



**HAL**  
open science

# C(sp<sup>3</sup>)-H activation énantiospécifique catalysée par des nanoparticules de ruthénium : application au marquage isotopique de molécules d'intérêt biologique.

Céline Taglang

## ► To cite this version:

Céline Taglang. C(sp<sup>3</sup>)-H activation énantiospécifique catalysée par des nanoparticules de ruthénium : application au marquage isotopique de molécules d'intérêt biologique.. Chimie organique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112086 . tel-01179325

**HAL Id: tel-01179325**

**<https://theses.hal.science/tel-01179325>**

Submitted on 22 Jul 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :  
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : *Laboratoire de Marquage au Tritium*

# THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

**Céline TAGLANG**

C(sp<sup>3</sup>)-H activation énantiospécifique catalysée par des nanoparticules de ruthénium : application au marquage isotopique de molécules d'intérêt biologique

Date de soutenance : **24/06/2015**

**Composition du jury :**

Directeur de thèse :	Bernard ROUSSEAU	Directeur de recherche (CEA Saclay)
Rapporteurs :	Olivier BAUDOIN Françoise COLOBERT	Professeur (Université Lyon 1) Professeur (Université de Strasbourg)
Examineurs :	Cyrille Kouklovsky Grégory Pieters Sébastien ROY	Professeur (Université Paris Sud) Chercheur (CEA Saclay) Ingénieur (Sanofi Chilly Mazarin)









*À mes parents*



# Remerciements

Je voudrais remercier toutes les personnes qui ont participé à mes travaux de thèse.

Bernard Rousseau pour m'avoir accueillie, fait confiance, donné l'opportunité de travailler sur deux sujets très originaux et pour ton énergie qui m'a permis d'obtenir mon premier article en tant que premier auteur.

Les membres du jury : Pr. Cyrille Kouklovsky, Pr. Françoise Colobert, Pr. Olivier Baudoin et M. Sébastien Roy pour avoir accepté de juger mon travail et m'avoir offert la chance d'échanger nos idées.

L'équipe Tritium : Christophe pour ton écoute et ton soutien. Merci d'avoir cru au marquage des aminoacides et porté le projet PhePhe. Grégory pour tout ce que tu m'as appris. Sébastien pour ton accueil, ton dynamisme et ta gentillesse. Emmanuelle aux dépens de qui j'ai bien rigolé ! Serge pour nos réflexions sur le marquage des aminoacides dans D<sub>2</sub>O et pour m'avoir invitée dans ton fief où l'on a vu Kaaris, notre idole. Bo pour ta gentillesse et ton humour qui fait toujours mouche. Abdel qui m'a beaucoup touchée.

Le service d'analyse pour les très nombreuses masses intro-directes et HPLC : David pour ta filmographie douteuse et ton humour irrésistible, Céline avec qui j'ai réussi à venir à bout des 160 pages de partie expérimentale et Anaïs pour avoir travaillé très rapidement sur les HPLC chirales des acides aminés. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

L'équipe de Bruno Chaudret, au LPCNO à Toulouse. Nos échanges sur l'activité catalytique des nanoparticules de ruthénium étaient passionnants. Merci à Luis Miguel Martínez-Prieto pour la préparation de ces nanoparticules.

L'équipe de Romuald Poteau, à Toulouse également. La détermination du mécanisme de C-H activation a vraiment été précieuse. Merci à Iker del Rosal et Laurent Maron pour tous les mécanismes que vous avez envisagés.

Vincent Dauvois pour les analyses par spectrométrie de masse en phase gaz auxquelles je ne croyais pas beaucoup mais qui ont très vite apporté des réponses importantes sur le mécanisme d'échange H/D.

Thibault Charpentier pour les analyses RMN à l'état solide du tritium et pour ta bonne humeur permanente. Mélanie Moskura pour ton appui durant les remplissages d'inserts.

Yves Boulard pour ton travail de modélisation moléculaire sur PhePhe.

Maïté Paternostre, pour ton soutien, et Manolis Kasotakis pour ton aide sur le projet PhePhe.

Les autres membres du laboratoire : Éric pour tes encouragements à chacune de mes présentations. Ils m'ont poussée à tenter de faire toujours mieux. Edmond pour tes conseils. Simon (aka DJ Saïmon) pour tes délires, ta fantaisie, ta sensibilité, ta philosophie positive de la vie... Dinh Vu que j'ai vraiment appris à connaître durant ma thèse. On se retrouvera dans un prochain labo ! Florence pour toutes tes attentions et ton soutien. Julien pour ton accueil chaleureux et notre superbe randonnée au Mont-Dore. Fabien, le gentleman, pour ta discographie vintage mais inoubliable. Naoko pour ta générosité et ton humilité. Élise pour ton énergie et tes conseils. Fayçal pour tes bons plans! Anil, Dhanaji and Praveen for your kindness. Anaëlle pour ta sympathie et ta persévérance. Je suis sûre que tu feras une belle thèse.

Les membres du C14 qui m'ont soutenue et chouchoutée : Frédéric pour ta bienveillance, ton enthousiasme et pour m'avoir aidée à préparer mon concours Irtelis. Kahina, ma plus belle rencontre au SCBM, je te remercie d'avoir veillé sur moi et d'avoir cru en moi. Tu as toujours les mots justes qui apaisent. Je suis très heureuse d'avoir participé à ta thèse et que l'on soit restées amies. Manon pour tes conseils et ton dynamisme. Valentina pour ta douceur et ta joie de vivre. Sandra pour ton sourire omniprésent. Davide et Évelia, je vous souhaite beaucoup de bonheur. Dominique et Olivier pour les petites discussions qui donnent le sourire.

L'ensemble de SCBM, j'ai passé trois belles années avec vous : Jean-Christophe, Yves, Marie-Pierre, Thierry, Chantal, Éric, Goulven, Françoise et tous les autres...

Élias qui m'a aidée à traverser ma dernière année de thèse. Merci pour ton soutien.

Les personnes passionnantes et adorables que j'ai rencontrées durant mes stages : Sophie, Bruno, Fabienne, Luc, Marcel, Jean-Marie, Patrick, Nicolas, Fred, Jérôme et les autres...

Mes amis que j'adore : Laura A., Sophie, Sylvie, Laura B. qui a fait le marathon « soutenance + soirée », Gulcan, Alexandra, Laaaaaaaaam, P-A, Filipe, Johanna, Georges.

Pascal. La plus belle surprise que m'ait fait la vie.

Ma mère et mon père. Merci pour votre amour, votre patience et les magnifiques moments que nous partageons depuis 26 ans.





# Table des matières

Remerciements .....	6
Table des matières .....	11
Liste des abréviations .....	15
PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE MÉTHODOLOGIE DE DEUTÉRATION PAR ÉCHANGE H/D CATALYSÉE PAR DES NANOPARTICULES DE RUTHÉNIUM .....	
Introduction .....	21
I. État de l'art .....	27
I. A. « La renaissance de l'échange H/D » .....	28
I. A. 1. Applications et nouvelles potentialités du marquage .....	29
I. A. 2. Méthodes d'échange classiques .....	46
I. A. 3. Méthodes d'échange H/D régiosélectives de substrats azotés récemment publiées .....	62
I. B. Nanoparticules de ruthénium et genèse du projet .....	70
I. B. 1. Les nanoparticules de métaux de transition pour la catalyse .....	70
I. B. 2. Les nanoparticules de ruthénium du groupe de Bruno Chaudret (RuNP@PVP). 73	
I. C. Objectifs de la thèse .....	81
II. La deutération régiosélective de composés azotés catalysée par RuNP@PVP.....	85
II. A. Échange H/D catalysé par RuNP@PVP sur des molécules azotées.....	85
II. B. Échange H/D catalysé par RuNP@PVP sur des molécules biologiquement actives .	88
II. C. Premières indications sur le mécanisme d'échange H/D catalysé par RuNP@PVP ..	90
II. D. Conclusions.....	91
III. Application des RuNP@PVP au marquage au deutérium d'aminoacides et de peptides ..	97
III. A. Stratégie de marquage 1 (aminoesters) .....	97
III. A. 1. Procédure de deutération des aminoesters catalysée par RuNP@PVP .....	98
III. A. 2. Cas de la L-tyrosine <i>tert</i> -butyl éther <i>tert</i> -butyl ester <b>46</b> .....	99
III. A. 3. Cas de la L-phénylalanine benzyl ester <b>49</b> et du L-tryptophane benzyl ester <b>52</b> .....	102
III. B. Stratégie de marquage 2 (aminoacides).....	105
III. B. 1. Échange H/D sur la L-leucine dans l'eau .....	105
III. B. 2. Échange H/D sur la L-phénylalanine dans l'eau lourde (D <sub>2</sub> O) .....	107
III. B. 3. Procédure de deutération des aminoacides catalysée par RuNP@PVP dans D <sub>2</sub> O .....	108
III. B. 4. Résultats de deutération des aminoacides catalysée par RuNP@PVP dans D <sub>2</sub> O .....	109



III. B. 5. Alternative à l'utilisation de D <sub>2</sub> O : NaOH 0,01M.....	111
III. C. Marquage des peptides en position C <sub>α</sub> de l'extrémité N-terminale.....	114
III. D. Conclusions.....	115
IV. Études mécanistiques expérimentales.....	119
IV. A. Influence des groupements fonctionnels sur le marquage (amines et dérivés).....	119
IV. A. 1. Exemple de la ( <i>R</i> )-3-méthylbutan-2-amine <b>73</b> : procédure de marquage.....	120
IV. A. 2. Exemple de la ( <i>R</i> )-3-méthylbutan-2-amine <b>73</b> : analyses.....	120
IV. B. Quelle est la source de D ?.....	124
IV. C. Conclusions.....	127
V. Études mécanistiques théoriques (travail réalisé à Toulouse par l'équipe du Pr. Romuald Poteau).....	131
V. A. Introduction.....	131
V. A. 1. Chimie de surface des nanoparticules de métal : un challenge pour la chimie informatique.....	131
V. A. 2. Activation des liaisons C-H et métaux de transition.....	132
V. B. Choix des modèles.....	135
V. B. 1. L'amine modèle.....	135
V. B. 2. Clusters nus de taille finie et modèles en bloc.....	135
V. B. 3. Coordination de l'amine sur des modèles « nus ».....	136
V. B. 4. Le rôle des hydrures.....	137
V. C. Études mécanistiques.....	140
V. C. 1. Les voies de plus basse énergie.....	140
V. C. 2. L'influence des hydrures de surface.....	141
V. D. Mise en évidence d'un intermédiaire-clé original : le dimétallacycle à quatre centres.....	143
V. D. 1. Les différentes approches pour l'activation C-H.....	143
V. D. 2. Une nouvelle voie de cycloméallation pour l'activation C-H : l'intermédiaire dimétallacycle à quatre centres.....	146
V. E. Conclusions.....	147
Conclusions.....	151
Perspectives.....	155

PARTIE 2 : NOUVELLE STRATÉGIE D'ÉTUDE STRUCTURALE DE PETITES MOLÉCULES EN INTERACTION AVEC DES COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES .....	157
Introduction .....	161
I. État de l'art.....	167
I. A. La RMN du tritium à l'état solide, un nouvel outil potentiel d'analyse structurale ..	169
I. A. 1. Les méthodes d'analyse structurale conventionnelles .....	169
I. A. 2. Le tritium, un atout idéal pour la RMN du solide .....	180
I. B. Les travaux précédents au laboratoire.....	186
I. B. 1. Choix et synthèse de molécules modèles .....	186
I. B. 2. Mesure de longues distances interatomiques par spectroscopie RMN du tritium à l'état solide .....	187
I. C. Phe-Phe, un dipeptide aux propriétés remarquables .....	189
I. C. 1. Les études de Phe-Phe par l'équipe de Gazit .....	190
I. C. 2. Les études de Phe-Phe par l'équipe de Görbitz.....	195
I. D. Objectifs de la thèse .....	197
II. Le marquage au tritium de Phe-Phe cristallisé pour la détermination de distances intramoléculaires par RMN <sup>3</sup> H à l'état solide .....	203
II. A. La modélisation moléculaire de Phe-Phe cristallisé (travail réalisé par le Dr. Yves Boulard au CEA-Saclay).....	204
II. B. La synthèse des Phe-Phe cristallisés ditritiés à partir de précurseurs dibromés par échange Br/T .....	206
II. B. 1. Synthèse de [4- <sup>3</sup> H]Phe-[4- <sup>3</sup> H]Phe <b>88</b> .....	206
II. B. 2. Synthèse de [4- <sup>3</sup> H]Phe-[3- <sup>3</sup> H]Phe <b>89</b> .....	208
II. B. 3. Synthèse de [3- <sup>3</sup> H]Phe-[4- <sup>3</sup> H]Phe <b>90</b> .....	209
II. C. Conclusions.....	210
III. La mesure des distances interatomiques <sup>3</sup> H- <sup>3</sup> H par RMN <sup>3</sup> H à l'état solide (travail réalisé à Saclay par l'équipe du Dr. Thibault Charpentier) .....	215
III. A. Mesure de la distance <sup>3</sup> H- <sup>3</sup> H de [4- <sup>3</sup> H]Phe-[4- <sup>3</sup> H]Phe <b>88</b> .....	216
III. B. Mesure de distances <sup>3</sup> H- <sup>3</sup> H de [4- <sup>3</sup> H]Phe-[3- <sup>3</sup> H]Phe <b>89</b> .....	217
III. C. Mesure de distances <sup>3</sup> H- <sup>3</sup> H de [3- <sup>3</sup> H]Phe-[4- <sup>3</sup> H]Phe <b>90</b> .....	219
III. D. Conclusions .....	221
IV. Essai de marquage au tritium de Phe-Phe utilisant RuNP@PVP .....	227
IV. A. La synthèse du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn <b>102</b> .....	228
IV. A. 1. Approche rétrosynthétique .....	228
IV. A. 2. Synthèse du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn <b>102</b> .....	229
IV. B. Double marquage au deutérium du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn <b>102</b> .....	230
IV. B. 1. Mise au point de l'étape 1 : échange Br/D .....	230

IV. B. 2. Mise au point de l'étape 2 : échange H/D .....	231
IV. B. 3. Résultat de la double deutération par échanges Br/D puis H/D à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn <b>102</b> .....	234
IV. C. Essai de double marquage au tritium du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn <b>102</b> .....	235
IV. D. Conclusions .....	236
V. Le marquage au tritium de Phe-Phe cristallisé pour la détermination de distances intermoléculaires par RMN <sup>3</sup> H à l'état solide .....	241
V. A. Synthèse de Phe-[3- <sup>3</sup> H]Phe <b>109b</b> .....	242
V. Conclusions .....	242
Conclusions .....	245
Perspectives .....	249
PARTIE EXPÉRIMENTALE PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE MÉTHODOLOGIE DE DEUTÉRATION PAR ÉCHANGE H/D CATALYSÉE PAR DES NANOPARTICULES DE RUTHÉNIUM.....	251
PARTIE EXPÉRIMENTALE PARTIE 2 : NOUVELLE STRATÉGIE D'ÉTUDE STRUCTURALE DE PETITES MOLÉCULES EN INTERACTION AVEC DES COMPLEXES SUPRAMOLÉCULAIRES .....	349

# Liste des abréviations

Boc : *tert*-butoxycarbonyle

Bn : benzyle

COSY : *C*Orrelation *S*pectroscop*Y*

CP : *cross coupling*

Da : Dalton

DCM : dichlorométhane

DFT : *Density Functional Theory*

DIPEA : *N,N*-diisopropyléthylamine

DMF : diméthylformamide

EDC : *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

EPR : *Electron Paramagnetic Resonance*

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

HFIP : hexafluoroisopropylamine

HOBt : *N*-hydroxybenzotriazole

MAS : *Magic Angle Spinning*

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MET : Microscopie Électronique en Transmission

PES : *Potential Energy Surface*

PCTFE : Polychlorotrifluoroéthène

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : *Root-Mean-Square Deviation*

SAXS : *Small-Angle X-ray Scattering*

TA : température ambiante

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TMS : triméthylsilane

TS : *Transition State*



**PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT  
D'UNE NOUVELLE  
MÉTHODOLOGIE DE  
DEUTÉRATION PAR ÉCHANGE  
H/D CATALYSÉE PAR DES  
NANOPARTICULES DE  
RUTHÉNIUM**



# **Introduction**





# Introduction

L'une des missions de notre laboratoire consiste à mettre au point des méthodes de synthèse efficaces pour l'obtention de composés deutérés ou tritiés qui sont des outils précieux dans de nombreux domaines.

Les synthèses mises au point avec l'atome de deutérium, isotope stable de l'hydrogène, servent généralement de modèles pour l'optimisation des synthèses avec l'atome de tritium, isotope radioactif de l'hydrogène, et permettent de mener des études *in vitro* et *in vivo* en pharmacocinétique. Récemment, l'émergence de la métabolomique a fait augmenter la demande en composés marqués isotopiquement. En particulier, leur utilisation en tant que standards internes est essentielle pour la quantification de métabolites dans des échantillons biologiques complexes et la prévention des risques de maladies. De plus, les molécules tritiées sont d'un grand intérêt dans les études de toxicité des nanomatériaux. Enfin, l'effet isotopique cinétique du deutérium peut ralentir la métabolisation de candidats-médicaments et donc prolonger leur activité.

Deux stratégies peuvent être suivies pour la synthèse d'une molécule deutérée :

- la synthèse conventionnelle multi-étape
- l'échange direct d'un (ou plusieurs) atome(s) d'hydrogène par un (ou plusieurs) atome(s) de deutérium sur la molécule-cible ou sur un intermédiaire à un stade avancé.

La deuxième stratégie, rapide et plus économique, nécessite généralement l'utilisation d'un catalyseur métallique.

De nombreuses méthodes basées sur la catalyse homogène et hétérogène pour l'échange H/D ont déjà été décrites. La deutération sélective de molécules azotées fait l'objet d'études particulièrement intenses car cet hétéroatome est très présent dans les composés à activité biologique. En 2012, pour les dérivés de pyridine et d'indole, l'équipe de Schnürch a décrit une méthode utilisant un complexe commercial  $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$  catalysant la réaction d'échange H/D avec de bonnes sélectivités et incorporations en deutérium. Concernant les amines alkylées, l'équipe de Beller a développé l' $\alpha,\beta$ -deutération d'amines secondaires et tertiaires. Cette méthode repose sur l'utilisation du complexe de Shvo en tant que catalyseur et permet d'atteindre de forts enrichissements isotopiques sur des molécules complexes à activité pharmaceutique. Ces méthodes sont certes intéressantes mais elles n'ont jamais été appliquées

sur des molécules chirales et requièrent des températures élevées (115 °C à 150 °C) qui peuvent conduire à la formation de sous-produits voire à la dégradation de substrats sensibles. Par conséquent, le développement d'une méthode de marquage chimio-, régio- et stéréospécifique, applicable à une large variété de substrats, est encore nécessaire.

Au cours d'études précédentes, l'équipe de Bruno Chaudret a obtenu des nanoparticules de ruthénium, de taille homogènes (1,1 nm) par décomposition d'un précurseur organométallique Ru(cot)(cod), sous atmosphère d'hydrogène (H<sub>2</sub>), en présence d'un stabilisant (polymère polyvinylpyrrolidone ou ligand hexadécylamine, par exemple). Ces nanoparticules présentent à leur surface des hydrures mobiles et réactifs. L'équipe de Chaudret a observé que le traitement de ces nanoparticules sous atmosphère de deutérium (D<sub>2</sub>), à température ambiante, dans le THF, conduisait à l'incorporation de deutérium sur les ligands amines primaires liées à la surface des nanoparticules.

Nous nous sommes fixés comme objectif de cette thèse d'évaluer l'activité catalytique de ces nanoparticules de ruthénium envers la réaction d'échange H/D, par activation C-H, sur des molécules azotées. La deutération de quatorze molécules modèles et huit composés plus complexes a eu lieu dans des conditions douces (TA ou 55 °C, sous 1 à 2 bar de H<sub>2</sub>), régiosélectivement (en position  $\alpha$  de l'atome d'azote) et avec une incorporation en deutérium élevée.

Ces résultats nous ont conduit à tester notre méthode d'échange H/D, basée sur l'utilisation des nanoparticules de ruthénium, sur des liaisons C(sp<sup>3</sup>)-H de centres chiraux.

Dans une première partie, nous avons procédé à la deutération d'une classe de composés aux propriétés biologiques cruciales : les aminoacides et leurs dérivés aminoesters. Puis, nous nous sommes intéressés à l'application de notre méthode sur des molécules plus complexes : les peptides.

Dans une deuxième partie, nous avons réalisé la deutération d'amines chirales modèles, en faisant varier différents paramètres tels que la nature du solvant et du gaz afin de mieux comprendre le mécanisme de la réaction d'échange H/D. Les résultats obtenus confirment que l'atome d'azote coordinant joue le rôle de groupement directeur. Notre hypothèse est que cette coordination facilite l'insertion d'un second atome de ruthénium sur la liaison C(sp<sup>3</sup>)-H et la réaction d'échange entre l'atome d'hydrogène et l'atome de deutérium. Des calculs quantiques DFT ont été réalisés pour tester cette hypothèse et proposer un mécanisme d'échange H/D par activation C-H à la surface des nanoparticules de ruthénium.

Ces travaux de thèse ont donc été réalisés en collaboration avec le Pr. Bruno Chaudret et son équipe (Nanostructures et Chimie Organométallique, Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, INSA Toulouse) pour la synthèse des nanoparticules de ruthénium, le Pr. Romuald Poteau et son équipe (Modélisation Physique et Chimique, Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, INSA Toulouse) pour la validation de notre hypothèse de mécanisme par calculs DFT.

Les analyses par HPLC avec une phase stationnaire chirale des aminoacides et des peptides deutérés ont été effectuées par Céline Puente et David Buisson, dans notre service d'analyse.

Enfin, les analyses par spectrométrie de masse en phase gaz ont également été réalisées au CEA, par le Dr. Vincent Dauvois et son équipe (CEA Saclay).



# **I. État de l'art**



# I. État de l'art

La synthèse organique repose sur la transformation de groupements fonctionnels présentant une réactivité chimique relativement haute. Généralement, les liaisons C-H ne sont pas considérées comme des groupes fonctionnels à cause de leur énergie de dissociation élevée (98 kcal/mol). L'installation d'une nouvelle liaison requière plutôt la présence soit d'un hétéroatome (oxygène, halogène,...) soit d'une insaturation dans le squelette carboné, d'où la nécessité d'établir une stratégie de synthèse multi-étape à partir de réactifs structurellement éloignés des produits finaux (Figure 1).

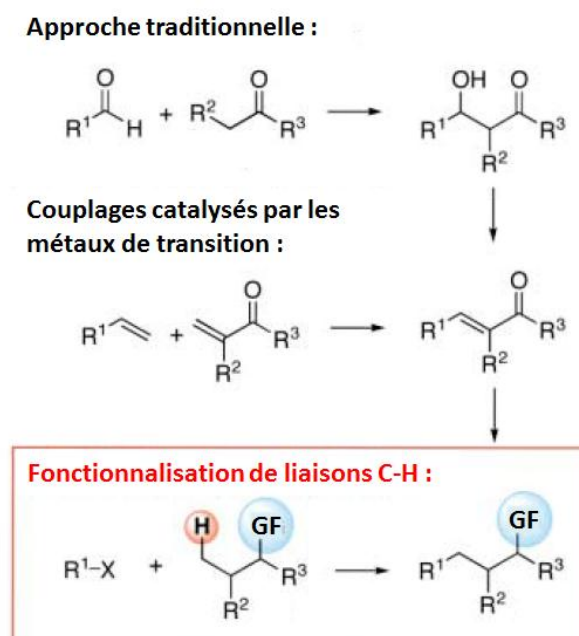


Figure 1 : Différentes stratégies de la synthèse organique<sup>1</sup>. GF : groupement fonctionnel

L'abondance des liaisons C-H étant très élevée, la transformation en une seule étape de liaisons C-H en liaisons C-C ou C-X (X = O, N,...) sans perturbation de la structure moléculaire environnante représente un intérêt considérable pour la synthèse organique. Indéniablement, la transformation directe de liaisons C-H procure des raccourcis comparés à une stratégie de synthèse classique, rendant ainsi les voies de synthèse plus simples et économes en atomes. Cette nouvelle approche permettrait en plus d'accéder à des connections auparavant inatteignables. Depuis ces 15 dernières années, poussés par les exigences

<sup>1</sup> K. Godula, D. Sames, *Science* **2006**, 312, 67–72.



environnementales et économiques, les chimistes s'efforcent de transformer de manière sélective, efficace et contrôlée ces liaisons C-H, dans le but de modifier des composés complexes à un stade avancé ou d'accélérer la synthèse d'analogues et de rationaliser la recherche de candidats médicaments : la capacité à cibler sélectivement différentes liaisons C-H dans des substrats complexes permettrait l'accès direct à de multiples analogues à partir d'un précurseur-clé commun.

Ainsi, en envisageant les liaisons C-H comme des « fonctionnalités omniprésentes » et non plus comme des liaisons latentes, l'activation de liaisons C-H apparaît comme une nouvelle méthode de choix pour accéder plus rapidement à des structures complexes ou construire des structures jusqu'à présent inexplorées. Dans la suite de cette thèse, c'est à cette méthode de fonctionnalisation que nous nous intéresseront plus particulièrement.

## **I. A. « La renaissance de l'échange H/D »**

Le deutérium est un isotope stable et non-radioactif de l'hydrogène  $^1\text{H}$ , avec une abondance naturelle de 0,015 %. L'UICPA<sup>2</sup> recommande de représenter le deutérium par le symbole  $^2\text{H}$  afin de préserver l'homogénéité de ses dénominations, mais tolère le symbole D qui est largement utilisé. Son noyau atomique possède un proton et un neutron, d'où un nombre de masse égal à 2. L'existence du deutérium a été mise en évidence par Harold Clayton Urey<sup>3</sup>, chimiste de l'université de Columbia, dont la découverte lui a valu le Prix Nobel de Chimie en 1934. La masse atomique de l'hydrogène  $^1\text{H}$  est de 1,00782503214 u alors que celle du deutérium  $^2\text{H}$  est de 2,01410177799 u. D'un point de vue chimique, l'atome de deutérium présente un effet isotopique significatif : il est un peu moins réactif que l'hydrogène et forme des liaisons (covalentes ou hydrogènes) légèrement plus fortes. À l'état diatomique, sous forme gazeuse, le deutérium ( $\text{D}_2$  gaz) est utilisé dans l'industrie nucléaire et peut être obtenu par électrolyse de l'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou par distillation fractionnée d'hydrogène liquide. Il s'agit d'un gaz incolore, inodore et inflammable.<sup>4</sup>

La plupart des produits marqués au deutérium sont obtenus par la création de liaisons carbone-deutérium particulièrement stables. Les atomes de deutérium des liaisons oxygène-

---

<sup>2</sup> Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée.

<sup>3</sup> H. C. Urey, F. G. Brickwedde, G. M. Murphy, *Phys. Rev.* **1932**, 39, 164.

<sup>4</sup> The Merck Index, 11th edition, Merck & Co. Inc., Rahway R, NJ, USA, **1989**, 463.

deutérium et azote-deutérium sont labiles : ils peuvent facilement s'échanger avec les protons des solvants protiques tels que le méthanol.

Les composés deutérés sont essentiels pour les études de mécanismes réactionnels en biologie ainsi qu'en chimie organique et organométallique. Ils sont également d'un intérêt particulier pour le développement de dispositifs optiques efficaces tels que les fibres polymères optiques et les diodes électroluminescentes organiques (OLED en anglais : Organic Light-Emitting Diode). Récemment, l'émergence de la métabolomique a fait augmenter la demande en composés marqués isotopiquement. Leur utilisation en tant que standards internes est essentielle pour l'analyse quantitative en LC-MS/MS de métabolites dans les fluides biologiques. Pour la synthèse de telles molécules, l'échange isotopique est clairement préféré à une voie de synthèse partant de composés de base ou impliquant un précurseur. Par conséquent, le développement de méthodologies de marquage efficaces et sélectives par réactions d'échange H/D catalysées sur les centres carbonés de molécules-cibles est d'un grand intérêt.

## **I. A. 1. Applications et nouvelles potentialités du marquage**

Une période de recherche intense dans les années 1960 et 1970 a été suivie par une période plus calme dans le domaine de l'échange H/D. Ce n'est qu'au milieu des années 1990 que ce domaine a connu une renaissance résultant de l'intérêt grandissant des chimistes pour l'activation de liaisons C-H et le besoin en composés deutérés comme matériels de référence en spectrométries de masse.

### **I. A. 1. a) L'effet isotopique cinétique du deutérium**

L'effet isotopique cinétique est la variation de la vitesse d'une réaction chimique lorsqu'un atome d'un des réactifs est remplacé par un de ces isotopes. Souvent, la différence de vitesse peut être expliquée comme conséquence du changement de masse entre l'atome de référence et l'isotope. Un isotopologue plus lourd possède des fréquences vibrationnelles plus petites, et alors l'énergie du point zéro diminue. Si l'énergie du point zéro, correspondant à l'énergie

vibrationnelle des liaisons d'une molécule au zéro absolu, est plus faible, il faut fournir une énergie d'activation supérieure pour briser la liaison, ce qui ralentit la réaction<sup>5</sup> (Figure 2).

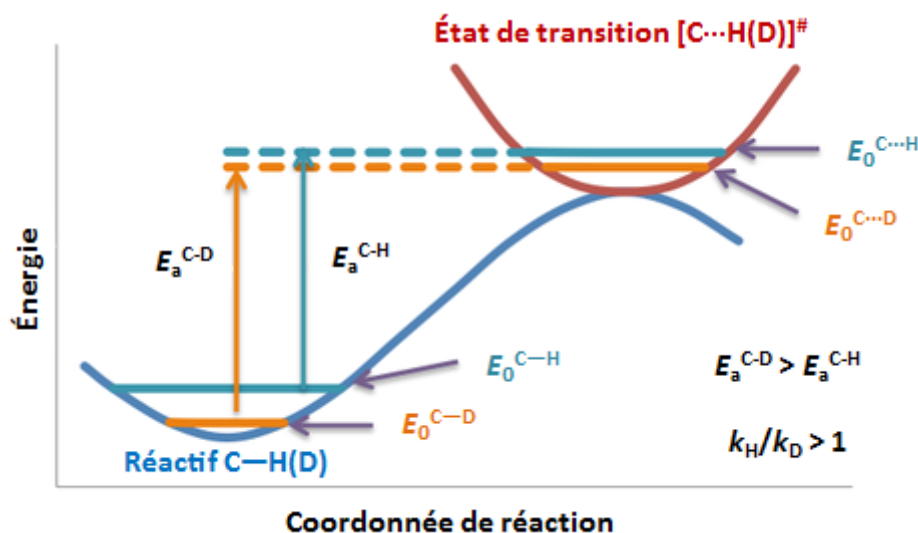


Figure 2 : Profil d'énergie potentielle pour les liaisons C-H et C-D<sup>6</sup>.  $E_0$  : énergie de point zéro,  $E_a$  : énergie d'activation.

Les effets isotopiques les plus importants correspondent donc aux plus grands changements relatifs de masse : changer un atome d'hydrogène en deutérium représente une augmentation en masse de 100 % (remplacer un  $^{12}\text{C}$  en  $^{13}\text{C}$  n'augmente la masse que de 8 %) ; la vitesse de réaction de la liaison C-H peut donc être environ 6,5 fois plus rapide que celle de la liaison C-D, à 25 °C, soit 298 K (Équation 1).

$$\frac{k_H}{k_D} = e^{\frac{hc(\nu_H - \nu_D)}{2kT}}$$

Équation 1 :  $k_H$  vitesse de réaction pour la liaison C-H,  $k_D$  vitesse de réaction pour la liaison C-D,  $h$  constante de Planck,  $c$  vitesse de la lumière,  $\nu_H$  fréquence d'élongation avec la liaison C-H ( $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_D$  fréquence d'élongation avec la liaison C-D ( $\sim 2100 \text{ cm}^{-1}$ ),  $k$  constante de Boltzmann,  $T$  température.

L'effet isotopique du deutérium est donc d'une grande valeur dans l'étude des mécanismes des réactions chimiques. Les états vibrationnels d'une molécule peuvent être étudiés selon plusieurs voies. La plus directe est la spectroscopie infrarouge, les transitions vibrationnelles requérant une quantité d'énergie qui correspond typiquement à la région infrarouge du

<sup>5</sup> K. B. Wiberg, *Chem. Rev.* **1955**, 4, 713–743.

<sup>6</sup> "C-H and C-D bond breaking" Aykutaydin. CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons - [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:C-H\\_and\\_C-D\\_bond\\_breaking.png#/media/File:C-H\\_and\\_C-D\\_bond\\_breaking.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:C-H_and_C-D_bond_breaking.png#/media/File:C-H_and_C-D_bond_breaking.png)

spectre. La spectroscopie Raman, qui utilise typiquement la lumière visible, peut aussi être utilisée pour mesurer les fréquences de vibration.

## I. A. 1. b) Deutérium en nanosciences

### I. A. 1. b) i- Améliorer les dispositifs optiques

Une diode électroluminescente organique (OLED en anglais : organic light emitting diode) est un composant qui permet de produire de la lumière. La structure de base d'un composant OLED consiste à superposer plusieurs couches de matériaux organiques entre deux électrodes (Figure 3).

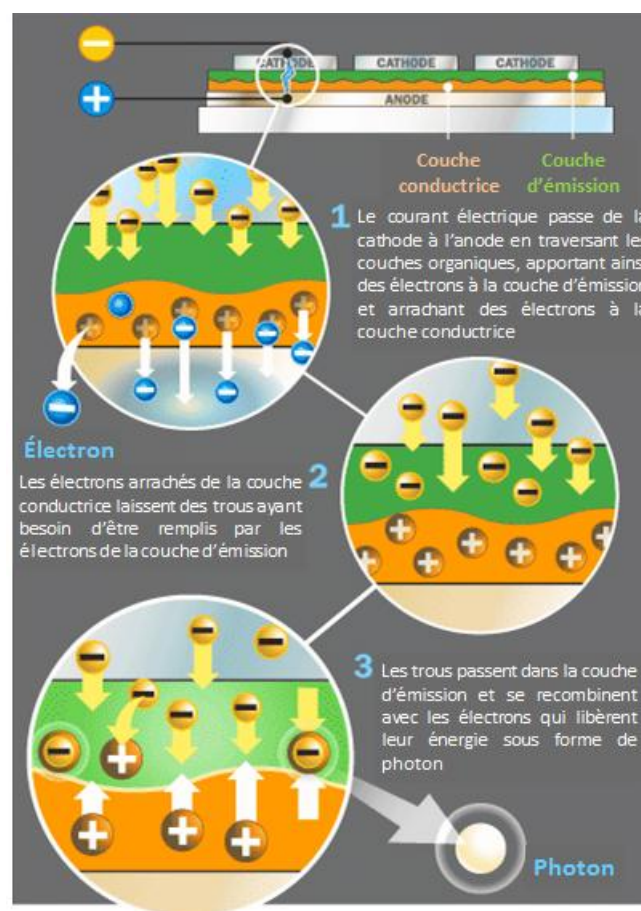


Figure 3 : Principe de la technologie OLED<sup>7</sup>

Les matériaux de transfert de charges, la couche d'émission et le choix des électrodes sont des paramètres fondamentaux qui déterminent les performances et l'efficacité du composant

<sup>7</sup> Freudenrich, Ph.D., Craig. "How OLEDs Work", 24 mars 2005. HowStuffWorks.com. <<http://electronics.howstuffworks.com/oled.htm>>

OLED. Les luminophores (éléments de la couche lumineuse) utilisés dans une OLED sont principalement dérivés du PPV (poly (*p*-phénylène vinylène)) et du polyfluorène (Figure 4).

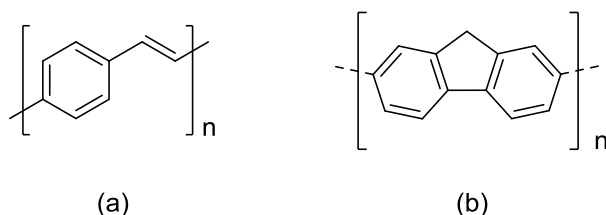


Figure 4 : (a) PPV (poly (*p*-phénylène vinylène)), (b) polyfluorène

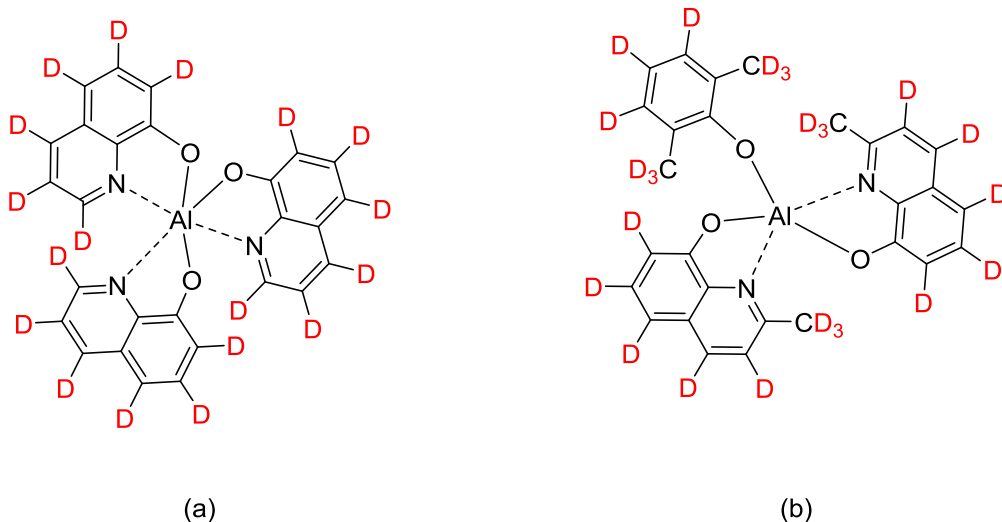
Les OLED sont de plus en plus utilisées sur des produits à durée de vie courte ou moyenne (téléphone mobiles, appareils photo numériques, baladeurs mp3), mais l'utilisation pour des produits à durée de vie plus longue (moniteurs d'ordinateurs, téléviseurs) devrait prendre plus de temps (Tableau 1).

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Minceur, souplesse et légèreté du support car ne nécessite pas de rétroéclairage</li> <li>- Processus de fabrication plus abordable</li> <li>- Temps de réponse inférieur à 0,1 ms</li> <li>- Meilleur rendu des couleurs et des contrastes</li> <li>- Lumière plus diffuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durée de vie insuffisante (14000 heures). Un téléviseur en nécessiterait 50000</li> <li>- Sensibilité des matériaux organiques à l'humidité</li> <li>- Rendements d'émission de lumière encore faibles</li> <li>- Instabilité à haute tension</li> </ul>

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de la technologie OLED

En 2007, l'équipe de Hwang<sup>8</sup> est la première à utiliser la deutération pour montrer que les ruptures de liaisons C-H aromatiques constituent un facteur important d'instabilité du dispositif à base d'Alq<sub>3</sub>, complexe couramment utilisé dans les OLED. L'équipe montre alors qu'il est possible d'améliorer à la fois le rendement en émission de lumière et la stabilité à haute tension de dispositifs OLED par deutération de matériaux organiques : l'aluminium 8-hydroxyquinoline (D-Alq<sub>3</sub>) et le bis(2-méthyl-8-quinolinolato)(2,6-diméthyl-phenolato)aluminium(III) (D-Q<sub>2</sub>AlOAr) (Figures 5).

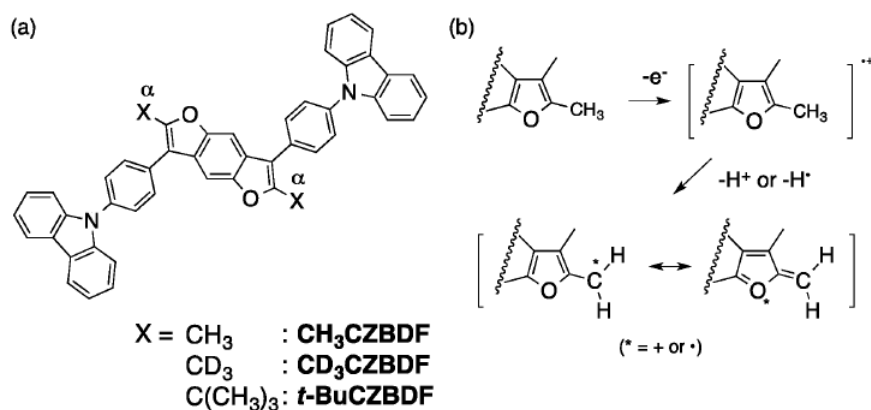
<sup>8</sup> C. C. Tong, K. C. Hwang, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 3490–3494.



Figures 5 : (a) D- Alq<sub>3</sub>, (b) D- Q<sub>2</sub>AlOAr

En effet, l'équipe de Hwang démontre que le remplacement par le deutérium d'hydrogènes dans les matériaux organiques émetteurs de lumière apporte une meilleure stabilité à haute tension et une augmentation d'environ 280 % du rendement quantique externe à une densité de courant de 500 mA. cm<sup>-2</sup>, dans le cas d'un dispositif à base de Alq<sub>3</sub>, et une augmentation d'environ 270 % à 150 mA. cm<sup>-2</sup>, dans le cas d'un dispositif à base de Q<sub>2</sub>AlOAr. Grâce à leur rendement quantique externe d'émission de lumière plus élevé, ces dispositifs deutérés peuvent fournir la même intensité d'émission de lumière que les dispositifs de référence hydrogénés à plus faible tension, avec ainsi une consommation électrique plus faible.

Afin d'augmenter la durée de vie des OLED, il semble important d'étudier leurs mécanismes de dégradation. La deutération représente un outil très utile pour trouver des solutions. En 2014, l'équipe de Nakamura montre que la deutération d'un matériau OLED (CH<sub>3</sub>CZBDF vs. CD<sub>3</sub>CZBDF) augmente la durée de vie du dispositif d'un facteur 5 (12 minutes vs. 1 heure) sans affecter les autres propriétés et permet de concevoir un nouveau dérivé plus stable et plus efficace (*t*-BuCZBDF) (Figure 6a).



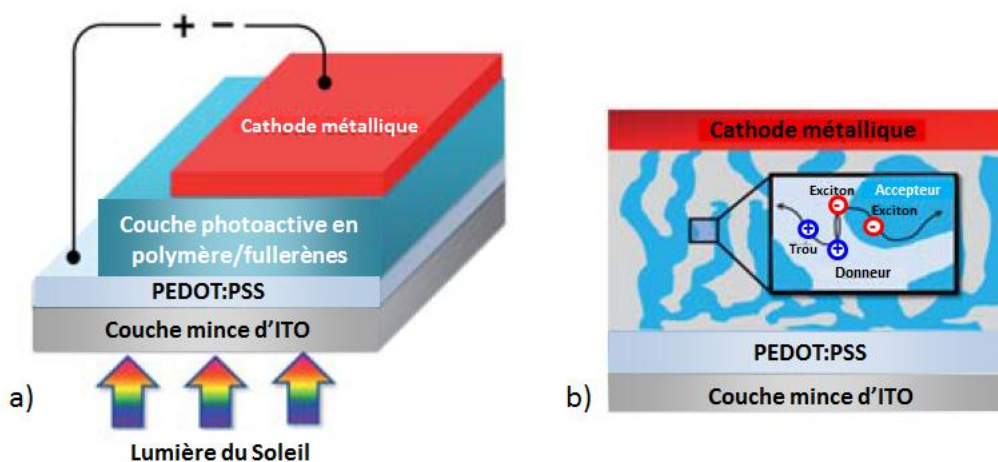
Figures 6 : Matériaux étudiés par l'équipe de Nakamura<sup>9</sup>. (a) Structures chimiques des dérivés CZBDF, (b) voie de dégradation plausible de CH<sub>3</sub>CZBDF

En effet, la dégradation du groupement méthyle dans CH<sub>3</sub>CZBDF, mise en évidence par deutération, est impliquée en tant qu'étape critique du processus de dégradation du dispositif OLED. La molécule est oxydée en un radical cation (formation de trou) et subit la perte soit d'un proton soit d'un radical hydrogène (Figure 6b). Guidés par cette analyse, l'équipe remplace les liaisons C-H hétérolytiquement labiles par des liaisons C-CH<sub>3</sub> plus stables et découvre que la durée de vie du dérivé *t*-BuCZBDF augmente alors d'un facteur 22,5 (12 minutes vs. 4h30).

I. A. 1. b) ii- Développer des dispositifs pour l'énergie

L'effet photovoltaïque est le produit du choc des photons de la lumière sur un matériau semi-conducteur qui transmet leur énergie aux électrons qui génèrent une tension électrique. Il est mis en œuvre dans les cellules photovoltaïques pour produire de l'électricité à partir du rayonnement solaire (Figures 7).

<sup>9</sup> H. Tsuji, C. Mitsui, E. Nakamura, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 14870–14872.



Figures 7 : (a) Structure schématique d'une cellule solaire polymère. (b) Schéma de la couche photoactive<sup>10</sup>.  
 ITO : oxyde d'indium-étain ; PEDOT:PSS : poly(3,4-éthylènedioxythiophène):poly(styrène sulfonate) de sodium

Actuellement, les technologies photovoltaïques sont dominées par les cellules solaires à base de semi-conducteurs inorganiques. Cependant, la fabrication de ces cellules solaires inorganiques traditionnelles implique souvent une température élevée, un vide poussé et de nombreuses étapes d'impression, entraînant des coûts de production et une consommation en énergie élevés. Les cellules solaires basées sur des matériaux organiques tels que les petites molécules et les polymères conjugués offrent une voie économique pour convertir l'énergie solaire en électricité. En effet, les cellules solaires organiques (OSC en anglais : organic solar cells) ont divers avantages : elles sont fines, flexibles, légères et présentent un faible coût de fabrication.

Suite aux travaux précurseurs de Tang<sup>11</sup>, sur des OSC à hétérojonction<sup>12</sup> bi-couche, publiés en 1986, d'importantes recherches ont été menées afin d'améliorer le rendement de conversion électrique (PCE en anglais : power conversion efficiency). Ce paramètre est le plus utilisé pour déterminer les performances d'une cellule solaire. Il est défini comme le rapport de la puissance électrique produite sur la puissance de lumière incidente. En 1992, l'équipe de Sariciftci<sup>13</sup> prépare un dispositif composé d'une hétérojonction entre un polymère donneur d'électrons et un fullerène accepteur d'électrons. Les dérivés fullerènes, comme [6,6]-phényl-C<sub>61</sub>-butanoate de méthyle (PCBM), constituent les matériaux accepteurs d'électrons les plus

<sup>10</sup> Y. Zhou, M. Eck, M. Krüger, *Energy Environ. Sci.* **2010**, *3*, 1851.

