sur colonne de silice en phase inverse.

8. Substrat fluorogénique ayant pour formule générale (II)



dans laquelle

- R^1 représente H, ou OH, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
 - R^2 représente H, ou un halogène, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
 - R^1 et R^2 pouvant former ensemble un cycle, substitué ou non
 - R^3 représente H, ou un halogène, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié, ou $-COR^4$, ou $-COOR^4$, ou $-CONHR^4$
 - avec R^4 étant H, ou un radical alkyle de C_1 à C_6 substitué ou non, linéaire ou ramifié ou un aryle, substitué ou non
 - M représente Na ou K
 - Z représente un sucre choisi dans le groupe constitué par les sucres suivants : cellobiose, xylobiose, maltose, saccharose, glucose, xylose, galactose, arabinose, xylane, glucane, xylotriose, maltotriose, cellotriose, xylo tétraose et un mélange de certains d'entre eux
 - et dans laquelle Z ne pouvant être le galactose lorsque R^1 est H, R^2 et R^3 sont F et M est Na.
9. Substrat selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il fait partie du groupe suivant : β -D-cellobioside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-glucoside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-xyloside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-xylobioside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-xylopolyoside 6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin-4-

méthanesulfonate de sodium, β -D-glucoside 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-xyloside 5,6-benzo-7-hydroxycoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, β -D-glucoside 7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthanesulfonate de sodium, ou β -D-galactoside 7-hydroxy-8-méthylcoumarin-4-méthanesulfonate de sodium.

10. Procédé d'obtention d'un substrat tel que défini dans la revendication 8 ou 9, caractérisé par le greffage d'un sucre sur une coumarine sulfonquée dans du DMF.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ledit greffage est suivi d'une déprotection des fonctions de type acétal.
12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce que ledit sucre est bromé avant d'être greffé sur ladite coumarine.
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que le substrat est ensuite purifié par chromatographie d'absorption sur colonne de silice en phase inverse.
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que le substrat est obtenu par greffage d'un sucre sur une coumarine sulfonquée comprenant la réaction du dérivé acétobromo dudit sucre avec la coumarine sulfonquée dans le DMF, puis la déprotection des fonctions du type acétal.
15. Détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules, caractérisée en ce que ladite détection se fait grâce à l'un des substrats fluorogéniques tel que défini dans la revendication 8 ou 9.
16. Détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules selon la revendication 15, caractérisée en ce que lesdits extraits ou microorganismes ou cellules sont compartimentés dans des gouttelettes aqueuses en suspension dans une phase huile.
17. Détection d'activités glycosidases (EC3.2.1) sur des extraits enzymatiques purifiés ou non ou sur des microorganismes ou sur des cellules selon la revendication 16, caractérisée en ce que lesdites gouttelettes aqueuses sont produites par un dispositif microfluidique.