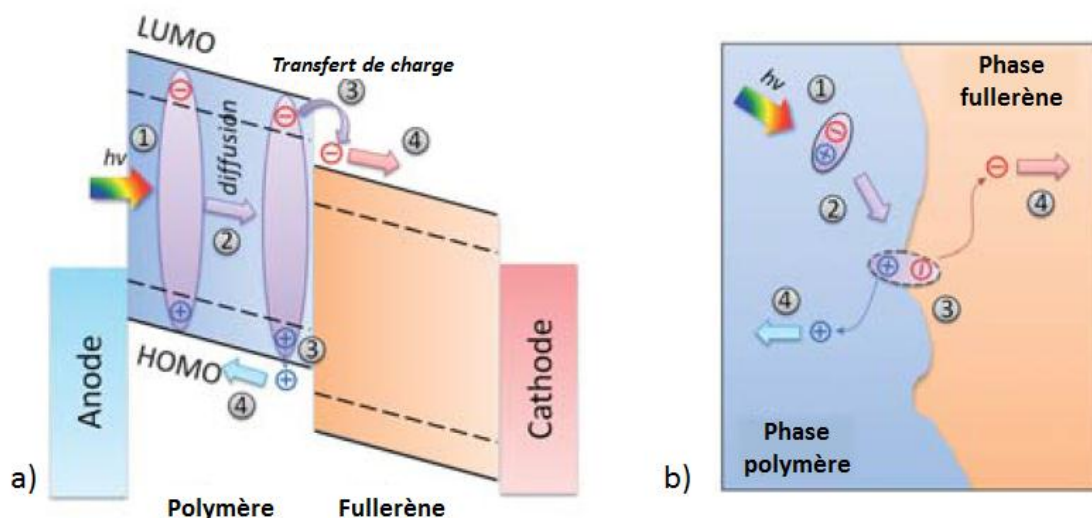
<sup>11</sup> C. W. Tang, *Appl. Phys. Lett.* **1986**, *48*, 183.

<sup>12</sup> Zone de contact électrique entre deux matériaux différents.

<sup>13</sup> N. S. Sariciftci, L. Smilowitz, A. J. Heeger, F. Wudl, *Science* **1992**, *258*, 1474.

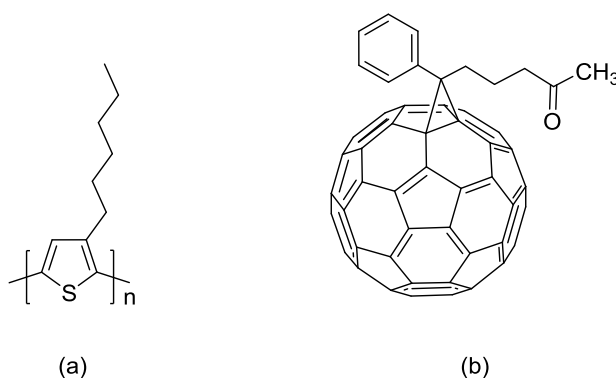


utilisés dans les cellules solaires polymères (PSC en anglais : polymer solar cells) à hétérojonction en vrac (BHJ en anglais : bulk heterojunction) (figures 8).



Figures 8 : Mécanisme de génération du photocourant dans une cellule solaire à hétérojonction en vrac<sup>14</sup>. a) Schéma des différents niveaux d'énergie : génération d'un exciton (1), diffusion de l'exciton (2), transferts de charge (3), transport des porteurs de charge et collecte. b) Schéma de la zone de contact polymère / fullerène.

En effet, ils ne maintiennent pas seulement les propriétés des fullerènes C<sub>60</sub> telles qu'une affinité et une mobilité électronique élevée mais aussi une solubilité modulable dans les solvants organiques. Ainsi, les cellules solaires composées d'un polymère conjugué, par exemple poly(3-hexylthiophène) (P3HT), et d'un dérivé fullerène constituent le dispositif de référence pour l'étude de nouveaux matériaux (Figures 9).



Figures 9 : (a) P3HT, (b) PCBM

Encouragée par les travaux de Hwang *et al.* sur l'effet isotopique cinétique du deutérium permettant d'augmenter la durée de vie des matériaux dans les OLED, l'équipe de

<sup>14</sup> Y. Zhou, M. Eck, M. Krüger, *Energy Environ. Sci.* **2010**, 3, 1851.

Yamamoto<sup>15</sup> est la première à étudier l'effet isotopique cinétique du deutérium sur les performances photovoltaïques des PSC. L'équipe montre alors que des cellules solaires à hétérojonction (BHJ), comportant P3HT en tant que donneur et un dérivé de fullerène monobenzylé deutéré (BnDC) en tant qu'accepteur, présentent des performances photovoltaïques plus élevées comparées aux dispositifs protonés correspondants (BnHC) et au dispositif de référence comportant PCBM (Figure 10).

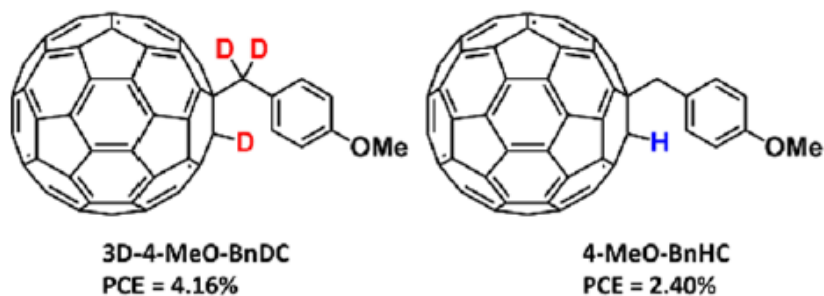


Figure 10 : Structures d'un BnDC et du BnHC protoné correspondant étudiés par l'équipe de Yamamoto.

En effet, le remplacement de protons par des deutériums modifie notablement le PCE qui passe de 2,40 % pour 4-MeO-BnHC à 4,16 % pour son dispositif deutéré correspondant 3D-4-MeO-BnDC. De plus, ce dispositif deutéré présente un PCE plus élevé que le dispositif de référence PCBM (PCE = 3,78 %). Ainsi, bien que de plus amples études soient nécessaires pour clarifier l'effet isotopique cinétique du deutérium, il est clair que le marquage au deutérium fournit une nouvelle approche pour améliorer les performances des cellules solaires polymères.

## I. A. 1. c) Deutérium en R&D du Médicament

I. A. 1. c) i- Étudier le devenir in vivo de molécules actives

Le développement d'une nouvelle entité chimique à visée thérapeutique (candidat-médicament) repose fondamentalement sur la caractérisation de son profil pharmacocinétique. Il a pour but d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration dans l'organisme et apporte les informations qui permettent de choisir la voie et la fréquence d'administration, ainsi que la forme galénique et la dose, pour son

<sup>15</sup> S. Lu, T. Jin, T. Yasuda, W. Si, K. Oniwa, K. a Alamry, S. a Kosa, A. M. Asiri, L. Han, Y. Yamamoto, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5674–5677.

utilisation future. La pharmacocinétique, parfois désignée sous l'abréviation « ADME », comprend quatre grandes étapes :

- L'**a**bsorption est caractérisée par la biodisponibilité du principe actif, qui est le pourcentage de molécule administrée atteignant effectivement la circulation générale (100 % pour la voie intraveineuse et de 5 % à 100 % pour la voie orale).
- La **d**istribution permet de calculer le volume de substance active qui, après s'être retrouvée dans le flux sanguin, passe les membranes biologiques et exerce un effet pharmacodynamique. Le volume restant peut se lier plus ou moins fortement, et de façon réversible, dans certains organes ou tissus.
- Le **m**étabolisme étudie la transformation du médicament par le système enzymatique de l'organisme, au niveau du foie en particulier, qui aboutit à des métabolites plus hydrophiles, ce qui permet d'éliminer plus facilement, par voie urinaire, le médicament. Les métabolites ainsi produits peuvent avoir : aucune activité, une activité pharmacologique (pro-drogue) ou une activité toxique avant élimination.
- L'**e**xcrétion se quantifie par le paramètre de clairance. Pour un organe, la clairance est définie comme le volume sanguin ou plasmatique totalement débarrassée de la substance par unité de temps (débit exprimé en mL/min).

Diverses études *in vitro* et *in vivo* sont conduites au cours du développement d'un médicament pour déterminer son profil pharmacocinétique. Certaines études sur les animaux et les humains utilisent des composés radiomarqués au tritium ( $^3\text{H}$  ou T), isotope radioactif de l'hydrogène, ou au carbone 14 ( $^{14}\text{C}$ ), isotope radioactif du carbone. Elles impliquent l'administration du médicament radiomarqué aux animaux de laboratoire et aux humains suivie par la collecte des excréments et du sang<sup>16</sup> (Figure 11).

---

<sup>16</sup> N. Penner, L. Xu, C. Prakash, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 513–531.

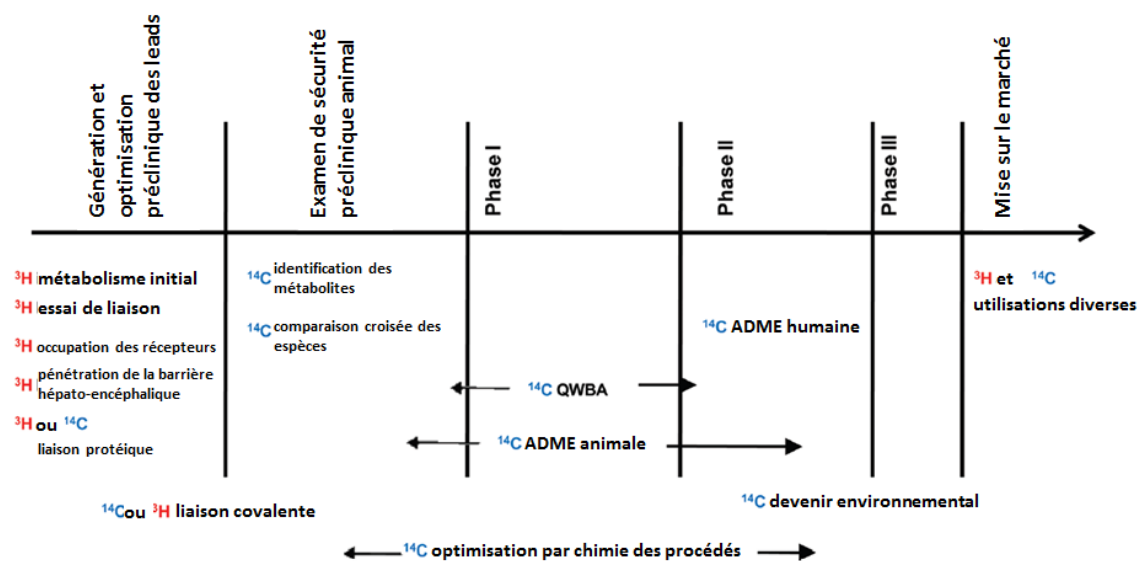


Figure 11 : Études pharmacocinétiques impliquant des candidats-médicaments radiomarqués  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$  (source : AstraZeneca<sup>17</sup>).

Le tritium ( $^3\text{H}$  ou T) est l'isotope radioactif de l'hydrogène (Tableau 2). Il possède un proton et deux neutrons, et a une masse atomique de 3,0160492 u. Il a été mis en évidence en 1934 par Ernest Rutherford (Prix Nobel de Chimie 1908)<sup>18</sup>. Il est relativement rare à l'état naturel (environ un atome de tritium pour  $10^{18}$  atomes d'hydrogène)<sup>19</sup>, mais il est émis dans l'environnement par l'industrie nucléaire, dans le fonctionnement normal des réacteurs nucléaires et lors du traitement des éléments combustibles. Dans les conditions normales de températures et de pression, le tritium existe à l'état diatomique ( $\text{T}_2$  gaz). Comme l'hydrogène, le tritium gazeux est difficile à stocker à température ambiante<sup>20</sup>.

Le deutérium peut être inséré dans une molécule cible ou un intermédiaire avancé dans la synthèse, par échange H/D, à l'aide de  $\text{D}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2$  gaz. Ainsi, l'échange H/D, en plus de permettre l'accès aux molécules deutérées, peut être aussi employé pour optimiser les synthèses de principes actifs tritiés.

<sup>17</sup> E. M. Isin, C. S. Elmore, G. N. Nilsson, R. A. Thompson, L. Weidolf, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 532–542.

<sup>18</sup> M. L. Oliphant, P. Harteck, E. Rutherford, *Nature* **1934**, 133, 413.

<sup>19</sup> Livre blanc du Tritium : Présentation du Tritium, www.asn.fr, Autorité de Sureté Nucléaire, **2010**, 6.

<sup>20</sup> The Merck Index, 11th edition, Merck & Co. Inc., Rahway R, NJ, USA, **1989**, 1535.

Demie-vie	12,32 ans ± 2 ans
Produit de désintégration	Hélium 3 ( <sup>3</sup> He)
Activité spécifique	3,560*10 <sup>14</sup> Bq/g ou 9621 Ci/g
Émission	Rayonnement β- d'énergie 5,7 keV Neutrino d'énergie 12,89 keV

Tableau 2 : Propriétés principales de l'isotope tritium.

### I. A. 1. c) ii- La métabolomique

En 1941, George Beadle et Edward Tatum proposent l'hypothèse « un gène – une enzyme » (« one gene – one enzyme » en anglais). Cette hypothèse repose sur leurs résultats expérimentaux montrant que des souches mutantes de champignon *Neurospora* sont incapables d'effectuer des réactions biochimiques spécifiques nécessaires à leur croissance, après exposition aux rayons X. En passant au crible différents composés dans le milieu de culture permettant la croissance des souches mutantes, Beadle et Tatum identifient les métabolites dont la biosynthèse a été affectée par la mutation génétique<sup>21</sup>. Ils confirment ainsi leur hypothèse selon laquelle chaque gène est responsable de la production d'une enzyme unique qui à son tour affecte une seule étape dans une voie métabolique et sont les premiers à relier génotype et phénotype à l'échelle moléculaire, ce qui leur a valu le Prix Nobel de Médecine en 1958. Les expériences de Métabolomique moderne sont similaires à celle de Beadle et Tatum car elles cherchent à faire le lien entre génotype et phénotype par criblage de métabolites (Figure 12).

<sup>21</sup> G. W. Beadle, E. L. Tatum, *Proc. Natl Acad. Sci.* **1941**, 27, 499–506.

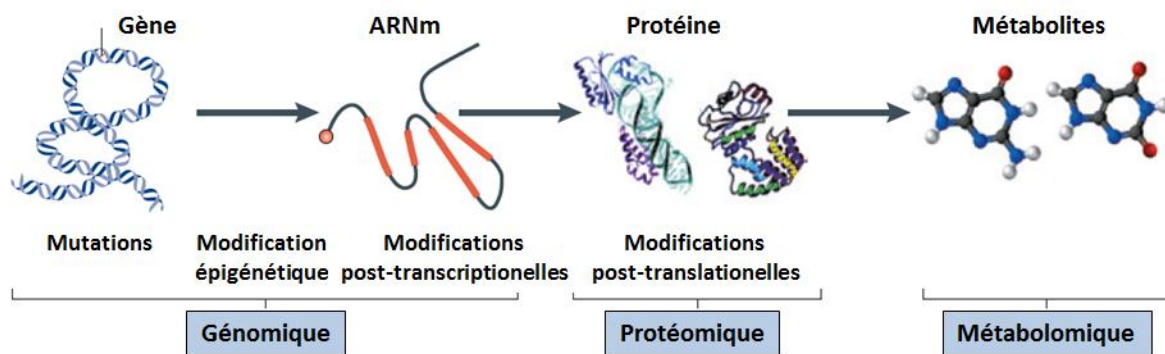


Figure 12 : Les approches « omiques »<sup>22</sup>

La Métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (de petites molécules telles que les sucres, les acides aminés ou les acides gras) présents dans un organe, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme. Il s'agit d'une étude dynamique : l'identité et la quantité des différents métabolites dépendent de nombreux facteurs tels que les nutriments disponibles, les stimuli environnementaux ou l'état physiologique. L'ensemble des métabolites est appelé métabolome. Les applications sont nombreuses dans différents secteurs d'activité comme la Santé, la Nutrition ou l'Agro-environnement. La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS) constitue l'outil le plus puissant pour identifier et quantifier ces métabolites : il est possible d'obtenir une quantification absolue à faibles concentrations, difficiles à détecter avec des méthodes moins sensibles telles que la RMN, et les quantités d'échantillon requises sont minimales (moins de 25 mg de tissus, environ 1 million de cellules ou 50  $\mu$ L de plasma ou d'urine).

Lorsque l'on conçoit une expérience de Métabolomique, la première étape consiste à déterminer le nombre de métabolites à mesurer. Dans certains cas, il peut être intéressant d'examiner un lot défini de métabolites en utilisant une approche ciblée. Dans d'autres cas, une approche non ciblée peut être choisie où autant de métabolites que possible sont mesurés et comparés entre les échantillons.

#### *Métabolomique ciblée*

Cette approche se réfère à une liste spécifiée de métabolites à mesurer, en se focalisant sur une ou plusieurs voies métaboliques d'intérêt proches. Elle est donc communément conduite pour répondre à une hypothèse de biochimie spécifique (Figure 13).

<sup>22</sup> G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 263–269.

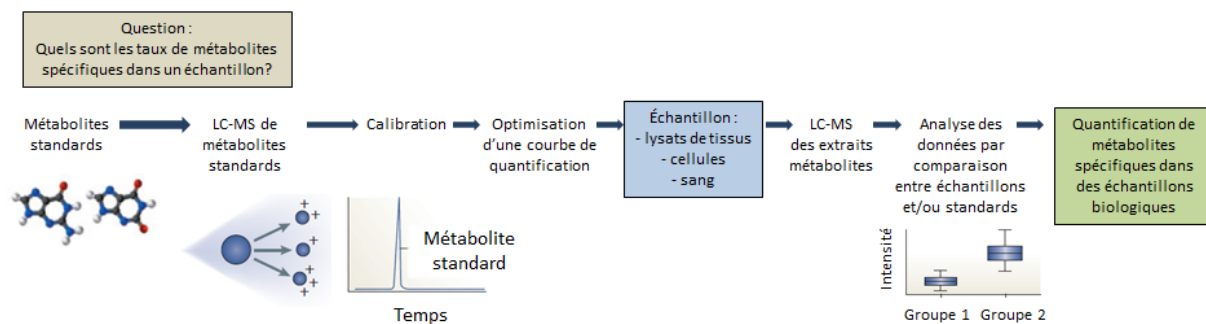


Figure 13 : Approche ciblée de Métabolomique basée sur la LC-MS<sup>23</sup>

Cette approche sensible, robuste et rapide peut être efficace pour des études pharmacocinétiques de métabolisme du médicament et pour la mesure de l'influence de modifications thérapeutiques ou génétiques sur une enzyme spécifique.

#### *Métabolomique non ciblée*

Cette approche a pour objectif de mesurer simultanément autant de métabolites que possible à partir d'échantillons biologiques sans calibrage préalable (Figure 14).

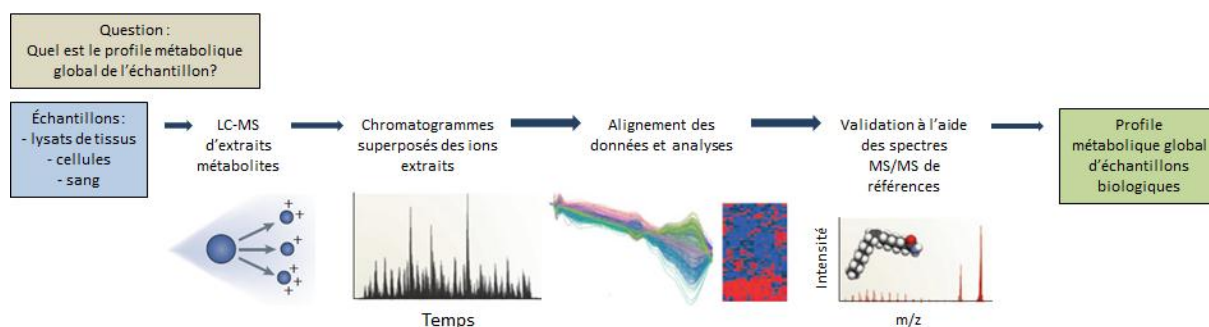


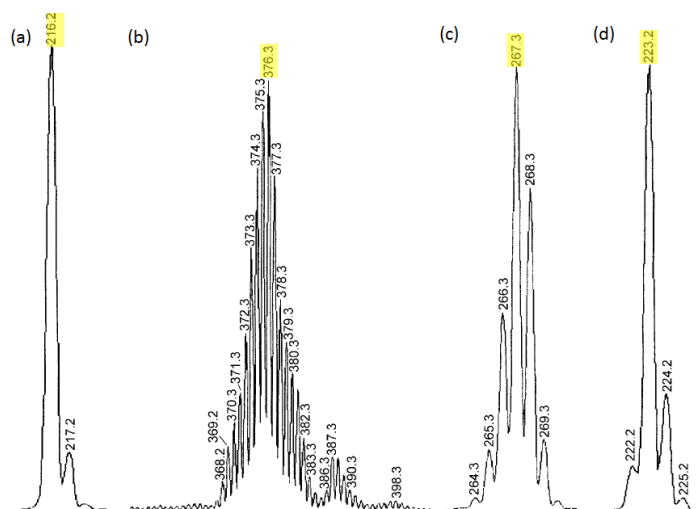
Figure 14 : Approche non ciblée de Métabolomique basée sur la LC-MS<sup>23</sup>

En routine, les analyses basées sur la LC-MS/MS permettent de détecter des milliers de pics dans un seul échantillon. Chacun de ces pics (ou ensemble de pics) correspondant à un ion détecté avec un rapport  $m/z$  et un temps de rétention uniques représente alors l'empreinte propre à un métabolite. Contrairement aux résultats de Métabolomique ciblée, les données recueillies par Métabolomique non ciblée sont extrêmement complexes, avec des tailles fichiers de l'ordre du gigabyte par échantillon. L'examen manuel de chacun des pics serait inenvisageable. Ces 10 dernières années, l'introduction de logiciels de Métabolomique a permis de surmonter ce problème.

<sup>23</sup> G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 263–269.

L'utilisation de standards internes (c'est-à-dire coélus avec l'échantillon) marqués isotopiquement est d'un avantage particulier dans la quantification de métabolites<sup>24,25</sup>. En effet, lors de l'analyse LC-MS/MS d'échantillons environnementaux, animaux et humains, des effets de matrice peuvent altérer l'ionisation de l'interface électrospray et donc interférer sur la précision des mesures<sup>26,27</sup>. Ces effets de matrice peuvent être évités grâce aux standards internes marqués isotopiquement car ils présentent généralement la même rétention et le même comportement lors de l'ionisation mais différent en termes de masse<sup>28</sup>. C'est cette différence de masse du standard interne marqué isotopiquement qui permet la détermination quantitative du composé « naturel ».

Une molécule est adaptée comme standard interne d'études LC-MS/MS si la part de molécule non marquée ( $M_0$ ) (Figure 15a) représente moins de 0,5 % et si elle présente une distribution isotopique étroite après échange H/D ainsi qu'un pic de masse représentatif, distinct du pic de masse de la molécule  $M_0$  (Figure 15d). Typiquement, pour les petites molécules sans chlore, brome ou soufre, une incorporation de trois à cinq deutériums est nécessaire.



Figures 15 : (a) Distribution isotopique naturelle en spectrométrie de masse d'un hydrocarbure, (b) distribution isotopique large après un échange H/D non-sélectif, (c) distribution isotopique modérément large avec un pic de masse représentatif, (d) distribution isotopique après un échange H/D hautement sélectif.

En appliquant cette approche au plasma humain, les métabolites ciblés peuvent être passés au crible comme signatures métaboliques potentielles de maladies. Récemment, ce type de

<sup>24</sup> C. Kao, R. W. Giese, *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 70–75.

<sup>25</sup> H. Wang, A. Hussain, J. S. Pyrek, J. Goodman, P. J. Wedlund, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 1063–1070.

<sup>26</sup> G. Tranfo, A. M. Cialdella, E. Paci, D. Pignini, *Prev. Today* **2007**, *3*, 57–64.

<sup>27</sup> . Wang, M. Cyronak, E. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 701–107.

<sup>28</sup> J. Atzrodt, V. Derau, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 674–685.



criblage a permis de mettre en évidence que les métabolites dérivés d'acide citrique et qu'un groupe de 5 aminoacides essentiels (isoleucine, phenylalanine, tyrosine, leucine et valine) étaient respectivement des signatures métaboliques précoces d'ischémie myocardique<sup>29</sup> et de diabète<sup>30</sup>.

#### I. A. 1. b) iii- « Leaving the label in the drug »

Les compagnies pharmaceutiques commencent à parier sur l'emploi du deutérium : en échangeant simplement certains atomes d'hydrogène par des atomes de deutérium, sur des principes actifs dont l'activité pharmacologique a déjà été établie, elles obtiendraient de nouveaux médicaments avec une sécurité clinique, une tolérance et une efficacité renforcées<sup>31</sup>. Dans la plupart des cas, le but est d'augmenter la demi-vie du médicament. En effet, un médicament qui reste plus longtemps dans l'organisme permet de diminuer la fréquence et le volume des doses. Il y a alors moins d'effets secondaires et moins de risque pour le patient d'oublier son traitement voire de l'abandonner. La confiance du patient est améliorée, et indirectement, l'efficacité et la sécurité<sup>32</sup>.

Le corps humain adulte contient approximativement 2 grammes de deutérium. En général, le deutérium présente une très faible toxicité. Il a été démontré, par exemple, qu'un taux de 15 à 23 % de deutérium dans le plasma du corps humain n'entraînait pas d'effets secondaires<sup>33</sup>. De plus, l'eau lourde (ou eau deutérée) est excrétée par les reins avec une demie-vie de dix jours. Le nuage électronique des atomes qui composent une molécule définissent la forme de la molécule. L'hydrogène et le deutérium possédant chacun un électron, les composés deutérés présentent donc la même forme et la même taille que leurs analogues hydrogénés. Par contre, des variations des propriétés physiques peuvent être observées dans les composés deutérés tels qu'une hydrophobicité réduite et un pKa modifiés quand le deutérium est adjacent à un groupe ionisable. Les liaisons carbone-deutérium étant généralement six à dix fois plus stables que les liaisons carbone-hydrogène correspondantes, elles se rompent plus difficilement et donc plus lentement. On parle alors d'effet cinétique isotopique du deutérium. En théorie, cet effet modifie le devenir *in vivo* des médicaments lorsque leur métabolisation

---

<sup>29</sup> M. S. Sabatine, E. Liu, D. A. Morrow, E. Heller, R. McCarroll, R. Wiegand, G. F. Berriz, F. P. Roth, R. E. Gerszten, *Circulation* **2005**, *112*, 3868–3875.

<sup>30</sup> T. J. Wang, M. G. Larson, R. S. Vasan, S. Cheng, E. P. Rhee, E. McCabe, G. D. Lewis, C. S. Fox, P. F. Jacques, C. Fernandez, *et al.*, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 448–454.

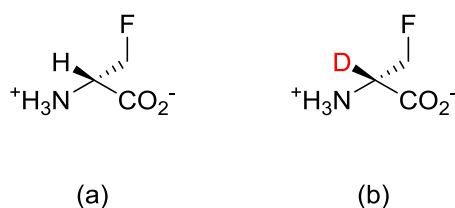
<sup>31</sup> K. Sanderson, *Nature* **2009**, *458*, 269.

<sup>32</sup> T. G. Gant, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3595–3611.

<sup>33</sup> N. Blagojevic, G. Storr, B. J. Allen, H. Hatanaka, H. Nakagawa, Role of heavy water in boron neutron capture therapy. *Topics in Dosimetry & Treatment Planning for Neutron Capture Therapy*, **1994**, 125-134.

par l'organisme implique la rupture de liaisons C-H. En pratique, dans les systèmes biologiques, de nombreux autres mécanismes masquent l'effet isotopique du deutérium. Ainsi, l'effet de la deutération sur la métabolisation du médicament peut être faible voire indétectable. L'amplitude et même la direction de ces effets isotopiques cinétiques sont imprévisibles et dépendent de la structure de molécule.

Dans la littérature, on retrouve peu de composés deutérés étudiés en tant que nouveaux médicaments. La Fludalanine (2-<sup>2</sup>H-3-fluoro-D-alanine), développée par Merck dans les années 80, est l'exemple le plus étudié (Figures 16). Son analogue hydrogéné est très efficace en tant qu'agent anti-infectieux, mais des études précliniques ont montré qu'il est métabolisé pour former le 3-fluorolactate, une toxine causant la formation de vacuoles dans le cerveau. Combinée avec la cyclosérine, la Fludalanine présente une forte activité antibactérienne et induit une production en 3-fluorolactate réduite à un taux acceptable pour la santé. De plus, il a été démontré sur un modèle primate, que la Fludalanine présente une clairance *in vivo* 2,5 fois plus faible que celle de son analogue hydrogéné. Cependant, malgré ces propriétés prometteuses, les études sur la Fludalanine ont été interrompues en Phase IIb.



Figures 16 : (a) 3-fluoro-D-alanine, (b) 2-<sup>2</sup>H-3-fluoro-D-alanine.

Ces dix dernières années, après la preuve de concept de Merck sur le primate, diverses compagnies de biotechnologie se sont spécialisées dans le développement de médicaments deutérés. Certains sont parvenus jusqu'à l'évaluation clinique. Concert Pharmaceuticals a présenté des résultats de Phase I sur CTP-347, un analogue deutéré de la paroxétine, pour le traitement des bouffées de chaleur (Figure 17). Une faible dose de paroxétine est déjà efficace pour traiter ce problème mais son utilisation peut être compliquée voire contre-indiquée pour les patientes post-ménopausées ou atteintes de cancer, car il pourrait provoquer des interactions néfastes avec les autres médicaments. En effet, un métabolite très réactif de la paroxétine peut se lier de façon covalente au site actif de CYP2D6, une enzyme hépatique. Une fois le complexe formé, CYP2D6 est inactivé de manière irréversible. Des expériences *in vitro* ont montré qu'avec CTP-347 l'inactivation n'avait pas lieu ou très peu. L'étude sur 96

patients comparant les effets entre la paroxétine et CTP-347 sur CYP2D6 ont permis de confirmer ces résultats.

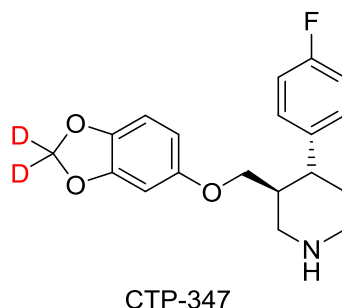


Figure 17 : Structure du principe actif CTP-347, analogue deutéré de la paroxétine.

D'autres compagnies de biotechnologie comme Auspex Pharmaceuticals ou Beroline innovative Research and Development Services Pharma (BiRDS Pharma) développent également leurs analogues deutérés de principes actifs dans les domaines de l'oncologie, des maladies cardiovasculaires ou de l'inflammation.

## I. A. 2. Méthodes d'échange classiques

Les méthodes connues pour l'échange H/D sont divisées en 2 classes :

- L'échange H/D pH-dépendant
- L'échange H/D catalysé par les métaux de transition (homogène ou hétérogène).

### I. A. 2. a) Échanges H/D pH-dépendants

Les réactions d'échange H/D qui sont pH-dépendantes comptent parmi les plus anciennes méthodes utilisées. D'un point de vue mécanistique, l'énolisation catalysée par un acide ou une base constitue le fondement de ces réactions. C'est la raison pour laquelle l'échange H/D sur des positions activées peut être réalisé en utilisant des acides et des bases de Brønsted deutérés.

I. A. 2. a) i- Échanges H/D sans ajout d'acide ou base

Les réactions d'échange H/D sans ajout d'acides ou de bases sont caractérisées par la deutération d'une position C-H acide par simple utilisation d'eau lourde qui, grâce à la

réaction d'autoprotolyse<sup>34</sup>, peut agir en tant qu'acide ou en tant que base. Par exemple, un haut enrichissement en deutérium est obtenu pour la [1,1,3,3-D<sub>4</sub>]2-indanone par chauffages répétés dans D<sub>2</sub>O<sup>35</sup> (Figure 18).

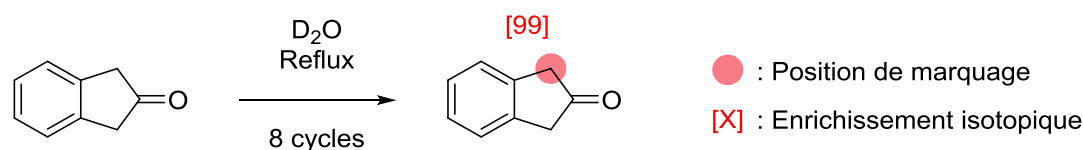
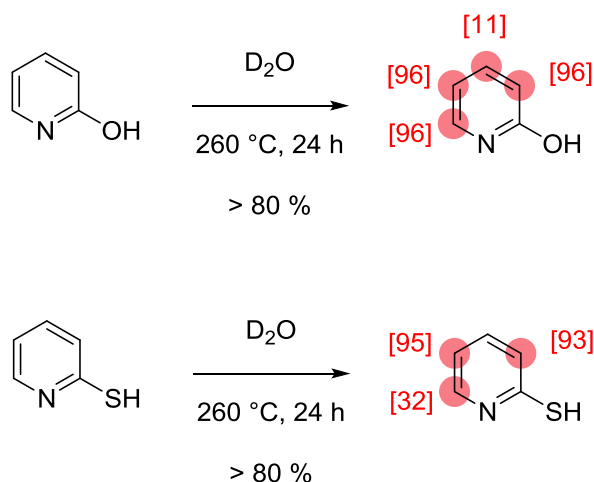


Figure 18 : Échange H/D de la 2-indanone dans D<sub>2</sub>O.

Dans d'autres cas, l'échange H/D est réalisé sous des conditions drastiques avec une bonne sélectivité. Par exemple, Werstiuk et Ju incorporent plusieurs atomes de deutérium dans des dérivés de la pyridine, dans D<sub>2</sub>O à 260 °C, sur les positions C3, C5 et C6 préférentiellement<sup>36</sup> (Figures 19).



Figures 19 : Échange H/D de dérivés de la pyridine dans D<sub>2</sub>O.

Une autre méthode consiste à réaliser l'échange H/D en milieu supercritique. Junk et Catallo montre que différents arènes sont totalement deutérés dans D<sub>2</sub>O, en autoclave, à 380-430 °C. Ainsi, un enrichissement presque complet est atteint sur le phénanthrène (> 98 % D)<sup>37</sup> (Figure 20). Dans la plupart des cas, la réaction est répétée à plusieurs reprises. Mais si cette méthode donne de bons résultats pour certains substrats (1-méthylnaphtalène, *n*-butylbenzène ou

<sup>34</sup> Réaction de transfert de proton entre 2 molécules identiques, l'une jouant le rôle d'acide de Brønsted et l'autre celui de base.

<sup>35</sup> U. Edlund, G. Bergson, *Acta Chem. Scand.* **1971**, 25, 3625–3633.

<sup>36</sup> N. H. Werstiuk, C. Ju, *Can. J. Chem* **1989**, 67, 5–10.

<sup>37</sup> T. Junk, J. W. Catallo, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3445–3448.

aniline), elle conduit à la décomposition d'autres substrats (benzothiazole, azobenzène ou acide phénylacétique).

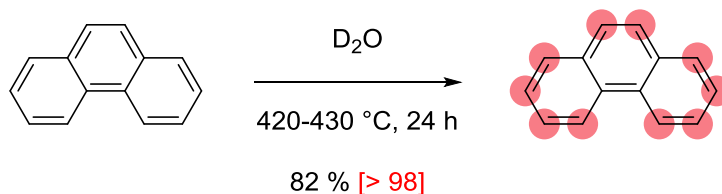


Figure 20 : Échange H/D du phénanthrène en conditions supercritiques.

Plus récemment, l'emploi des micro-ondes a permis certaines avancées. En effet, comparées aux deutérations obtenues sous conditions de chauffage conventionnelles, des deutérations comparables voire meilleures peuvent être atteintes, dans des temps de réactions plus courts grâce aux micro-ondes. Par exemple, divers standards du glycopeptide bléomycine A<sub>2</sub> pour la spectrométrie de masse peuvent être préparés en deux minutes, dans D<sub>2</sub>O, à 165 °C<sup>38</sup>.

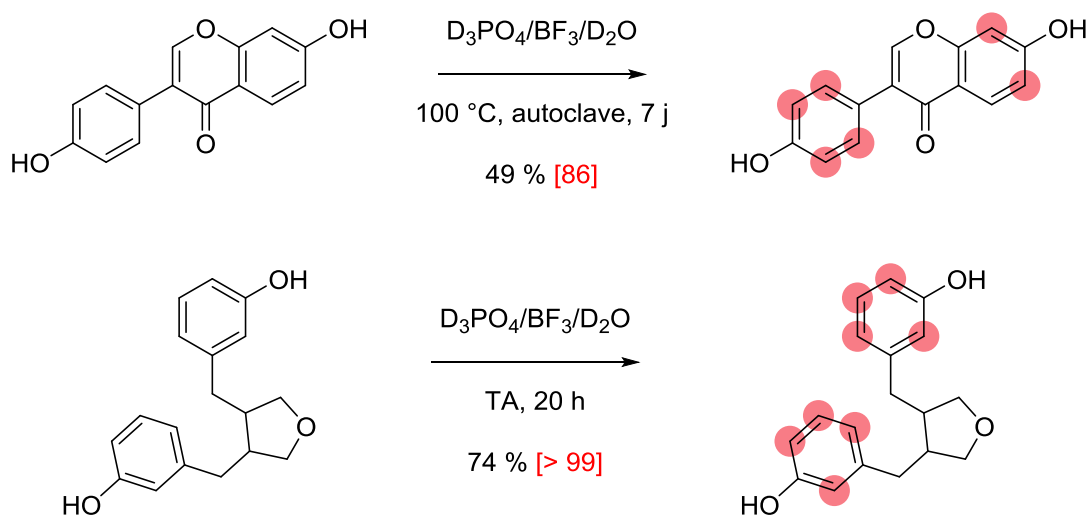
#### I. A. 2. a) ii- Échanges H/D catalysés par l'ajout d'acide

Les acides de Brønsted deutérés forts ou les acides de Lewis, combinés à une source de deutérium, permettent l'incorporation de deutériums dans des composés aromatiques. L'équipe de Wähälä étudie, à partir de 1997, la deutération de substrats polyphénoliques tels que des flavonoïdes, des isoflavonoïdes et des lignanes, dans des mélanges de D<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub> et de D<sub>2</sub>O<sup>39</sup>. Dans le cas de la daidzéine, sous conditions drastiques à 100 °C, en autoclave, la plupart des positions aromatiques sont deutérées. Concernant l'entérolactone, l'échange complet des protons aromatiques est observé (> 99 % D) avec un bon rendement à température ambiante. Par contre, aucun échange n'est observé en positions aliphatiques<sup>40</sup> (Figures 21).

<sup>38</sup> S. A. de Keczer, T. S. Lane, M. R. Masjedizadeh, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 733–740.

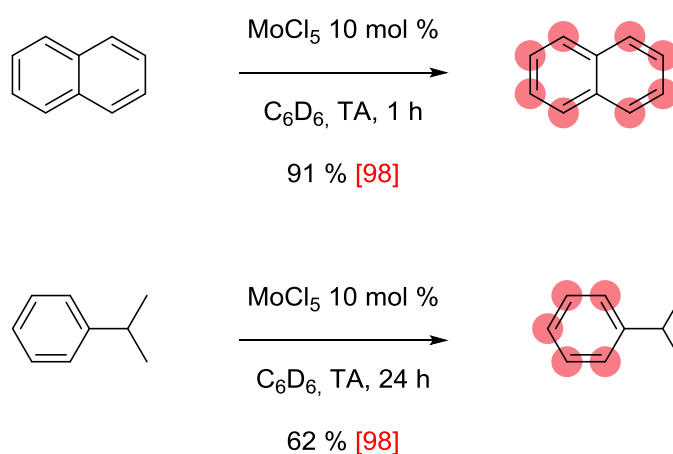
<sup>39</sup> K. Wähälä, S. Rasku, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7287–7290.

<sup>40</sup> E. Leppälä, K. Wähälä, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 25–30.



Figures 21 : Échange H/D de la daidzéine et de l'entérolactone.

Les réactions d'échange H/D en présence d'acides de Lewis tels que  $\text{AlBr}_3$ ,  $\text{EtAlCl}_2$  ou  $\text{MoCl}_5$  sont, quant à elles, restreintes aux arènes non polaires, comme le naphthalène ou l'isopropylbenzène<sup>41</sup>. Dans le benzène deutéré ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ), l'échange est complet sur toutes leurs positions hydrogénées aromatiques, mais il est impossible sur d'autres arènes tels que le phénol, l'anisole, l'aniline, le benzaldéhyde ou l'acide benzoïque<sup>42</sup> (Figures 22).



Figures 22 : Échanges H/D d'arènes non-polaires catalysés par un acide Lewis.

En 2000, l'équipe de Lämmerhofer étudie la deutération en milieu acide sur des  $\alpha$ -aminoacides (alanine, leucine et phénylalanine)<sup>43</sup>. Avec un excès d'acide acétique deutéré et d'aldéhyde en quantité catalytique, un enrichissement isotopique supérieur à 95 % est observé, via la base de Schiff correspondante. Après conversion en dérivés protégés *tert*-

<sup>41</sup> J. L. Garnett, M. A. Long, R. F. W. Vining, T. Mole, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5913–5914.

<sup>42</sup> Q.-X. Guo, B.-J. Shen, H.-Q. Guo, T. Takahashi, *Chinese J. Chem.* **2005**, *23*, 341–344.

<sup>43</sup> J. Atzrodt, V. Derdau, T. Fey, J. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7744–7765.

butoxycarbonyl (Boc), les énantiomères obtenus sont séparés par HPLC préparative chirale (Figure 23).

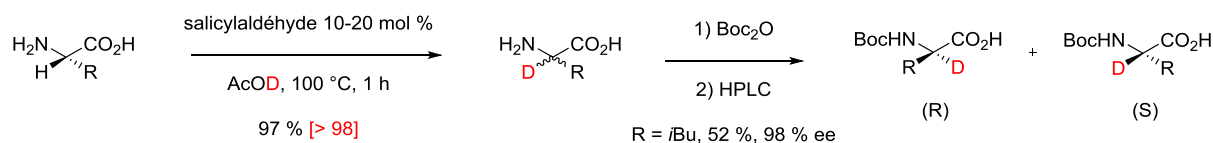


Figure 23 : Deutération en milieu acide d' $\alpha$ -aminoacides.

I. A. 2. a) iii- Échanges H/D catalysés par l'ajout de base

Les réactions d'échange H/D avec ajout de base constituent également une méthode utile pour la deutération à la place d'atomes d'hydrogène acides, tirant partie de l'équilibre céto-énolique. C'est le cas pour les composés carbonylés (cétones, aldéhydes, esters et acides carboxyliques), mais aussi pour les cétones  $\alpha,\beta$ -insaturées, dans  $\text{D}_2\text{O}$  avec un deuteroxyde alcalin<sup>44</sup> (Figure 24).

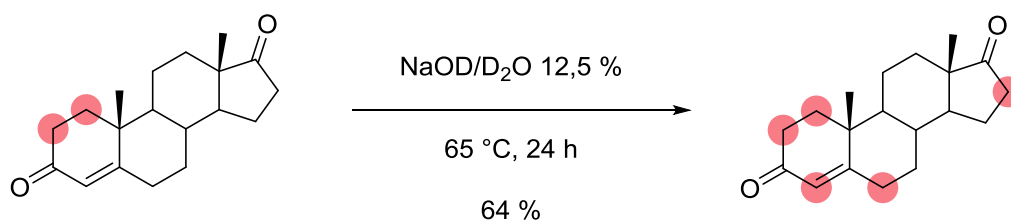


Figure 24 : Deutération en milieu basique de l'androstènedione.

Les méthodes en milieu basique, pour la synthèse d'acides aminés  $\alpha$ -deutérés énantiomériquement purs, utilisent souvent de la glycine ou des dérivés. À la suite de la réaction d'échange H/D, la chaîne latérale désirée est insérée sélectivement à l'aide d'un auxiliaire chiral. En se basant sur la méthode à l'éther de bislactim de Schöllkopf<sup>45</sup>, l'équipe de Gani développe une deutération de la position C6 de la dihydropyrazine dans un mélange  $\text{MeOD}/\text{D}_2\text{O}$  à reflux. Aucun échange H/D n'est alors observé sur la position C3 à cause de l'encombrement stérique du groupement isopropyl. L'intermédiaire deutéré obtenu est ensuite alkylé stéréosélectivement en position C6, ce qui donne accès à une série d'acides aminés  $\alpha$ -

<sup>44</sup> T. Furuta, A. Suzuki, M. Matsuzawa, H. Shibasaki, Y. Kasuya, *Steroids* **2003**, *68*, 693–703.

<sup>45</sup> B. U. Schöllkopf, W. Hartwig, U. Groth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1979**, *18*, 863–864.

deutérés (sérine, phénylalanine, allylglycine, acide aspartique) avec des rendements modérés à bons et des excès énantiomériques élevés (> 95 %) <sup>46</sup> (Figure 25).

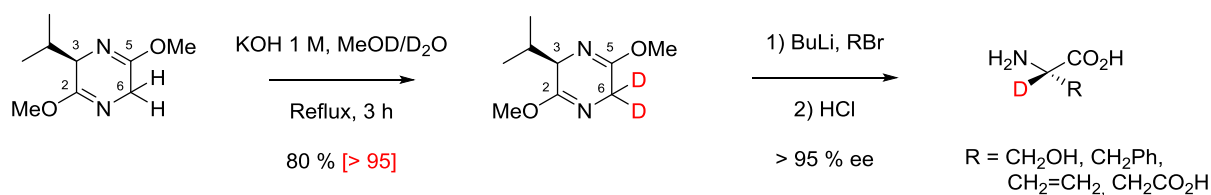


Figure 25 : Synthèse d'acides α-deutérés à l'aide de l'éther de bislactim de Schöllkopf.

Grâce aux recherches intensives sur la lithiation sélective de composés organiques, les deutérations diastéréosélectives et énantiosélectives sont aussi possibles par échange Li/D. En 1993, l'équipe de Hoppe réussit une deutération énantiosélective (> 99 % D) par lithiation en présence de spartéine. L'effet isotopique cinétique du deutérium joue ensuite un rôle important puisqu'il permet la formation d'un dérivé énantiomériquement pur (> 95 %) par déprotonation puis silylation <sup>47</sup> (Figure 26).

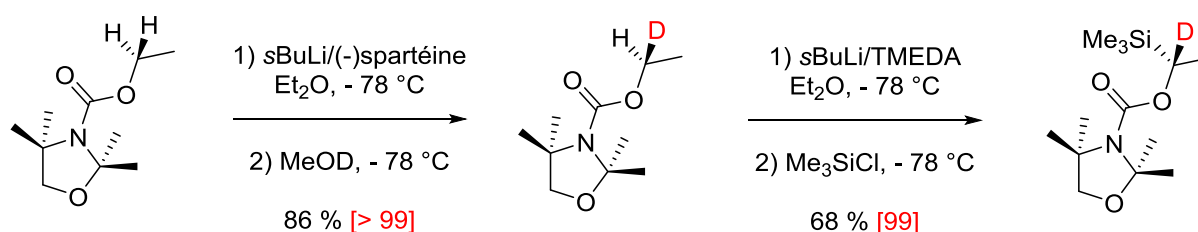


Figure 26 : Échange H/D énantiosélectif selon Hoppe *et al.* TMEDA : N,N,N',N'-tetraméthylethylènediamine.

## I. A. 2. b) Échanges H/D par catalyse métallique homogène

Les réactions d'échange H/D catalysées par des complexes de métaux de transition solubles offrent de nombreux avantages par rapport aux autres méthodologies : les conditions de réaction sont plutôt douces et permettent une grande tolérance envers des groupements fonctionnels sensibles à la déhalogénéation, l'hydrolyse ou l'épimérisation. L'incorporation de deutérium et la régiosélectivité sont élevées. Certaines réactions peuvent être adaptées à la tritiation.

<sup>46</sup> J. E. Rose, P. D. Leeson, D. Gani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1995**, 157–165.

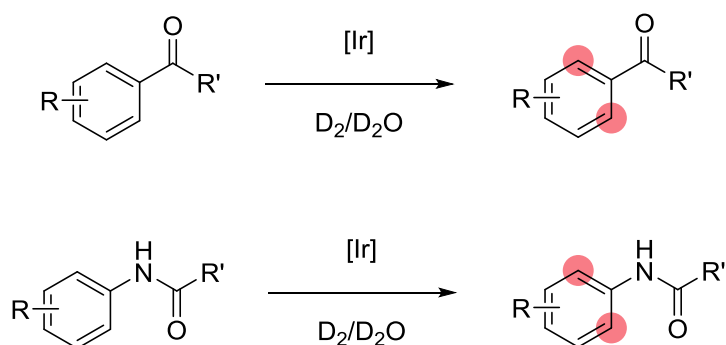
<sup>47</sup> D. Hoppe, M. Paetow, F. Hintze, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 394–396.



## I. A. 2. b) i- Échanges H/D catalysés par des complexes d'iridium

Depuis les premiers travaux des équipes de Garnett<sup>48,49</sup> et Shilov<sup>50</sup> au début des années 1970, de nombreuses méthodes ont été développées pour l'échange H/D, en catalyse homogène, sur des substrats aromatiques et aliphatiques.

Dans ce domaine, les méthodes utilisant des complexes cationiques d'iridium sont, de loin, les plus répandues. La deutération la plus étudiée est l'*ortho*-deutération de cétones aryliques et d'acétanilides (Figures 27).



Figures 27 : *ortho*-deutération catalysée à l'iridium de cétones aryliques et acétanilides.

Suite aux travaux des équipes de Heys<sup>51</sup>, Hesk<sup>52</sup>, et Crabtree<sup>53</sup> un mécanisme avec un complexe d'iridium III comme intermédiaire central a pu être proposé pour expliquer la régiosélectivité en position *ortho* : après coordination du substrat au catalyseur cationique d'iridium I, l'addition oxydante conduit à la formation d'un métallacycle à cinq chaînons suivie de l'étape d'échange H/D et de l'élimination réductrice. Dans le cas des acétanilides, l'addition oxydante conduit à la formation d'un métallacycle à six chaînons, dû à la présence de l'azote supplémentaire (Figure 28).

<sup>48</sup> J. L. Garnett, R. J. Hodges, *Chem. Commun.* **1967**, 1001–1003.

<sup>49</sup> J. L. Garnett, R. J. Hodges, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4546–4547.

<sup>50</sup> A. E. Shilov, G. B. Shul, *Chem. Rev.* **1997**, 2665, 2879.

<sup>51</sup> J. R. Heys, A. Y. L. Shu, S. G. Senderoff, N. M. Phillips, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1993**, 33, 431–438.

<sup>52</sup> D. Hesk, P. R. Das, B. Evans, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1995**, 36, 497–502.

<sup>53</sup> R. Crabtree, *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 331–337.

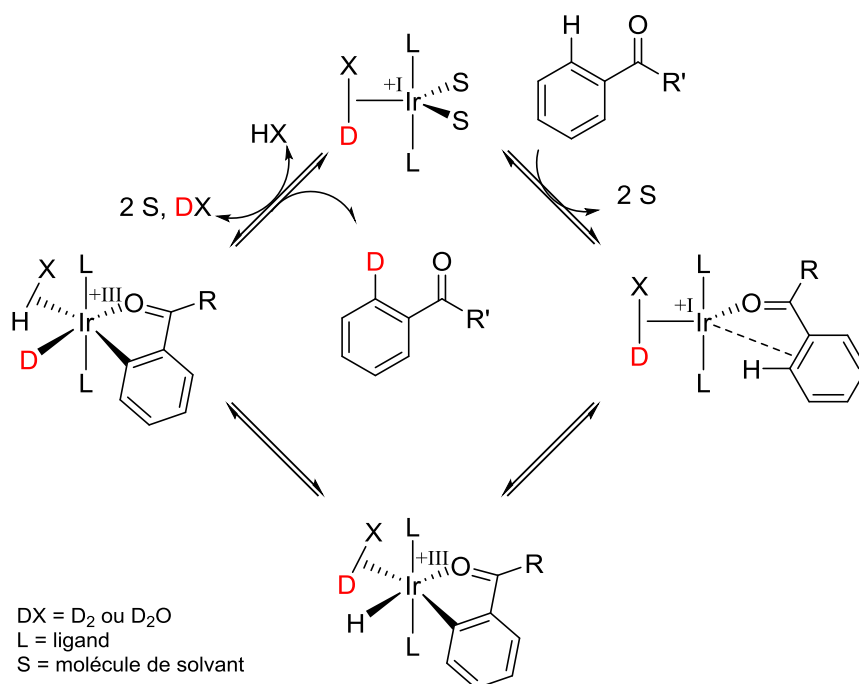


Figure 28 : Mécanisme proposé de l'*ortho*-deutération de cétones aryliques.

Depuis les années 2000, la gamme de substrats deutérés par des catalyseurs d'iridium homogènes s'est étendue aux acides carboxyliques aromatiques et  $\alpha,\beta$ -insaturés<sup>54</sup>, anilines et benzylamines<sup>55</sup>, alcools<sup>56</sup> et éthers aliphatiques<sup>57</sup>. Récemment, l'équipe de Kerr a montré qu'en intégrant un ligand carbène N-hétérocyclique avec différents ligands phosphines, une série de catalyseurs à base d'iridium hautement sélectifs était obtenue et pouvait servir pour le marquage au deutérium et au tritium de composés complexes tels que des principes actifs<sup>58,59</sup> (Figure 29).

<sup>54</sup> J. Krüger, B. Manmontri, G. Fels, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2005, 1402–1408.

<sup>55</sup> M. J. Hickey, J. R. Jones, L. P. Kingston, W. J. S. Lockley, A. N. Mather, B. M. Mcauley, D. J. Wilkinson, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3959–3961.

<sup>56</sup> S. R. Klei, J. T. Golden, T. D. Tilley, R. G. Bergman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2092–2093.

<sup>57</sup> R. Corbera, M. Sanau, E. Peris, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3974–3979.

<sup>58</sup> J. a. Brown, A. R. Cochrane, S. Irvine, W. J. Kerr, B. Mondal, J. a. Parkinson, L. C. Paterson, M. Reid, T. Tuttle, S. Andersson, et al., *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 3551–3562.

<sup>59</sup> W. J. Kerr, R. J. Mudd, L. C. Paterson, J. a Brown, *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 14604–14607.

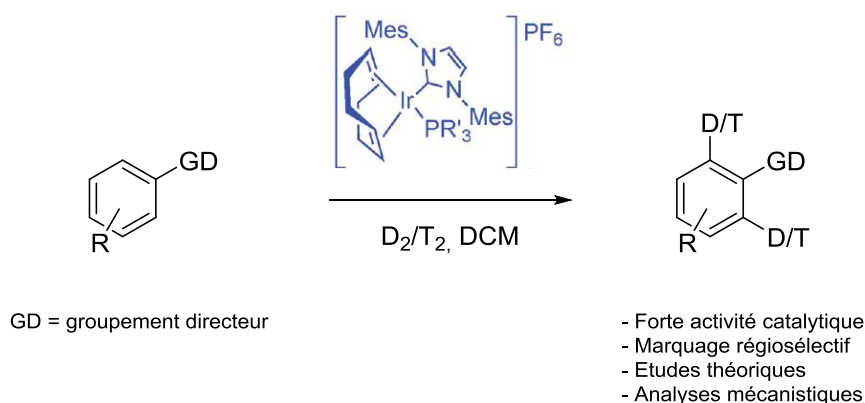


Figure 29 : Application de complexes d'iridium (I) à l'échange isotopique catalytique.

### I. A. 2. b) ii- Échanges H/D catalysés par d'autres métaux de transition

L'équipe de Garnett a également travaillé sur l'échange H/D en utilisant d'autres métaux de transition tels que le platine<sup>60</sup> et le rhodium<sup>61</sup>. Dans le cas du platine, ce sont les sels de tetrachloridoplatinate(II) tel que  $\text{Na}_2[\text{PtCl}_4]$  qui sont le plus souvent employés pour la deutération d'arènes. Les réactions ont lieu dans un mélange  $\text{D}_2\text{O}/\text{AcOD}$ , qui joue à la fois le rôle de source de deutérium et de solvant, entre 80 et 130 °C. L'activité et la stabilité pH-dépendantes du complexe catalyseur nécessitent des conditions de réaction acides. Mais l'emploi de l'irradiation micro-onde permet de réduire le temps de réaction et même de réaliser la deutération sans acide.

Récemment, les catalyseurs homogènes à base de ruthénium ont également été étudiés. En 2005, l'équipe de Matsubara démontre, à l'aide du complexe  $\text{Ru}_2\text{Cl}_2(\text{PPh}_3)_2$  dans  $\text{D}_2\text{O}$ , que des alcools primaires et des amines peuvent être deutérés en moins d'une heure<sup>62,63</sup>. Dans le cas de l'alcool primaire, la configuration du carbone en position  $\beta$  n'est pas affectée tant que la température ne dépasse pas 100 °C (Figure 30).

<sup>60</sup> J. L. Garnett, J. H. O'Keefe, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **1975**, *11*, 201–222.

<sup>61</sup> B. Michael, R. Blake, J. L. Garnett, I. A. N. K. Gregor, K. I. M. Hoa, A. Long, S. Wales, *Chem. Commun.* **1975**, 930–932.

<sup>62</sup> K. Ishibashi, M. Takahashi, Y. Yokota, K. Oshima, S. Matsubara, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 664–665.

<sup>63</sup> M. Takahashi, K. Oshima, S. Matsubara, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 192–193.

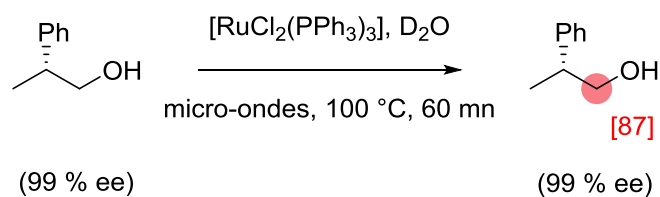


Figure 30 :  $\alpha$ -deutération d'un alcool primaire selon l'équipe de Matsubara.

### I. A. 2. c) Échanges H/D par catalyse métallique hétérogène

L'avantage de la catalyse hétérogène, par rapport à la catalyse homogène, est la possibilité d'éliminer le catalyseur par simple filtration à la fin de la réaction. Cependant, des produits de déhalogénéation, hydrogénation ou hydrolyse peuvent être obtenus et l'épimérisation ou la racémisation peuvent être observées. L'optimisation des conditions de réaction est donc inévitable pour chaque type de substrat. Les catalyseurs au palladium, platine, rhodium, nickel, cuivre et cobalt sont adaptés pour l'échange H/D en catalyse hétérogène.

Constatant, que la réaction d'échange avait principalement lieu sur des substrats contenant des doubles liaisons ou des cycles aromatiques, l'équipe de Garnett a proposé un mécanisme impliquant un complexe  $\pi$ . Des études cinétiques montrent qu'en plus d'un mécanisme d'association, un mécanisme de dissociation a lieu. Au cours du mécanisme d'association **I**, l'atome d'hydrogène est directement substitué par un atome de deutérium lié au métal. Au cours du mécanisme dissociatif **II**, un proton du complexe  $\pi$  est substitué par le métal, formant ainsi un intermédiaire radical phényle sur lequel le métal est substitué par un atome de deutérium. Selon le métal de transition utilisé, chaque mécanisme est plus ou moins favorisé : pour le palladium, c'est le mécanisme d'association qui prédomine et pour le rhodium, les deux mécanismes sont impliqués (Figure 31).

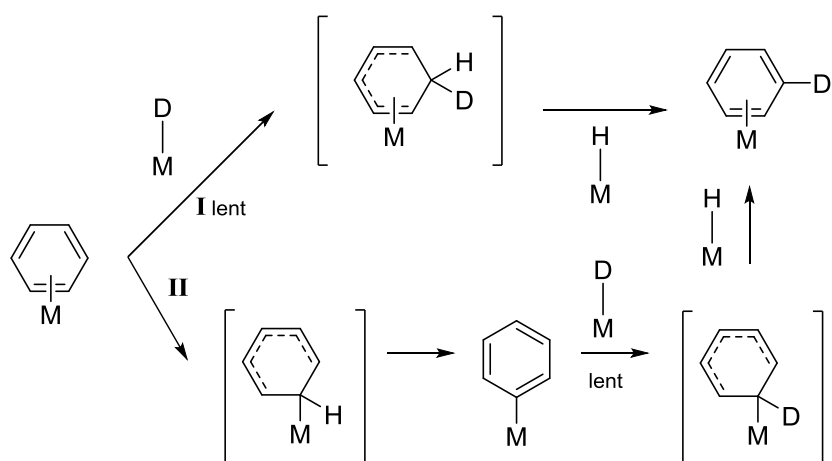


Figure 31 : Mécanisme d'association **I** et de dissociation **II** de l'échange H/D hétérogène de substrats aromatiques<sup>64</sup>.

### I. A. 2. c) i- Échanges H/D hétérogènes catalysés par du palladium

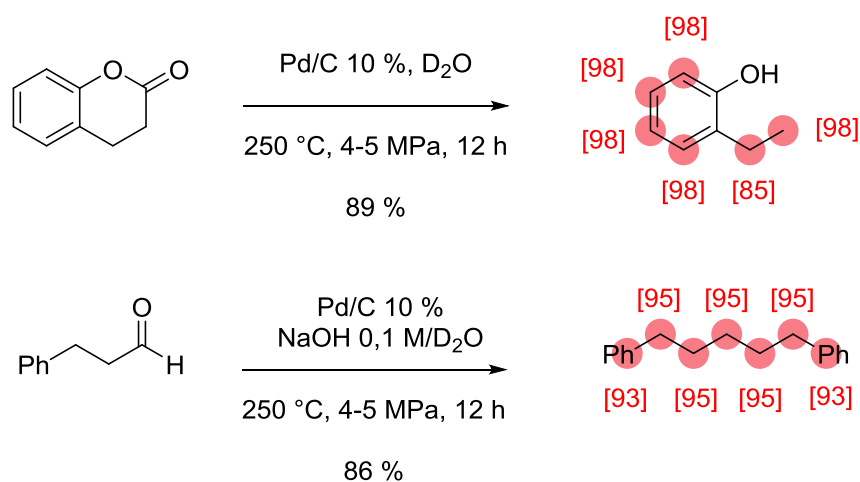
Pour les deutérations en catalyse hétérogène, le palladium est très souvent employé avec du D<sub>2</sub> gaz. Dans la méthode développée par l'équipe d'Azran<sup>65</sup>, la surface du catalyseur Pd/C 10 % est libérée de ces hydrogènes et composés protiques par purges répétées avec D<sub>2</sub> gaz, avant d'être utilisé pour la deutération du bibenzyle. Les atomes d'hydrogène bibenzyliques sont substitués sélectivement en une heure, à température ambiante.

Selon l'équipe de Matsubara, des hydrocarbures aromatiques ou aliphatiques peuvent être obtenus deutérés après décarboxylation ou décarbonylation dans D<sub>2</sub>O. Ici, les conditions de réaction sont très dures puisque la deutération a lieu à 250 °C, sous 4 à 5 MPa. Par exemple, un dérivé phénol est obtenu après réaction d'une lactone dans D<sub>2</sub>O<sup>66</sup>. En présence de base, l'aldéhyde hydrocinnamique réagit sur lui-même pour former, par aldolisation, un intermédiaire énal qui est converti en diphenylpentane deutéré via réduction et décarbonylation dans D<sub>2</sub>O, en présence de Pd/C (Figures 32).

<sup>64</sup> J. L. Garnett, W. A. Sollich-Baumgartner, *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 3177–3183.

<sup>65</sup> J. Azran, M. Shimoni, O. Buchman, *J. Catal.* **1994**, 148, 648–653.

<sup>66</sup> S. Matsubara, Y. Yokota, K. Oshima, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2071–2073.

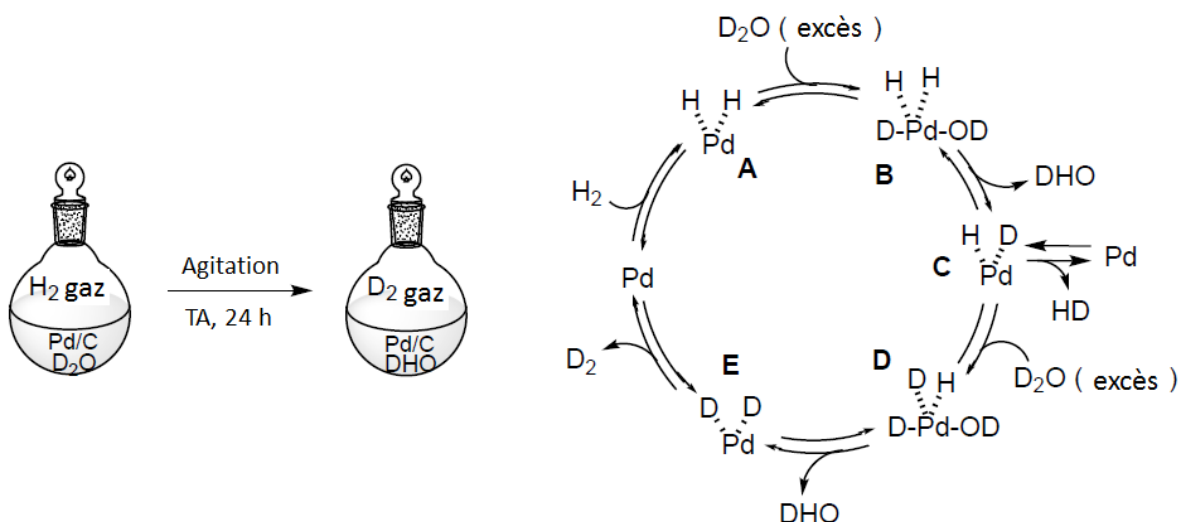


Figures 32 : Deutération d'une lactone et d'un aldéhyde sous conditions hydrothermiques.

Dans les années 1960, l'équipe de Garnett observe que les réactions de deutération sont effectives sous des conditions douces (30 à 120 °C, pression atmosphérique, D<sub>2</sub>O) lorsque le catalyseur (PtO<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) est préalablement réduit avec de l'hydrogène (H<sub>2</sub> gaz)<sup>67</sup>. Au début des années 2000, l'équipe de Sajiki reprend ces travaux et développe une méthode de deutération catalysée au Pd/C, sous atmosphère d'hydrogène (H<sub>2</sub> gaz), dans D<sub>2</sub>O. En effet, H<sub>2</sub> gaz dissout dans D<sub>2</sub>O est converti en HDO et D<sub>2</sub> gaz (ou HD) par catalyse au palladium : à partir du complexe H<sub>2</sub>-Pd(0) **A** sur charbon actif et de D<sub>2</sub>O, l'adduit **B** est formé. Après échange H/D et élimination réductrice, le complexe **C** HD-Pd(0) est formé, de la même manière que le complexe D<sub>2</sub>-Pd(0) **E** qui libère ensuite D<sub>2</sub> gaz et le palladium régénéré<sup>68</sup> (Figures 33).

<sup>67</sup> J. L. Garnett, *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 436–437.

<sup>68</sup> H. Sajiki, T. Kurita, H. Esaki, F. Aoki, T. Maegawa, K. Hirota, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3521–3523.



Figures 33 : Mode opératoire pour la conversion de H<sub>2</sub> gaz en D<sub>2</sub>, dans D<sub>2</sub>O, en flacon hermétiquement scellé et mécanisme proposé par l'équipe de Sajiki<sup>69</sup>.

Cette méthode tolère de nombreux substrats benzyliques, mais la régiosélectivité et l'incorporation en deutérium varie en fonction de la température : les atomes d'hydrogène en position benzyliques sont sélectivement substitués par des atomes de deutérium à température ambiante, tandis qu'à 160 °C, les positions qui étaient moins réactives sont deutérées<sup>70</sup> (Figure 34).

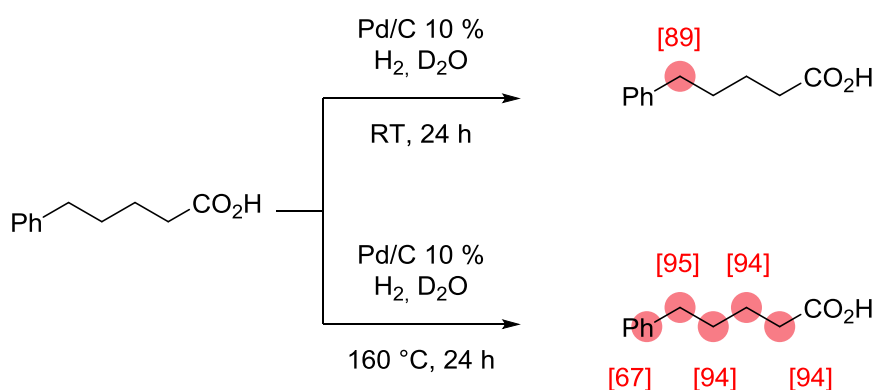


Figure 34 : Influence de la température sur l'incorporation en deutérium et la régiosélectivité de l'échange H/D.

La même méthode est appliquée sur la L-phénylalanine conduisant à la deutération sélective en position  $\beta$ , à 110 °C, sans racémisation. À 160 °C, la position  $\alpha$  est elle aussi soumise à l'échange H/D mais donne lieu à la racémisation (17 % ee)<sup>71</sup> (Figure 35).

<sup>69</sup> Y. Sawama, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Synlett* **2012**, 23, 959–972.

<sup>70</sup> H. Sajiki, F. Aoki, H. Esaki, T. Maegawa, K. Hirota, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1485–1487.

<sup>71</sup> J. Atzrodt, V. Derdau, T. Fey, J. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, 46, 7744–7765.

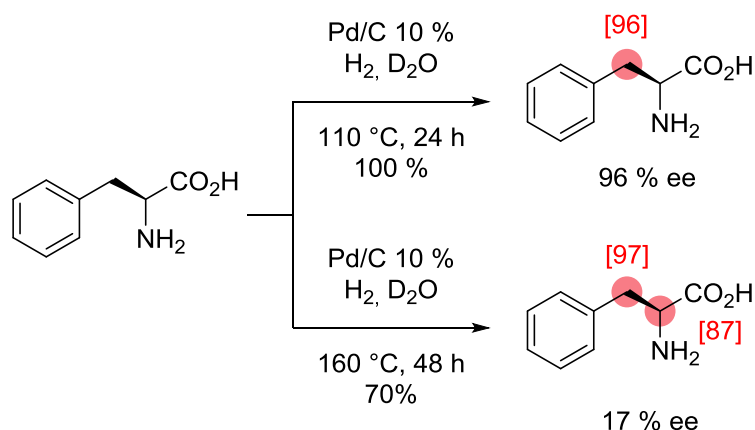


Figure 35 : Deutération de la L-phénylalanine : influence de la température sur l'incorporation en deutérium et la stéréochimie de l'échange H/D.

Les hétérocycles, largement présents dans les composés biologiquement actifs, peuvent être aussi deutérés par cette méthode<sup>72</sup> (Figure 36).

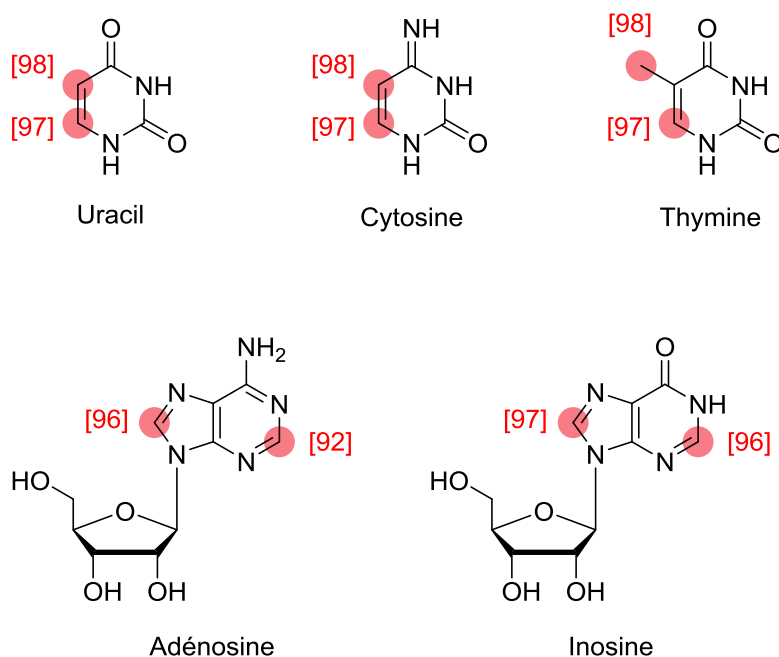


Figure 36 : Échange H/D de bases pyrimidines et de nucléosides selon le groupe de Sajiki.

L'équipe de Sajiki a également travaillé sur l'utilisation d'autres catalyseurs pour cette méthode, comme Rh/C pour la deutération des alcanes et Ru/C pour la deutération régiosélective d'alcools (en position  $\alpha$  de l'oxygène) et la deutération stéréosélective de sucres<sup>73</sup>.

<sup>72</sup> H. Esaki, N. Ito, S. Sakai, T. Maegawa, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Tetrahedron* **2006**, 62, 10954–10961.

<sup>73</sup> Y. Sawama, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Synlett* **2012**, 23, 959–972.



### I. A. 2. c) ii- Échanges H/D hétérogènes catalysés par du ruthénium

En 2003, l'équipe de Jackson a montré qu'à 100 °C, sous 69 bar de D<sub>2</sub> gaz, dans D<sub>2</sub>O, la L-alanine subissait la deutération pour donner le L-alaninol, en présence de Ru/C 5 %. La stéréochimie sur le carbone α, à l'issue de la réaction est conservée à 100 °C. L'équipe de Jackson en déduit alors que la stéréochimie du C<sub>α</sub> est également conservée sur la L-alanine deutérée. Mais, la L-alanine deutérée n'est pas isolée. Cette réaction est un exemple intéressant d'échange H/D énantiospécifique sur un centre stéréogène d'une molécule d'intérêt biologique, mais les conditions utilisées sont très dures et conduisent à la formation d'un produit différent (L-alaninol) du substrat de départ (L-alanine) (Figure 37).

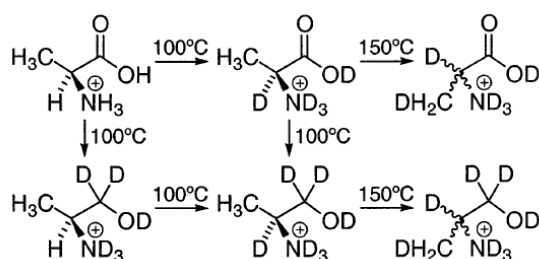


Figure 37 : Deutération de la L-alanine et du L-alaninol dans D<sub>2</sub>O, sous D<sub>2</sub>, en présence de Ru/C<sup>74</sup>.

### I. A. 2. c) iii- Échanges H/D hétérogènes catalysés par du platine

En règle générale, les mêmes principes de réaction et d'activation de l'échange H/D catalysé au palladium peuvent être appliqués à l'échange H/D catalysé au platine. Le choix du métal de transition dépend alors du substrat, de la sélectivité souhaitée et des conditions de réaction. Dans une étude comparative de 2005, l'équipe de Sajiki montre que les catalyseurs au platine permettent une meilleure deutération sur les positions aromatiques, tandis que les catalyseurs au palladium deutèrent préférentiellement les positions aliphatiques<sup>75</sup> (Figure 38).

<sup>74</sup> F. T. Jere, D. J. Miller, J. E. Jackson, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 527–530.

<sup>75</sup> H. Sajiki, N. Ito, H. Esaki, T. Maesawa, T. Maegawa, K. Hirota, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6995–6998.

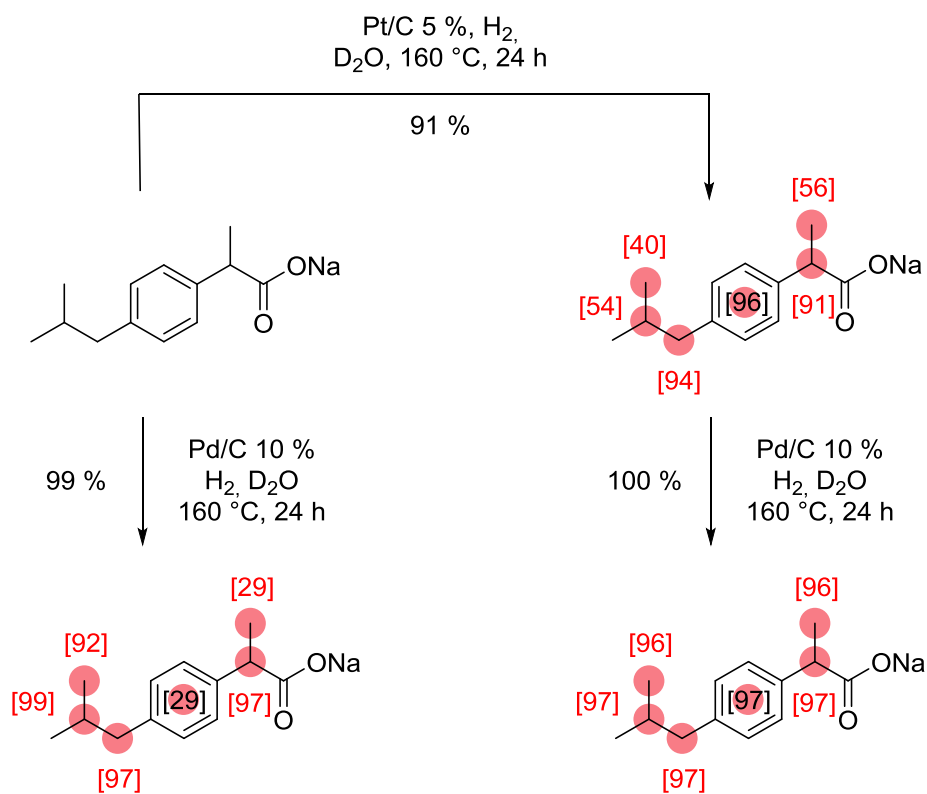
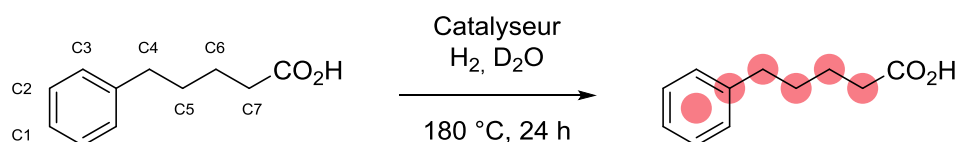


Figure 38 : Échanges H/D catalysés au palladium et au platine sur l'ibuprofène.

Dans certains cas, le platine et le palladium peuvent être utilisés de façon concomitante : l'échange H/D, à 180 °C, de la position *ortho* (C3) de l'acide 5-phénylvalérique, par exemple, n'est que de 14 % avec Pd/C 10 %, de 19 % avec Pt/C 5 %, mais de 97 % avec la combinaison des deux catalyseurs, par effet de synergie<sup>76</sup> (Tableau 3).

<sup>76</sup> N. Ito, T. Watahiki, T. Maesawa, T. Maegawa, H. Sajiki, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1025–1028.



Entrée	Catalyseur	[D %]						Rdt %
		C1	C2	C3	C4	C5, C6	C7	
1	Pd/C 10 % (10 %)	96	96	14	98	96	96	88
2	Pt/C 5 % (20 %)	97	97	19	28	8	10	92
3	Pd/C 10 % (10 %) + Pt/C 5 % (20 %)	97	97	97	97	97	94	84

Tableau 3 : Comparaison de l'efficacité de l'échange H/D sur l'acide 5-phénylvalérique, en utilisant Pd/C, Pt/C ou un mélange Pd/C-Pt/C en tant que catalyseurs.

### I. A. 3. Méthodes d'échange H/D régiosélectives de substrats azotés récemment publiées

De nombreuses méthodes basées sur la catalyse hétérogène ou homogène pour l'échange H/D ont déjà été décrites. Récemment, la deutération sélective de molécules azotées a fait l'objet d'une attention particulière due à la présence de cet hétéroatome dans de nombreux composés biologiquement actifs. Divers systèmes catalytiques tels que Rh black<sup>77</sup> et des colloïdes de PdNp@PVP (Np : nanoparticules, PVP : polyvinylpyrrolidone)<sup>78</sup> ont été décrits pour la deutération de dérivés de pyridine. Depuis 2012, pour l'échange H/D des dérivés d'indole, l'équipe de Schnürch utilise un complexe de ruthénium commercial<sup>79</sup>. C'est également en 2012 que l'équipe de Beller décrit l' $\alpha,\beta$ -deutération d'amines secondaires et tertiaires<sup>80</sup>. Avant cela, les protocoles de marquage d'amines alkylées étaient essentiellement appliqués sur des substrats non-fonctionnalisés, et nécessitaient des conditions forcées avec une sélectivité et un enrichissement en deutérium faibles.

<sup>77</sup> E. Alexakis, J. R. Jones, W. J. S. Lockley, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5025–5028.

<sup>78</sup> K. A. Guy, J. R. Shapley, *Organometallics* **2009**, 28, 4020–4027.

<sup>79</sup> B. Gröll, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 4432–4437.

<sup>80</sup> L. Neubert, D. Michalik, S. Bähn, S. Imm, H. Neumann, J. Atzrodt, V. Derdau, W. Holla, M. Beller, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12239–12244.

### I. A. 3. a) Deutération régiosélective d'hétérocycles azotés (équipe de Schnürch)

Les hétérocycles azotés comptent parmi les structures les plus étudiées à cause de leur présence dans de nombreux produits naturels et composés synthétiques présentant des activités biologiques intéressantes. Leurs dérivés deutérés sont, par conséquent, d'un grand intérêt dans de nombreux domaines (cf. I. A. 1.).

En 2012, l'équipe de Schnürch propose un protocole de deutération des *N*-hétérocycles en milieu neutre, sous argon, avec une quantité de réactif deutérant réduite (5 à 10 équivalents de *t*BuOD par position deutérée) et une grande sélectivité. Même si cette méthode requière toujours une température (115 °C) élevée, le catalyseur utilisé est un complexe de ruthénium commercial ( $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ ) avec une charge catalytique de 5 mol % (Figure 39).

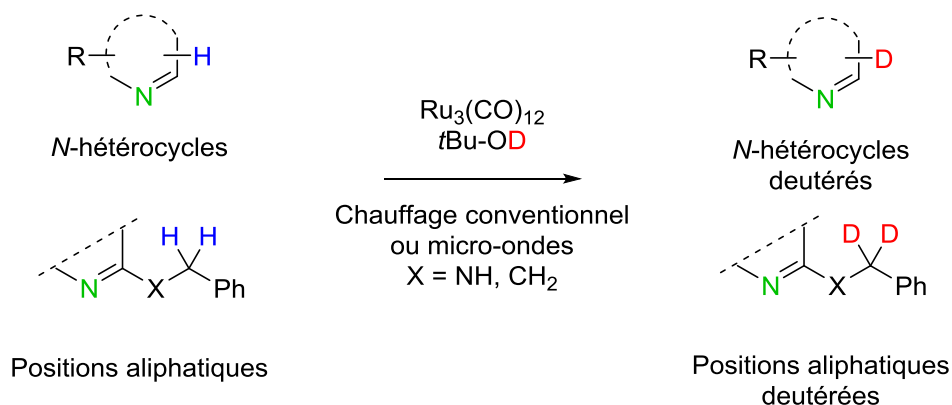


Figure 39 : Deutération sélective de *N*-hétérocycles.

Un temps de réaction de 30 minutes est suffisant pour la deutération de l'indole et de l'isoquinoline. Cependant, pour la deutération de leurs dérivés substitués, un temps de réaction de 3 heures est nécessaire. Dans le cas de l'indole **1** et de ses dérivés (7-azaindole **2**, 6-chloro-7-deazapurine **5**, par exemple), l'échange H/D a lieu en position 3 (ou  $\beta$ ) de l'azote, le site le plus riche en électron. Sur le benzimidazole, la deutération a lieu en position 2 (ou  $\alpha$ ). Concernant les nitroindoles, la formation d'un précipité noir est observée à l'issue de la réaction et aucun produit deutéré n'est isolé. Dans le cas de la pyridine **6** et de ses dérivés, la deutération a lieu en position  $\alpha$  de l'azote, site le plus riche en électron. Tandis que l'enrichissement en deutérium atteint 79 % sur la pyridine **6** et 80 % sur l'isoquinoline **3**, il n'est que de 50 % sur la 4-aminopyridine **7**. Il se peut que les azotes de l'amine libre et du cycle aromatique soient en compétition dans l'étape de complexation du catalyseur. Curieusement, d'autres *N*-hétérocycles tels que la pyrimidines, le pyrazole, la pyridazine et le

pyrrole ne sont pas deutérés dans ces conditions, de même que le (benzo)thiophène et le (benzo)furane (Figure 40).

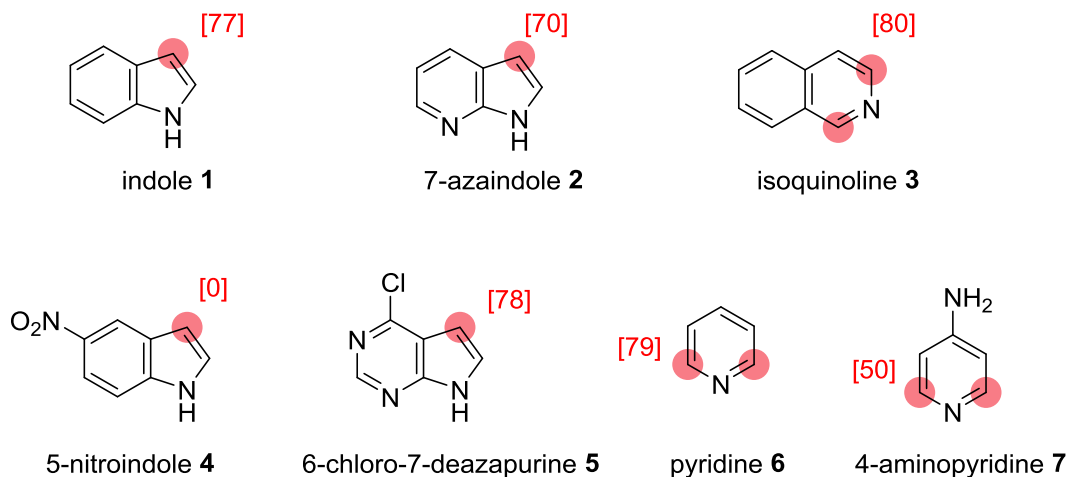


Figure 40 : Exemple d'hétérocycles deutérés. Chauffage conventionnel (115 °C), 3 h, *t*BuOD (5 équiv./position deutérée),  $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$  5 mol %.

Pour augmenter l'enrichissement en deutérium, des cycles répétés de la réaction peuvent être réalisés. Après le premier cycle, *t*BuOD est évaporé et les mêmes quantités de *t*BuOD et de catalyseur sont rajoutées avant lancement du deuxième cycle. Le renouvellement du catalyseur est essentiel car on peut observer que le renouvellement de *t*BuOD uniquement n'améliore pas le taux de deutération, ce qui montre que le catalyseur se retrouve inactivé à l'issue d'un cycle de réaction. L'application d'un deuxième cycle, fait passer l'enrichissement de 77 % à 90 % sur l'indole, et de 80 % à 93 % sur l'isoquinoline.

La méthodologie peut être étendue à certains centres carbonés aliphatiques. En effet, les positions benzyliques liées aux hétérocycles sont deutérées avec de bons enrichissements, après réaction à 140 °C pendant 24 heures. Le cycle pyridine est également deutéré mais dans une moindre mesure. Cela montre que l'activation C-H aliphatique est favorisée par rapport à l'activation C-H aromatique (Figure 41).

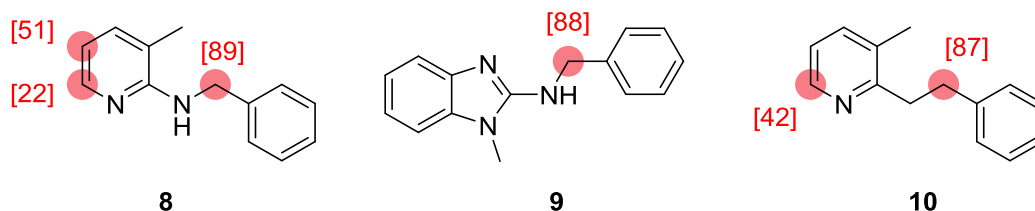


Figure 41 : Exemples de positions aliphatiques deutérées. Chauffage conventionnel (140 °C), 24 h, *t*BuOD (5 équiv./position deutérée),  $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$  5 mol %.

L'utilisation de l'irradiation microonde, avec 10 équivalents de *t*BuOD par position de deutération, représente une alternative au chauffage conventionnel car il permet la deutération de certains dérivés en seulement 15 minutes.

L'équipe de Schnürch propose des mécanismes de deutération sur la pyridine et sur une pyridine benzylée. Tout d'abord, le catalyseur au ruthénium est coordonné dans les deux mécanismes. Dans le cas de la pyridine, l'insertion du métal a lieu sur la liaison C-H la plus proche, en l'occurrence en position 2 puisqu'il n'y a pas de possibilité de formation d'un métallacycle à cinq chaînons. Dans le cas du substrat aliphatique, l'insertion a lieu en position benzylique permettant le passage par un intermédiaire métallacycle à 5 chaînons. Finalement, après échange entre l'hydrogène et le deutérium provenant du solvant, et élimination réductrice, le composé deutéré est obtenu. Toutes les étapes sont réversibles. En fait, un équilibre entre forme hydrogénée et forme deutérée s'établit (Figure 42).

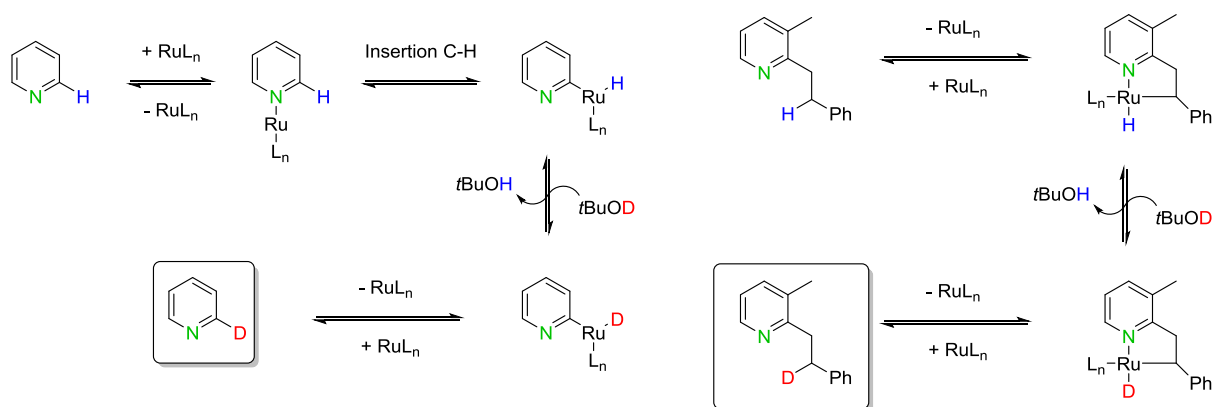


Figure 42 : Mécanismes de deutération de la pyridine et de la pyridine benzylée proposés par Schnürch.

Dans les cas des indoles, la N-coordination du catalyseur devrait conduire à l'insertion du métal dans la liaison C-H de la position C2. Cependant, l'insertion a lieu de toute évidence en position C3 puisque que c'est sur cette position que la deutération est observée. Cela suggère qu'un mécanisme différent, non élucidé, se produit pour les indoles.

### I. A. 3. b) Deutération régiosélective d'amines aliphatiques (équipe de Beller)

Avant 2012, peu d'exemples d'échange H/D sur des amines par catalyse hétérogène étaient connus. Ces deutérations conduisaient à une incorporation en deutérium modérée et/ou au marquage compétitif sur des aromatiques. À l'exception des travaux des équipes de Matsubara, sur les amines primaires, et de Lockley, sur les amines secondaires, la deutération

en catalyse homogène des amines a été très peu étudiées, alors qu'elle permet de nombreuses transformations sélectives. L'équipe de Beller est donc la première à publier la réaction d'échange H/D chimiosélective d'amines tertiaires et à l'appliquer sur des principes actifs (Figure 43).

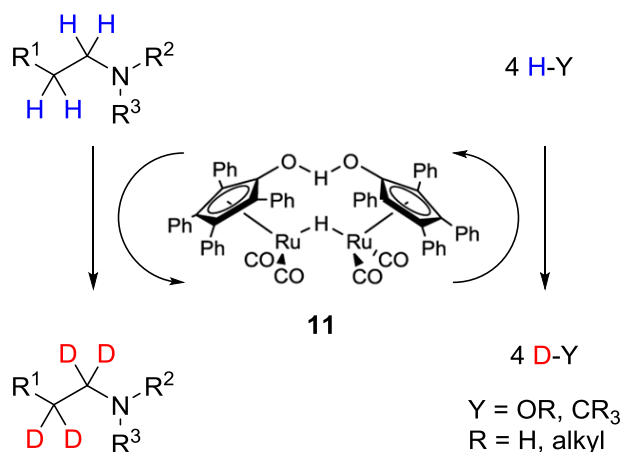


Figure 43 :  $\alpha,\beta$ -deutération d'amines bioactives sélective catalysée au ruthénium.

Au cours de cette réaction, un cation iminium (ou intermédiaire énamine) est généré pour être ensuite deutéré et donner l'amine deutérée correspondante. Bien que divers catalyseurs à base de Ru et Ir soient déjà utilisés pour l'échange H/D, à l'issue d'essais préliminaires, l'équipe de Beller observe que le catalyseur de Shvo **11** (Figure 44) permet la réaction sur des amines primaires, secondaires et tertiaires avec une chimiosélectivité supérieure.