Figure 1

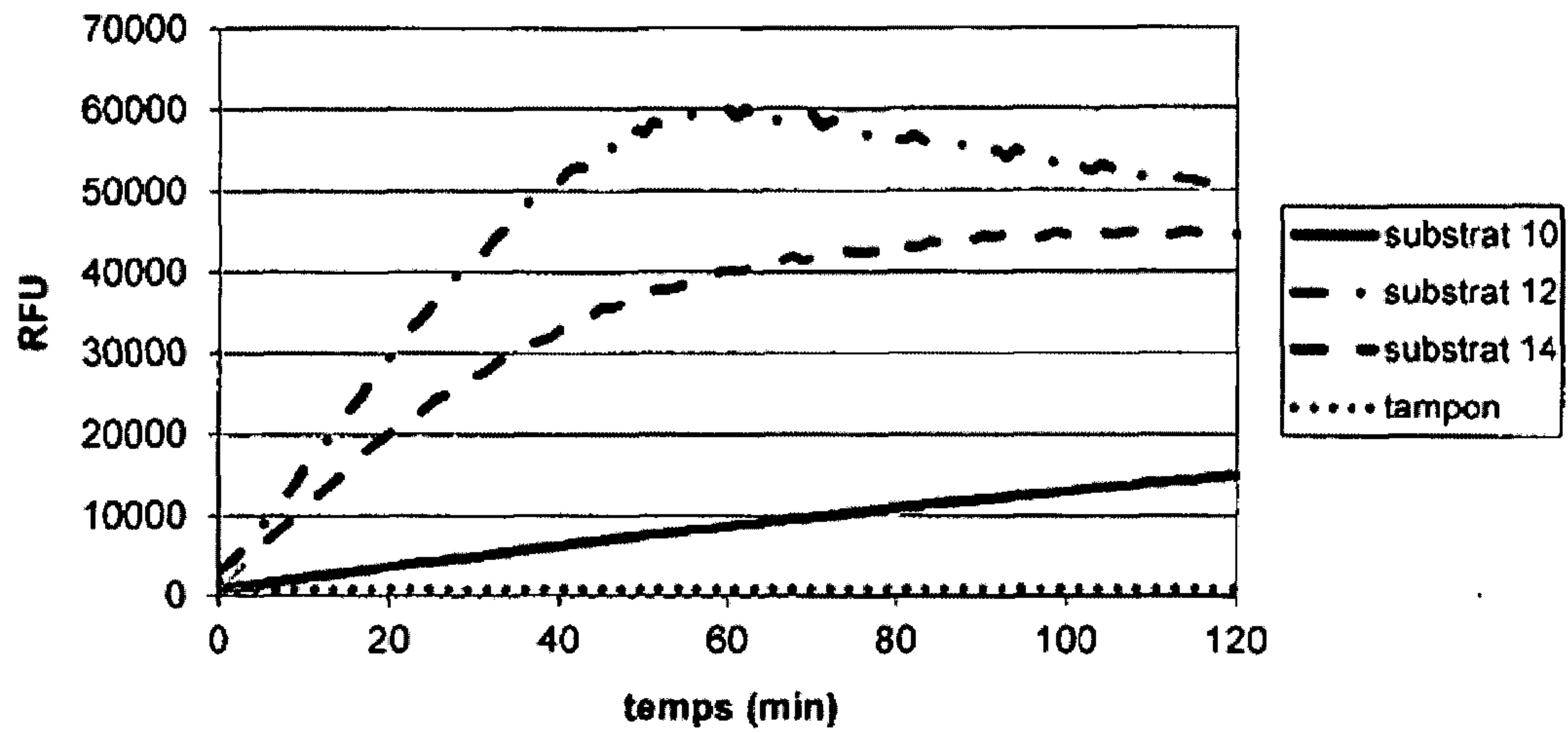


Figure 2