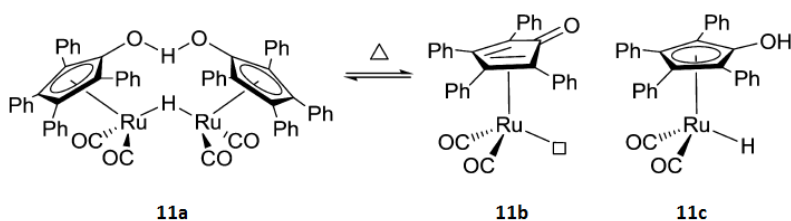


Figure 44 : Catalyseur de Shvo dans sa forme dimérique, monomérique déhydrogénée et monomérique hydrogénée<sup>80</sup>.

Grâce à ces essais préliminaires, sur la trihexylamine **12** comme substrat modèle, l'équipe constate que la deutération a lieu sur les positions en  $\alpha$  et en  $\beta$  de l'atome d'azote, confirmant le passage par un intermédiaire énamine. La même sélectivité est observée sur d'autres trialkylamines (Figure 45).

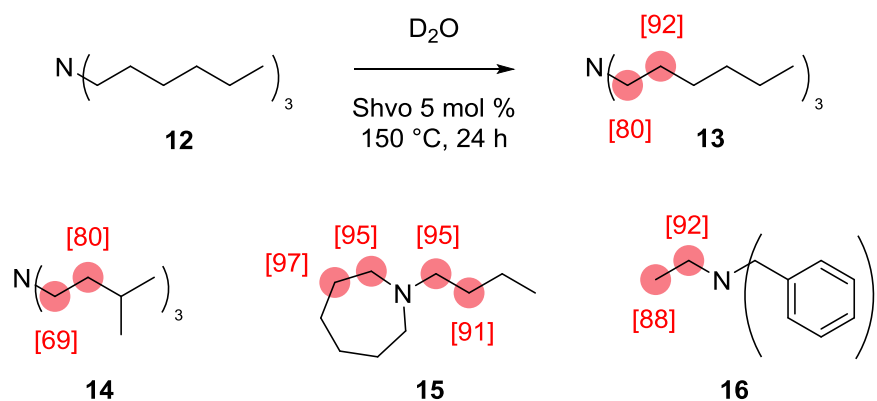


Figure 45 : Régiosélectivité de la deutération sur des trialkylamines.

En effet, aucun échange H/D n'a lieu sur les autres positions des chaînes alkyles ni même sur la position benzylique de la *N*-dibenzyléthylamine **16**. Un mécanisme de deutération des amines tertiaires au catalyseur de Shvo est alors proposé (Figure 46).

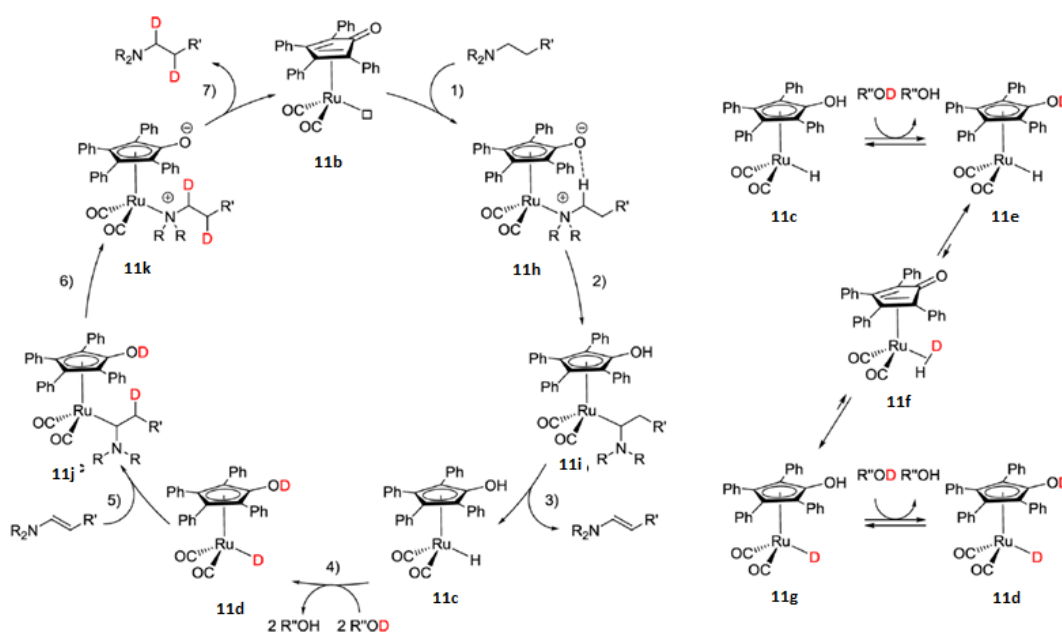


Figure 46 : Mécanisme proposé pour la deutération au catalyseur de Shvo sur des amines tertiaires<sup>80</sup>.

Après coordination de l'amine sur le ruthénium, attaque de l'alcoolate cyclopentadiényle sur l'hydrogène  $\alpha$  acide puis élimination  $\beta$ -hydrure, l'énamine est formée ainsi que le monomère Shvo hydrogéné. Dans l'étape (4), un mécanisme de type Grotthuss conduit à la deutération du monomère par un solvant protique deutéré. L'échange H/D sur la liaison Ru-H procède ensuite via un équilibre entre **11e** et **11g**, passant par l'intermédiaire **11f**, conduisant au monomère de Shvo deutéré **11d**. L'insertion de l'énamine sur la liaison Ru-D de **11d** génère alors l'amine tertiaire  $\alpha,\beta$ -deutérée souhaitée.



Après s'être assuré de la sélectivité de sa méthode, l'équipe de Beller décide d'optimiser ses conditions, sur la trihexylamine **12**, pour qu'elles puissent être adaptées à la deutération de standards internes de spectrométrie de masse. Tout d'abord, une température minimale de 110 °C est requise pour observer une activité catalytique significative. Mais une augmentation jusqu'à 150 °C permet d'atteindre un très haut enrichissement : 10 D par molécule en 24 heures, dans un mélange D<sub>2</sub>O (150 équiv.)/toluène. En passant d'un chauffage conventionnel aux irradiations micro-ondes, un enrichissement similaire (9 D par molécule) peut être obtenu en 2 heures et 100 équivalents de D<sub>2</sub>O. Enfin, en augmentant la quantité de deutérium dans le mélange (500 équiv. de D<sub>2</sub>O), l'enrichissement est aussi grandement supérieur (11 D par molécule).

En gardant le chauffage aux micro-ondes comme procédure standard, différentes sources de deutérium se trouvent être compatibles avec ce système catalytique : D<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>OD, isopropanol-*d*<sub>1</sub> et -*d*<sub>8</sub>, acétone-*d*<sub>6</sub> et cyclohexanone-*d*<sub>10</sub>.

Pour évaluer l'étendue du potentiel de sa nouvelle méthode, l'équipe de Beller choisit ensuite trois principes actifs actuellement sur le marché et quatre composés avec des propriétés pharmaceutiques intéressantes contenant des noyaux pyrrolidines, pipéridines et pipérazines, comme molécules-tests. Dans des conditions adéquates, les sept molécules cibles sont bien deutérées en  $\alpha$  et  $\beta$  des azotes, sans marquage sur les aromatiques (Figure 47).

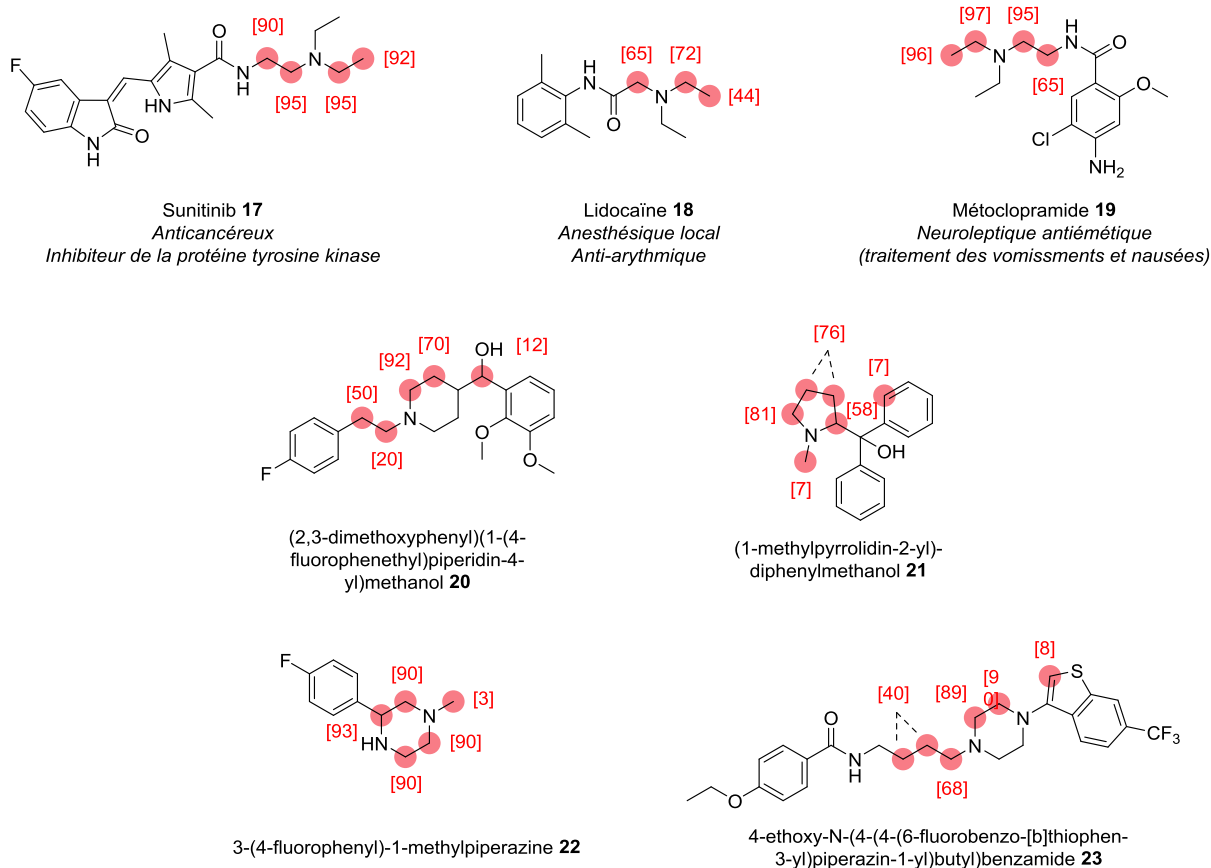


Figure 47 : Échange H/D sur trois médicaments commercialisés et quatre composés aux propriétés pharmaceutiques intéressantes.

On peut noter que l'enrichissement est très faible sur les groupements méthyles, ce qui confirme que la présence d'un atome d'hydrogène en  $\beta$  est essentielle pour l'activation de l'amine. De plus, les résultats de deutération sur la molécule **23** montrent que la nature de l'atome d'azote influence l'efficacité de l'échange H/D. En effet, tandis que les protons en  $\alpha$  et  $\beta$  de la pipérazine sont bien échangés, aucune deutération n'a lieu près de la fonction amide. De même, lorsque les substrats sont utilisés sous forme de sels (chlorhydrate pour la molécule **22** et acétate d'ammonium pour la molécule **23**), aucun échange H/D n'est observé. Dans ce type de cas, il est alors essentiel de préparer la base libre correspondante avant de procéder à toute deutération.

Cette méthode de deutération développée par l'équipe de Beller, basée sur un complexe de ruthénium en tant que catalyseur permet donc d'atteindre des enrichissements en deutérium élevés. Cependant, elle requiert toujours un chauffage à haute température (150 °C) pouvant conduire à des sous-produits et à la dégradation de substrats fragiles. De plus, elle n'a pas été appliquée à des composés chiraux. En effet, le mécanisme proposé dans la figure 46, passant par la formation d'une énamine, suggère que cette méthode puisse conduire à la racémisation

des centres chiraux. En conséquence, la mise au point d'une méthode de marquage régiosélective, chimiosélective et stéréospécifique, applicable à une large variété de substrats reste un challenge.

## **I. B. Nanoparticules de ruthénium et genèse du projet**

### **I. B. 1. Les nanoparticules de métaux de transition pour la catalyse**

La catalyse hétérogène, qui a l'avantage d'utiliser des catalyseurs facilement éliminés à l'issue d'une réaction et pouvant être employés à hautes températures, a pendant longtemps souffert d'un manque de sélectivité et de compréhension des aspects mécanistiques, pourtant indispensables lorsque l'on souhaite améliorer un procédé et ses paramètres. La catalyse homogène est très efficace et sélective, et peut être utilisée dans des procédés industriels. Mais les catalyseurs peuvent être difficiles à éliminer et leur stabilité thermique peut être limitée. Désormais, les catalyseurs se doivent, à la fois, d'être facilement éliminés du milieu réactionnel et recyclés pour de nouveaux cycles de réaction, tout en présentant une grande efficacité. Un nouvel axe de recherche apparaît donc à l'interface de la catalyse homogène et hétérogène<sup>81</sup>.

L'utilisation de nanoparticules (NPs) de métaux de transition en catalyse (qualifiée parfois de « semi-hétérogène ») est intéressante puisqu'elles miment la catalyse et l'activation de surfaces métalliques à l'échelle nanométrique et apportent ainsi l'efficacité et la sélectivité qui manquaient à la catalyse hétérogène. Cette approche est également pertinente par rapport à la catalyse homogène puisque les NPs sont bien solubles dans les solvants classiques et peuvent être manipulées ou même caractérisées comme des composés moléculaires par des techniques de routine telles que la RMN, l'infrarouge et la spectroscopie UV-visible. Les NPs de métaux de transition sont des « clusters » contenant quelques dizaines à milliers d'atomes métalliques, stabilisés par des ligands, surfactants, polymères ou dendrimères protégeant leur surface. Leur taille varie de un à quelques centaines de nanomètres, mais les NPs les plus actives ont un

---

<sup>81</sup> D. Astruc. *Transition-Metal Nanoparticles in Catalysis : From Historical Background to the State-of-the Art. Nanoparticles and Catalysis*. D. Astruc, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2008**, 1–48.

diamètre allant de un à quelques nanomètres, et contiennent donc plusieurs dizaines ou centaines d'atomes seulement.

Ces nanocatalyseurs peuvent être obtenus par diverses méthodes. Le stabilisant est choisi selon le milieu (aqueux ou organique). Les polymères, les surfactants, les dendrimères et les cyclodextrines sont considérés comme des stabilisants stériques qui piègent, sans ou avec de très faibles interactions, les particules. Les ligands, quant à eux peuvent se coordonner à la surface des particules et ont donc une influence sur l'activité catalytique et la sélectivité.

Pour la synthèse de nanoparticules, deux voies sont possibles selon la nature du précurseur (Figure 48) :

- la réduction douce de solutions de sels métalliques (chlorures de rhodium ou de ruthénium, par exemple)
- l'extrusion des atomes de métal à partir de composés organométalliques capables de se décomposer en solution, dans des conditions douces.

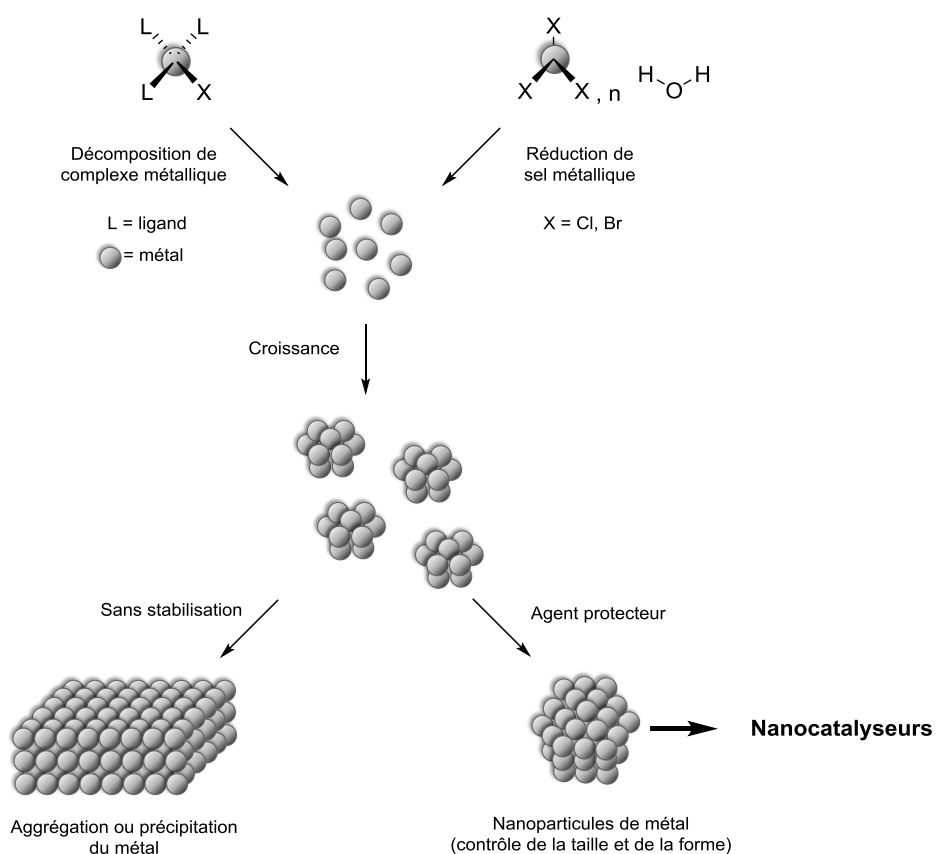


Figure 48 : Méthodes utilisées pour la synthèse de nanocatalyseurs<sup>82</sup>.

<sup>82</sup> A. Roucoux, A. Nowicki, K. Philippot. Rhodium and Ruthenium Nanoparticles in Catalysis. *Nanoparticles and Catalysis*. D. Astruc, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2008**, 349–388.

## I. B. 1. a) Synthèse des NPs par réduction douce de solutions de sels métalliques

Cette approche est la plus utilisée. Les agents réducteurs sont variés : alcools, dihydrogène, borohydrures ou boranes. La taille des nanoparticules est bien contrôlée et permet donc d'obtenir des nanoparticules efficaces pour la catalyse et dont la synthèse est reproductible. Néanmoins, des sels, de l'eau et des sous-produits restent souvent en contact de la surface des nanoparticules. Les oxydes et hydroxydes de surface ainsi formés peuvent alors altérer la réactivité des NPs<sup>83</sup>.

## I. B. 1. b) Synthèse des NPs par décomposition d'un précurseur organométallique

L'équipe de Bruno Chaudret a développé l'utilisation de complexes organométalliques comme précurseurs de la synthèse de NPs métalliques. L'avantage principal de cette approche organométallique réside dans le fait que la synthèse a lieu dans des conditions douces : température ambiante, pression de gaz faible (1 à 3 bar de H<sub>2</sub>). Les complexes d'oléfines tels que Ru( $\eta^6$ -C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>)( $\eta^4$ -C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>) ou les complexes allyliques comme Rh( $\eta^3$ -C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>) sont les précurseurs les plus intéressants car, après hydrogénation, ils forment des alcanes inertes envers la surface des NPs et sont facilement éliminés par évaporation. La synthèse des NPs est alors bien contrôlée en taille et en morphologie par l'ajout d'un polymère ou d'un ligand dans le milieu réactionnel.

Les NPs issues de la décomposition du complexe Ru( $\eta^6$ -C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>)( $\eta^4$ -C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>) ou Ru(cot)(cod) (cot = 1,3,5-cyclooctatriène, cod = 1,5-cyclooctadiène) sont très sensibles et peuvent brûler à l'air libre, ce qui démontre leur réactivité potentielle. Des NPs de Ru préparées dans un mélange THF/MeOH 90/10 vol. % présentant une taille moyenne de 20 nm, sont très stables en solution (au moins un an) et peuvent être utilisées comme nanocatalyseurs pour l'hydrogénation de dérivés aromatiques (benzène et quinoline). Ces réactions ont lieu par addition des substrats dans les solutions colloïdales préformées. Dans le cas de l'hydrogénation du benzène, une conversion de 82 % en cyclohexane est obtenue au bout de 14 heures, à 80 °C, sous 20 bar de H<sub>2</sub> gaz ([substrat]/[Ru] = 500, TON = 410, TOF = 35 h<sup>-1</sup>). Dans le cas de l'hydrogénation de l'isoquinoline, une conversion de 62 % en 1,2,3,4-

---

<sup>83</sup> U. H. Maier-Greiner, C. B. A. Klaus, L. M. Estermaier, G. R. Hartmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1312–1314.

tétrahydroquinoline est obtenue ( $[\text{substrat}]/[\text{Ru}] = 500$ ,  $\text{TON} = 311$ ,  $\text{TOF} = 16 \text{ h}^{-1}$ ). Finalement, ces NPs sont stables puisqu'elles ont une taille et une dispersion similaire avant et après catalyse (observation par TEM)<sup>84</sup>.

## I. B. 2. Les nanoparticules de ruthénium du groupe de Bruno Chaudret (RuNP@PVP)

### I. B. 2. a) Synthèse des RuNP@PVP

En 2001, l'équipe de Chaudret décrit la synthèse des RuNP@PVP : à partir de la décomposition du précurseur Ru(cot)(cod), dans le THF, en présence de polymère PVP (polyvinylpyrrolidone) ( $[\text{Ru}]/[\text{polymère}] = 5 \%$  en masse), sous 3 bar de H<sub>2</sub>, pendant 15 heures, une solution marron est obtenue. L'addition de pentane provoque alors la précipitation d'une poudre marron qui est dissoute dans le méthanol puis précipitée une nouvelle fois par du pentane<sup>85</sup> (Figure 49).

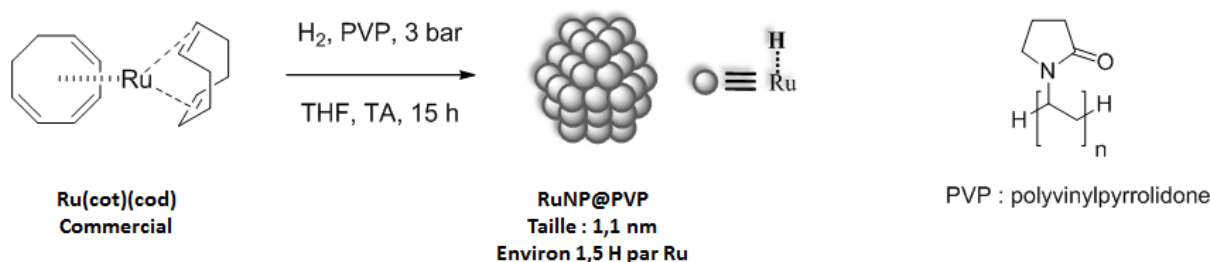
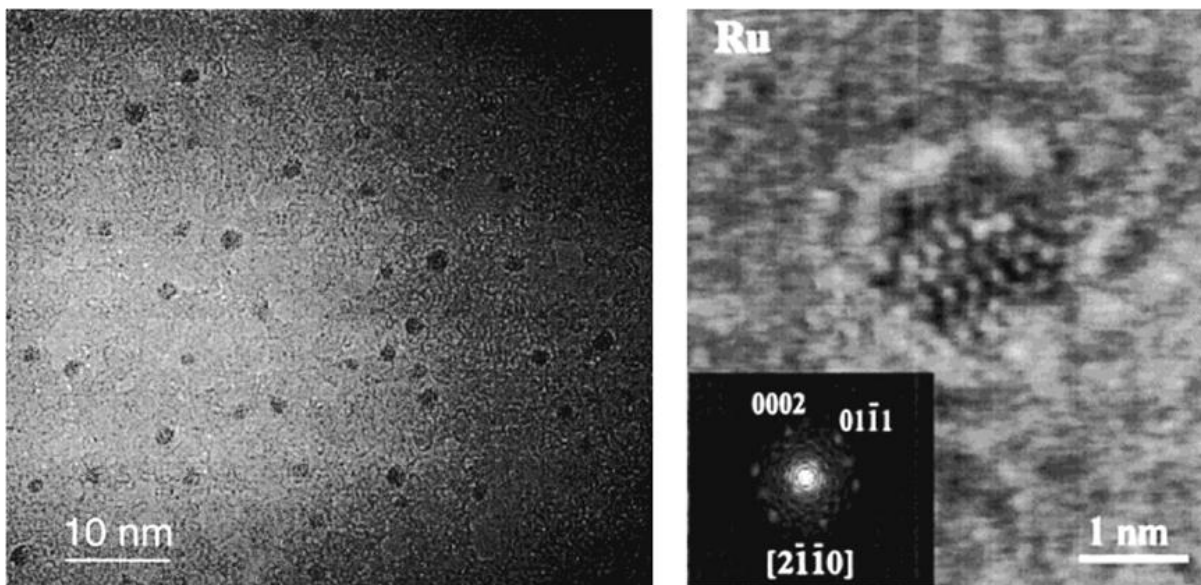


Figure 49 : Synthèse des RuNP@PVP selon l'équipe de Chaudret et structure du polymère PVP.

Le colloïde, contenant 7,6 % en masse de ruthénium, est alors caractérisé par spectroscopie infrarouge (IR) après adsorption de CO, microscopie électronique en transmission MET (TEM en anglais : transmission electron microscopy), microscopie électronique à haute résolution (HREM en anglais : high-resolution electron microscopy) et diffraction de rayons X aux grands angles (WAXS en anglais : wide-angle X-ray scattering). En IR, le colloïde présente une bande d'absorption à  $2014 \text{ cm}^{-1}$  caractéristique de l'étirement d'une liaison C-O, correspondant donc aux groupements terminaux CO adsorbés sur Ru(0). La microscopie haute résolution permet d'observer que la distribution en taille des particules est homogène (environ 1,1 nm de diamètre et structure cristalline hexagonale hcp) (Figure 50).

<sup>84</sup> K. Pelzer, O. Vidoni, K. Philippot, B. Chaudret, V. Collière, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, *13*, 118–126.

<sup>85</sup> C. Pan, K. Pelzer, K. Philippot, B. Chaudret, F. Dassenoy, P. Lecante, M.-J. Casanove, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7584–7593.



Figures 50 : Analyses TEM et HREM des nanoparticules de ruthénium dans le PVP<sup>85</sup>.

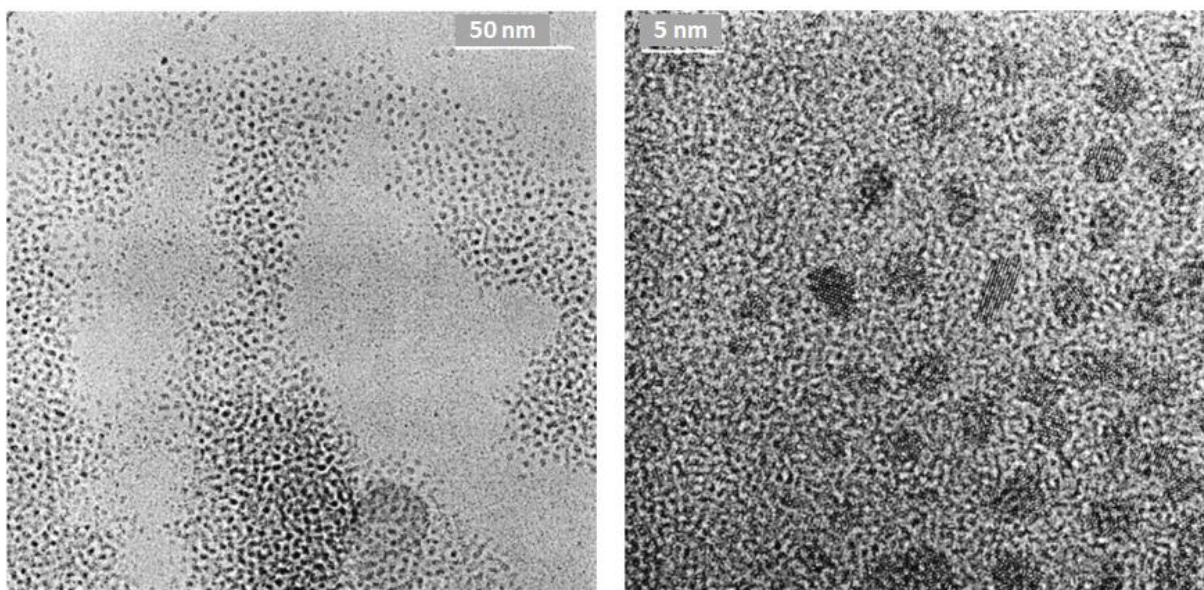
Cette synthèse montre donc que la décomposition du précurseur Ru(cot)(cod), en présence de PVP, conduit à la formation de nanoparticules cristallines sphériques, de petite taille, avec une distribution de taille étroite.

### I. B. 2. b) Synthèse des RuNp stabilisées par le ligand hexadecylamine (HDA)

La synthèse des nanoparticules de ruthénium stabilisées par le ligand hexadecylamine (ou HDA) est similaire à celle des RuNp@PVP : une solution de HDA dans le THF est ajoutée à une solution de Ru(cot)(cod) dans le THF. Après pressurisation sous 3 bar de H<sub>2</sub> gaz à – 80 °C, la solution est mise à agiter pendant 20 heures, à température ambiante. Après dépressurisation, concentration de la solution et addition de pentane, une poudre noire lavée au pentane et soluble dans le THF est obtenue.

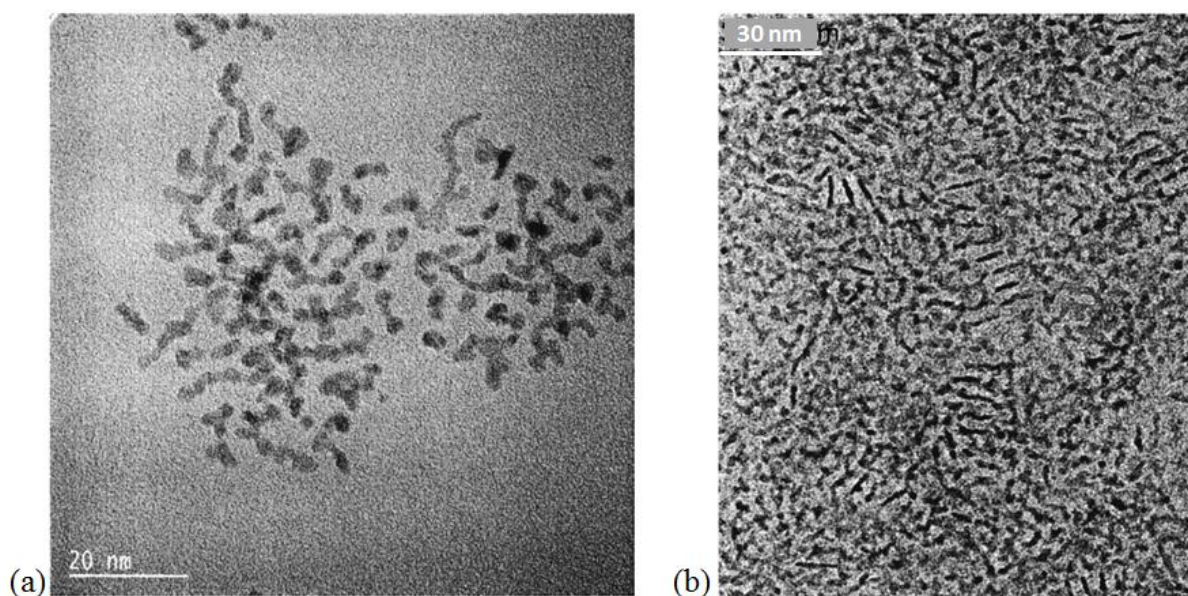
Dans son étude de 2001, l'équipe de Chaudret compare alors l'influence de la quantité en HDA sur la morphologie des NPs. Trois colloïdes sont préparés avec 0,2 ; 0,5 et 1 équivalent de HDA. Ils sont ensuite analysés par microscopie. L'équipe observe alors que les particules présentent un aspect différent de celui des RuNP@PVP : avec 0,2 équivalents de HDA, les particules monocristallines sphériques sont bien séparées mais ont une tendance à la coalescence (Figure 51).





Figures 51 : Analyses TEM et HREM des nanoparticules de ruthénium stabilisées par HDA (0,2 équiv.)<sup>85</sup>.

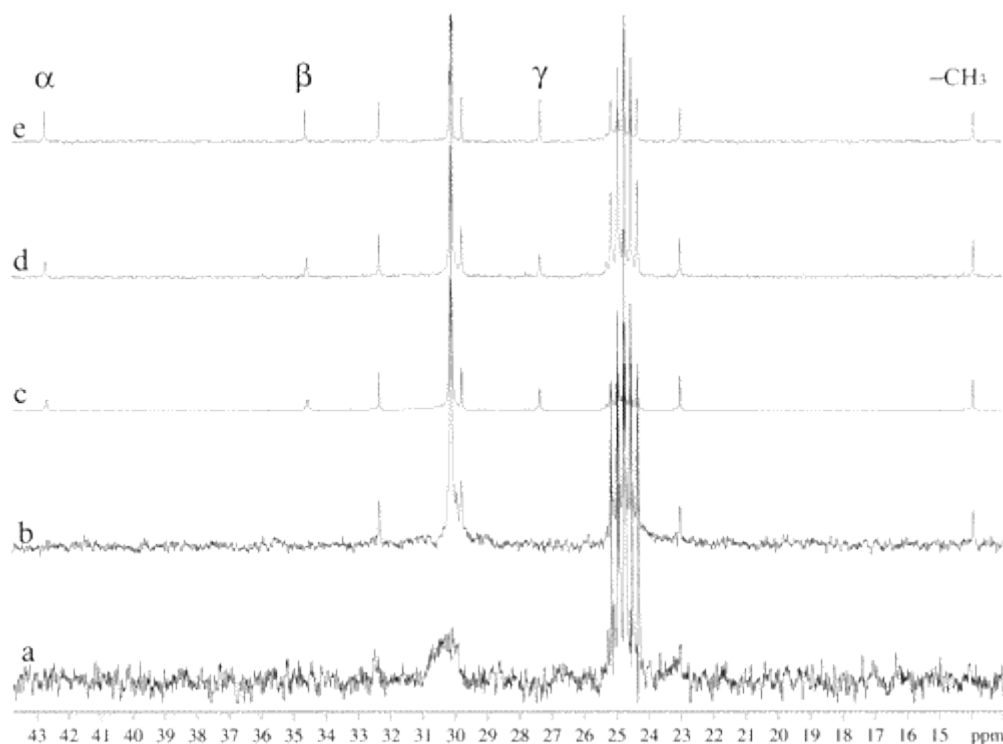
Après un certain temps en solution, les particules présentent même une forme allongée (Figure 52a). Enfin, lorsque le colloïde est plus concentré dans le THF avec 0,5 équivalents de HDA, les particules semblent s'organiser en bâtonnets (Figure 52b). Un diamètre moyen de ces particules allongées a pu être mesuré (1,9 nm avec 0,2 équiv. de HDA, 2,4 nm avec 0,5 équiv. et 2,6 avec 1 équiv.).



Figures 52 : Analyses TEM des nanoparticules de ruthénium stabilisées par HDA. (a) Colloïde à 0,2 équiv. de HDA resté plus longtemps en solution. (b) Colloïde à 0,5 équiv. de HDA à plus haute concentration dans le THF<sup>85</sup>.



Afin de mieux comprendre le mode de coordination du ligand à la surface des NPs, l'équipe de Chaudret procède à une analyse RMN  $^{13}\text{C}$  en solution du colloïde avec 0,2 équiv. de HDA, à température ambiante, dans le THF- $d_8$ , à 100,71 MHz (Figures 53).



Figures 53 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (THF- $d_8$ , 101 MHz)<sup>85</sup>. (a) Colloïde de Ru stabilisé par HDA (0,2 équiv.). (b-d) Colloïde + HDA en excès. (e) HDA libre.

Le premier spectre (a) présente trois massifs à 32,3 ; 30 et 23 ppm correspondant aux groupements méthylènes de la chaîne alkyle de HDA. Mais aucun de ces signaux ne correspondant aux carbones en positions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de l'azote ni même au groupement méthyle en bout de chaîne. Un excès d'amine est ensuite progressivement ajouté. Sur le deuxième spectre (b), les pics de méthylènes à 32,3 ; 29,8 et 23,0 sont plus fins et un nouveau pic à 13,9 ppm est présent. Il correspond au groupement méthyle. Ces pics sont certes plus fins que dans le spectre (a) mais ils restent plus larges que les pics du spectre de référence (e) de l'hexadécylamine libre. Après une nouvelle addition de HDA, trois pics supplémentaires sont observés sur les spectres (c) et (d) à 42,7 ; 34,5 et 27,3 ppm correspondant aux carbones en positions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Ces pics sont, eux aussi, plus larges que les pics du spectre de HDA de référence. Ces différences de largeurs de pics, d'un spectre à l'autre, sont caractéristiques d'un équilibre rapide, à l'échelle de la RMN, entre deux espèces : HDA libre et HDA coordinée. De plus, l'absence des signaux des carbones  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et du méthyle sur les spectres (a) et (b) suggère également qu'à faible quantité de HDA, la surface des NPs est

recouverte par les ligands et que les groupements méthyles sont liés à la surface métallique par le biais d'une interaction agostique. L'addition de HDA provoque ensuite l'éloignement des groupements méthyles de la surface de NPs par les groupements amines et donc l'apparition sur les spectres (b), (c) et (d) du signal à 13,9 ppm. Finalement, ces analyses RMN en solution permettent de mettre en évidence le processus dynamique qui a lieu à la surface des NPs en présence du ligand HDA (Figure 54).

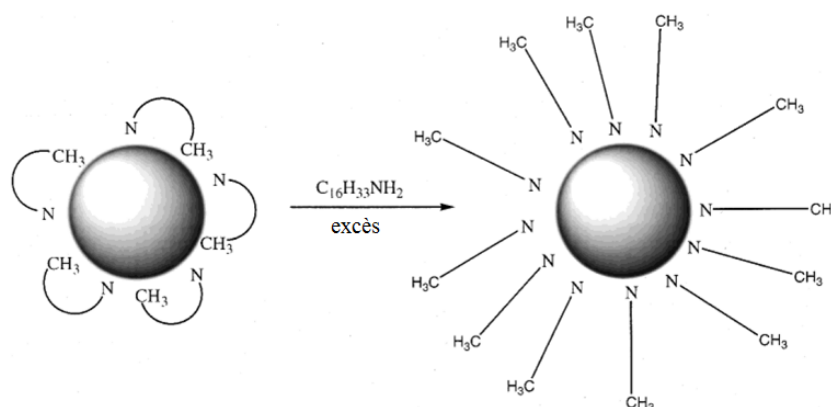


Figure 54 : Modes de coordination possibles de l'hexadécylamine sur les particules de ruthénium en fonction de la concentration en amine<sup>85</sup>.

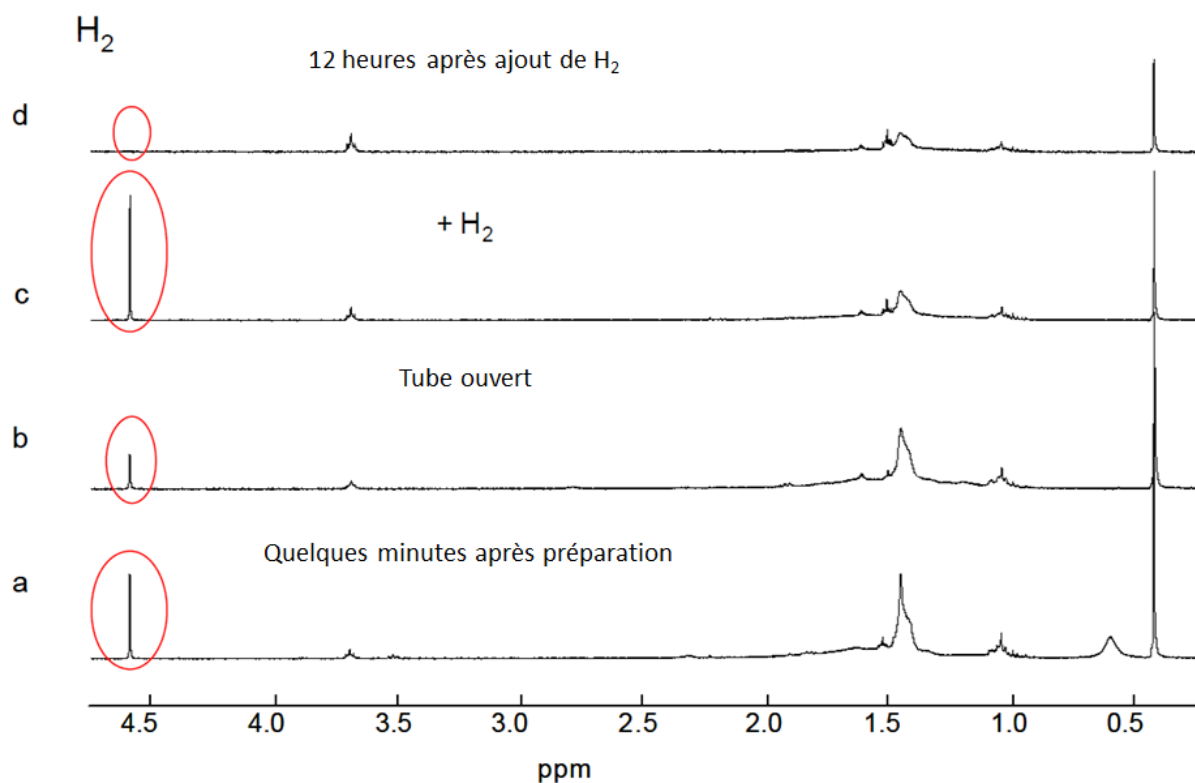
## I. B. 2. c) L'incorporation de deutérium sur les NPs de Ru

En 2005, l'équipe de Chaudret utilise diverses méthodes RMN, en particulier la RMN <sup>2</sup>H à l'état solide, afin de mieux comprendre les interactions de l'hydrogène avec les NPs de ruthénium<sup>86</sup>.

### I. B. 2. c) i- Étude RMN <sup>1</sup>H en solution

L'étude a lieu sur le colloïde Ru-HDA décrit en 2001 (cf. I. B. 2. b). Tout d'abord, le colloïde Ru-HDA fraîchement préparé est dissout dans du THF-*d*<sub>8</sub> pour une analyse RMN <sup>1</sup>H. Le spectre obtenu présente un pic à 4,6 ppm, avec un temps de relaxation *T*<sub>1</sub> de 2,1 s, caractéristique de H<sub>2</sub> dissout libre (Figure 54, spectre a). Une fois le tube RMN ouvert, ce signal diminue. Mais, il augmente à nouveau après addition de H<sub>2</sub>. Cette analyse suggère donc une désorption partielle en H<sub>2</sub> de la surface de ruthénium (Figures 55).

<sup>86</sup> T. Pery, K. Pelzer, G. Buntkowsky, K. Philippot, H.-H. Limbach, B. Chaudret, *ChemPhyschem* **2005**, 6, 605–607.



Figures 55 : RMN  $^1\text{H}$  en solution du colloïde Ru-HDA-*h* (THF- $d_8$ , 400 MHz) avec l'évolution du pic de  $\text{H}_2$ <sup>86</sup>.

### I. B. 2. c) ii- Étude RMN $^1\text{H}$ en phase gaz

Dans un deuxième temps, le colloïde Ru-HDA est introduit dans un tube RMN et gardé sous vide, à température ambiante, pendant deux jours. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de la phase gaz présente alors un unique pic à 0,77 ppm correspondant à l'eau sous forme de gaz à l'extérieur du tube (Figure 56, spectre a). Ce dernier est ensuite rempli de  $\text{D}_2$  (800 mbar, température ambiante). Le spectre présente alors un nouveau pic à 4,5 ppm de largeur 230 Hz correspondant à HD, dont l'atome d'hydrogène provient du colloïde. On en déduit que  $\text{D}_2$  est activé par la nanoparticule et que la recombinaison avec des atomes d'hydrogène conduit à la désorption de HD et donc à la deutération du colloïde (Figure 56, spectres b et c).

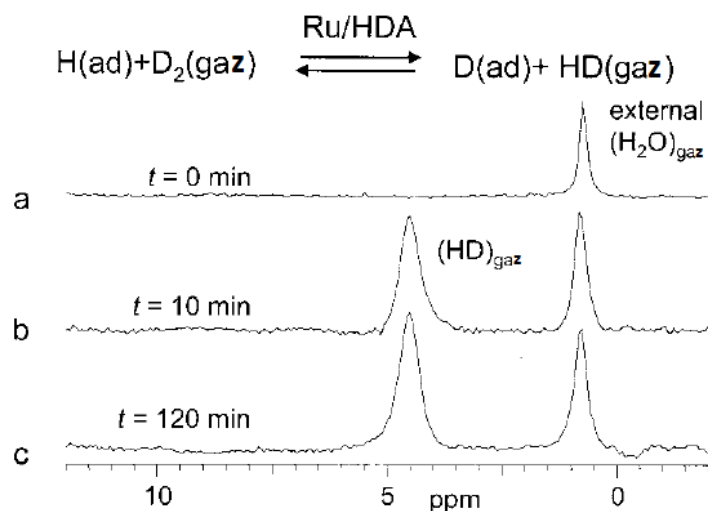
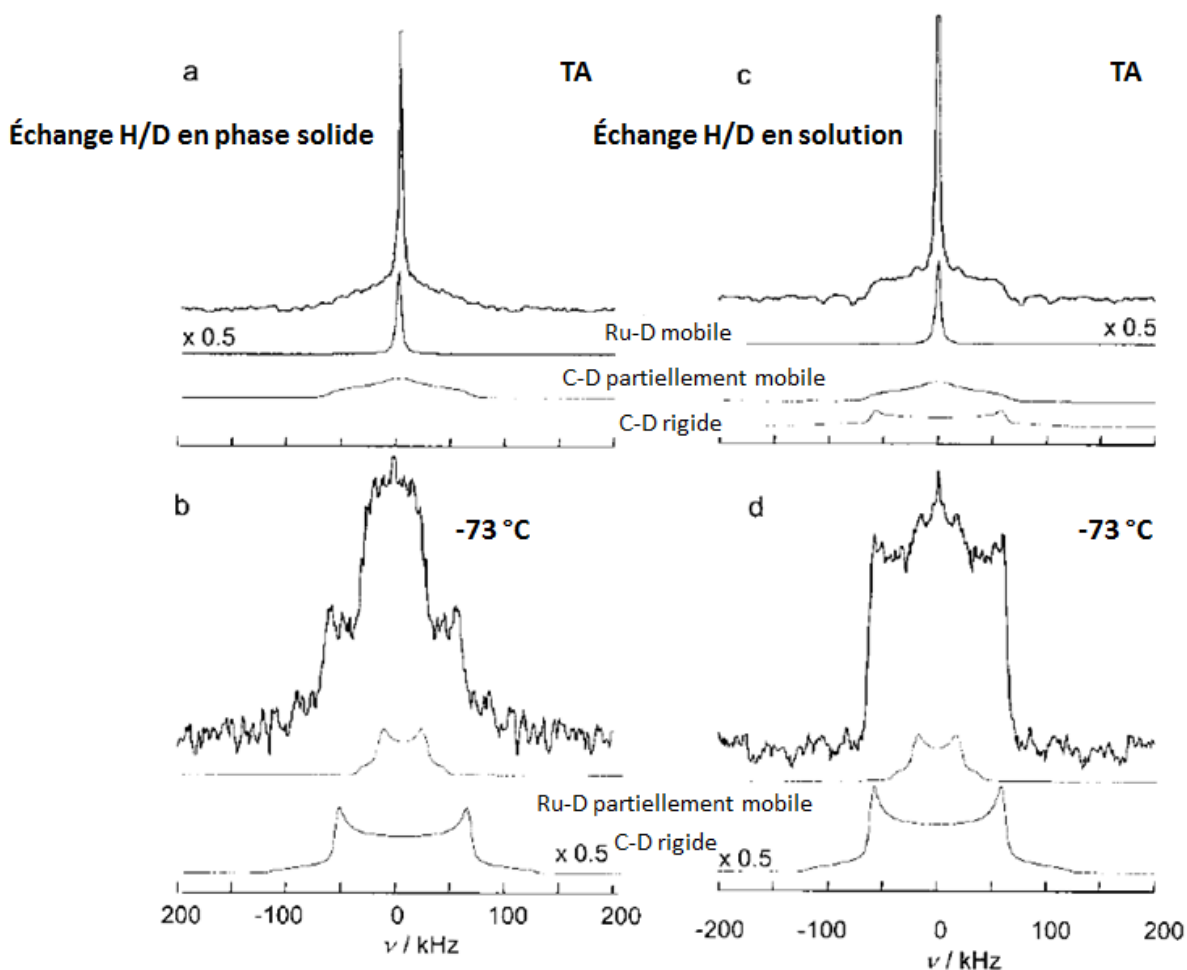


Figure 56 : RMN  $^1\text{H}$  en phase gaz du colloïde Ru-HDA-*h* (500 MHz) après réaction avec  $\text{D}_2$ , avec l'évolution du pic de HD<sup>86</sup>.

### I. B. 2. c) iii- Étude RMN $^2\text{H}$ à l'état solide

Dans un troisième temps, l'analyse RMN  $^2\text{H}$  à l'état solide du colloïde Ru-HDA-*d* (Ru-HDA après échange H/D), à température ambiante, permet d'observer un signal constitué d'un pic fin et d'un massif large. La même analyse à  $-73\text{ }^\circ\text{C}$  présente, elle aussi, deux signaux superposés, mais de forme différente (de type Pake<sup>87</sup>). Par comparaison avec des spectres modèles, il est alors possible d'assigner le pic central fin à des liaisons Ru-D (D étant mobile) et le massif large à des liaisons C-D rigides à partiellement rigides (Figures 57a-b). Le deutérium est donc bien incorporé sur la chaîne aliphatique du ligand HDA.

<sup>87</sup> G. E. Pake, *J. Chem. Phys.* **1948**, 16, 327.



Figures 57 : RMN  $^2\text{H}$  en phase solide du colloïde Ru-HDA (45.7 MHz) après échange H/D à l'état solide (a-b) et en solution (c-d)<sup>86</sup>.

Un dernier échantillon est ensuite préparé et analysé : directement après la préparation du colloïde Ru-HDA dans le THF,  $\text{D}_2$  gaz est introduit en solution (2 heures, 1 bar, température ambiante). L'analyse RMN  $^2\text{H}$  à l'état solide présente de nouveau des signaux caractéristiques des liaisons Ru-D et C-D, mais la part en liaisons C-D est beaucoup plus importante que la part en liaisons Ru-D (Figures 57c-d). Il s'agit de la première détection d'atomes de deutérium liés à des NPs de métal. Les ligands HDA coordonnés aux nanoparticules de Ru coexistent avec des ligands H ou D mobiles et réactifs. Ces derniers peuvent être impliqués dans la réaction d'échange H/D avec les ligands HDA, probablement par un mécanisme classique d'addition oxydante/élimination réductrice (Figure 58).

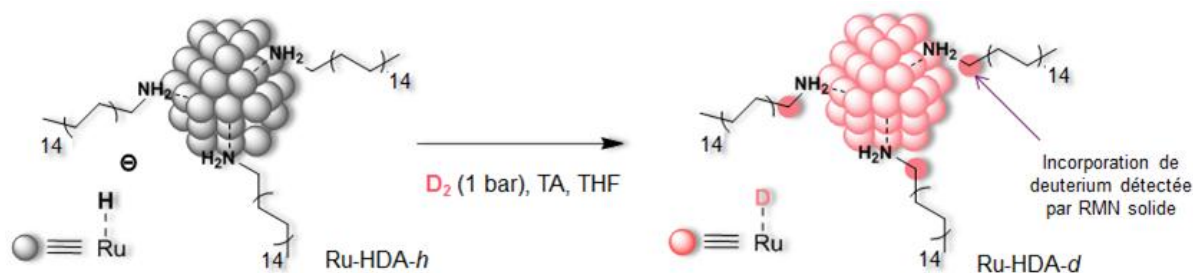


Figure 58 : Échange H/D entre surface des nanoparticules de ruthénium et ligands HDA coordonnés.

## I. C. Objectifs de la thèse

La deutération sélective de molécules azotées est étudiée de manière intensive car l'atome d'azote est présent dans de nombreux composés biologiquement actifs. En 2012, les équipes de Schnürch et Beller ont chacune développé une méthode de deutération, par échange H/D de composés azotés. La première repose sur la deutération de dérivés d'indoles et de pyridines à l'aide du complexe commercial  $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ . La seconde méthode permet la deutération d'amines tertiaires et secondaires à l'aide du catalyseur de Shvo. Ces deux méthodes de deutération sont régiosélectives (en position  $\alpha$  et  $\beta$  de l'atome d'azote), mais elles requièrent des températures de réaction élevées (115 °C à 150 °C). Ces températures élevées peuvent conduire à des sous-produits de réaction voire à la dégradation de substrats fragiles. De plus, ces méthodes n'ont pas été appliquées sur des composés chiraux.

Par conséquent, le développement d'une méthode de deutération chimio-, régio- et stéréospécifique, applicable à une large variété de substrats, est toujours nécessaire.

Des études RMN  $^1\text{H}$  en solution et en phase gaz, ainsi que des études RMN  $^2\text{H}$  à l'état solide, pour mieux comprendre la chimie de surface des nanoparticules de ruthénium préparées par l'équipe de Bruno Chaudret montrent que le traitement de ces nanoparticules sous atmosphère de  $\text{D}_2$  conduit à l'incorporation de deutérium sur des ligands amines lié à la surface des RuNPs. Cette incorporation a lieu dans des conditions douces (0,8 bar de  $\text{D}_2$  gaz, température ambiante).

Le premier objectif de ma thèse était donc d'évaluer l'activité catalytique des nanoparticules de ruthénium envers la réaction d'échange H/D, par activation C-H, sur des substrats azotés.

Ce travail d'évaluation a été réalisé avec le Dr. Grégory Pieters, chercheur postdoctoral au laboratoire quand j'ai débuté ma thèse, et a conduit au développement d'une nouvelle méthode efficace d'échange H/D permettant la deutération de dérivés de pyridine, quinoline,

indole et d'amines alkylées, ainsi que de composés complexes biologiquement actifs, à l'aide des nanoparticules RuNp@PVP en tant que catalyseur et D<sub>2</sub> en tant que source isotopique.

## **II. La deutération régiosélective de composés azotés catalysée par RuNP@PVP**





# **II. La deutération régiosélective de composés azotés catalysée par RuNP@PVP**

En 2014, notre équipe démontre que l'utilisation de nanoparticules de ruthénium de l'équipe de Chaudret permet la deutération douce (1 à 2 bar de D<sub>2</sub> gaz, à température ambiante ou 55 °C), efficace et sélective d'une large gamme de composés azotés tels que des pyridines, quinolines, indoles et des amines alkylées (primaires, secondaires et tertiaires)<sup>88</sup>. Le choix du catalyseur s'oriente vers RuNP@PVP, considérée comme une « particule nue », afin de faciliter l'interaction entre les substrats et la surface réactive de Ru. L'application de cette nouvelle méthode est également étendue au marquage de huit composés bioactifs, certains de ces composés contenant des centres stéréogènes.

## **II. A. Échange H/D catalysé par RuNP@PVP sur des molécules azotées**

Les deutérations sont effectuées en présence de 3 % de RuNP@PVP, dans le THF, sous atmosphère de D<sub>2</sub> (1 ou 2 bar) (Figure 59).

---

<sup>88</sup> G. Pieters, C. Taglang, E. Bonnefille, T. Gutmann, C. Puente, J.-C. Berthet, C. Dugave, B. Chaudret, B. Rousseau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 230–234.

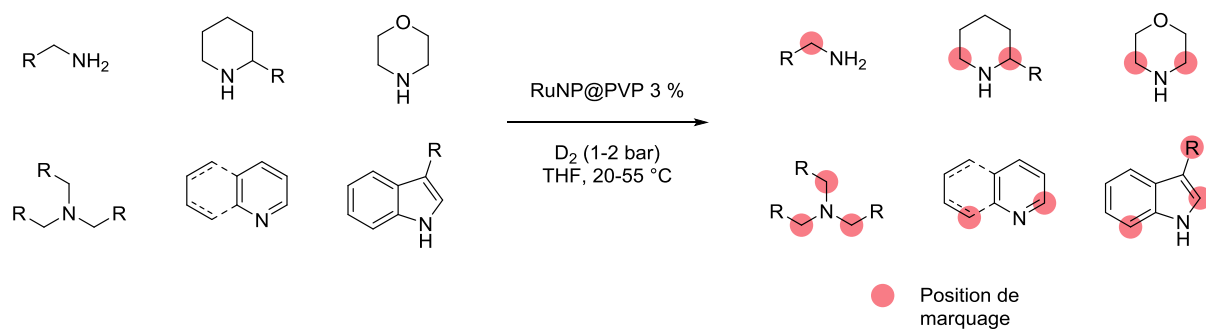


Figure 59 : Étendue de la réaction de deutération et positions marquées.

Les dérivés de pyridines **24**, **25**, et la 2-phénylpyridine stériquement encombrée **26** sont deutérés régiosélectivement avec un fort enrichissement isotopique (Tableau 4). Pour les quinolines **27** et **28**, l'activation C-H a lieu régiosélectivement avec une grande incorporation en deutérium. Cependant, la formation concomitante de tétrahydroquinoline marquée (environ 50 %) est également observée.

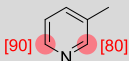
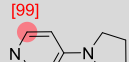
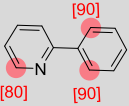
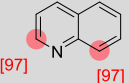
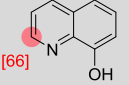
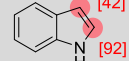
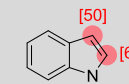
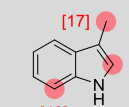
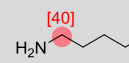
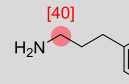
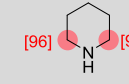
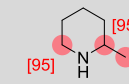
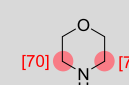
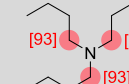
Produit	Structure	Méthode	Nombre moyen de D
24		A	1,7
25		B	2,0
26		B	2,7
27		A	2,0
28		A	0,7
29		B	1,4
30		B	1,1
31		C	1,9
32		B	0,8
33		B	0,8
34		C	3,9
35		C	4,3
36		C	2,8
37		C	5,6

Tableau 4 : Deutération catalytique régiosélective en présence de 3 % de RuNP@PVP, dans le THF, pendant 36 heures. Méthode A : D<sub>2</sub> (1 bar), TA ; méthode B : D<sub>2</sub> (1 bar), 55 °C ; méthode C : D<sub>2</sub> (2 bar), 55 °C.

Dans la série des indoles (composés **29-31**), RuNP@PVP catalyse également l'échange H/D avec une haute sélectivité, sans formation de sous-produit. Sur les composés **29** et **30**, l'activation C-H a lieu aux positions 2 et 3, tandis que l'on observe le marquage régiosélectif du scatol **31** sur trois positions. Cette différence de sélectivité entre l'indole et le scatol peut être expliquée par une différence de modes de coordination à la surface du ruthénium.

Dans le cas de l'hexylamine **32**, un échange H/D de seulement 20 % est observé en position  $\alpha$  de l'azote, à température ambiante, tandis qu'il atteint les 40 % à 55 °C. Des résultats similaires sont obtenus sur la 3-phényl-1-propanamine **33**. Des sous-produits non identifiés sont formés mais les amines primaires deutérées sont facilement isolables sous forme de sels de chlorhydrates.

Le marquage des amines secondaires et tertiaires est, quant à lui, très efficace. La pipéridine **34** est marquée sur ces positions 2 et 6, avec remplacement presque total des quatre atomes d'hydrogène par quatre atomes de deutérium. La 2-méthylpipéridine **35** est aussi deutérée sur les positions 2 et 6, et sur le groupement méthyle, incorporant jusqu'à six atomes de deutérium. La morpholine **36** est deutérée régiosélectivement en incorporant jusqu'à quatre atomes de deutérium, tandis que la tributylamine **37** est deutérée sur toutes les positions  $\alpha$  pour donner un composé hautement deutéré (jusqu'à six deutériums).

## **II. B. Échange H/D catalysé par RuNP@PVP sur des molécules biologiquement actives**

Suite aux résultats obtenus sur ces molécules modèles, la méthode est appliquée au marquage de composés biologiquement actifs contenant au moins un atome d'azote, les conditions douces utilisées pouvant, de plus, être adaptées au marquage de composés chiraux complexes.

La nicotine **38** et l'anabasin **39**, deux agonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, contenant des cycles azotés, sont deutérés régiosélectivement avec une forte incorporation en deutérium (Figure 60). L'échange exclusif sur le cycle pyridine peut s'expliquer par une plus forte affinité de l'azote de la pyridine pour la surface de ruthénium, comparée à celle des azotes de la pipéridine et de la pyrrolidine. Dans le cas de la nicotine **38**, la pureté énantiomérique reste inchangée après la deutération ( $[\alpha]_D^{25} = -180,1$  avant et  $-176,5$  ( $c = 0,5$  ;

CHCl<sub>3</sub>) après marquage). De plus, les conditions expérimentales douces permettent d'obtenir les composés deutérés purs par simple filtration du mélange réactionnel sur alumine.

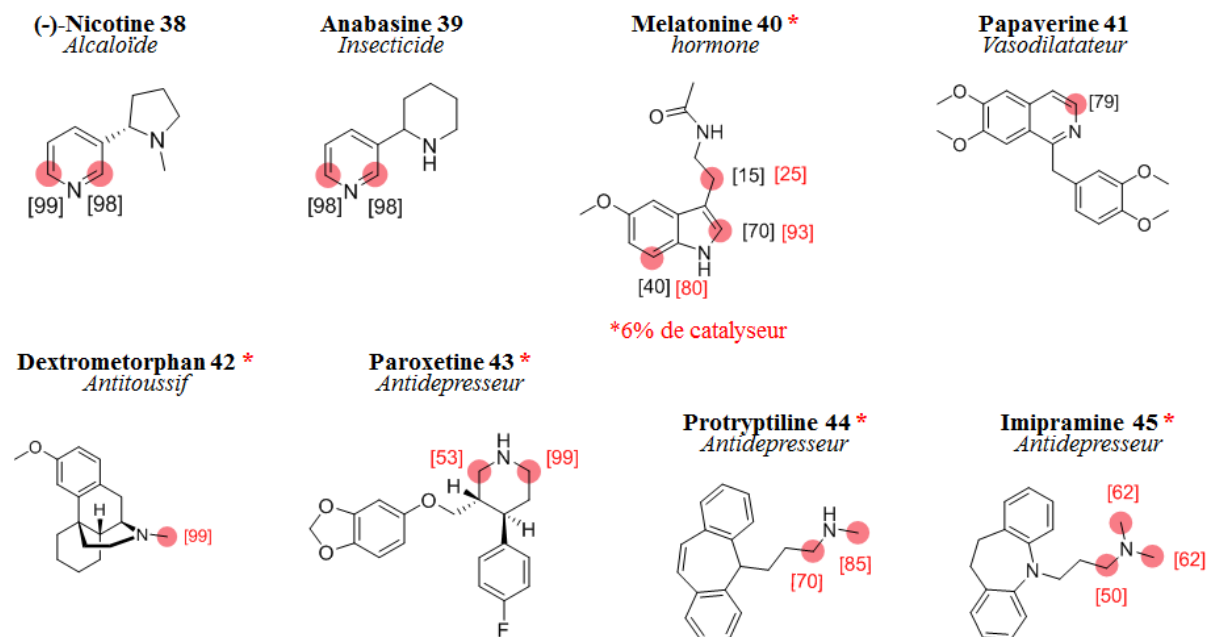


Figure 60 : Structures des molécules biologiquement actives marquées (méthode C).

La papavérine **41**, un médicament antispasmodique, est deutéré en position 2 à 79 %. La deutération de la mélatonine **40**, une hormone régulant les rythmes circadiens de diverses fonctions biologiques, a lieu sur les trois mêmes positions que celle observée sur le scatol. Le dextrométorphan **42** est deutéré sélectivement sur la position *N*-méthyle, avec l'incorporation de trois atomes de deutérium. Cette forte régiosélectivité peut s'expliquer par la faible accessibilité des autres positions en  $\alpha$  de l'azote intégré dans un cycle à six chaînons. Cette sélectivité suggère que la réaction d'échange H/D a lieu à la surface des RuNP et n'implique pas le relargage de Ru en solution. Ici aussi, aucune perte de pureté énantiomérique n'est détectée après deutération ( $[\alpha]_D^{25} = +65,1$  avant et  $+65,4$  ( $c = 1,0$  ; CHCl<sub>3</sub>) après marquage). L'imipramine **45**, un antidépresseur tricyclique de la famille des dibenzazépines, incorpore jusqu'à huit atomes de deutérium sur l'amine tertiaire alkylée. Dans ces six cas, aucun sous-produit n'est détecté, probablement grâce aux conditions de réaction douces utilisées. Les rendements en produits deutérés sont donc presque quantitatifs.

Jusqu'à cinq atomes de deutérium sont régiosélectivement incorporés sur la protriptyline **44**, un autre antidépresseur tricyclique. Bien que ce composé contienne une double liaison disubstituée susceptible d'être facilement réduite, une faible part de produit réduit est formée (environ 20 %). L'ancrage de la protriptyline à la surface des RuNPs, par interaction amine-

ruthénium, empêche probablement la réduction de la double liaison éloignée. À notre connaissance, aucun composé contenant une double liaison n'avait été auparavant marquée avec jusqu'à cinq atomes de deutérium par échange isotopique à l'aide de D<sub>2</sub> gaz. L'utilité de notre nouveau procédé d'activation C-H pour le marquage au deutérium est mise en évidence par le cas de la paroxétine **43**, un antidépresseur inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine. En effet, un brevet de 1993 décrit la synthèse de la paroxétine deutérée en sept étapes<sup>89</sup>. Notre méthode de marquage de cette même molécule ne requière qu'une seule étape, sans altération de la chiralité ( $[\alpha]_D^{25} = -78,5$  ( $c = 1,0$  ; CHCl<sub>3</sub>)).

L'utilisation de molécules deutérées comme standards internes pour des études de métabolomique requière un enrichissement isotopique élevé. Ces molécules doivent contenir au minimum deux atomes de deutérium et moins de 0,5 % de part non deutérée. Dans la plupart des cas, les conditions standards mises au point permettent d'obtenir des composés marqués remplissant ces critères. Dans le cas contraire, il est possible d'augmenter l'incorporation en deutérium de deux façons. Pour la mélatonine **40**, le doublement de la charge catalytique donne accès à un plus grand enrichissement isotopique, sans changement de sélectivité (sur la position 2, de 70 % à 93 %, sur la position 7, de 40 à 80 %, et sur la position aliphatique, de 15 à 25 %). Pour l'imipramine **45**, la répétition du procédé de deutération conduit à une proportion négligeable de molécules non- et monodeutérée.

## **II. C. Premières indications sur le mécanisme d'échange H/D catalysé par RuNP@PVP**

D'un point de vue mécanistique, notre première observation intéressante est que, dans les conditions douces de cette méthode, les liaisons C(sp<sup>2</sup>)-H et C(sp<sup>3</sup>)-H sont aussi bien deutérées les unes que les autres. La seconde observation concerne la forte régiosélectivité de la réaction. Aucune deutération n'a lieu près d'un oxygène donneur, tandis qu'un fort échange se produit sur les liaisons C-H au voisinage d'un atome d'azote. Ces résultats montrent clairement que le processus d'échange H/D repose sur la coordination directe de l'azote sur le ruthénium. L'affinité des éthers pour la surface de Ru est probablement trop faible pour initier

---

<sup>89</sup> C. M. Zepp, Y. Gao, D. L. Heefner, U.S. Patent 5,258,517, **1993**.

la réaction de deutération. Ces résultats sont similaires à ceux des études menées sur les catalyseurs organométalliques moléculaires où seuls les atomes d'hydrogène en  $\alpha$  de l'atome d'azote peuvent être activés. Ces résultats sont aussi comparables à ceux d'études plus anciennes sur les complexes métalliques, dont les complexes de Ru, où seules les atomes d'hydrogène *ortho* accessibles de la triphénylphosphine et de la triphénylphosphite sont échangés par *ortho*-métallation<sup>90</sup>. Cependant, l'accessibilité des sites de Ru sur les nanoparticules permet une efficacité beaucoup plus grande pour le processus d'activation C-H, ce qui démontre l'intérêt d'utiliser de tels nanoobjets organométalliques.

Les études précédentes de l'équipe de Chaudret ont montré que :

- la surface des RuNP@PVP était recouverte d'hydrures (1,5 atomes par Ru de surface)
- ces hydrures sont mobiles
- ces hydrures peuvent être échangés avec du deutérium présent en phase gaz<sup>91</sup>.

L'ensemble des observations suggère donc que les liaisons C-H en  $\alpha$  des atomes d'azotes sont rompues et reformées à la surface de Ru. De plus, nous avons vu précédemment que le caractère flexible des ligands azotés coordonnés conduisait à un échange dynamique entre ligands libres et ligands coordonnés (cf. I. B. 2. b). Cet échange est à l'origine du processus catalytique observé.

## II. D. Conclusions

La méthode d'échange H/D développée par notre équipe permet la deutération de pyridines, quinolines, indoles et amines alkylées à l'aide de nanoparticules RuNP@PVP en tant que catalyseur et de D<sub>2</sub> en tant que source isotopique. Par cette procédure simple et générale impliquant des conditions de réaction douces et un traitement par simple filtration, vingt-deux composés ont été marqués isotopiquement, avec de bons rendements et de fortes chimio- et régiosélectivités. La viabilité de cette procédure a été démontrée par le marquage de huit composés biologiquement actifs. On observe une conservation de la pureté énantiomérique même si le marquage a lieu au voisinage du centre asymétrique. L'enrichissement isotopique est adapté pour des études de métabolomique dans la plupart des cas. De plus, cette approche

---

<sup>90</sup> G. W. Parshall, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 113–117.

<sup>91</sup> a) I. Favier, S. Massou, E. Teuma, K. Philippot, B. Chaudret, M. Gómez, *Chem. Commun.* **2008**, 3296–3298. b) T. Gutmann, I. del Rosal, B. Chaudret, R. Poteau, H.-H. Limbach, G. Buntkowsky, *Chemphyschem* **2013**, *14*, 3026–3033. c) P.-J. Debouttière, Y. Coppel, A. Denicourt-Nowicki, A. Roucoux, B. Chaudret, K. Philippot, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 1229–1236. d) P. Lara, K. Philippot, B. Chaudret, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 28–45.



est parfaitement appropriée pour le marquage au tritium car il utiliserait  $T_2$  gaz comme source isotopique.

En plus de ces applications sur des molécules d'intérêt biologique, cette méthode révèle une chimie riche et encore sous-estimée à la surface des nanoparticules de Ru, réactifs potentiels pour la chimie organique.

Dans la suite de ces travaux de thèse, notre objectif est d'étendre la méthode à de nouveaux composés naturels : les aminoacides, possédant un squelette commun avec un centre stéréogène en  $\alpha$  de l'azote mais variant en termes de chaîne latérale, et les peptides. En effet, sur les molécules marquées précédemment, l'activation C-H a lieu sur des groupements méthyles ou méthylènes, mais jamais sur un centre stéréogène. Pour étudier la stéréochimie d'une telle transformation, les aminoacides nous semblent être d'excellents candidats :

- leur diversité moléculaire offre la possibilité de travailler avec des molécules solubles ou non dans l'eau et d'évaluer la compatibilité chimique de la méthode
- ils jouent un rôle essentiel en biochimie.

De plus, les aminoacides deutérés (non-protéinogènes et dérivés) ont d'importantes applications (cf. I. A. 1). Comme les aminoacides ne sont pas solubles dans le THF, notre stratégie initiale consiste à appliquer, sur les aminoesters, nos conditions de réaction déjà mises au point précédemment pour le marquage de dérivés azotés (Figure 61).

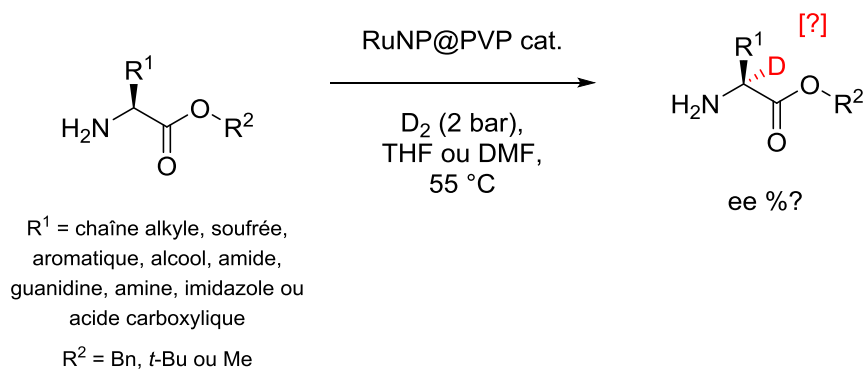


Figure 61 : Stratégie de marquage initiale : application des RuNP@PVP au marquage au deutérium d'ainoesters.

Le deuxième objectif est de mieux comprendre le mécanisme mis en jeu lors de l'échange H/D, par l'approche expérimentale d'un côté et des calculs théoriques de l'autre, en collaboration avec l'équipe de Romuald Poteau. En effet, cette dernière est capable de proposer un modèle quantique pour les RuNP (Figure 62), en s'appuyant sur les caractérisations RMN et MET de l'équipe de Bruno Chaudret.

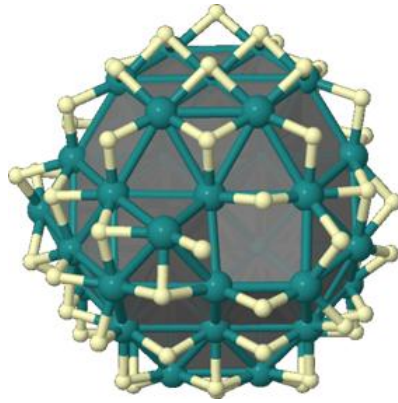


Figure 62 : Modèle  $\text{Ru}_{55}$  (1 nm) pour  $\text{RuNP@PVP}$ , avec 1,6 D par  $\text{Ru}_{\text{surface}}$ . Atomes de Ru en vert, deutériures en jaune.



### **III. Application des RuNP@PVP au marquage au deutérium d'acides amino et de peptides**



# III. Application des RuNP@PVP au marquage au deutérium d'acides aminés et de peptides

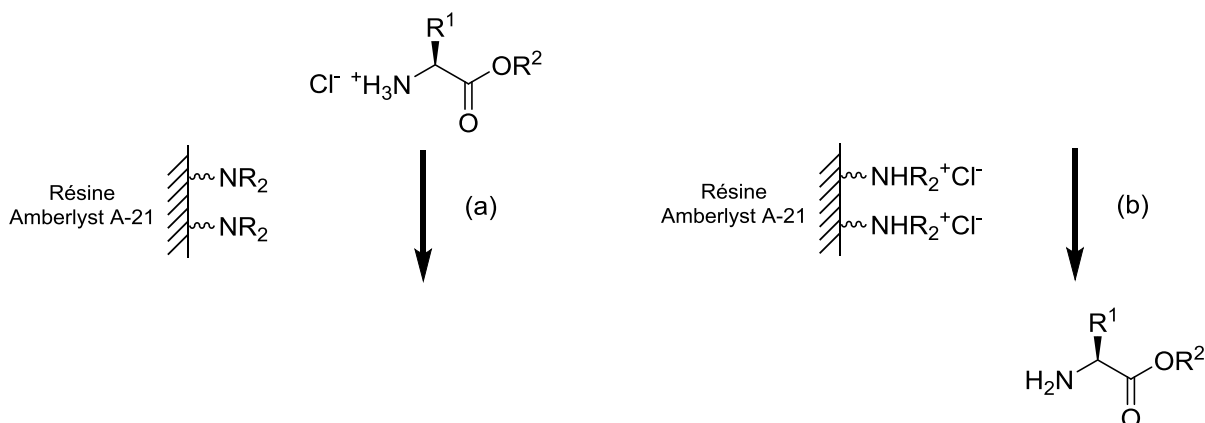
À partir des nanoparticules RuNP@PVP préparées par l'équipe de Bruno Chaudret, nous avons pu développer une méthode de deutération, par activation C-H, de molécules azotées. Cependant, cette méthode de marquage, douce et sélective, a été appliquée uniquement sur des groupements méthyles et méthylènes. Cette méthode n'a pas encore été appliquée sur un centre stéréogène. Nous avons donc décidé de tester notre nouvelle méthode sur des centres chiraux, en particulier les C<sub>α</sub> qui sont contenus dans les acides aminés qui représentent des substrats intéressants.

Peut-on appliquer notre nouvelle méthode de marquage sur le C<sub>α</sub> d'un acide aminé sans provoquer de racémisation ou d'inversion de configuration ?

## III. A. Stratégie de marquage 1 (aminoesters)

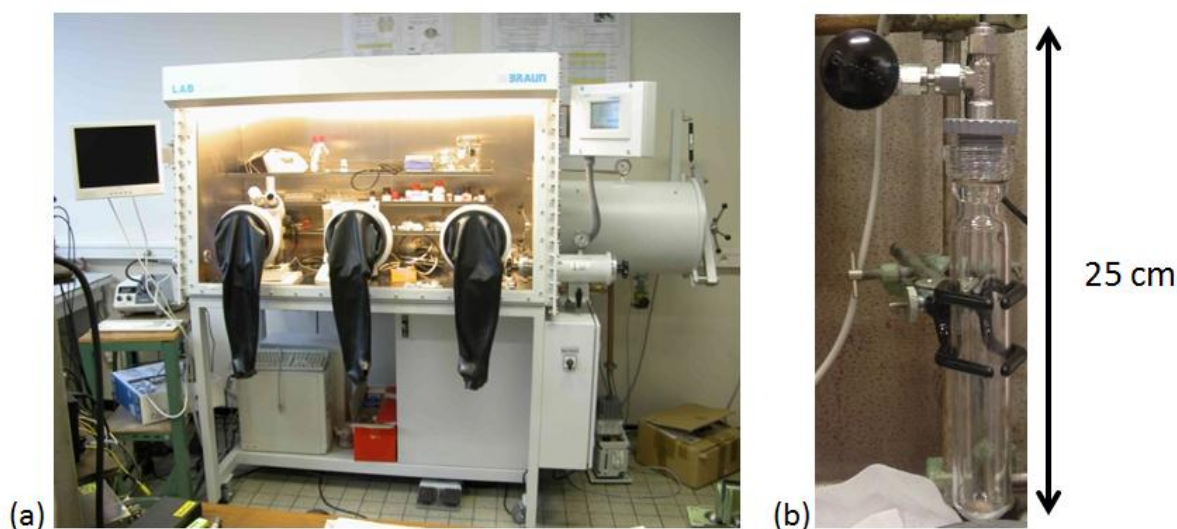
Les acides aminés aromatiques (L-phénylalanine, L-tyrosine et L-tryptophane) étant faiblement solubles dans le THF, nous décidons d'appliquer notre procédure de marquage catalysé aux RuNP@PVP sur leurs dérivés aminoesters : la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester, la L-phénylalanine benzyl ester et le L-tryptophane benzyl ester.

Ces trois composés sont vendus sous forme de chlorures par Aldrich et Bachem. Comme nous supposons que la coordination de l'atome d'azote sur le ruthénium est la condition primordiale pour la réaction d'échange H/D, nous réalisons un pré-traitement de ces réactifs commerciaux, par passage sur résine échangeuse d'ions Amberlyst A-21 afin d'obtenir les aminoesters sous forme d'amine libre (Figure 63).



Figures 63 : Pré-traitement des aminoesters commerciaux sur Amberlyst A-21. (a) Dissolution de l'ainoester dans le DCM et passage sur résine. L'ion chlorure est fixé sur la résine. (b) Lavage de la résine au DCM et obtention de l'ainoester sous forme d'amine libre.

Les nanoparticules de ruthénium sont conservées en boîte à gant, sous atmosphère d'argon ( $\text{O}_2 < 0,1$  ppm). Toute manipulation des nanoparticules (synthèse et catalyse) a donc lieu soit en boîte à gants soit dans une verrerie Fischer&Porter (Figures 64).



Figures 64 : (a) Boîte à gants dans laquelle sont stockées les nanoparticules. (b) Bouteille Fischer&Porter dans laquelle a lieu la réaction de deutération.

### III. A. 1. Procédure de deutération des aminoesters catalysée par RuNP@PVP

La deutération est réalisée sur une solution de substrat (0,15 mmol) dans le THF ou le DMF (2 mL), en présence de RuNP@PVP, à 55 °C, sous pression de  $\text{D}_2$  (2 bar), pendant 36 heures.

Le mélange réactionnel est ensuite recueilli dans une seringue et filtré sur alumine ou résine échangeuse d'ions Dowex 50W-X8.

À l'issue de l'étape de marquage, l'aminoester est débenzylé ou hydrolysé pour donner l'aminoacide correspondant. L'incorporation en deutérium est quantifiée par deux méthodes complémentaires : la spectrométrie de masse et la RMN  $^1\text{H}$ . La diminution de l'intégration des signaux correspondant aux positions marquées comparée à l'intégration sur les signaux du spectre du composé de départ (non marqué) permet de déterminer l'enrichissement isotopique. Enfin, l'analyse HPLC avec une phase stationnaire chirale permet de déterminer l'excès énantiomérique, par comparaison des chromatogrammes de l'aminoacide marqué et du mélange racémique commercial (50 % forme L + 50 % forme D).

### III. A. 2. Cas de la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester **46**

La deutération de la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester **46** est réalisée en présence de 3 % de RuNP@PVP, sous  $\text{D}_2$  (2 bar), dans le THF à 55 °C, pendant 36 heures. Après filtration sur alumine (sur laquelle le catalyseur et le PVP restent fixés) et évaporation du solvant, l'aminoester deutéré **47** est obtenu avec un rendement de 43 % (Figure 65).

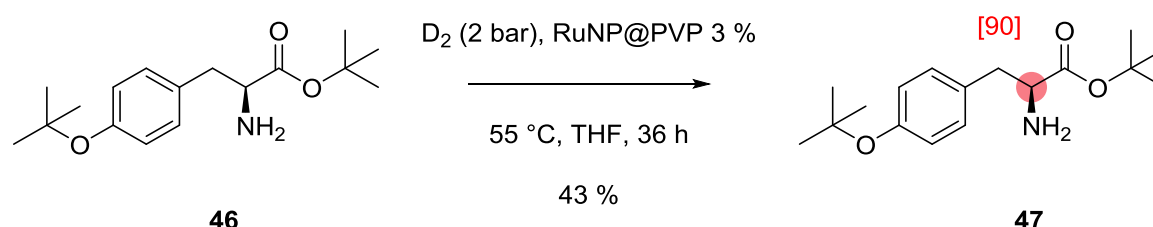
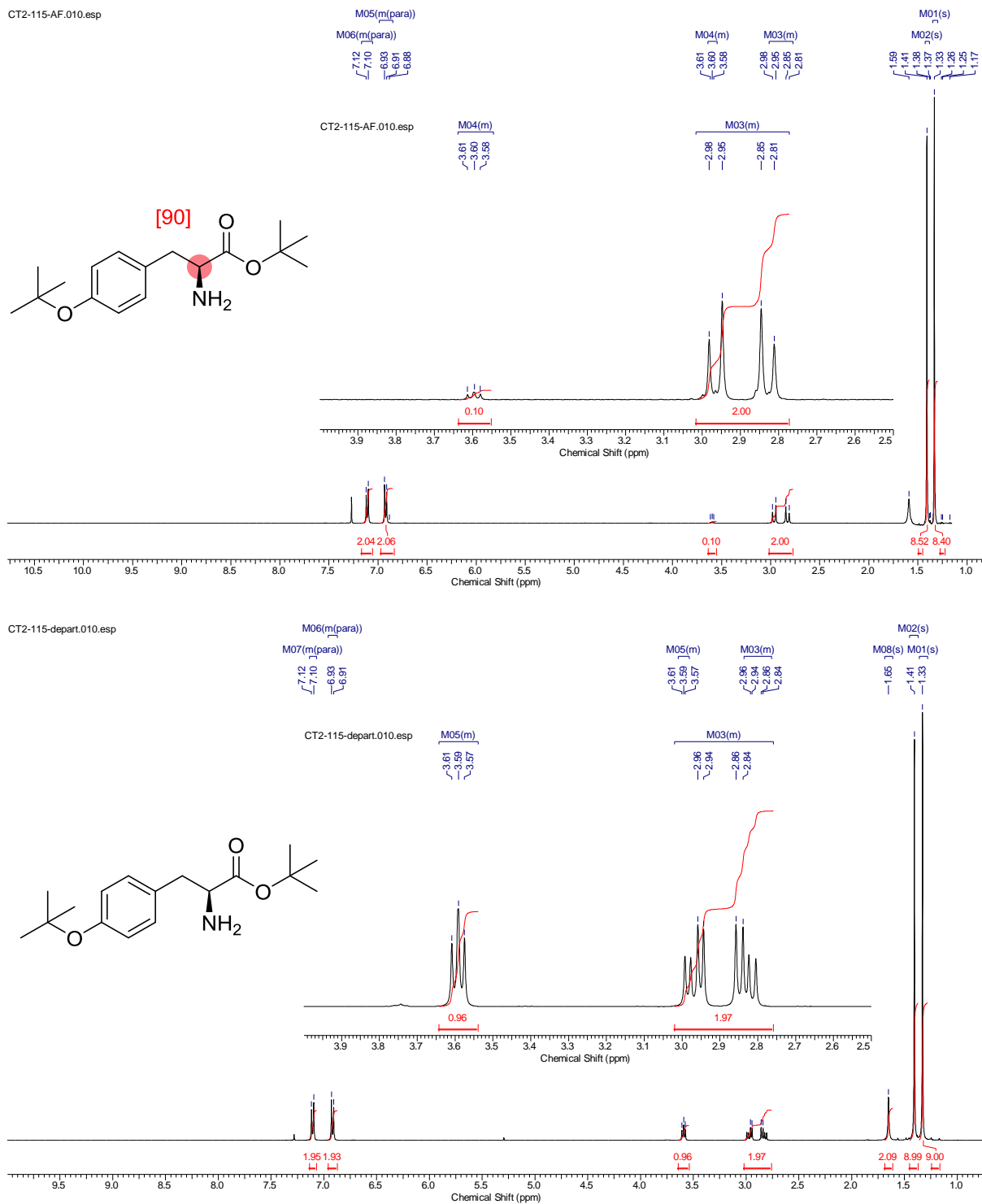


Figure 65 : Marquage du dérivé ester de la L-tyrosine à l'aide de RuNP@PVP.

Les analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  montrent qu'à la suite d'une simple filtration le produit deutéré est obtenu avec une pureté élevée et que l'échange H/D a lieu régiosélectivement sur la position en  $\alpha$  de l'azote. La comparaison des intégrations du signal correspondant à cette position (3,60 ppm en RMN  $^1\text{H}$ ), sur les spectres du produit deutéré et du substrat de départ, permet de déterminer l'enrichissement isotopique à 90 % (Figures 66). Cette valeur de l'enrichissement isotopique est confirmée par la spectrométrie de masse (cf. partie expérimentale).





Figures 66 : Comparaison des spectres RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester deutérée **47** et de la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester de départ **46** (sous forme d'amine libre).

L'ainoester **47** est ensuite hydrolysé ( $\text{HCl}$  6M, reflux, 3 heures) afin de former l'ainoacide **48** correspondant, avec un rendement de 85 % (Figure 67).

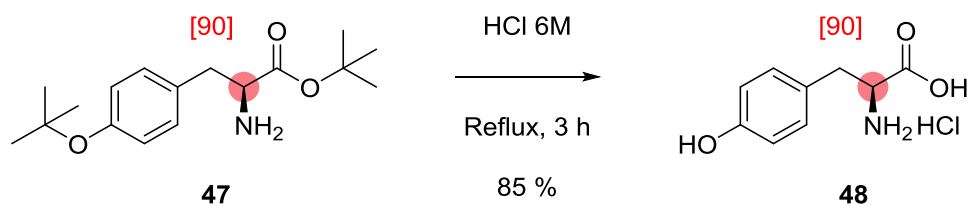


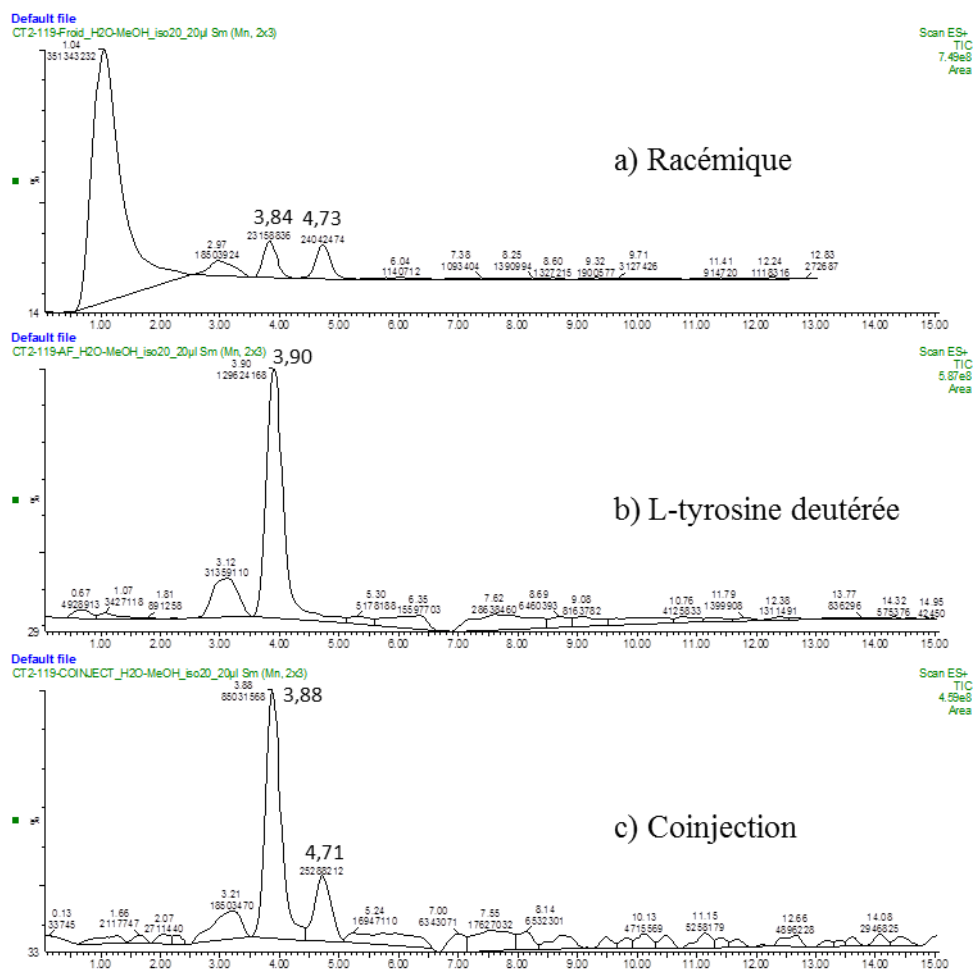
Figure 67 : Hydrolyse de la L-tyrosine *tert*-butyl éther *tert*-butyl ester deutérée 47.

Les analyses RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  montrent que la position en  $\alpha$  de l'azote est toujours marquée. L'intégration du signal correspondant à cette position en RMN  $^1\text{H}$ , et l'analyse par spectrométrie de masse confirment que l'enrichissement isotopique n'a pas été altéré (90 %) (cf. Partie expérimentale).

Il est donc possible de réaliser une deutération régiosélective sur le centre stéréogène d'un aminoester, avec une forte incorporation en deutérium. Mais qu'en est-il de la configuration du carbone  $\alpha$  à l'issue de la réaction d'échange H/D ?

L'analyse HPLC avec une phase stationnaire chirale de l'acide aminé deutéré permet d'obtenir une réponse rapide<sup>92</sup> (Figures 68).

<sup>92</sup> J. E. Claus, *Reporter* **2011**, 3041, 8–9.



Figures 68 : Chromatogrammes HPLC. (a) Tyrosine racémique commerciale. (b) L-tyrosine deutérée. (c) Coinjection (racémique:L-tyrosine deutérée 50:50).

Après comparaison des chromatogrammes, on peut constater que la réaction d'échange H/D n'altère pas l'énantiopureté de la molécule deutérée. Notre méthode de marquage est donc énantiospécifique.

### III. A. 3. Cas de la L-phénylalanine benzyl ester 49 et du L-tryptophane benzyl ester 52

Après avoir démontré l'efficacité, la régiosélectivité et l'énantiospécificité de notre méthode de marquage, sur l'ester de tyrosine 47, nous décidons d'étendre la méthode sur les esters de phénylalanine 49 et de tryptophane 52. Pour ces deux substrats, nous utilisons le DMF, pour qu'ils soient le mieux solubilisés possible, ainsi que 9 % de RuNP@PVP, pour atteindre de meilleurs enrichissements isotopiques. La débenzylation des aminoesters deutérés 50 et 53

(H<sub>2</sub>, Pd/C, eau/MeOH, 2 heures) permet ensuite d'obtenir les aminoacides **51** et **54** correspondants (Figure 69).

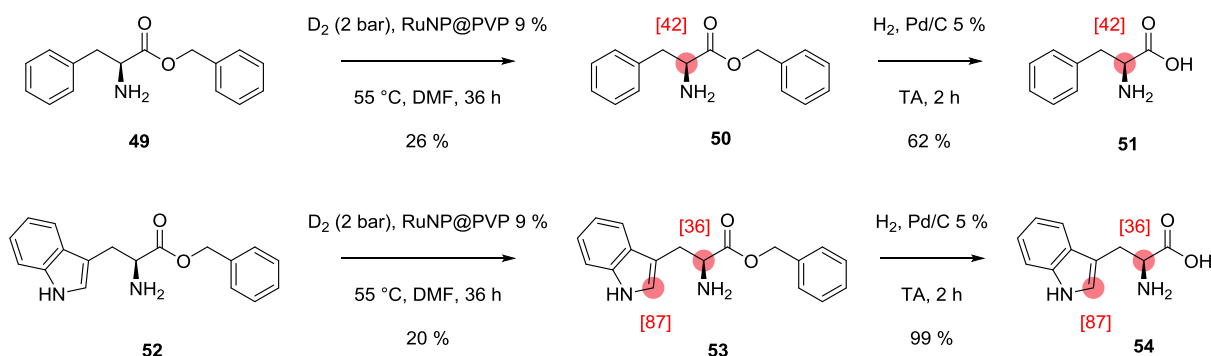


Figure 69 : Deutérations de la L-phénylalanine benzyl ester et du L-tryptophane benzyl ester suivies de la formation des aminoacides correspondants.