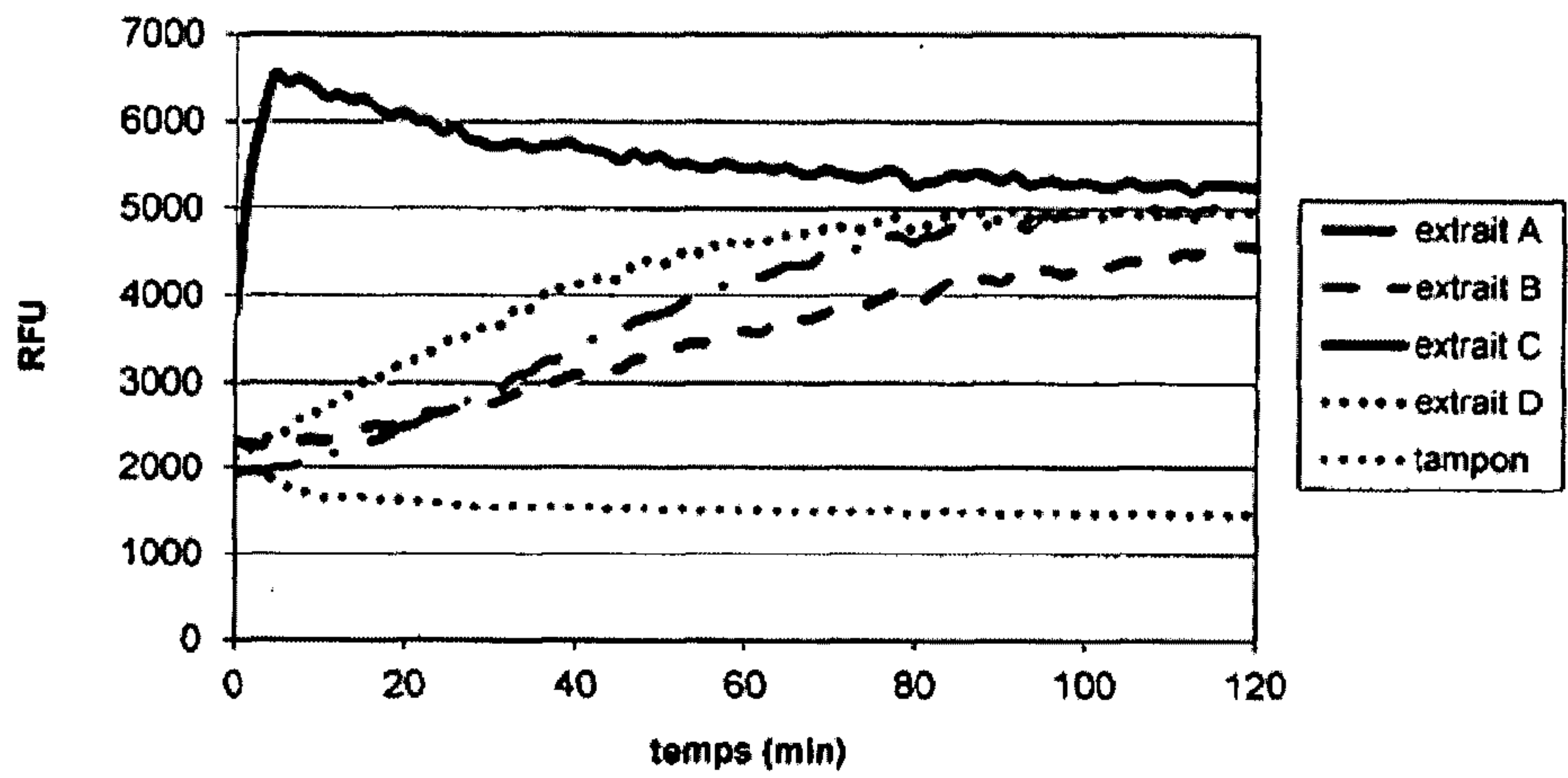


Figure 3