Les analyses RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C permettent de confirmer, là encore, que la deutération est régiosélective. L'analyse HPLC avec une phase stationnaire chirale confirme également que la configuration du C<sub>α</sub> est toujours conservée (cf. partie expérimentale).

Les conditions mises au point sont donc adaptées aux dérivés d'aminoacides aromatiques. Nous tentons alors d'étendre notre technique aux autres dérivés esters d'aminoacides protéinogènes. Malheureusement, sur les dix-sept autres dérivés testés, seuls sept présentent des spectres RMN et des spectres de masse exploitables. Sur ces sept aminoesters marqués, cinq présentent un enrichissement isotopique supérieur à 50 % (Figure 70).

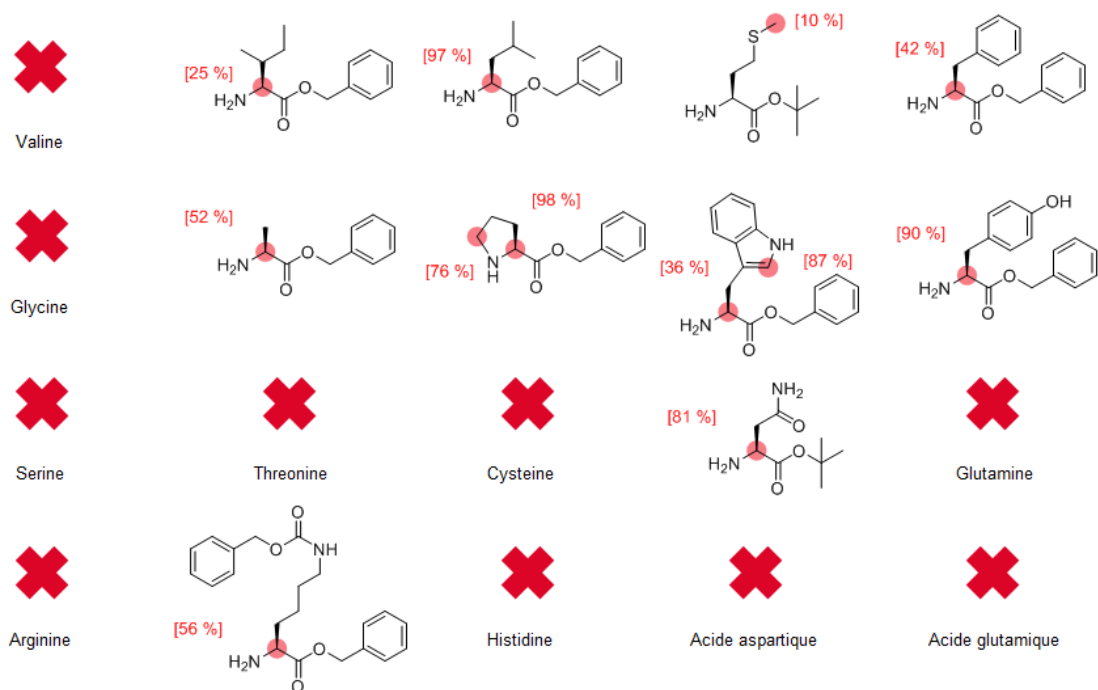


Figure 70 : Résultats du screening de deutération avec RuNP@PVP sur des dérivés aminoesters d'acides aminés protéinogènes. Les croix rouges indiquent les substrats qui se sont dégradés ou dont les rendements trop faibles ne permettent pas d'obtenir d'analyse RMN exploitable.

L'échec des échanges H/D sur les dix autres dérivés s'expliquent par deux raisons :

- leur faible solubilité dans le THF
- une réaction en compétition avec la réaction d'échange H/D.

En effet, il semblerait que les conditions de réaction utilisées favorisent la réaction d'hydrolyse de l'ester et donc la formation de l'acide aminé correspondant. L'acide aminé formé n'étant pas soluble dans le THF, il reste alors sur l'alumine et n'est pas recueilli. De plus, cette réaction d'hydrolyse doit empêcher la réaction d'échange H/D d'avoir lieu, d'où les faibles rendements et enrichissements isotopiques obtenus.

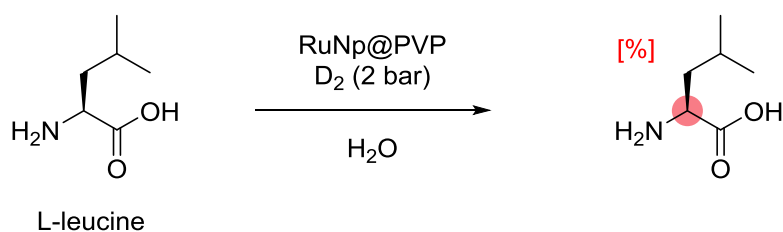
La mise au point de nouvelles conditions de réaction est donc nécessaire pour parvenir au marquage des acides aminés non-aromatiques protéinogènes.

## **III. B. Stratégie de marquage 2 (aminoacides)**

Peut-on appliquer notre méthode de marquage par échange H/D catalysée par RuNP@PVP sur un aminoacide dans l'eau ?

### **III. B. 1. Échange H/D sur la L-leucine dans l'eau**

Nous décidons d'effectuer divers essais de marquage sur la L-leucine à l'aide de RuNP@PVP, sous D<sub>2</sub> (2 bar), dans l'eau, en faisant varier la température (TA ou 90 °C), la durée de la réaction (36, 60 ou 84 h) et la charge catalytique (3 ou 9 %) (Tableau 5). Nous constatons qu'il est bien possible de réaliser l'échange H/D dans l'eau : avec RuNP@PVP 3 %, à température ambiante, pendant 60 heures, la L-leucine présente un enrichissement isotopique de 35 % (Entrée 1). Avec RuNP@PVP 3 %, à 90 °C, pendant 36 heures, la L-leucine présente un enrichissement isotopique de 31 % (Entrée 2). De plus, le marquage reste régiosélectif (sur le C<sub>α</sub>) et énantiospécifique.



Entrée	RuNP@PVP (%)	Température (°C)	Temps (h)	Enrichissement isotopique [%]	Rdt (%)
1	3	TA	60	35	50
2	3	90	36	31	50
3	3	90	84	38	40
4	9	TA	36	38	70
5	9	90	36	15	75

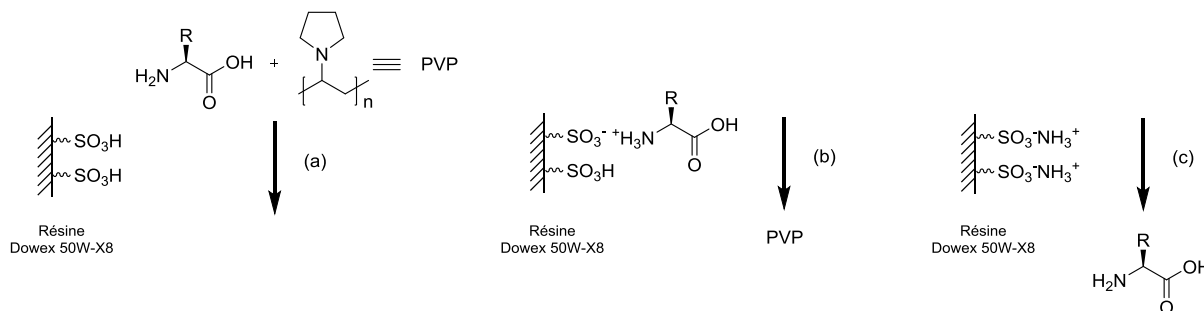
Tableau 5 : Essais de deutération de la L-leucine avec RuNP@PVP, dans l'eau, à diverses températures et durées de réaction.

Enfin, comme dans ces conditions la compétition de la réaction d'échange H/D avec la réaction d'hydrolyse est évitée, la L-leucine est obtenue avec des rendements de 40 à 75 %.

Malgré ces résultats encourageants, le marquage des aminoacides dans l'eau semble présenter une limitation. En effet, on pourrait s'attendre à augmenter l'enrichissement isotopique de la L-leucine en allongeant la durée de la réaction. Pourtant, en passant de 36 à 84 heures de réaction, avec RuNP@PVP 3 %, à 90 °C, l'enrichissement isotopique passe seulement de 31 à 38 % (Entrées 2 et 3). Nous décidons alors d'augmenter la charge catalytique (RuNP@PVP 9 %) mais, là encore, l'enrichissement isotopique n'est pas augmenté (38 % à TA et 15 % à 90 °C, après réaction pendant 36 heures) (Entrées 4 et 5). Ainsi, malgré l'augmentation de la durée de réaction et de la charge catalytique, l'enrichissement isotopique ne dépasse pas les 38 %. Il semblerait qu'une autre réaction, en compétition avec la réaction d'échange H/D, se produise dans l'eau.

Nous constatons que le marquage d'un aminoacide dans l'eau présente beaucoup d'avantages :

- il n'est plus nécessaire de passer par un dérivé (aminoester)
- le traitement est simple (filtration sur Dowex 50W-X8) (Figures 71).



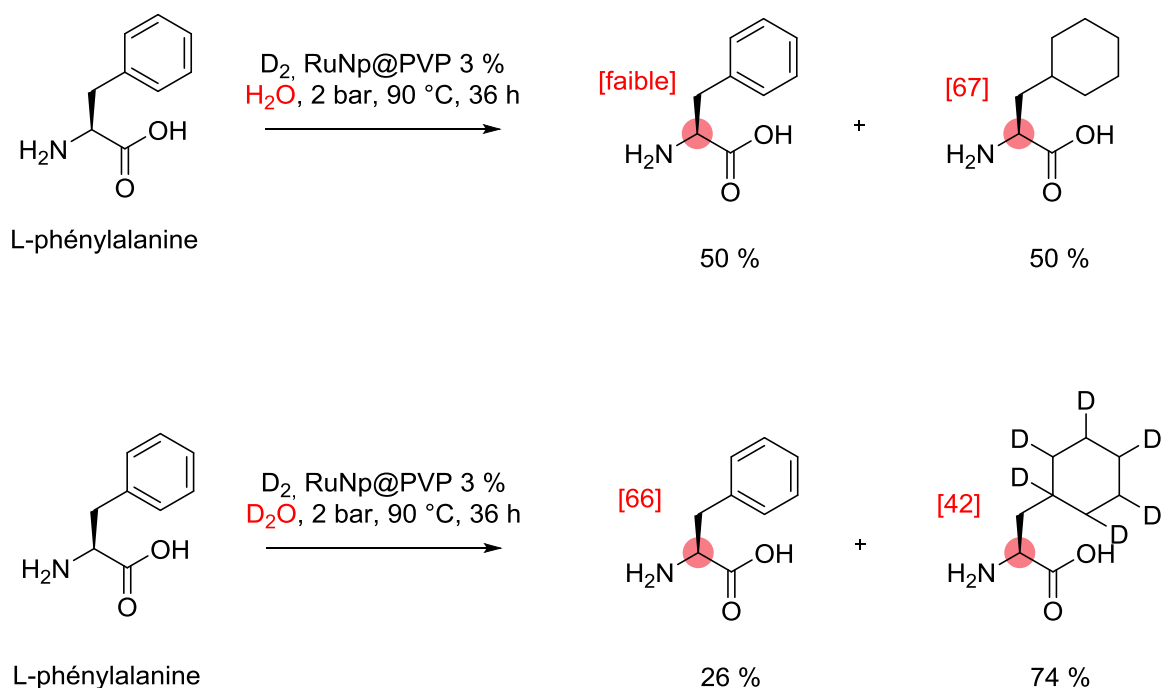
Figures 71 : Purification des aminoacides sur Dowex 50W-X8. (a) Passage du mélange réactionnel sur résine. (b) Lavage de la résine à l'eau et élimination du polymère PVP. (c) Lavage de la résine avec une solution d'ammoniaque 20 % et obtention de l'acide aminé marqué purifié.

Mais, dans l'eau, l'échange H/D ne permet pas d'obtenir des enrichissements isotopiques élevés. Un ajustement des conditions est donc encore nécessaire.

### III. B. 2. Échange H/D sur la L-phénylalanine dans l'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ )

Les essais d'échange H/D sur la L-leucine dans l'eau montre que ce solvant influence fortement l'issue de la réaction. Afin de confirmer cette observation, la deutération de la L-phénylalanine, avec RuNP@PVP 3%, dans  $\text{H}_2\text{O}$ , sous  $\text{D}_2$  (2 bar), à  $90^\circ\text{C}$ , pendant 36 heures, est réalisée (Figures 72). Deux produits sont alors obtenus avec un ratio de 50/50 : la L-phénylalanine, avec un enrichissement nul à faible, et la L-cyclohexylalanine, produit de réduction de la L-phénylalanine sur le cycle aromatique. Dans le but de mieux comprendre ce résultat, la même expérience est réalisée dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Deux produits sont alors obtenus avec un ratio de 26/74 : la L-phénylalanine, avec un enrichissement isotopique de 66 % sur le  $\text{C}_\alpha$ , et la L-cyclohexylalanine, avec un enrichissement isotopique de 42 % sur le  $\text{C}_\alpha$ , présentant un cycle réduit par des deutériums.





Figures 72 : Deutérations de la L-phénylalanine sous  $\text{D}_2$  (2 bar), dans  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{D}_2\text{O}$ , à l'aide de  $\text{RuNP@PVP}$ .

Ainsi, lors de la réaction d'échange H/D catalysée par  $\text{RuNP@PVP}$  dans l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{D}_2\text{O}$ ), sur un aminoacide aromatique, la réaction de réduction du cycle aromatique entre en compétition. Il apparaît donc que le choix des conditions de réaction doit dépendre de la nature du substrat. Concernant les aminoacides aromatiques, la stratégie 1 basée sur l'utilisation du THF ou du DMF sur les dérivés aminoesters est pertinente. Concernant les autres aminoacides, l'utilisation de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) ne permet pas d'obtenir un enrichissement isotopique satisfaisant. Par contre, l'essai de marquage de la L-phénylalanine dans  $\text{D}_2\text{O}$  montre que l'on peut atteindre un enrichissement isotopique de 66 %.

L'eau lourde ( $\text{D}_2\text{O}$ ) semble donc le meilleur solvant pour la deutération des aminoacides par échange H/D catalysé par  $\text{RuNP@PVP}$ .

### III. B. 3. Procédure de deutération des aminoacides catalysée par $\text{RuNP@PVP}$ dans $\text{D}_2\text{O}$

La deutération est réalisée sur une solution de substrat (0,15 mmol) dans  $\text{D}_2\text{O}$  (2 mL), en présence de  $\text{RuNP@PVP}$  3 %, à 55 °C, sous pression de  $\text{D}_2$  (2 bar), pendant 36 heures.

Le mélange réactionnel est ensuite récupéré dans une seringue et filtré sur résine échangeuse d'ions Dowex 50W-X8.

### III. B. 4. Résultats de deutération des aminoacides catalysée par RuNP@PVP dans D<sub>2</sub>O

Une incorporation efficace en deutérium (77 % à 99 %) est obtenue sur les aminoacides aliphatiques **55-59**, amides **60-61** et azotés **62-63**, ce qui montre l'étendue du potentiel de notre procédé d'activation C-H énantiospécifique (Figure 73). Pour la sérine **64** et la thréonine **65**, en plus du marquage énantiospécifique sur la position C<sub>α</sub>, un processus d'activation C-H additionnel a lieu sur la position C<sub>β</sub>. Sur la position C<sub>β</sub> de la L-thréonine **65**, le marquage a également lieu avec rétention de la configuration. Pour l'histidine **66**, en plus du marquage énantiospécifique sur la position C<sub>α</sub>, un marquage total du cycle imidazole est observé. Ce cycle imidazole (avec deux atomes d'azote) doit présenter une plus forte affinité pour la surface du nanocatalyseur que l'azote terminal, ce qui explique son enrichissement isotopique plus élevé. Pour l'acide aspartique **67** et l'acide glutamique **68**, l'activation C-H a toujours lieu énantiospécifiquement sur la position C<sub>α</sub>. Mais on peut constater que pour ces trois derniers composés, l'incorporation en deutérium sur le C<sub>α</sub> est plus faible que celle observée sur les autres aminoacides. Il se peut que la coordination de deux groupements proches, présentant une forte affinité pour la surface de Ru, sur un même substrat (c'est-à-dire un imidazole et un acide carboxylique sur **66**, deux acides carboxyliques sur **67** et **68** diminue :

- l'accessibilité de la liaison C<sub>α</sub>-H à la surface des NPs
- la flexibilité des molécules en interaction avec la surface des NPs.

Par conséquent, l'accessibilité de la liaisons C(sp<sup>3</sup>)-H vers le nanocatalyseur peut être réduite et pourrait expliquer la faible incorporation en deutérium obtenue.

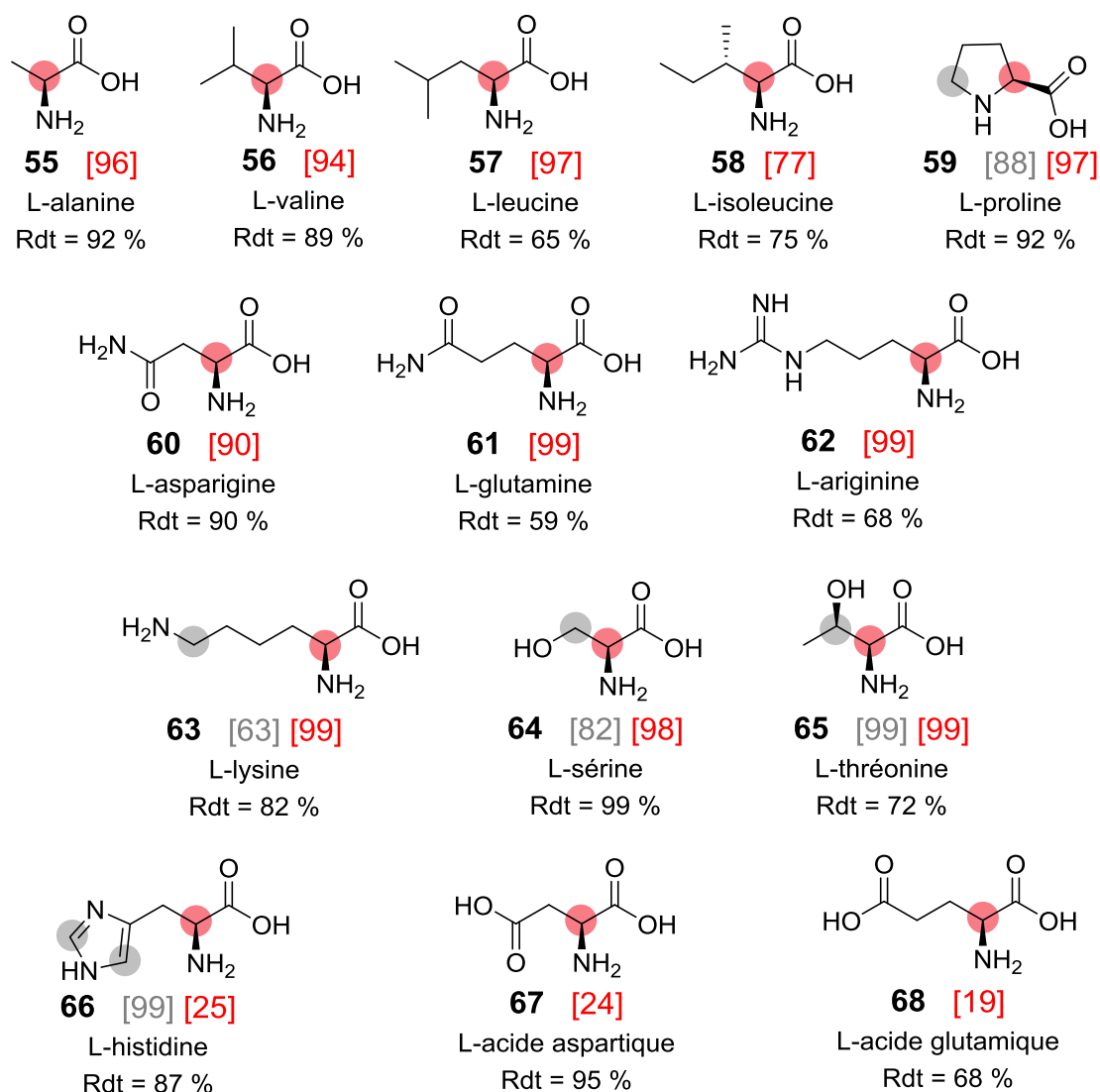


Figure 73 : Deutérations des aminoacides protéinogènes à l'aide de RuNP@PVP, dans D<sub>2</sub>O. La L-Glycine n'est pas présentée car elle ne possède pas de centre stéréogène.

Généralement, la robustesse d'un système catalytique est une spécification cruciale pour assurer une manipulation simple et une étendue large d'applications. Dans ce contexte, notre catalyseur est complémentaire à de nombreux complexes organométalliques : il présente une tolérance totale à l'eau, ce qui est particulièrement utile pour la modification de molécules à activité biologique.

Notre réaction a lieu avec une grande régiosélectivité et une énantiospécificité totale dans différents solvants (eau, THF, DMF). Si nécessaire, l'enrichissement isotopique peut être amélioré en augmentant la quantité de catalyseur (de 3 % à 9 %).

Sur les vingt acides aminés protéinogènes, notre méthode de deutération utilisant RuNP@PVP permet d'en marquer dix-huit (en comptant la glycine) : en passant par des

dérivés aminoesters dans le THF ou le DMF, lorsque la chaîne latérale est aromatique, ou directement sur les aminoacides commerciaux dans D<sub>2</sub>O, lorsque la chaîne latérale n'est pas aromatique. La deutération des deux aminoacides protéinogènes soufrés (la L-cystéine et la L-méthionine) n'est pas réalisable dans les conditions décrites précédemment. Il semblerait que l'atome de soufre S présente une trop grande affinité pour la surface des nanoparticules « nues » RuNP@PVP et empêche l'échange dynamique entre les atomes de D de la surface de Ru et les atomes de H liés aux carbones de l'acide aminé. Des études complémentaires, au laboratoire, montrent qu'il est possible de deutérer ces substrats soufrés en utilisant une autre classe de nanoparticules de ruthénium : RuNP/dppb (dppb : 1,4-bis(diphénylphosphino)butane). Ces nanoparticules sont préparées par l'équipe de Chaudret dans des conditions similaires à celles utilisées pour préparer RuNP@PVP et RuNP/HDA, à l'aide du ligand dppb (Figure 74) qui permet donc de moduler la sélectivité de la réaction d'échange H/D à la surface de la nanoparticule de ruthénium.

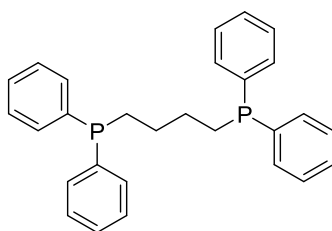


Figure 74 : Structure du ligand dppb.

### III. B. 5. Alternative à l'utilisation de D<sub>2</sub>O : NaOH 0,01M

Nous avons vu que l'utilisation de D<sub>2</sub>O comme solvant pour la deutération, par échange H/D catalysé aux RuNP@PVP, permettait d'obtenir des résultats satisfaisants en termes d'enrichissement isotopique, de régiosélectivité et d'énantiospécificité.

Mais ces conditions ne sont pas compatibles avec une réaction de tritiation. En effet, notre laboratoire possède un savoir-faire unique dans le domaine du marquage au tritium et l'utilisation de T<sub>2</sub> gaz pour la tritiation d'un aminoacide est parfaitement envisageable, mais l'utilisation de T<sub>2</sub>O ou HTO en tant que solvant pose problème. La quantité de radioactivité mise en jeu serait beaucoup trop importante et entraînerait :

- des risques élevés de contamination pour le manipulateur
- la radiolyse/dégradation du produit

- des rejets de T<sub>2</sub> gaz et de déchets tritiés dépassant les limites autorisées.

Nous décidons alors d'identifier un autre solvant qui pourrait être compatible avec une réaction de tritiation. Dans l'eau, les acides aminés, qui possèdent des groupements amines (sous forme d'ammonium NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, à pH ~ 7) et acides carboxyliques (sous forme de carboxylate COO<sup>-</sup>, à pH ~ 7) existent à l'état de zwitterion. Plus précisément, chaque composé susceptible de former un zwitterion possède une valeur de pH caractéristique pour laquelle il est sous la forme zwitterionique globalement neutre. Il s'agit du pH isoélectrique (pH<sub>i</sub> ou pI). Dans le cas où le pH est inférieur au pI, le composé se trouve majoritairement dans sa forme positive. Dans le cas où le pH est supérieur au pI, le composé se trouve dans sa forme négative (Tableau 6). Le pI n'est pas forcément égal à une valeur de pH = 7 mais dépend du pKa des groupements chimiques constituant le composé. Ainsi, les acides aminés, qui diffèrent en termes de chaîne latérale, possède des pI différents.

pH (acide) < pI	pH ~ pI	pH (basique) > pI
$^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH} \rightleftharpoons ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COO}^-$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COO}^-$

Tableau 6 : Formes majoritaires (positive, zwitterionique ou négative) d'un acide aminé selon le pH de la solution.

Les études précédentes sur les RuNP par l'équipe de Chaudret et sur le marquage de molécules azotées par notre équipe, confirme que l'atome d'azote coordinant à la surface de la nanoparticule joue le rôle de groupement directeur. Notre hypothèse est que l'azote joue au mieux son rôle d'hétéroatome coordinant et directeur lorsque l'amine est sous forme NH<sub>2</sub> plutôt que NH<sub>3</sub><sup>+</sup>. Pour favoriser cette forme NH<sub>2</sub>, l'acide aminé doit être mis à réagir dans un milieu basique. C'est la raison pour laquelle nous décidons de tester la deutération de la L-leucine, avec RuNP@PVP 3 %, sous D<sub>2</sub> (2 bar), à température ambiante, pendant 36 à 60 heures, à diverses concentrations de soude (Entrées 1-3, Tableau 7).

Entrée	Concentration de NaOH	Température (°C)	Temps (h)	Enrichissement isotopique [%]	Rdt (%)
1	1M (pH = 14)	TA	60	25	45
2	0,1M (pH = 13)	TA	36	36	50
3	0,01 M (pH = 12)	TA	36	54	75
4	0,01 M	TA	60	88	70
5	0,01 M	55	36	83	70

Tableau 7 : Essais de deutération de la L-leucine avec RuNP@PVP, dans NaOH, à divers pH, températures et durées de réaction.

Dans NaOH 1M (pH = 14), le marquage est toujours régiosélectif et présente un enrichissement isotopique de 25 %. Dans NaOH 0,1 M (pH = 13), l'enrichissement isotopique atteint 36 %. Dans NaOH 0,01M (pH = 12), il est de 54 %, ce qui est plus élevé que lors des essais dans l'eau à pH neutre. Notre hypothèse est donc confirmée : favoriser la forme NH<sub>2</sub> de l'amine à pH basique permet d'améliorer l'échange H/D et d'obtenir de meilleurs enrichissements isotopiques. En utilisant NaOH 0,01M comme solvant, il est possible d'augmenter l'incorporation en deutérium en augmentant la durée de la réaction (60 heures, 88 %) ou la température (55 °C, 83 %) (Entrées 4-5, Tableau 7). Ces résultats nous donnent des informations supplémentaires sur le mécanisme de la réaction d'échange H/D à la surface des nanoparticules et nous confirment qu'il est possible d'utiliser un solvant non-deutééré (ou non-tritiée) pour la deutération (ou la tritiation) des aminoacides.

### III. C. Marquage des peptides en position C $\alpha$ de l'extrémité N-terminale

Le marquage de dix-sept acides aminés et dérivés nous encourage ensuite à appliquer notre méthodologie à la deutération par activation C-H, à un stade avancé, sur des structures encore plus complexes et possédant des propriétés biologiques intéressantes : les peptides.

Les peptides, qui sont d'un grand intérêt en chimie médicinale, sont difficilement modifiés sélectivement à cause de la coexistence de multiples centre chiraux racémisables et de fonctions chimiques différentes. Une série de peptides à deux, trois ou quatre acides aminés est testée avec RuNP@PVP 3 % ou 6 %, sous D<sub>2</sub> (2 bar), dans D<sub>2</sub>O, à 55 °C, pendant 36 heures (Figure 75).

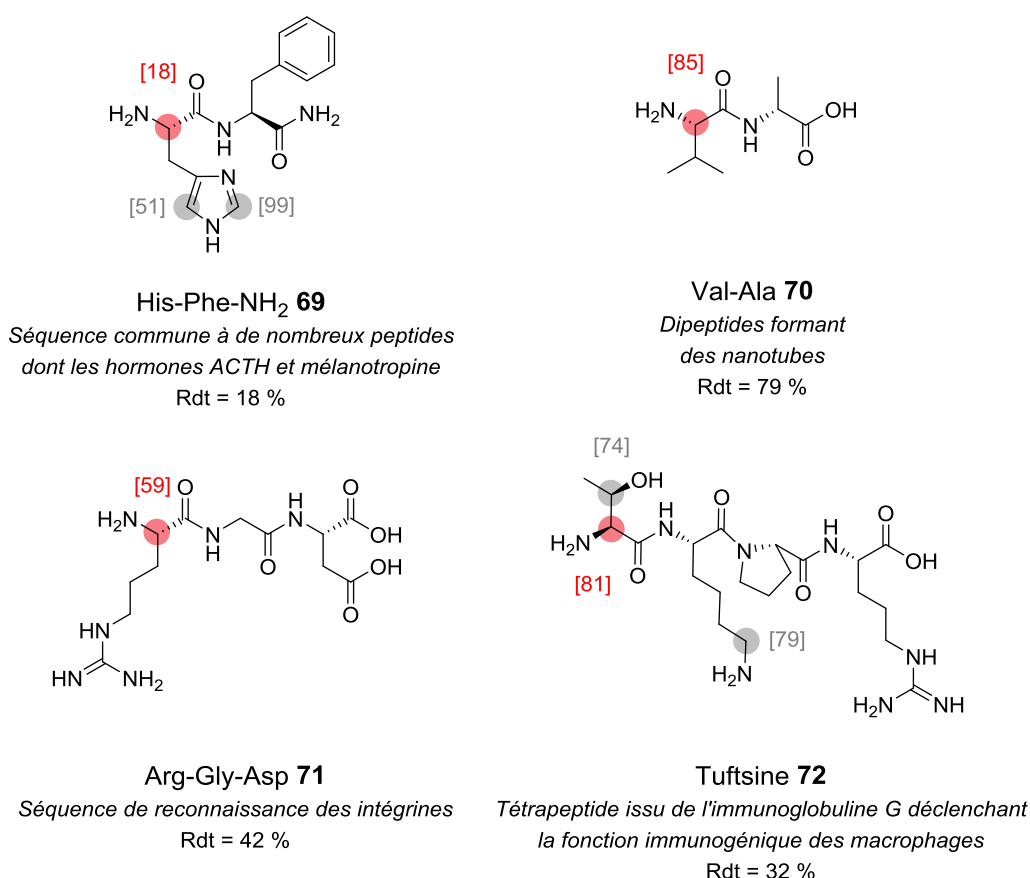


Figure 75 : Activation C-H/deutération énantiospécifique de peptides biologiquement actifs. Les disques indiquent les sites d'incorporation de deutérium (rouges pour les C $\alpha$ , gris pour les sites additionnels).

À l'issue de la deutération sur chacun des peptides, ceux-ci sont hydrolysés, dans une solution de HCl 6M et analysés par HPLC avec une phase stationnaire chirale (cf. partie expérimentale). Dans ces quatre cas, la deutération par activation C-H a lieu sur le C<sub>α</sub> de l'extrémité N-terminale sans épimérisation détectée sur le substrat, mais avec une incorporation en deutérium élevée. Un marquage additionnel est observé sur le cycle imidazole de l'histidine du peptide His-Phe-NH<sub>2</sub> **69**, ainsi que sur les chaînes latérales de la thréonine et de la lysine du peptide tuftsine **72**. Ces résultats sont similaires à ceux observés sur les aminoacides isolés.

### **III. D. Conclusions**

Dans cette partie « Application des RuNP@PVP au marquage au deutérium d'aminoacides et de peptides », nous avons décrit une méthode d'activation C-H énantiospécifique suivie de l'incorporation de deutérium sur des centres stéréogènes. Cette méthode performante a été appliquée sur vingt-et-un composés aux propriétés chimiques et biologiques importantes : dix-sept acides aminés et quatre peptides.

Notre méthode d'activation C-H énantiospécifique est basée sur l'utilisation de nanoparticules de ruthénium dispersées dans une matrice de polyvinylpyrrolidone (RuNP@PVP), sous conditions douces : D<sub>2</sub> (2 bar), 55 °C. Cette réaction peut avoir lieu dans l'eau mais aussi dans divers solvants organiques (THF, DMF), ce qui étend encore plus l'étendue potentielle de ses applications.

Dans le but de rationaliser la chimiosélectivité, l'énantiospécificité totale et la faible énergie d'activation de cette réaction, nous décidons d'en étudier le mécanisme à la fois par une approche expérimentale et par des calculs théoriques.





## **IV. Études mécanistiques expérimentales**



# IV. Études mécanistiques expérimentales

Nous avons confirmé précédemment que l'atome d'azote coordinant jouait le rôle de groupement directeur nécessaire à la réaction d'échange H/D chimio- et régiosélectif. Mais cet atome d'azote coordinant est-il suffisant pour expliquer l'énantiospécificité de la réaction d'échange H/D, dans le cas du marquage des acides aminés ?

De plus, le marquage des aminoacides ayant lieu dans  $D_2O$ , sous atmosphère de  $D_2$  gaz, d'où provient exactement l'atome de deutérium incorporé sur le  $C_\alpha$  ?

## IV. A. Influence des groupements fonctionnels sur le marquage (amines et dérivés)

Les acides aminés marqués dans  $D_2O$ , sous atmosphère de  $D_2$ , à l'aide de RuNP@PVP (c.f. II. A.), possèdent un squelette commun constitué d'une amine et d'un acide carboxylique. Dans le but de déterminer un mécanisme de la réaction d'échange H/D et d'expliquer son énantiospécificité, nous décidons de réaliser la deutération (dans le THF et l'eau lourde) de trois amines chirales, de la L-valine amide et de la *N*-acétyl-valine (Figure 76).

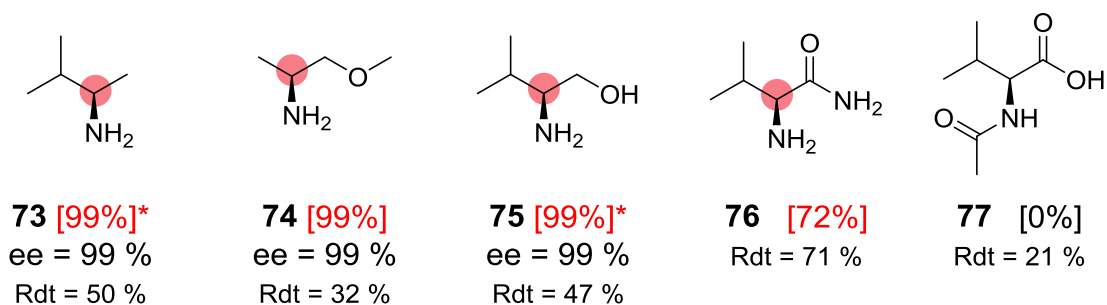


Figure 76 : Activation C-H/deutération énantiospécifique avec RuNP@PVP 3 %, sous D<sub>2</sub> gaz (2 bar), à 55 °C, pendant 36 heures, dans le THF (molécules **73** et **74**) ou dans D<sub>2</sub>O (molécule **75**, **76** et **77**). \* indique des positions de marquage additionnel (cf. partie expérimentale).

Dans les trois premiers cas, les amines deutérées sont isolées avec des rendements de 70 % à 80 %. Les analyses RMN <sup>1</sup>H montrent que la deutération sur le centre stéréogène se produit efficacement puisque les trois enrichissements isotopiques atteignent les 99 %. Les analyses HPLC avec une phase stationnaire chirale montrent, en plus, que l'activation C-H a lieu avec rétention de la configuration.

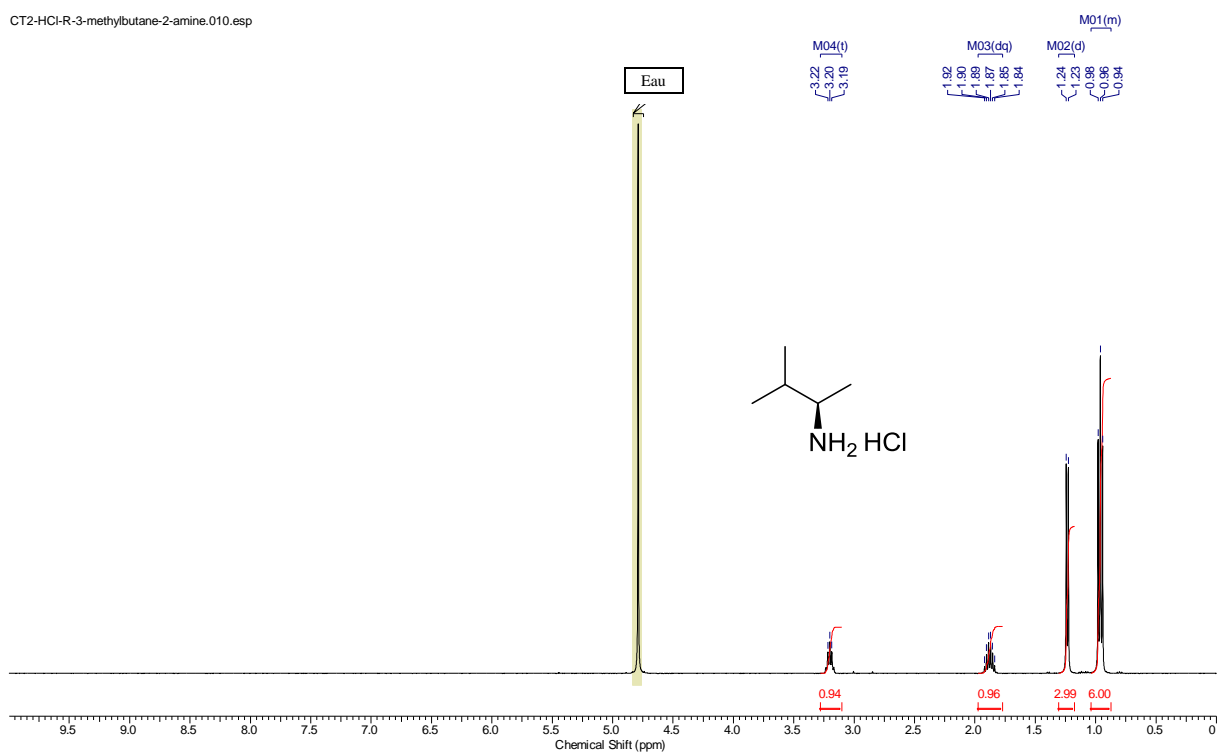
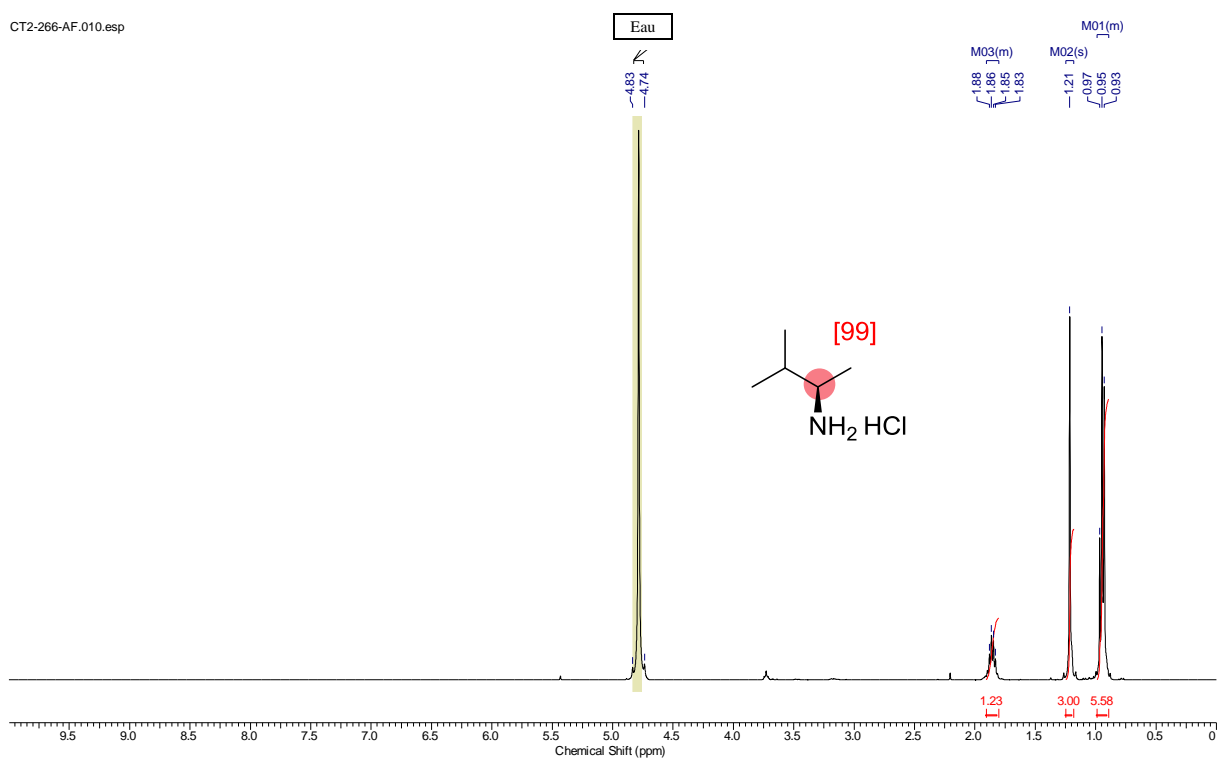
#### IV. A. 1. Exemple de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine **73** : procédure de marquage

La deutération est réalisée sur une solution de substrat (0,15 mmol) dans le THF (2 mL), en présence de RuNP@PVP, à 55 °C, sous pression de D<sub>2</sub> (2 bar), pendant 36 heures.

Le mélange réactionnel est ensuite récupéré dans une seringue et filtré sur alumine. Après ajout d'acide chlorhydrique, afin de former le chlorhydrate, le solvant est évaporé. L'amine sous forme de chlorhydrate est récupérée avec un rendement de 50 %.

#### IV. A. 2. Exemple de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine **73** : analyses

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H de l'amine de référence et de l'amine deutérée permet de déterminer un enrichissement isotopique de 99 % en position α de l'atome d'azote. Le marquage est donc régiosélectif (Figures 77).



Figures 77 : Comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine deutérée **73** et de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine de référence (sous forme de chlorhydrates). \* indique la présence de THF résiduel.

L'analyse par spectrométrie de masse permet de confirmer l'obtention de ce fort enrichissement isotopique (Figure 78).

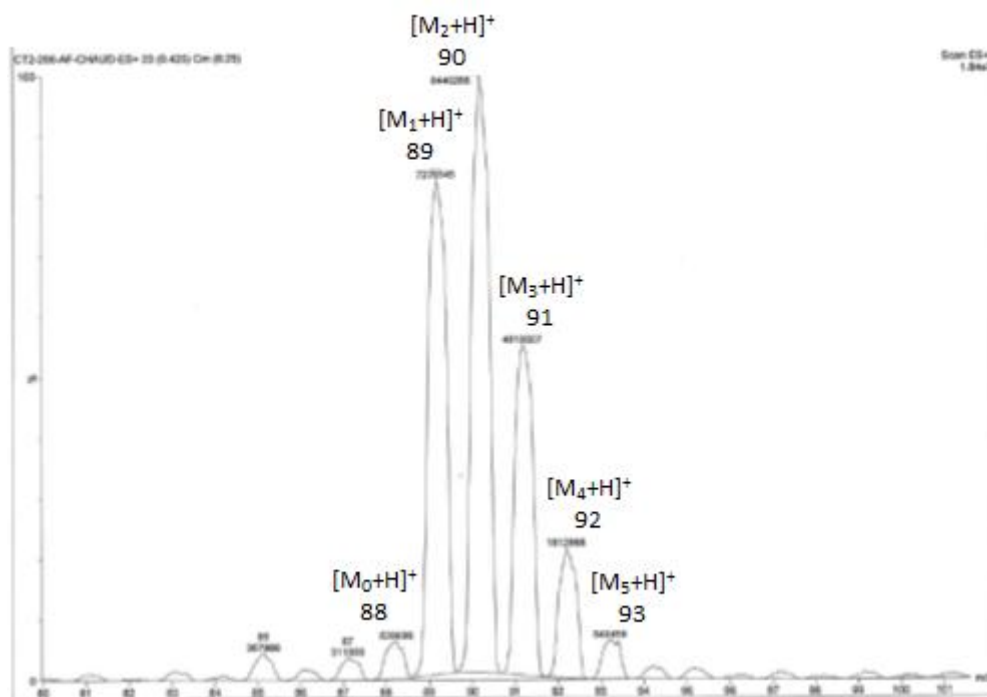


Figure 78 : Spectre de masse de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine deutérée **73** avec la quantité relative (en %) d'isotopologues non-deutérés ( $M_0$ ) et deutérés ( $M_{(0+x)}$ ) :  $M_0$  (2,4 %),  $M_{+1}$  (32,7 %),  $M_{+2}$  (36,2 %),  $M_{+3}$  (19,6 %),  $M_{+4}$  (7,0 %),  $M_{+5}$  (2,1 %).

La rétention de la configuration à l'issue de la deutération est démontrée par analyse HPLC avec une phase stationnaire chirale. L'amine n'étant pas détectable par rayonnements UV, nous devons procéder à la dérivation de celle-ci par formation d'une base de Schiff 9-anthraldimine<sup>93</sup> (Figure 79).

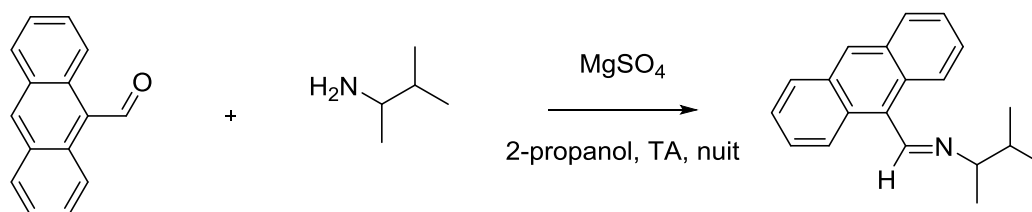
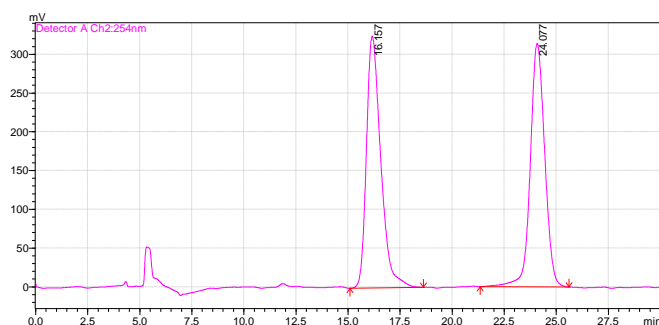


Figure 79 : Méthode de dérivation de la 3-méthylbutan-2-amine racémique, de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine commerciale et de la (*R*)-3-méthylbutan-2-amine deutérée **73** par formation d'une base de Schiff 9-anthraldimine.

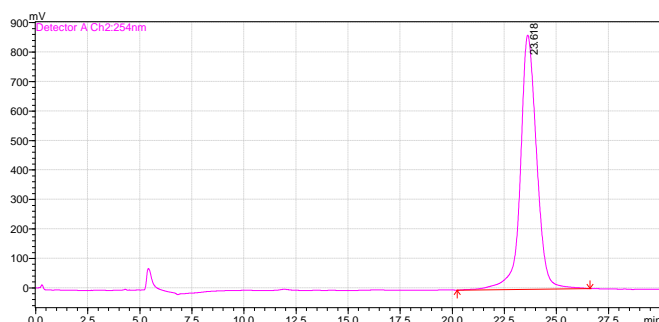
Chacun des dérivés obtenus est analysés par HPLC sur colonne chirale Phenomenex Lux Cellulose-1 00G-4458-E0 (Figures 80).

<sup>93</sup> W. J. Xu, J. H. Hong, H.-K. Han, J. S. Kang, W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32, 2493–2496.



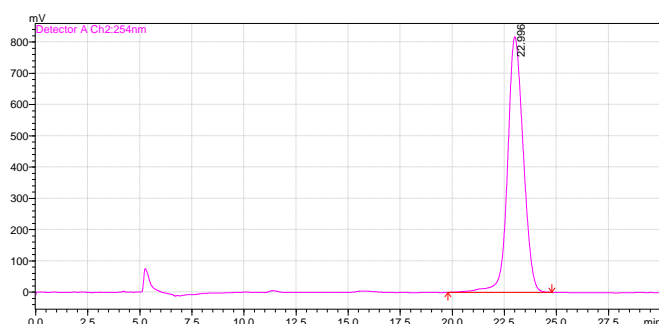
Tr (min)	Aire	%
16.157	15581048	50.5
24.077	15258847	49.5

Dérivé 9-anthraldimine de la 3-méthylbutan-2-amine racémique



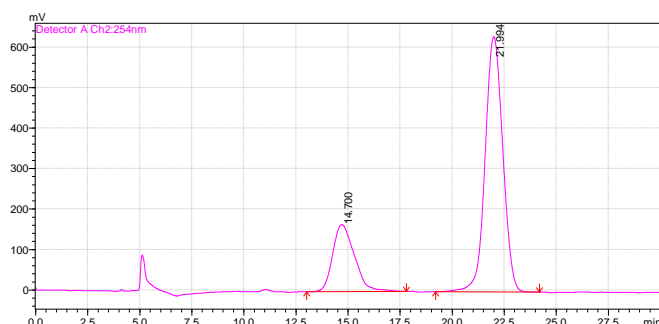
Tr (min)	Aire	%
23.618	46898128	100.0

Dérivé 9-anthraldimine de la (R)-3-méthylbutan-2-amine commerciale



Tr (min)	Aire	%
22.996	42799543	100.0

Dérivé 9-anthraldimine de la (R)-3-méthylbutan-2-amine deutérée **73**



Tr (min)	Aire	%
14.700	12050932	24.4
21.833	37256718	75.6

Coinjection

Figures 80 : Comparaison des chromatogrammes HPLC avec une phase stationnaire chirale après dérivatisation.  
Phase mobile : hexane/2-propanol 99,5/0,5. Débit : 1,0 mL.mn<sup>-1</sup>.

Les mêmes résultats d'analyse sont obtenus pour les deux autres amines chirales deutérées **74** et **75**. La présence de l'atome d'azote du substrat est donc la condition nécessaire et suffisante pour garantir l'énantiospécificité de la réaction d'échange H/D. L'importance de la coordination de l'azote à la surface de la nanoparticule est encore plus mise en évidence par les essais de deutération de la L-valine amide **76** et de la N-acétyl-valine **77**. Aucune réaction n'a lieu sur la N-acétyl-valine **77**, où le caractère coordinant de l'azote est amoindri par la N-

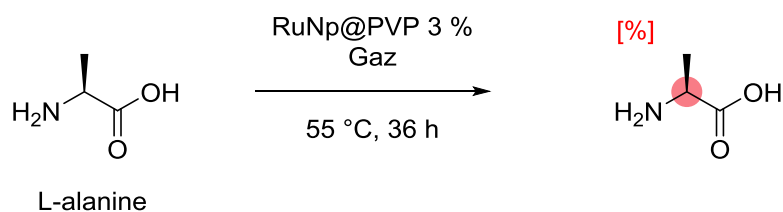


acétylation, tandis que la L-valine amide **76** est deutérée à 74 %. Dans le cas du marquage des aminoacides, le groupement acide carboxylique n'est donc pas directement impliqué dans le processus de rétention de la configuration du C $\alpha$ .

## IV. B. Quelle est la source de D ?

Un aspect important de l'étude du mécanisme de la réaction d'échange H/D catalysée par RuNP@PVP, est la détermination de la source de deutérium incorporé. Dans le cas où les amines et aminoesters sont marqués dans le THF, la seule source possible de deutérium est D<sub>2</sub> gaz. Par contre, dans le cas où les acides aminés sont marqués dans D<sub>2</sub>O, deux sources de deutérium incorporé sont possibles : D<sub>2</sub> gaz ou D<sub>2</sub>O. Certes, D<sub>2</sub> gaz doit rester la source de deutérium principale, mais D<sub>2</sub>O doit aussi avoir une influence sur l'issue du marquage. En effet, les essais de marquage de la L-leucine, dans H<sub>2</sub>O (cf. II. B. 1.), ne présentent pas d'enrichissement isotopique supérieur à 38 %, malgré les divers ajustements de paramètres. Dans H<sub>2</sub>O, une réaction en compétition avec la réaction d'échange H/D a donc lieu. C'est la raison pour laquelle nous supposons que D<sub>2</sub>O est une source secondaire de deutérium.

Nous procédons donc à divers essais de deutération de la L-alanine, catalysée par RuNP@PVP, dans D<sub>2</sub>O ou H<sub>2</sub>O, sous argon ou D<sub>2</sub>, à 55 °C, pendant 36 heures (Tableau 8).



Entrée	Gaz	Solvant	Enrichissement isotopique [%]
1	Argon	D <sub>2</sub> O	0
2	D <sub>2</sub>	D <sub>2</sub> O	96
3	D <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	63

Tableau 8 : Détermination de la source réelle de deutérium. Deutérations de la L-alanine (0,15 mmol), avec RuNP@PVP 3 %, dans D<sub>2</sub>O ou H<sub>2</sub>O (2 mL), à 55 °C, pendant 36 heures.

Lorsque la L-alanine est mise à réagir sous argon, dans  $D_2O$ , aucune incorporation en deutérium n'est détectée (Entrée 1, Tableau 8), ce qui montre que l'eau lourde n'est pas la principale source de marquage au deutérium. Ce résultat suggère également, qu'en dépit de leur flexibilité, les espèces D-Ru stockées à la surface du catalyseur ne sont pas suffisantes pour produire un échange H/D significatif. Un très fort enrichissement isotopique est obtenu lorsque la L-alanine réagit sous  $D_2$  gaz, dans  $D_2O$  (96 %, Entrée 2, Tableau 8). Par contre, l'enrichissement isotopique est de seulement 63 % lorsque la deutération de la L-alanine est réalisée dans  $H_2O$ , ce qui signifie que, dans ces conditions, un échange H/D catalysé par RuNP@PVP se produit entre  $D_2$  et  $H_2O$  (Entrée 3, Tableau 8).

Si un échange H/D a bien lieu entre  $D_2$  et  $H_2O$ , on devrait détecter une part significative de HD et  $H_2$  dans la phase gaz, à l'issue de la réaction. Après deutération de la L-alanine sous  $D_2$ , dans  $H_2O$ , nous procédons à l'analyse par spectrométrie de masse (ionisation par impact électronique) de la composition de la phase gaz (Tableau 9).

	Composition de la phase gaz de départ (D <sub>2</sub> commercial)	Composition de la phase gaz finale
H <sub>2</sub>	0,14	28,29
HD	1,15	44,25
D <sub>2</sub>	98,09	19,02
% de D dans (H <sub>2</sub> , HD, D <sub>2</sub> )	99,28	44,94
N <sub>2</sub>	0,495	7,145
O <sub>2</sub>	0,109	0,665
Ar	0,009	0,589
CO <sub>2</sub>	0,007	0,041
	100,00	100,00

Tableau 9 : Analyse de la composition de la phase gaz finale après deutération de la L-alanine, sous D<sub>2</sub>, dans H<sub>2</sub>O, par spectromètre de masse à secteur magnétique R30.

L'analyse par spectrométrie de masse montre clairement, qu'à l'issue de la réaction, la phase gaz est composée de D<sub>2</sub> (environ 19 %), de HD (environ 44 %) et de H<sub>2</sub> (environ 28 %), soit une part de deutérium (atome D) totale d'environ 45 % dans la phase gaz. La part de deutérium D dans le gaz de départ était d'environ 99 %. On observe donc une dilution isotopique du gaz au cours de la réaction, ce qui explique l'érosion du marquage en deutérium lorsqu'il a lieu dans H<sub>2</sub>O et confirme indirectement que D<sub>2</sub> gaz est la source exclusive de deutérium.

## IV. C. Conclusions

Dans cette partie « Études mécanistiques expérimentales », nous avons réalisé la deutération dans trois amines chirales, dans le THF ou D<sub>2</sub>O. Sur ces trois substrats modèles, l'échange H/D a lieu régiosélectivement sur la position  $\alpha$  de l'atome d'azote avec des enrichissements isotopiques maximaux, ce qui confirme les résultats de marquages et d'études effectuées précédemment indiquant que l'atome d'azote est l'élément nécessaire et suffisant pour produire un échange H/D régiosélectif. De plus, les analyses HPLC avec une phase stationnaire chirale montrent que la réaction d'échange H/D est également énantiospécifique, qu'elle ait lieu dans le THF ou dans D<sub>2</sub>O. L'atome d'azote coordonnant est donc l'élément essentiel pour que la réaction d'échange H/D soit énantiospécifique.

Enfin, divers essais de deutération, sous argon ou sous D<sub>2</sub>, dans H<sub>2</sub>O ou dans D<sub>2</sub>O, montrent que les atomes de D incorporés sur les substrats, après réaction avec RuNP@PVP, proviennent de D<sub>2</sub> gaz. Lorsque la réaction a lieu sous D<sub>2</sub>, dans H<sub>2</sub>O, une autre réaction entre en compétition avec la réaction principale d'échange H/D (Figure 81), ce qui explique les enrichissements isotopiques amoindris dans H<sub>2</sub>O.

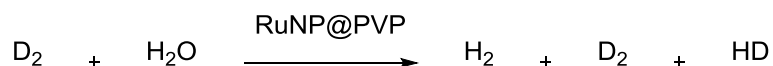


Figure 81 : Réaction secondaire d'échange possible entre D<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O catalysée par RuNP@PVP.

Après avoir obtenu ces résultats expérimentaux, nous sommes en mesure de proposer un mécanisme pour la réaction d'échange H/D, catalysée RuNP@PVP, sur les aminoacides (Figure 82).

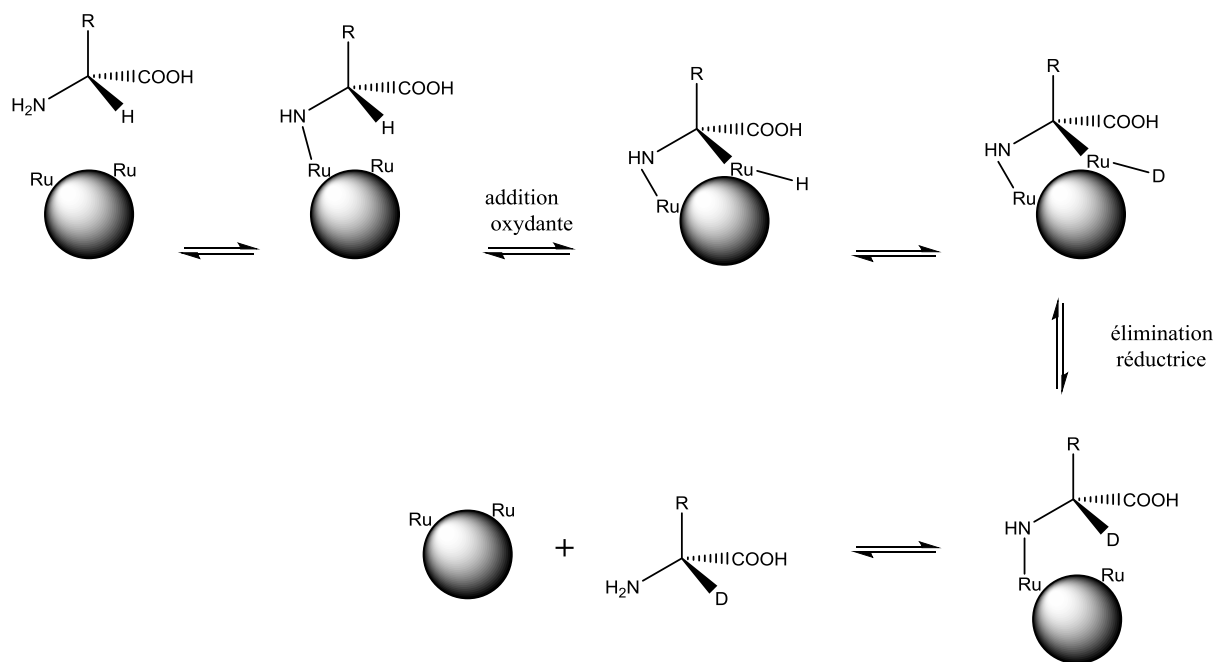


Figure 82 : Mécanisme proposé par notre équipe pour la réaction d'échange H/D sur les aminoacides, à la surface des nanoparticules RuNP@PVP.

**V. Études mécanistiques théoriques  
(travail réalisé à Toulouse par l'équipe  
du Pr. Romuald Poteau)**



# V. Études mécanistiques théoriques (travail réalisé à Toulouse par l'équipe du Pr. Romuald Poteau)

Peut-on déterminer le mécanisme mis en jeu lors de la réaction d'échange H/D, par activation C-H, à la surface des nanoparticules de ruthénium, grâce aux calculs théoriques et en particulier aux calculs DFT ?

## V. A. Introduction

### V. A. 1. Chimie de surface des nanoparticules de métal : un challenge pour la chimie informatique

La chimie quantique informatique est un outil très utile pour les chimistes organiciens car elle permet de mieux comprendre les réactions multi-étapes en localisant les réactifs, les produits, les intermédiaires et les états de transition (TSs en anglais : transition states) sur la surface d'énergie potentielle (PES en anglais : potential energy surface) du système. Les méthodes DFT sont régulièrement appliquées en catalyse homogène<sup>94</sup> et ont déjà permis de faire la lumière sur certaines problématiques en chimie organométallique de surface<sup>95</sup> ou en catalyse sur des surfaces de métaux de transition<sup>96</sup>. Mais explorer la chimie de surface de nanoparticules reste un challenge. En effet, il est difficile de décrire précisément de tels systèmes complexes constitués d'atomes métalliques et de ligands à leur surface, souvent

---

<sup>94</sup> a) S. Niu, M. B. Hall, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 353–405. b) D. Balcells, E. Clot, O. Eisenstein, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 749–823. c) T. Ziegler, J. Autschbach, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2695–2722.

<sup>95</sup> P. Sautet, F. Delbecq, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1788–1806.

<sup>96</sup> a) M. Neurock, *J. Catal.* **2003**, *216*, 73–88. b) J. K. Nørskov, T. Bligaard, J. Rossmeisl, C. H. Christensen, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 37–46. c) R. A. van Santen, M. Neurock, S. G. Shetty, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2005–2048. d) J. K. Nørskov, F. Abild-Pedersen, F. Studt, T. Bligaard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 937–943.



mobiles et parfois insuffisamment caractérisés. Au-delà des approches semi-empiriques<sup>97</sup>, les chimistes théoriciens font face à un dilemme : soit baser leur étude sur un petit cluster organométallique soit considérer les différentes facettes des nanoparticules comme des surfaces infinies. Ces deux modèles sont utiles pour mieux comprendre les propriétés organométalliques des nanoparticules mais, en réalité, ces nanoparticules présentent des propriétés physiques et chimiques intermédiaires<sup>98</sup> entre le petit composé moléculaire et le grand matériau.

Récemment, l'équipe de Poteau a reporté les énergies d'adsorption de divers ligands à la surface de nanoclusters de ruthénium « nus » Ru<sub>n</sub> (n= 55 et 147) calculées par DFT<sup>99</sup>. Ces valeurs d'énergies dépendent de la structure des sites d'adsorption mais aussi de la taille et de la forme des nanoparticules<sup>100</sup>.

## V. A. 2. Activation des liaisons C-H et métaux de transition

La réaction d'échange isotopique observée expérimentalement implique le clivage d'une liaison C-H. Il s'agit d'une liaison très forte avec des valeurs d'enthalpie de dissociation  $\Delta_d H_{298}$  allant de 89 kcal/mol à 133 kcal/mol<sup>101</sup>. L'utilisation de complexes ou de surfaces de métaux de transition peut compenser ce coût en énergie de clivage par formation de liaisons fortes M-C et M-H. Dans le cas du ruthénium, les énergies de liaisons Ru(0001)-H et Ru(0001)-CH<sub>3</sub> sont respectivement de 64,7 kcal/mol et 39,4 kcal/mol<sup>102</sup>, d'après les calculs DFT. Ces énergies sont faibles par rapport, par exemple, à l'énergie de dissociation de la liaison C-H du méthane (109,0 kcal/mol).

Les polyhydrures de métaux de transition peuvent adopter diverses structures : l'ion métal est coordonné soit avec un hydrures soit avec une molécule de dihydrogène. Les complexes dihydrogènes appartiennent au groupe des complexes  $\sigma$  dans lesquelles les liaisons  $\sigma$  des ligands jouent le rôle de donneurs de deux électrons sur le centre métallique (Figure 83).

---

<sup>97</sup> F. Calvo, A. Carré, *Nanotechnology* **2006**, *17*, 1292–1299.

<sup>98</sup> W. P. Halperin, *Rev. Mod. Phys.* **1986**, *58*, 533–606.

<sup>99</sup> I. del Rosal, M. Mercy, I. C. Gerber, R. Poteau, *ACS Nano* **2013**, *7*, 9823–9835.

<sup>100</sup> B. Hammer, J. K. Norskov, *Surf. Sci.* **1995**, *343*, 211–220.

<sup>101</sup> S. J. Blanksby, B. G. Ellison, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 255–263.

<sup>102</sup> J. a. Herron, S. Tonelli, M. Mavrikakis, *Surf. Sci.* **2013**, *614*, 64–74.

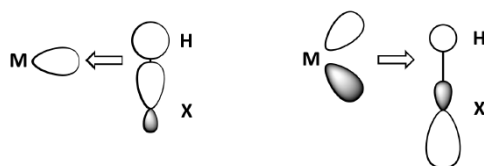


Figure 83 : Orbitales moléculaires des complexes  $\sigma$ ,  $M(\eta^2\text{-HX})$ .

Parmi les mécanismes d'échange H/D connus, le plus simple implique deux étapes successives : l'addition oxydante suivie de l'élimination réductrice (Figure 84)<sup>103</sup>.

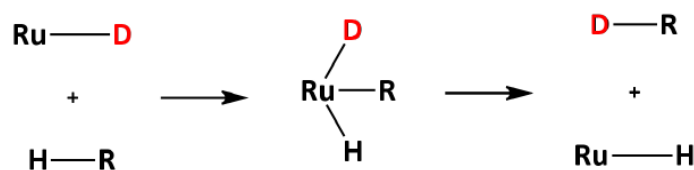


Figure 84 : Échange H/D *via* addition oxydante suivie de l'élimination réductrice

Les complexes  $\sigma$  peuvent jouer le rôle d'intermédiaires dans certains cas (Figures 85 et 86).

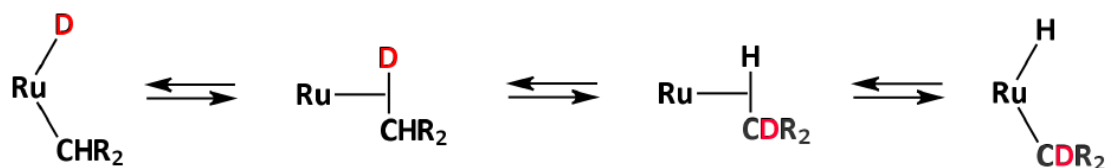


Figure 85 : Échange H/D *via* la formation d'un complexe  $\sigma$ .

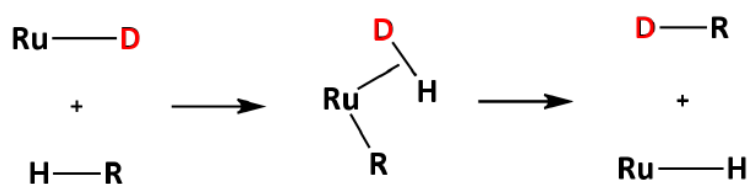


Figure 86 : Activation C-H impliquant la formation d'un complexe  $\sigma$ -HD.

La présence d'un complexe  $\sigma$ -D<sub>2</sub> peut aussi impliquer un mécanisme spécifique (Figure 87).

<sup>103</sup> a) W. D. Jones, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 140–146. b) M. Lersch, M. Tilset, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2471–2526. c) R. N. Perutz, S. Sabo-Etienne, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2578–2592.

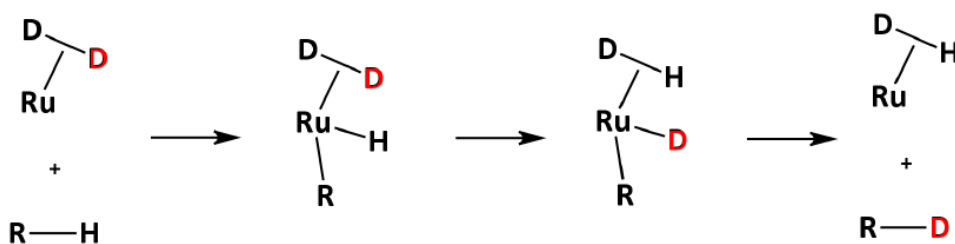


Figure 87 : Mécanisme d'échange H/D avec un complexe  $\sigma$ -D<sub>2</sub>.

Le passage par un mécanisme de métathèse de liaison  $\sigma$  peut aussi être proposé, impliquant un état de transition à quatre centres et un état d'oxydation du métal constant (Figure 88).

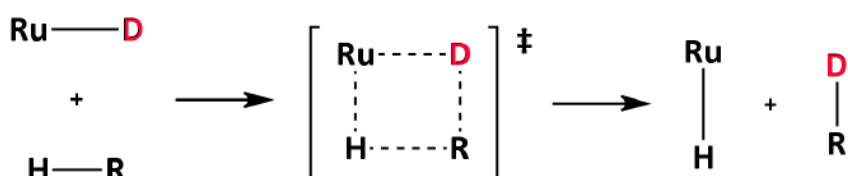


Figure 88 : Échange H/D *via* la métathèse de liaison  $\sigma$ .

Transposés à la catalyse hétérogène ou au cas des nanoparticules, ces mécanismes de la chimie organométallique sont classifiés selon deux catégories :

- mécanisme Langmuir-Hinshelwood ( $\text{amine}_{\text{ads}} + \text{D}_{\text{ads}} \rightarrow \text{deuterated-amine}_{\text{ads}} + \text{H}_{\text{ads}}$ )
- mécanisme Eley-Rideal ( $\text{amine}_{\text{ads}} + \text{D}_{2\text{ gas}} \rightarrow \text{deuterated-amine}_{\text{ads}} + \text{HD}_{\text{gas}}$ ) (Figure 89).

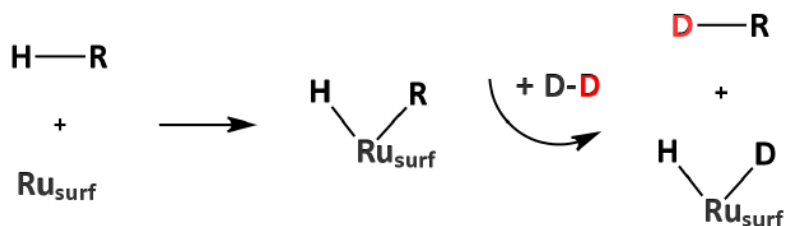


Figure 89 : Mécanisme de type Eley-Rideal.

## V. B. Choix des modèles

### V. B. 1. L'amine modèle

Les divers résultats expérimentaux montrent que l'utilisation de nanoparticules RuNP@PVP de 1,1 nm permet l'activation C(sp<sup>3</sup>)-H douce et sélective, en position vicinale, d'amines avec rétention totale de la configuration (cf. III. A.). L'équipe de Poteau décide d'utiliser l'isopropylamine achirale **78** comme substrat-modèle car elle nécessite moins de temps de calculs qu'une molécule chirale. Cela n'empêcherait pas d'observer une éventuelle inversion de configuration du C<sub>α</sub> (Figure 90).

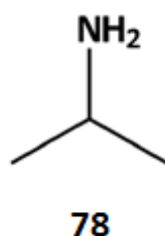


Figure 90 : Structure de l'isopropylamine modèle **78**.

### V. B. 2. Clusters nus de taille finie et modèles en bloc<sup>104</sup>

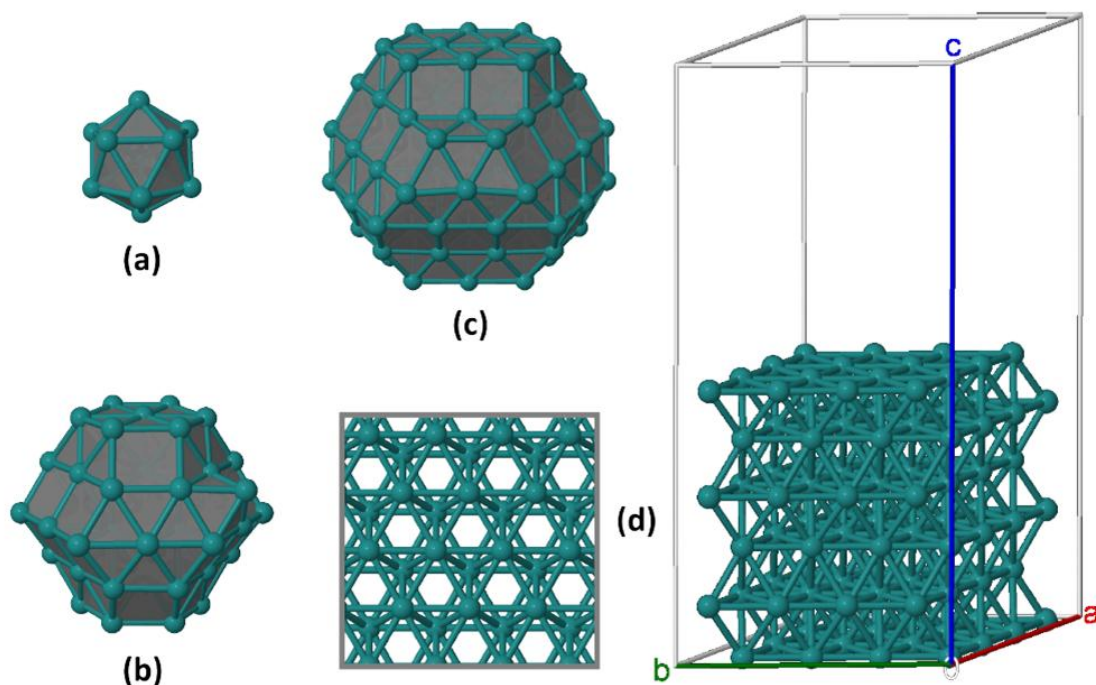
Quatre modèles sont employés pour cette étude :

- le cluster Ru<sub>13</sub> permet de rechercher les voies impliquées dans le processus d'échange H/D présentant le minimum d'énergie (Figure 91a)
- le cluster Ru<sub>55</sub>, une sphère d'un nanomètre d'un cristal hcp, nécessite plus de temps de calculs mais se révèle très utile pour valider des étapes clés (Figure 91b)
- le cluster Ru<sub>110</sub> d'un cristal hcp, de 1,3 nm, présente des dimensions proches des dimensions réelles (Figure 91c) et possède un site B<sub>5</sub><sup>105</sup> où un atome de ruthénium forme une pointe à la surface

<sup>104</sup> *Slab models.*

<sup>105</sup> Arrangement de trois atomes de Ru dans une couche et de deux autres atomes dans une couche interne.

- le modèle bloc périodique 4 X 4 X 6 utilisé pour représenter la surface Ru(0001) développé lors d'études précédentes (Figure 91d)<sup>106,107</sup>.



Figures 91 : Modèles utilisés pour l'étude mécanistique : (a) Ru<sub>13</sub>, (b) Ru<sub>55</sub>, (c) Ru<sub>110</sub> et (d) bloc Ru(0001) 4 X 4 X 6.

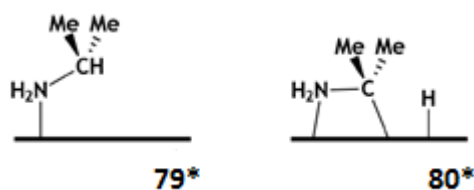
## V. B. 3. Coordination de l'amine sur des modèles

### « nus »

La force d'adsorption de deux composés clés est calculée à la surface des clusters Ru<sub>13</sub> et Ru<sub>110</sub> et du modèle en bloc Ru(0001) (Tableau 10).

<sup>106</sup> L. A. Truflandier, I. Del Rosal, B. Chaudret, R. Poteau, I. C. Gerber, *Chemphyschem* **2009**, *10*, 2939–2942.

<sup>107</sup> I. del Rosal, L. Truflandier, R. Poteau, I. C. Gerber, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 2169–2178.



Composé	$\Delta E$ Ru <sub>13</sub>	$\Delta E$ Ru <sub>110</sub>	$\Delta E$ Ru(0001)
<b>79*</b>	-21,9	-16,1 <sup>a</sup> /-29,9 <sup>b</sup>	-22,0
<b>80*</b>	-28,9	-25,7	-62,8

Tableau 10 : Énergie d'adsorption ( $\Delta E$  en kcal/mol) de l'isopropylamine avant (composé **79\***) et après activation C-H (composé **80\***) sur trois modèles « nus » de RuNPs. <sup>a</sup> adsorption sur une facette (001). <sup>b</sup> adsorption sur un site B<sub>5</sub>.

L'isopropylamine **79\*** avant activation C-H est modérément coordonnée (-16 à -22 kcal/mol) sur les trois modèles.

La valeur d'adsorption calculée pour le composé **80\*** sur le modèle Ru(0001) (-62,8 kcal/mol) est très différente de celles calculées sur les modèles Ru<sub>13</sub> et Ru<sub>110</sub>. On peut en déduire que le modèle Ru(0001) n'est pas adapté pour de petites nanoparticules RuNPs.

Bien que le modèle Ru<sub>13</sub> soit un petit cluster, les propriétés d'adsorption à sa surface sont très similaires à celles calculées sur Ru<sub>110</sub> (modèle le plus proche de la nanoparticule réelle). Ru<sub>13</sub> est donc un modèle précieux pour l'étude rapide du mécanisme de réaction d'échange H/D à la surface des nanoparticules.

## V. B. 4. Le rôle des hydrures

### V. B. 4. a) Nombre d'hydrures (ou deutérures) de surface

Les nanoparticules de ruthénium étudiées sont obtenues par hydrogénation de précurseurs organométalliques en présence de ligands (cf. I. B. 2.). La présence d'hydrures de surface mobiles est démontrée par analyses RMN <sup>1</sup>H en phase gaz et RMN <sup>2</sup>H du solide après réaction d'échange H<sub>2</sub>/D<sub>2</sub><sup>108</sup>. En 2008, l'équipe de Chaudret effectue la titration des hydrures de surface en hydrogénant de l'éthylène à la surface des RuNPs permettant de déterminer le nombre d'hydrures par atome de ruthénium de surface à 1,3<sup>109</sup>. Comme il s'agit d'une mesure

<sup>108</sup> T. Pery, K. Pelzer, G. Buntkowsky, K. Philippot, H.-H. Limbach, B. Chaudret, *Chemphyschem* **2005**, *6*, 605–607.

<sup>109</sup> J. García-Antón, M. R. Axet, S. Jansat, K. Philippot, B. Chaudret, T. Pery, G. Buntkowsky, H.-H. Limbach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2074–2078.

indirecte, le nombre réel d'hydrures par atome de ruthénium de surface doit être plus élevé. Dans notre étude, l'équipe de Poteau décide de fixer ce nombre à 1,6.

#### V. B. 4. b) Coordination, énergétique et spectroscopie

Une connaissance précise des modes de coordination et des énergies d'adsorption des ligands est indispensable pour comprendre la chimie des nanoparticules. Concernant les énergies d'adsorption, des études DFT exhaustives sur Ru(0001) et des petits clusters ont déjà été effectuées<sup>110</sup>. Les énergies d'adsorption utiles à notre étude peuvent donc en être extraites.

Il est aussi possible de tirer parti des données de spectroscopie dans le but d'examiner l'emplacement des ligands de surface. Les études RMN <sup>2</sup>H expérimentales et théoriques montrent que les atomes d'hydrogène peuvent se lier aux NPs de multiples façons : à un seul ruthénium, à deux ou à trois ruthéniums. En résumé, les nanoparticules métalliques présentent un fort potentiel catalytique car elles présentent de multiples sites de configurations différentes (rebords, sommets, arêtes, facettes) et de multiples modes de coordination pour les hydrures (ou deutérures). De plus, les hydrures (ou deutérures) se déplacent facilement à la surface des nanoparticules.

Par conséquent, différents clusters de ruthénium peuvent être modélisés. La figure 92a représente un cluster de 55 atomes de ruthénium, avec 1,6 hydrure par atome de ruthénium à sa surface. La figure 92b présente un autre isomère stable, avec le même noyau métallique mais deux atomes d'hydrogène sur un sommet.

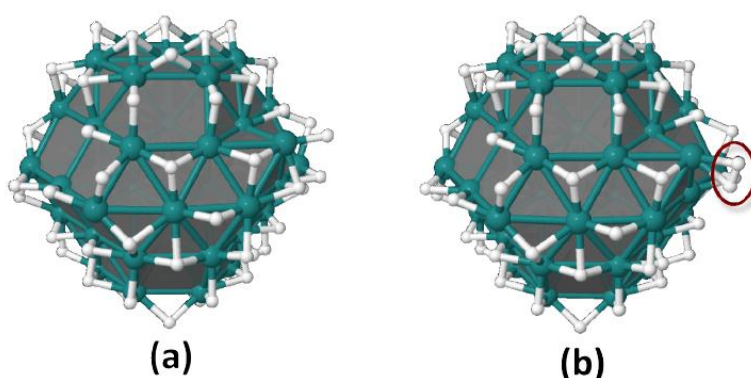


Figure 92 : Isomères du cluster hydrogéné Ru<sub>55</sub>H<sub>66</sub>.

<sup>110</sup> a) I. Rosal, M. Mercy, I. C. Gerber, R. Poteau, *ACS Nano* **2013**. b) I. del Rosal, L. Truflandier, R. Poteau, I. C. Gerber, *J. Phys. Chem. C* **2011**, 2169–2178. c) M. Y. Chou, J. R. Chelikowsky, *Phys. Rev. B* **1989**, *39*, 5623–5631. d) I. M. Ciobica, A. W. Kleyn, R. A. Van Santen, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 164–172. e) L. Xu, H. Y. Xiao, X. T. Zu, *Chem. Phys.* **2005**, *315*, 155–160.

La présence de H<sub>2</sub> non-dissocié est probablement spécifique de certains sites à la surface des nanoparticules, mais ils peuvent être à l'origine d'un mécanisme d'échange H/D passant par un complexe  $\sigma$ -D<sub>2</sub> (Figure 87).

#### V. B. 4. c) Propriétés d'adsorption sur des modèles hydrogénés

Les énergies d'adsorption des molécules **79\*** et **80\*** sur les modèles hydrogénés (Figure 93) sont regroupées dans le tableau 11.

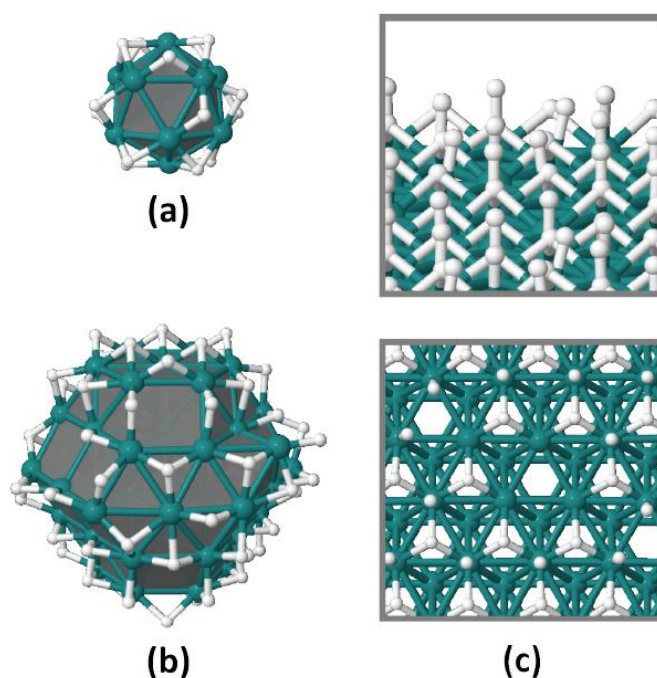


Figure 93 : Modèles hydrogénés de RuNPs avec 1,6 hydrures par atome de Ru de surface. (a) Ru<sub>13</sub>H<sub>19</sub>, (b) Ru<sub>55</sub>H<sub>66</sub>, (c) bloc Ru(0001) 4 X 4 X 6 avec 25 atomes de H (vues de dessus et de côté).

Composé	$\Delta E$ Ru <sub>13</sub> H <sub>19</sub>	$\Delta E$ Ru <sub>55</sub> H <sub>66</sub>	$\Delta E$ Ru(0001) + 25 H
<b>79*</b>	-20,1	-19,7 <sup>a</sup> /-31,1 <sup>b</sup>	-6,8
<b>80*</b>	-4,6	-6,5 <sup>a</sup> /-24,7 <sup>b</sup>	22,1

Tableau 11 : Énergie d'adsorption ( $\Delta E$  en kcal/mol) de l'isopropylamine avant (composé **79\***) et après activation C-H (composé **80\***) sur trois modèles hydrogénés de RuNPs. <sup>a</sup> adsorption sur une facette (001). <sup>b</sup> adsorption sur un site B<sub>5</sub>.



Là encore, nous pouvons observer que les résultats obtenus sur les clusters sont similaires. Tandis que l'adsorption est exothermique sur les clusters, elle n'est stable que dans le cas de l'adsorption du composé **79\*** sur le modèle Ru(0001). Ru(0001) n'est donc pas adapté en tant que modèle hydrogéné pour notre étude. Ru<sub>13</sub> représente le modèle le plus avantageux : il donne des résultats proches de ceux obtenus sur des clusters plus grands (Ru<sub>55</sub> et Ru<sub>110</sub>) mais, comme il est plus petit, il demande moins de temps de calculs, ce qui permet d'explorer beaucoup plus d'hypothèses de mécanisme.

## V. C. Études mécanistiques

### V. C. 1. Les voies de plus basse énergie

Sur Ru<sub>13</sub>H<sub>19</sub>, l'isopropylamine modèle **78** présente une énergie d'adsorption de -20,1 kcal/mol. Cette valeur indique que le mécanisme d'activation C-H doit certainement débiter par le greffage de l'amine sur un ruthénium de surface. Ensuite deux voies compétitives, basées sur le mécanisme de type Langmuir-Hinshelwood (cf. IV. A. 2.) sont possibles. L'une comme l'autre impliquent l'activation C-H sur un deuxième atome de ruthénium voisin. Dans la première voie (Figure 94), la réaction procède par un intermédiaire Ru( $\eta^2$ -HD) **2\***, avec un complexe  $\sigma$  similaire à celui décrit en Figure 85. Dans la seconde voie (Figure 95), l'activation C-H procède par addition oxydante sur la liaison C( $sp^3$ )-H et formation de l'intermédiaire **2<sub>a</sub>'\*** similaire à celui décrit en Figure 84. Ces deux voies peuvent avoir lieu sur le même site, avec des énergies d'activation similaires (**TS<sub>2</sub>** : 27,8 kcal/mol et **TS<sub>2</sub>'** : 30,1 kcal/mol). Enfin, il est important de noter que, quelle que soit la voie, la coordination simultanée des atomes d'azote et d'hydrogène sur le cluster implique de fait une rétention de configuration.

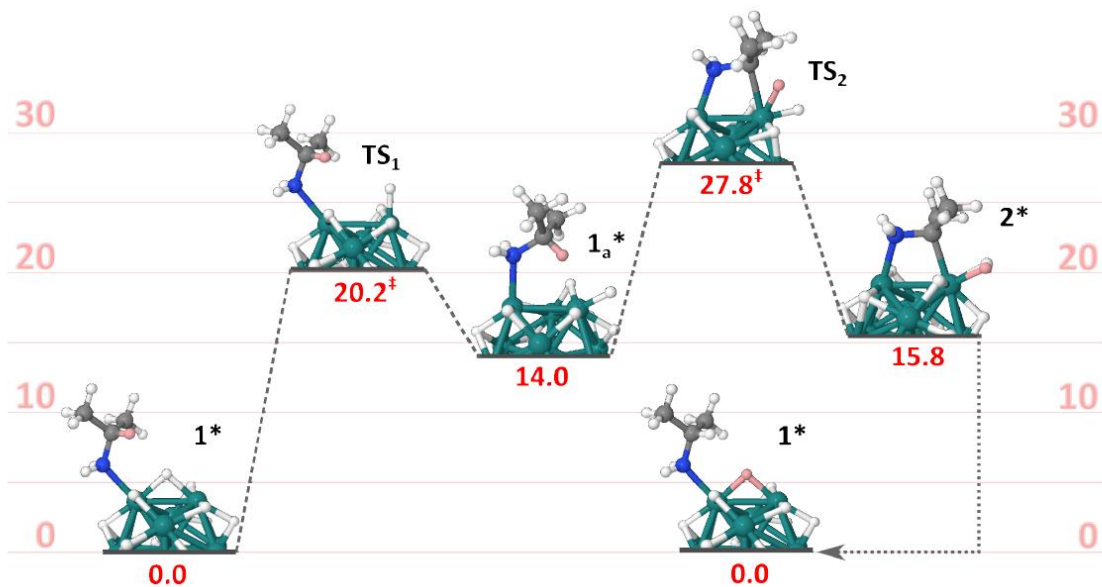


Figure 94 : Mécanisme 1 d'activation C-H sur un cluster  $\text{Ru}_{13}\text{H}_{19}$  par métathèse de liaison  $\sigma$  (énergies en kcal/mol). L'atome H partant est représenté en rouge pour plus de clarté.

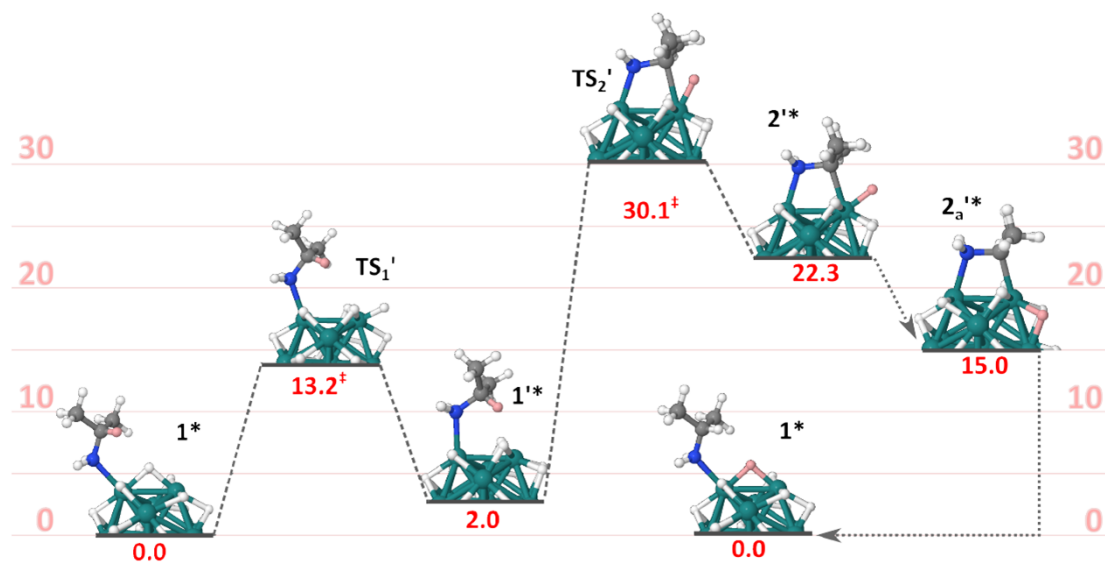


Figure 95 : Mécanisme 2 d'activation C-H sur un cluster  $\text{Ru}_{13}\text{H}_{19}$  par addition oxydante (énergies en kcal/mol). L'atome H partant est représenté en rouge pour plus de clarté.