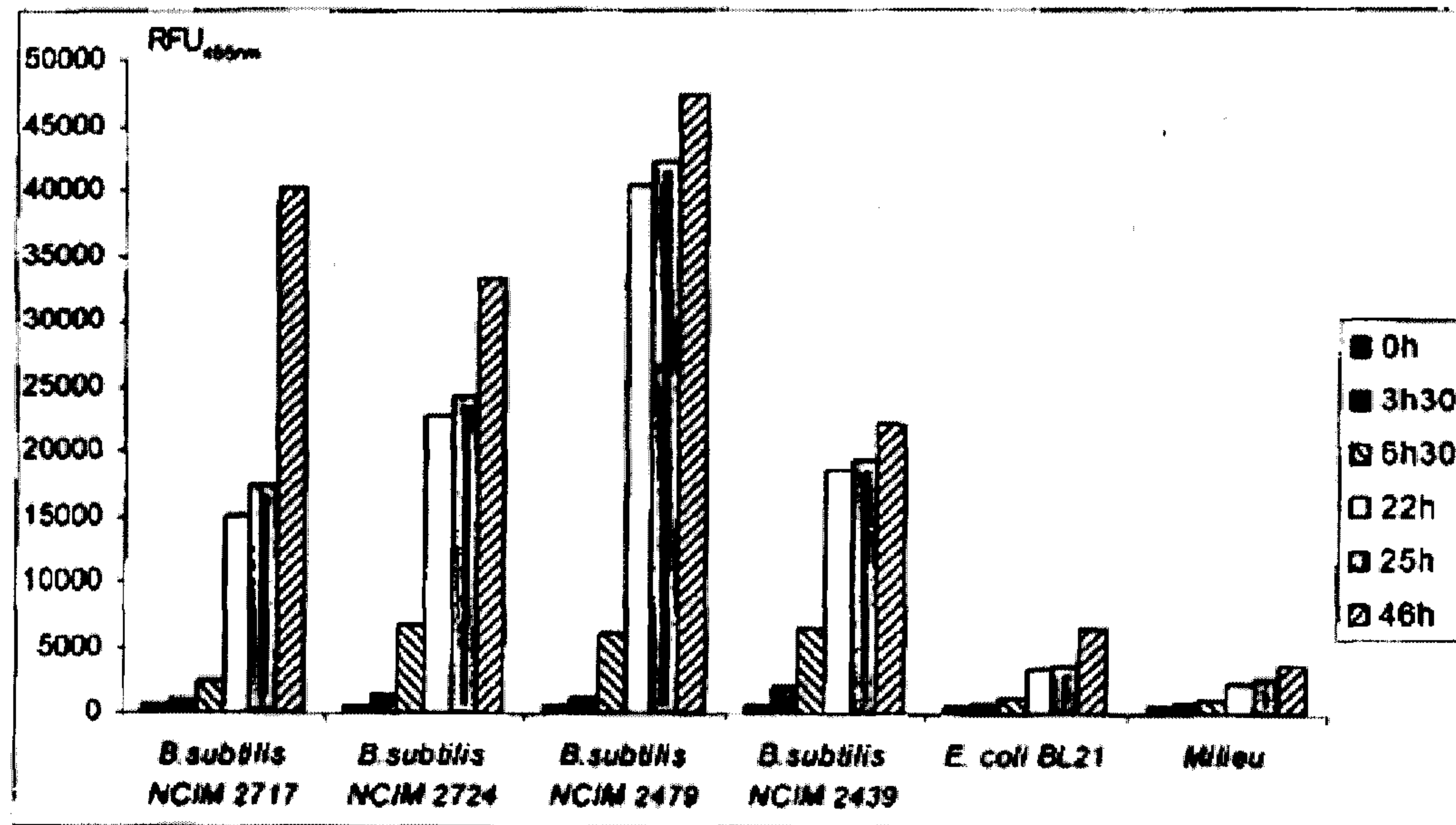


Figure 4

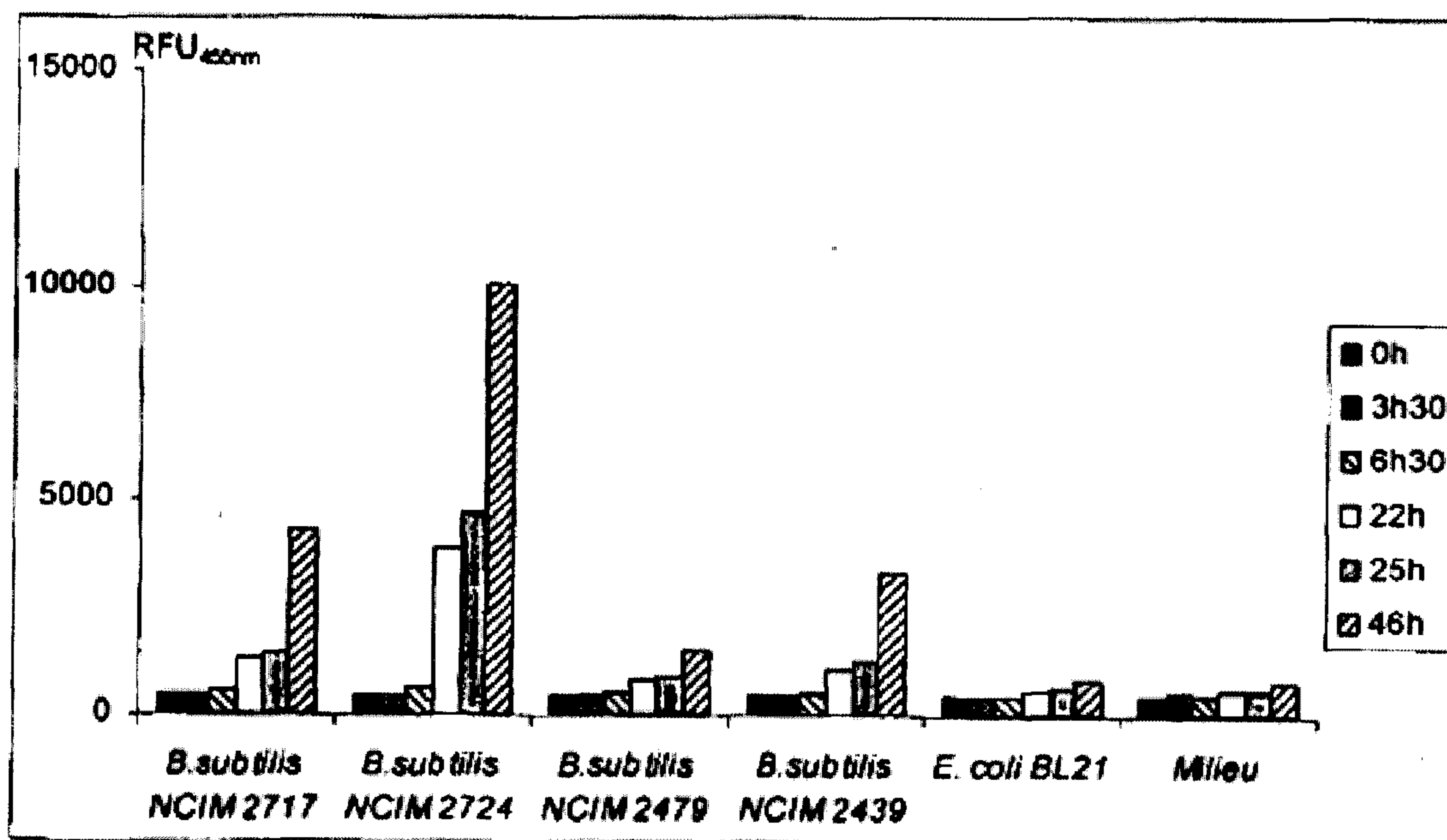
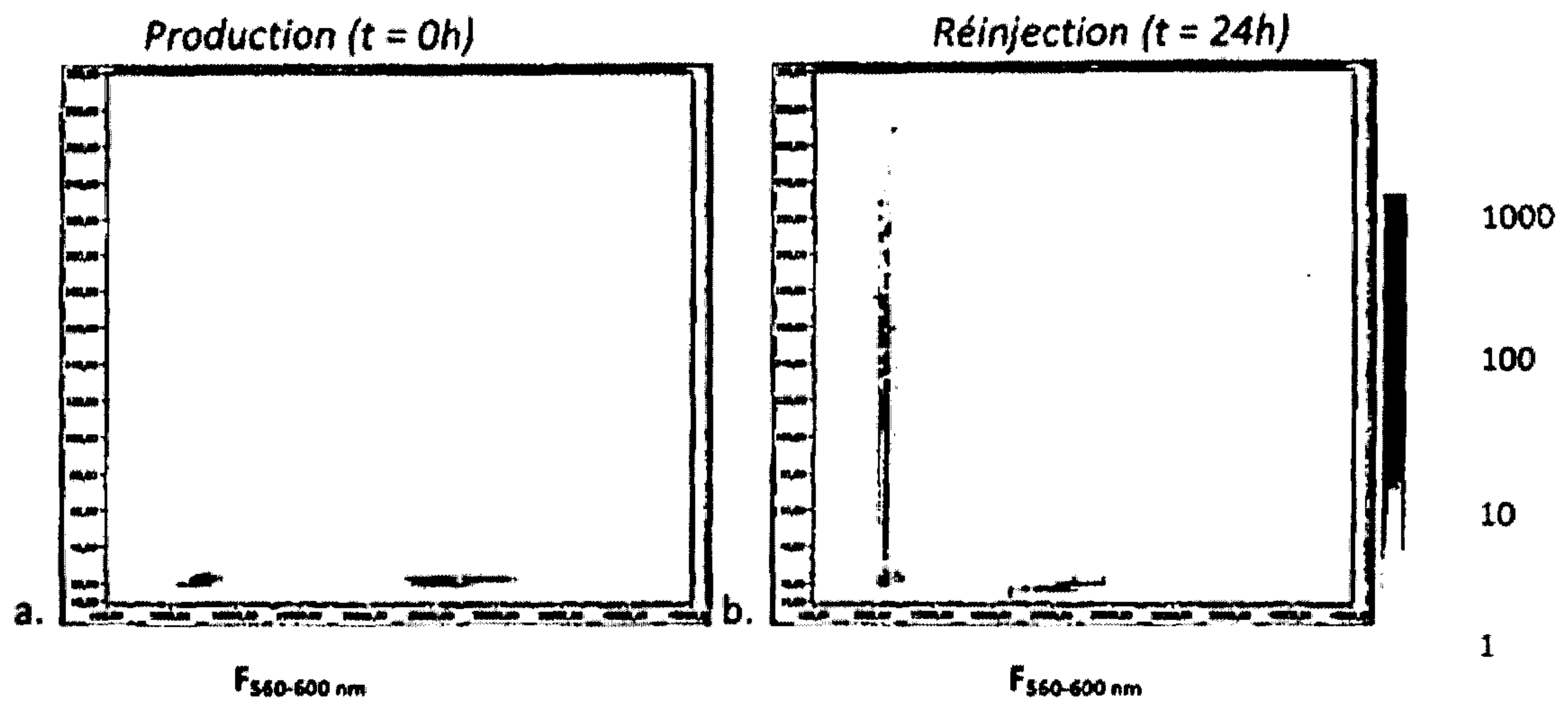


Figure 5



(I)