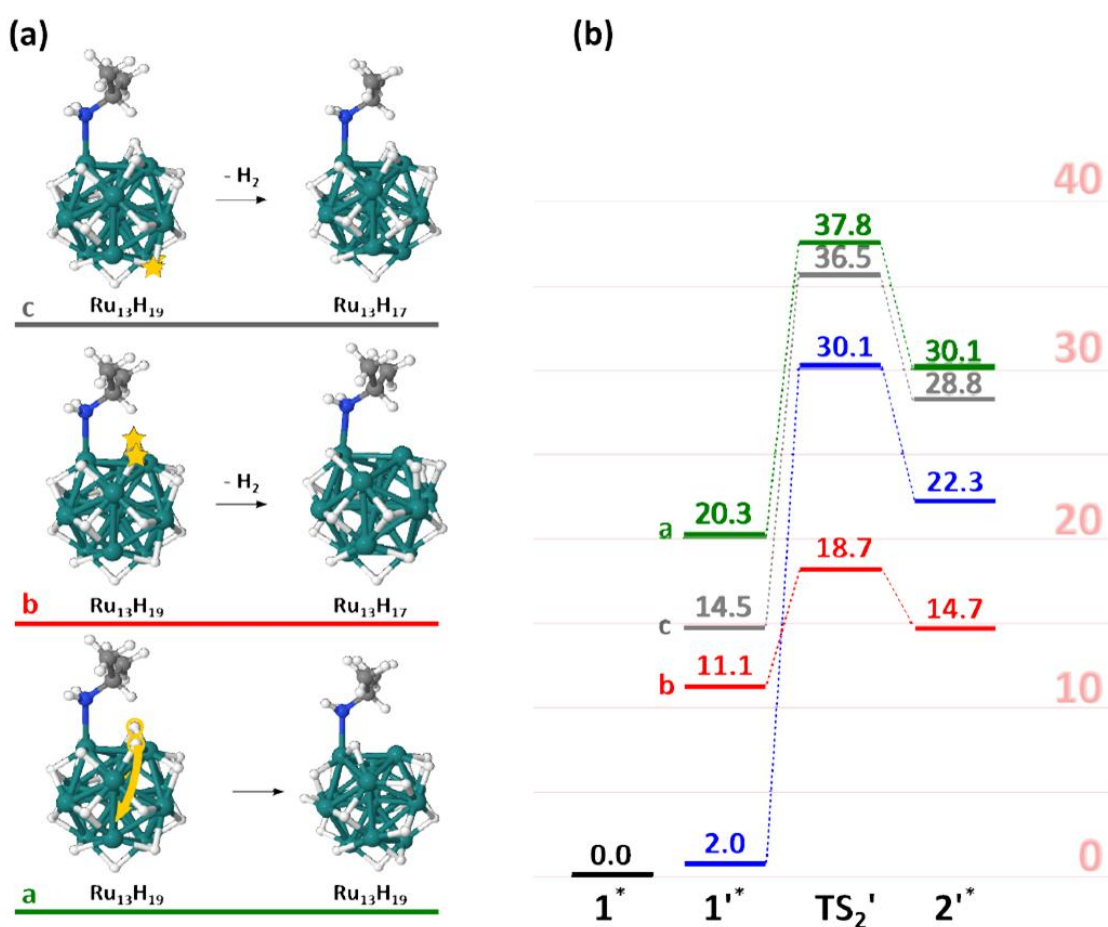
## V. C. 2. L'influence des hydrures de surface

Selon les calculs DFT, l'activation C-H peut avoir lieu selon deux voies avec des barrières d'énergie similaires (environ 30 kcal/mol). Les deux mécanismes peuvent donc avoir lieu dans des conditions douces.

L'équipe de Poteau décide d'étudier l'influence du nombre d'hydrures de surface par atome de ruthénium sur le mécanisme 2.

L'isopropylamine est greffée sur le modèle  $\text{Ru}_{13}\text{H}_{19}$  modifié de trois façons différentes (Figure 96a) :

- déplacement de deux atomes de H initialement coordonnés à l'atome de ruthénium activant la rupture de la liaison C-H (diagramme a vert)
- désorption/suppression de ces deux atomes de H du site actif (diagramme b rouge)
- désorption/suppression de deux atomes de H non-coordinés sur le site actif de Ru (diagramme c gris).



Figures 96 : Influence du nombre d'hydrures sur l'état de transition de l'addition oxydante ( $\text{TS}_2'$ , mécanisme 2). (a) Processus d'isomérisation ou de désorption. (b) Diagrammes d'énergie pour l'activation C-H par oxydation.

Le diagramme de référence correspondant au mécanisme 2 (Figure 93) est représenté en bleu.

Par comparaison avec le diagramme bleu de référence (Figure 96b), nous pouvons constater que les intermédiaires présentant une surface de Ru plus faiblement saturée en hydrures (ou deutères), au voisinage du site de greffage de l'amine, semblent favoriser l'activation C-H

par abaissement de l'énergie d'activation (12 kcal/mol) qui est alors beaucoup plus facile à surmonter en conditions douces.

Des comparaisons similaires sur le cluster Ru<sub>55</sub>H<sub>64</sub> conduisent aux mêmes observations : l'adaptation de la composition locale de la surface peut significativement abaisser la barrière d'énergie et le processus d'échange H/D peut être facilité par le mouvement dynamique des deutérures de surface.

L'activation C-H est donc plus facile si le site actif de Ru est le plus « nu » possible, grâce à la diffusion des deutérures de surface.

Selon le concept de Paul Sabatier, les propriétés catalytiques sont bloquées si les réactifs s'adsorbent trop fortement ou si l'interaction est trop faible<sup>111</sup>. Les RuNPs deutérées peuvent respecter ce principe en formant un arrangement optimal local des deutérures sur le site actif de Ru.

## **V. D. Mise en évidence d'un intermédiaire-clé original : le dimétallacycle à quatre centres**

### **V. D. 1. Les différentes approches pour l'activation C-H**

Le développement de nouvelles transformations chimiques, basées sur la fonctionnalisation catalytique de liaisons C-H non-activées peut considérablement simplifier la synthèse de molécules complexes. La catalyse par les métaux de transition représente un moyen précieux pour convertir ces liaisons C-H non-réactives en liaisons C-C ou C-X (X = hétéroatome)<sup>112</sup>. Mais la transformation sélective de liaisons C-H aliphatiques reste encore un challenge.

---

<sup>111</sup> a) P. Sabatier, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 1984–2001. b) H. Toulhoat, P. Raybaud, *J. Catal.* **2003**, *216*, 63–72. c) K. Tedsree, C. W. A. Chan, S. Jones, Q. Cuan, W.-K. Li, X.-Q. Gong, S. C. E. Tsang, *Science* **2011**, *332*, 224–229.

<sup>112</sup> a) X. Chen, K. M. Engle, D.-H. Wang, J.-Q. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 5094–5115. b) R. Giri, B.-F. Shi, K. M. Engle, N. Maugel, J.-Q. Yu, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3242–3272. c) K. Godula, D. Sames, *Science* **2006**, *312*, 67–72. d) K. M. Engle, T. Mei, M. Wasa, J. Yu, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 788–802. e) H. M. L. Davies, J. Du Bois, J.-Q. Yu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1855–1856. f) J. Yamaguchi, A. D. Yamaguchi, K. Itami, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 8960–9009. g) J. Wencel-Delord, F. Glorius, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 369–375.

Les approches les plus prometteuses de fonctionnalisation C-H ont lieu *via* une cycloméallation, c'est-à-dire qu'elles utilisent un groupement directeur qui positionne le catalyseur métallique près d'une liaison particulière C-H<sup>113</sup>. La plupart des procédés d'activation C-H aliphatique dirigée passe par un intermédiaire métallacycle à cinq centres<sup>114</sup>.

## V. D. 1. a) Métallacycles à cinq centres

Diverses classes de groupements directeurs peuvent participer à l'activation C-H de systèmes aliphatiques comme les dérivés carbonyliques, les hétérocycles aromatiques azotés et les motifs hydroxyles<sup>115</sup>. Les sels de palladium sont particulièrement utilisés pour la cycloméallation avec ces groupements fonctionnels. La coordination du centre palladium sur l'hétéroatome base de Lewis du groupement directeur permet d'abaisser le coût entropique et enthalpique du clivage de la liaison C-H et de la fermeture du cycle. Les intermédiaires cyclisés à cinq centres sont donc cinétiquement favorisés par rapport aux autres voies de cyclopalladation. La réaction entre la liaison C-Pd formée et un réactif externe conduit ensuite à la conversion de la liaison C-H de départ en groupement fonctionnel. Ce type de cycloméallation permet donc généralement la fonctionnalisation C-H en position  $\gamma$  du groupement directeur (Figure 97).

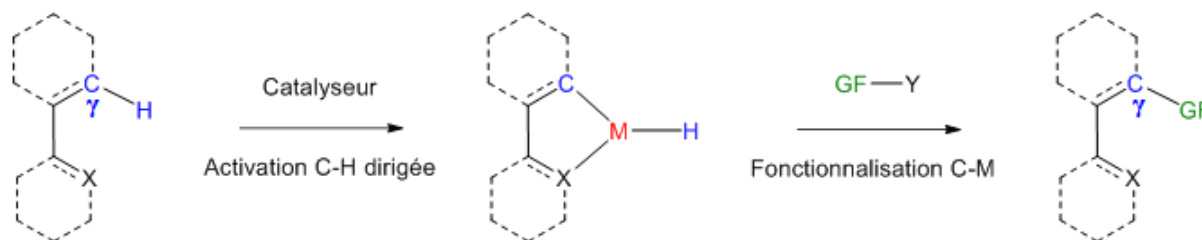


Figure 97 : Activation C-H dirigée par cycloméallation à cinq centres. M = métal, X = groupement directeur, GF = groupement fonctionnel.

En dépit de son incroyable succès depuis ces cinq dernières années, la cycloméallation à cinq centres présente une limitation : une seule position ( $\gamma$  le plus souvent) est susceptible d'être C-H activée selon le groupement directeur utilisé. Cela signifie que certaines disconnections

<sup>113</sup> J. Dupont, C. S. Consorti, J. Spencer, O. Addition, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2527–2571.

<sup>114</sup> a) T. W. Lyons, M. S. Sanford, I. C. N. B. Formation, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1147–1169. b) L. Ackermann, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 1315–1345. c) D. A. Colby, R. G. Bergman, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 624–655.

<sup>115</sup> a) L. V. Desai, K. L. Hull, M. S. Sanford, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9542–9543. b) V. G. Zaitsev, D. Shabashov, O. Daugulis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13154–13155. c) D. Wang, M. Wasa, R. Giri, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7190–7191. d) R. Giri, X. Chen, J.-Q. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2112–2115. e) L. Campeau, D. J. Schipper, K. Fagnou, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3266–3267. f) R. Giri, N. Mangel, J. Li, D. Wang, S. P. Breazzano, L. B. Saunders, J. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3510–3511. g) E. M. Simmons, J. F. Hartwig, *Nature* **2012**, *483*, 70–73.

sont encore inaccessibles. Il semble alors évident que le développement de nouvelles voies de cyclométabolisation permettrait d'avoir accès à de nouvelles transformations chimiques<sup>116</sup>.

### V. D. 1. b) Métallacycles à six centres

Contrairement aux exemples de fonctionnalisation C-H passant par des intermédiaires métallacycles à cinq centres, les exemples de fonctionnalisation C-H passant par des intermédiaires métallacycles à six centres sont plus rares (Figure 98)<sup>117</sup>. Ces intermédiaires permettent la fonctionnalisation en position  $\delta$  du groupement directeur.

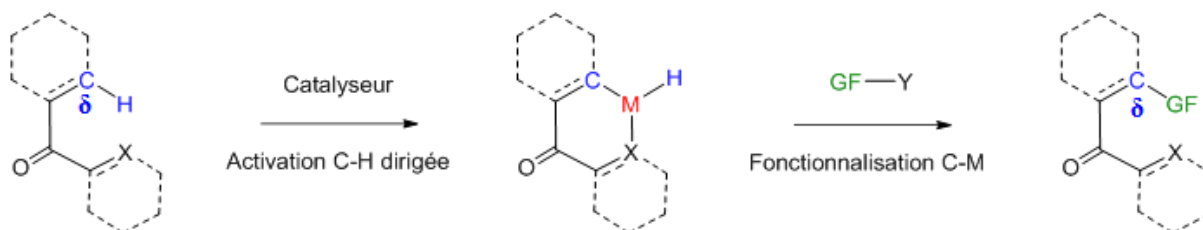


Figure 98 : Activation C-H dirigée par cyclométabolisation à six centres. M = métal, X = groupement directeur, GF = groupement fonctionnel.

### V. D. 1. c) Métallacycles à quatre centres

En 2014, l'équipe de Gaunt se propose de développer un nouveau mode d'activation C-H par l'intermédiaire d'un palladacycle à quatre centres, à partir d'un substrat qui ne possède pas de liaison C-H sur les positions ( $\gamma$  ou  $\delta$ ) facilitant un processus classique, cinétiquement favorisé, d'insertion et de formation des métallacycles à cinq ou six centres<sup>118</sup>. Tandis que les groupements directeurs tels que les acides carboxyliques et les hydroxyles ont été déjà décrits en cyclopalladation catalytique, aucun exemple d'activation C-H catalytique dirigée par une amine aliphatique non-protégée n'a été encore développé<sup>119</sup>. L'équipe décide alors de suivre une nouvelle stratégie d'activation C-H catalysée au palladium utilisant une amine secondaire aliphatique non-protégée pour diriger la formation d'un intermédiaire métallacycle à quatre centres (Figure 99).

<sup>116</sup> D. Leow, G. Li, T.-S. Mei, J.-Q. Yu, *Nature* **2012**, 486, 518–522.

<sup>117</sup> a) J.-H. Chu, S.-L. Tsai, M.-J. Wu, *Synthesis* **2009**, 2009, 3757–3764. b) X. Zhao, Z. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8136–8137. c) W. Jin, Z. Yu, W. He, W. Ye, W. Xiao, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1317–1320. d) M. C. Tseng, J. L. Ke, C. C. Pai, S. P. Wang, W. L. Huang, *Polyhedron* **2006**, 25, 2160–2166. e) B. Li, C. Darcel, P. H. Dixneuf, *ChemCatChem* **2014**, 6, 127–130.

<sup>118</sup> A. McNally, B. Haffemayer, B. S. L. Collins, M. J. Gaunt, *Nature* **2014**, 510, 129–133.

<sup>119</sup> a) G. He, Y. Zhao, S. Zhang, C. Lu, G. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3–6. b) S. Zhang, G. He, W. A. Nack, Y. Zhao, Q. Li, G. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2124–2127. c) A. D. Ryabov, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 403–424. d) K. S. L. Chan, M. Wasa, L. Chu, B. N. Laforteza, M. Miura, J.-Q. Yu, *Nat. Chem.* **2014**, 6, 146–150. e) P. M. Wehn, J. Lee, J. Du Bois, S. U. V., *Org. Lett.* **2003**, 5, 4823–4826.

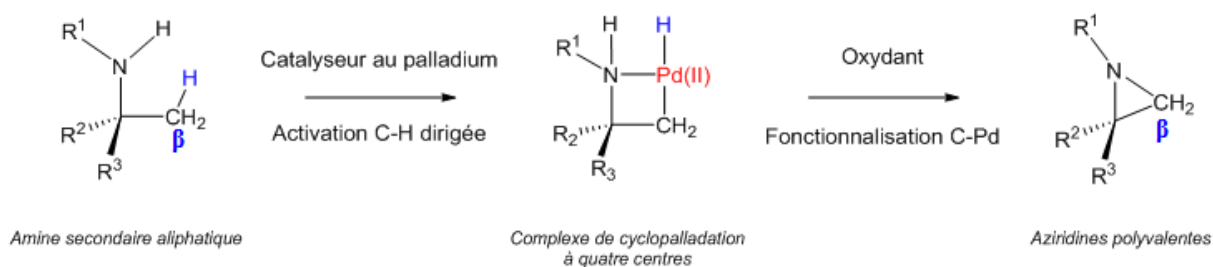


Figure 99 : Activation C-H d'une amine aliphatique secondaire *via* un complexe de cyclopalladation à quatre centres et nouvelle réactivité en présence d'un oxydant pour former des hétérocycles azotés tendus et synthétiquement polyvalents tels que les aziridines proposée par l'équipe de Gaunt. R<sup>1-3</sup> = substituants aliphatiques.

Ce nouveau mode d'activation C-H permet d'avoir accès à une large gamme de nouveaux dérivés aziridines, motifs polyvalents et très utiles pour la synthèse de composés complexes tels que les aminoacides quaternaires (Figure 100).

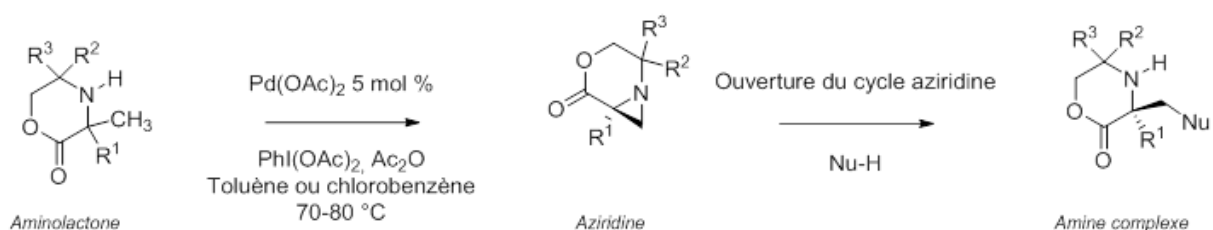


Figure 100 : Application de l'aziridination C-H catalysée au palladium pour la formation d'amines complexes<sup>118</sup>.

## V. D. 2. Une nouvelle voie de cycloméallation pour l'activation C-H : l'intermédiaire dimétallacycle à quatre centres

Les deux mécanismes déterminés, par calculs DFT, pour la réaction d'échange H/D par activation C-H sur l'isopropylamine modèle passent par le même intermédiaire dimétallacycle à quatre centres : l'atome d'azote directeur, l'atome de carbone en position  $\alpha$  de la liaison C-H activée et deux atomes de ruthénium) (Figure 101). En effet, après le greffage de l'azote sur le premier atome de ruthénium à la surface de la nanoparticule et la rupture de la liaison C-H par l'insertion d'un deuxième atome de ruthénium, les deux voies procèdent par la formation de cet intermédiaire-clé à l'origine de la régiosélectivité et de l'énantiospécificité observées expérimentalement.

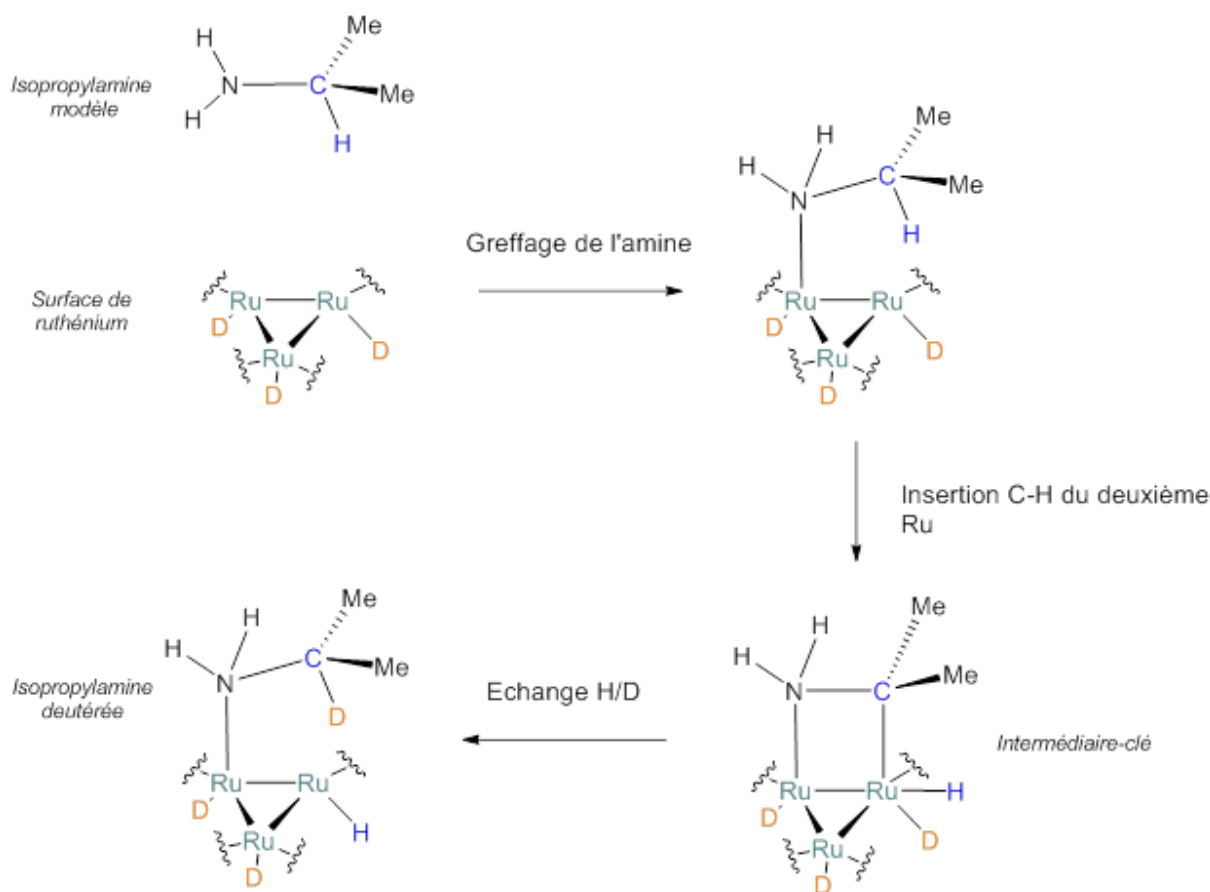


Figure 101 : Activation C-H passant par un intermédiaire-clé original dimétallacycle à quatre centres dont deux ruthéniums.

Le greffage de l'atome d'azote et de l'atome de carbone en position  $\alpha$ , sur deux atomes de ruthénium voisins, à la surface de la nanoparticule, implique *de facto* une rétention de configuration à cause de la rigidité du dimétallacycle. Nous pensons que cet intermédiaire-clé pourrait ouvrir la voie vers un nouveau type de fonctionnalisation C-H.

## V. E. Conclusions

Le mécanisme 1 passe par un état de transition à quatre centres **TS<sub>b</sub>**, avec deux atomes de Ru puis par un intermédiaire  $\text{Ru}(\eta^2\text{-HD})$  avec un complexe  $\sigma$  (composé **2b**, Figure 102). Cette réaction par métathèse de liaison  $\sigma$  n'implique pas de changement de l'état d'oxydation du site actif Ru. Il s'agit d'une voie alternative à la voie 2 d'addition oxydante sur la liaison  $\text{C}(sp^3)\text{-H}$  légèrement moins favorable.



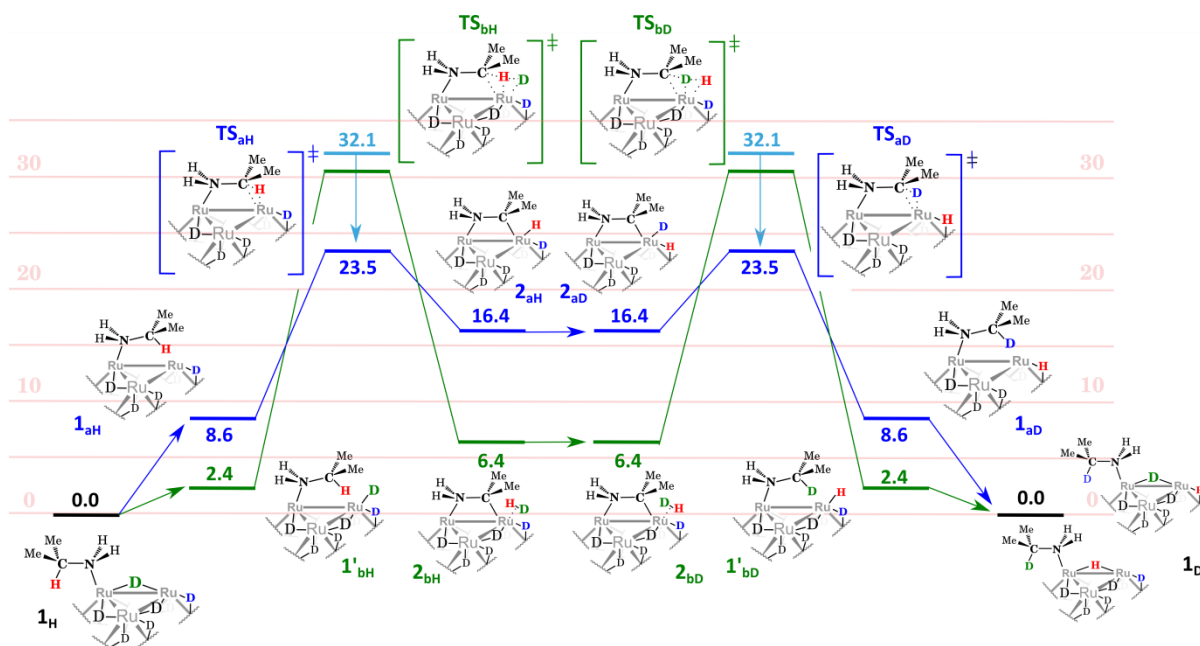


Figure 102 : Diagramme d'énergie des mécanismes d'échange H/D de type Langmuir-Hinshelwood sur un modèle Ru<sub>55</sub>D<sub>n</sub> de 1 nm (énergies en kcal/mol). L'étape limitante est soit la métathèse de liaison  $\sigma$  (diagramme vert, mécanisme 1) soit l'addition oxydante (diagramme bleu, mécanisme 2). Le diagramme bleu foncé est obtenu en diminuant par deux le nombre de deutériures directement liés à l'atome de Ru activant la liaison C $_{\alpha}$ -H afin de simuler une surface d'atomes de Ru faiblement coordonnée en atomes de D.

Cependant, un phénomène intéressant peut être identifié pour la voie 2 d'addition oxydante sur le cluster deutéré Ru<sub>13</sub> et confirmé sur le cluster Ru<sub>55</sub>. Les intermédiaires présentant des atomes de Ru faiblement coordonnés par des atomes de D, au voisinage du site de greffage de l'amine, favorisent l'activation C-H en abaissant significativement l'énergie d'activation (23,5 kcal/mol au lieu de 32,1 kcal/mol). Cela signifie que la diffusion des deutériures de surface permet au centre actif métallique de garder un état d'oxydation global stable durant l'addition oxydante. Le mécanisme 2 d'addition oxydante peut être compétitif sur certains sites des nanoparticules mais le mécanisme 1 de métathèse de liaison  $\sigma$  semble être le plus favorable pour la réaction d'échange H/D.

D'après les calculs DFT, ces deux mécanismes impliquent deux atomes de ruthénium voisins agissant de manière coopérative pour conduire à la formation d'un dimétallacycle à quatre centres original en tant qu'intermédiaire-clé.

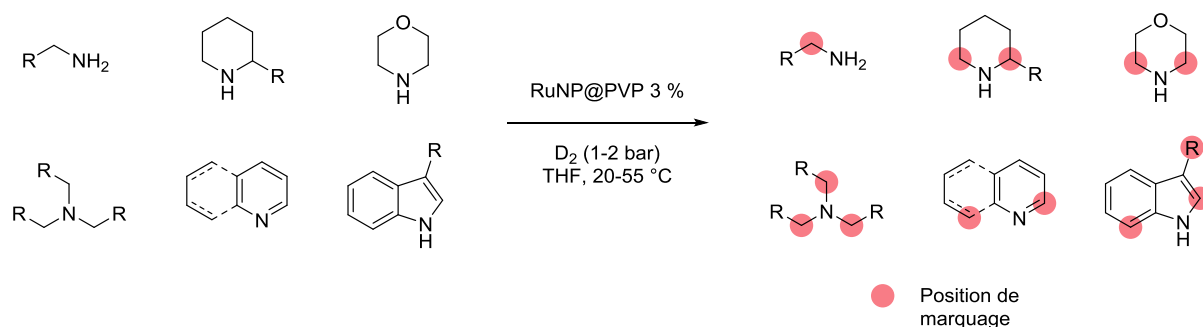
## **Conclusions et perspectives**



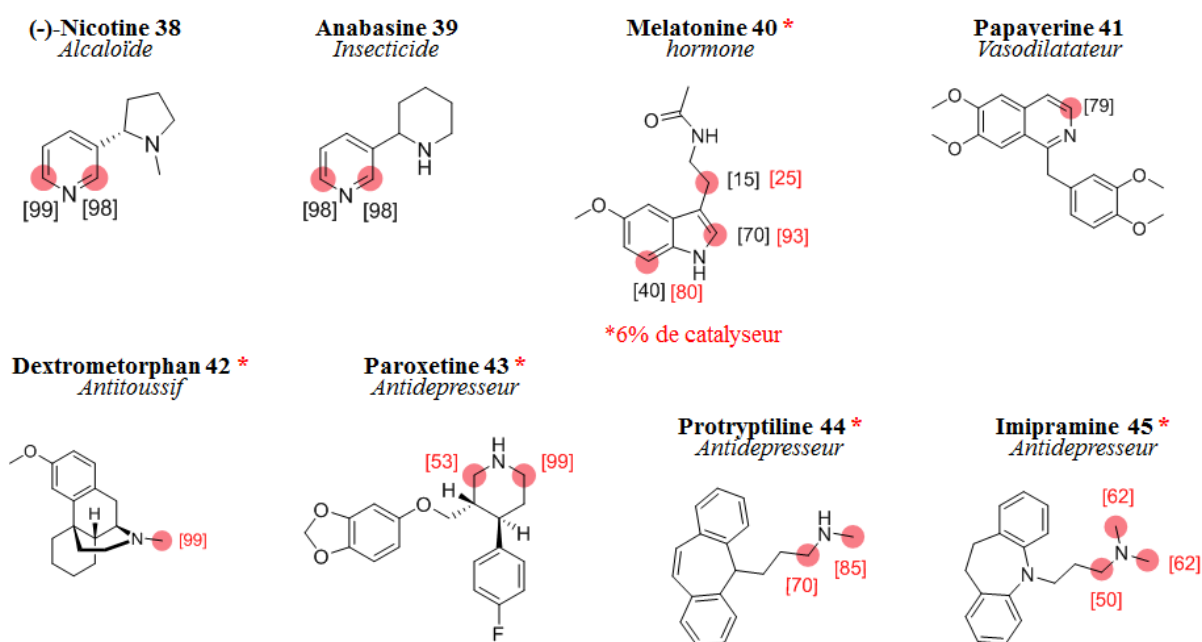
# Conclusions

Le premier objectif de la thèse consistait à évaluer l'activité catalytique des nanoparticules RuNP@PVP envers la réaction d'échange H/D, par activation C-H, sur des molécules azotées.

- La méthode d'échange H/D développée par notre équipe a permis la deutération de quatorze dérivés de pyridines, quinolines, indoles et amines alkylées, avec de bons rendements et de fortes chimio- et régiosélectivités, à l'aide de nanoparticules RuNP@PVP en tant que catalyseur et de D<sub>2</sub> en tant que source isotopique.



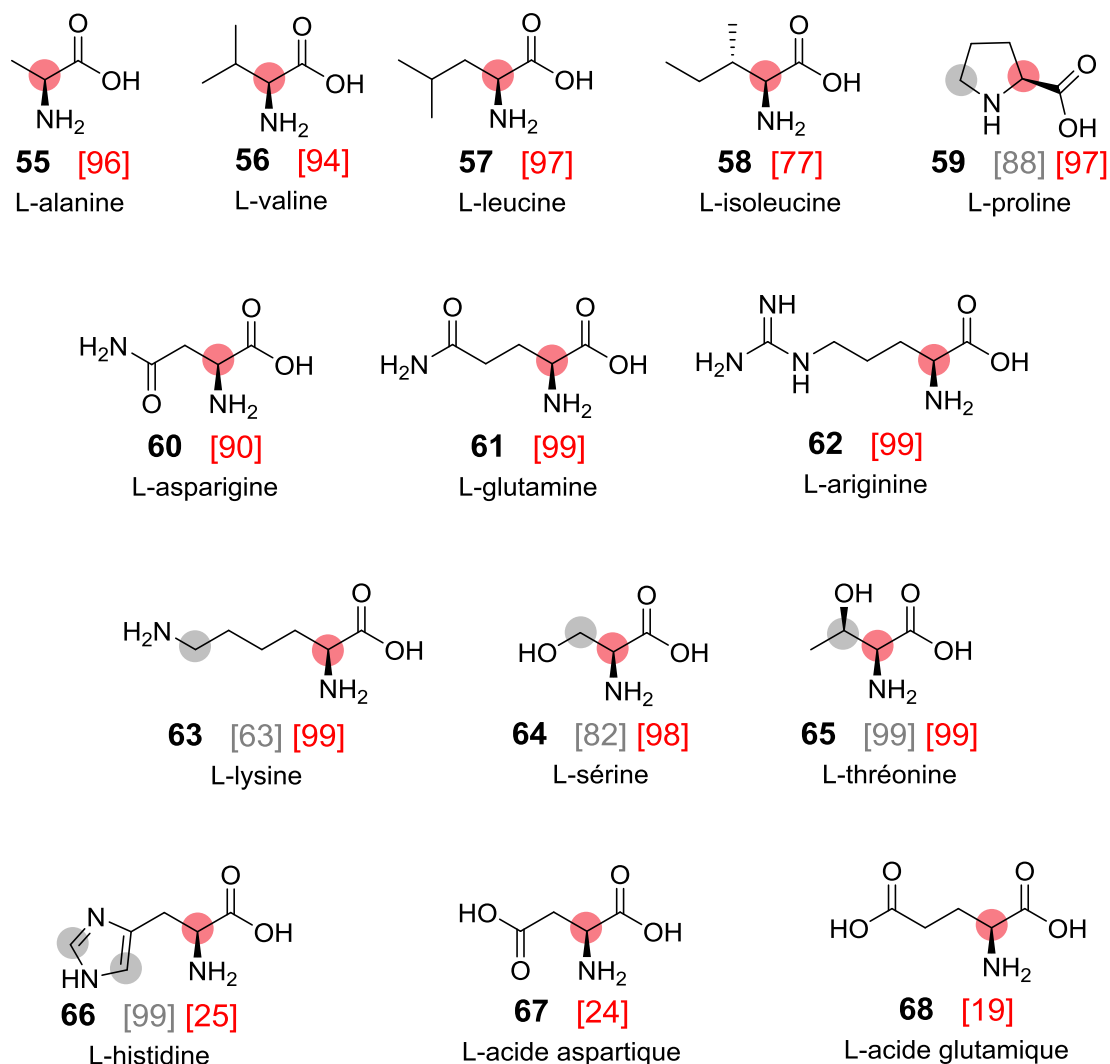
- La large gamme d'application de cette procédure a été démontrée par le marquage de huit composés biologiquement actifs. On observe une conservation de la pureté énantiomérique même si le marquage a lieu au voisinage du centre asymétrique.



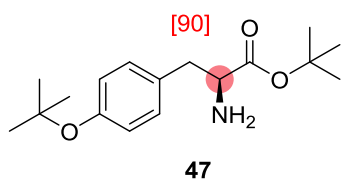
Le second objectif de ce travail de recherche était de tester notre nouvelle méthode d'échange H/D, par activation de liaisons C(*sp*<sup>3</sup>)-H, utilisant des nanoparticules de ruthénium, sur des centres stéréogènes.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à la deutération d'acides aminés protéinogènes et de dérivés aminoesters. Elle a lieu sous conditions douces (D<sub>2</sub> à 2 bar, 55 °C), dans divers solvants (D<sub>2</sub>O, THF, DMF), avec un fort enrichissement isotopique, de manière régiosélective (en position α de l'azote) et énantiospécifique. Les résultats obtenus sont les suivants :

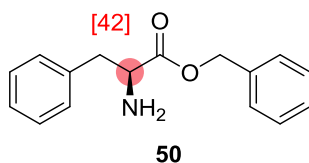
- Quatorze aminoacides protéinogènes ont été deutérés dans l'eau lourde sur le C<sub>α</sub> avec rétention totale de sa configuration.



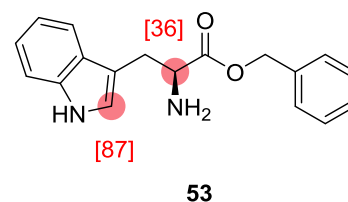
- Concernant les aminoacides aromatiques, nous avons préféré réaliser notre méthode de deutération sur leurs dérivés aminoesters, dans le THF ou le DMF, ce qui montre ses multiples applications.



L-tyrosine tert-butyl éther tert-butyl ester



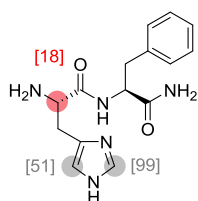
L-phénylalanine benzyl ester



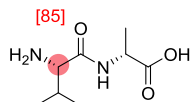
L-tryptophane benzyl ester

Après avoir obtenu ces résultats très encourageants, nous avons décidé d'étendre l'application de notre méthode de deutération sur une classe de molécules encore plus complexes et intéressantes : les peptides.

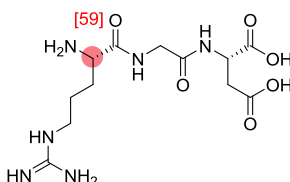
- Quatre peptides modèles aux propriétés biologiques essentielles ont été deutérés dans l'eau lourde, sous atmosphère de D<sub>2</sub> (2 bar), à 55 °C. Dans ces quatre cas également, la deutération a lieu régiosélectivement sur le C<sub>α</sub> voisin du N-terminal, sans altération des structures de départ et de leur configuration.



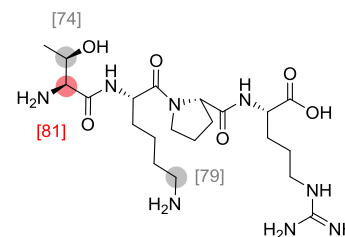
His-Phe-NH<sub>2</sub> **69**



Val-Ala **70**



Arg-Gly-Asp **71**



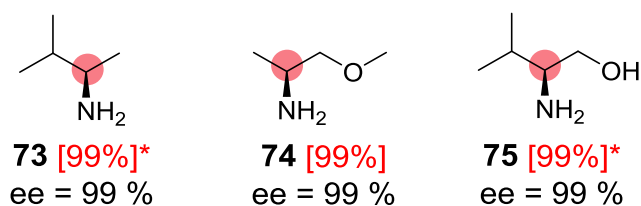
Tuftsin **72**

Enfin, des essais supplémentaires ont permis de recueillir de nouvelles informations les mécanismes mis en jeu lors du marquage au deutérium.

- Même si la deutération des aminoacides protéinogènes est possible dans l'eau (H<sub>2</sub>O), elle peut être nettement améliorée lorsqu'elle a lieu en milieu basique (NaOH 0,01M) et que la forme -NH<sub>2</sub> de l'amine est favorisée.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes concentrés sur l'étude du mécanisme de la réaction d'échange H/D ayant lieu à la surface des nanoparticules de ruthénium. Cette étude repose à la fois sur des observations expérimentales et sur des calculs quantiques DFT.

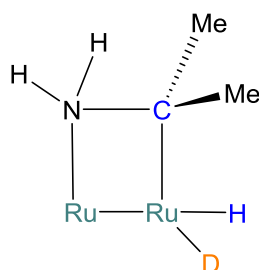
- Le marquage de trois amines chirales modèles a montré que l'atome d'azote, coordonnant à la surface des nanoparticules de ruthénium, joue le rôle de groupement directeur.



- Divers essais de deutération sous argon ou D<sub>2</sub>, dans H<sub>2</sub>O ou D<sub>2</sub>O ont confirmé que D<sub>2</sub> gaz est la source de deutérium incorporé sur le C<sub>α</sub> des aminoacides.

Les calculs DFT ont permis de déterminer deux mécanismes pour la réaction d'échange H/D, par activation C-H : le mécanisme par métathèse de liaison σ et le mécanisme d'addition oxydante.

- Ces deux mécanismes impliquent deux atomes de ruthénium voisins agissant ensemble pour conduire à la formation d'un intermédiaire-clé original dimétallacycle à quatre centres.



- Les conditions douces, la régiosélectivité et l'issue stéréochimique de cette nouvelle réaction sont parfaitement en accord avec les mécanismes déterminés par les calculs DFT. Ils indiquent aussi qu'un déplacement collectif des ligands de surfaces permet de moduler la structure électronique locale à la surface des nanoparticules et donc d'optimiser l'addition oxydante favorable sur certains sites.

Ces résultats démontrent clairement le grand potentiel des nanoparticules pour la catalyse de l'activation de liaisons C-H et ouvre la voie au développement rationnel de nouvelles fonctionnalisations C-H énantiospécifiques.

# Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la suite de ces travaux :

- Notre méthode de marquage a lieu sous atmosphère de D<sub>2</sub> à 1 ou 2 bar, paramètre important pour disposer de conditions douces, mais nous manquons encore d'informations concernant l'influence de la pression de gaz sur la deutération. Des travaux sont en cours pour essayer de comprendre cette influence et pour mettre au point des conditions de réaction (entre 0,2 et 0,8 bar) adaptées au marquage au tritium.
- L'application de notre méthode de deutération sur des molécules aux propriétés biologiques essentielles telles que les acides aminés et les peptides montre son utilité potentielle pour la préparation de standards internes, outils précieux en spectrométrie de masse. Il serait intéressant d'étendre la deutération à d'autres molécules essentielles de la biologie telles que les bases puriques, contenues dans l'ADN ou l'ARN.
- Les nanoparticules de ruthénium « nues » utilisées pour ces travaux de thèse ont permis d'obtenir d'excellents enrichissements isotopiques sur de nombreux substrats. Mais, à faible charge catalytique, la deutération des deux aminoacides soufrés (cystéine et méthionine) est très faible en  $\alpha$  de l'atome de soufre et nul en  $\alpha$  de l'atome d'azote. Des travaux sont en cours pour améliorer l'enrichissement isotopique sur ces deux acides aminés et d'autres dérivés soufrés.
- L'intermédiaire-clé dimétallacycle à quatre centres mis en évidence par les calculs DFT permettrait la C-H fonctionnalisation énantiospécifique, en position  $\alpha$  d'un atome d'azote, et donc la formation de liaisons C-C, C-Si ou C-B inédites. Il serait intéressant de vérifier si ces types de fonctionnalisations sont possibles à l'aide des nanoparticules de ruthénium.





**PARTIE 2 : NOUVELLE  
STRATÉGIE D'ÉTUDE  
STRUCTURALE DE PETITES  
MOLÉCULES EN INTERACTION  
AVEC DES COMPLEXES  
SUPRAMOLÉCULAIRES**



# **Introduction**



# Introduction

Les méthodes couramment utilisées pour déterminer des distances entre différents sites d'une molécule ou d'un complexe sont la diffraction aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (ou RMN), le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET en anglais : fluorescence energy transfer) et la résonance paramagnétique électronique (EPR en anglais : electron paramagnetic resonance). Chacune de ces méthodes présentent des avantages et des limitations suivant le principe physique mis en jeu, l'approche technique et la préparation de l'échantillon.

Les méthodes spectroscopiques biophysiques telles que le FRET et l'EPR sont efficaces pour obtenir des informations structurales de grands systèmes biologiques. Ces méthodes présentent l'avantage de donner accès à la mesure de très longues distances (15 à 80 Å) par transfert de fluorescence ou couplage dipolaire entre électrons non-appariés. Cependant, ces deux méthodes nécessitent le marquage de molécules avec des sondes de taille importante (marqueurs de spin portant un groupement nitroxy pour l'EPR ou fluorophores pour le FRET) qui peut induire des perturbations structurales ou des changements de conformation, en particulier pour les petites molécules semblables à celle que nous souhaitons étudier dans cette thèse.

La diffraction aux rayons X est la méthode la plus efficace pour déterminer les structures 3D de molécules mais la précision de la structure atomique déterminée dépend de la qualité des cristaux. La résolution de leurs structures reste donc difficile.

Enfin, la RMN représente, elle aussi, une méthode puissante pour la détermination de structures 3D à différents états. Des progrès significatifs ont été réalisés en RMN à l'état solide pour étudier l'agrégation des protéines à l'échelle atomique. Cependant, la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  ne permet que la mesure de distances courtes (typiquement jusqu'à 6-7 Å). Elle est aussi très utile pour la mesure des angles de torsion.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la RMN du tritium à l'état solide ( $^3\text{H}$ -ssNMR en anglais : tritium solid-state NMR) qui permet de mesurer des distances interatomiques plus longues (jusqu'à 14 Å).

Le dipeptide Phe-Phe (ou diphénylalanine) présente des propriétés intéressantes : selon le solvant utilisé, il peut cristalliser ou s'auto-assembler en nanotubes. Ces nanotubes de Phe-

Phe sont considérés comme des assemblages de référence pour le développement de nouveaux matériaux, de biogels et de vésicules/nanotubes vecteurs de médicaments. Bien que d'intenses recherches aient été menées pour caractériser et pour modéliser ces nanotubes de Phe-Phe, l'assemblage moléculaire reste encore à résoudre à l'échelle atomique.

Phe-Phe est également une référence pour l'étude des auto-assemblages de petits peptides. En effet, le déterminant moléculaire clé dans l'assemblage de peptides repose sur la position relative des chaînes latérales qui, dans le cas de Phe-Phe, sont aromatiques. La technique de diffraction aux rayons X ne peut pas être utilisée pour déterminer la structure d'un tel auto-assemblage. Seule une technique de spectroscopie telle que la RMN à l'état solide donne accès à ce type d'information. La RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide représente donc une technique pertinente car le marquage spécifique d'une position précise sur les cycles aromatiques des deux phénylalanines constituant Phe-Phe est simple et pourrait permettre la détermination de l'orientation relative des chaînes latérales.

Nous nous sommes fixés comme objectif de cette thèse de développer une nouvelle méthode d'étude structurale d'auto-assemblages moléculaires qui repose sur la synergie entre chimie de marquage, RMN du tritium à l'état solide et modélisation moléculaire. Construit autour du dipeptide Phe-Phe cristallisé, notre projet est divisé en deux parties :

- Dans une première partie, nous avons montré que l'utilisation de la modélisation moléculaire, du marquage au tritium et de la RMN du tritium à l'état solide permet la mesure de distances intramoléculaires nécessaires à la détermination de la conformation de Phe-Phe cristallisé. Notre but est de mesurer un nombre de distances suffisant pour déterminer une conformation et la confrontée à celle déjà connue grâce à la diffraction aux rayons X. Cette comparaison devrait nous permettre de valider notre stratégie.
- Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au marquage de Phe-Phe pour la mesure de distances intermoléculaires qui devrait nous permettre de reconstruire la maille cristalline.

À plus long terme, après avoir travaillé sur Phe-Phe cristallisé, l'objectif de notre laboratoire serait d'appliquer la nouvelle approche développée par ces travaux de thèse à la détermination de la conformation de Phe-Phe, lorsqu'il est auto-assemblé en nanotubes monodisperses.

Ces travaux de thèse ont donc été réalisés en collaboration avec le Dr. Yves Boulard (CEA Saclay) pour identifier les positions de marquage au tritium les plus pertinentes par modélisation moléculaire basée sur un protocole de recuit simulé. La réalisation des cristaux

de Phe-Phe et l'étude des nanotubes ont été réalisées avec l'aide du Dr. Maïté Paternostre et du Dr. Manolis Kasotakis (CEA Saclay), chimistes spécialisés dans la caractérisation d'auto-assemblages de peptides. Enfin, les mesures des distances inter-tritiums par RMN du tritium à l'état solide ont été effectuées par le Dr. Thibault Charpentier et son équipe (CEA Saclay).





# **I. État de l'art**



# I. État de l'art

Certaines protéines donnent aux cellules leur capacité de mouvement (division cellulaire, contraction musculaire ou motilité<sup>120</sup> cellulaire, par exemple). Ces protéines ont une propriété commune : elles sont constituées de chaînes polypeptidiques filamenteuses qui s'assemblent en structures multimériques pour former des filaments<sup>121</sup>. Elles peuvent être liées à d'importantes maladies telles que la maladie d'Alzheimer et les encéphalopathies à prions transmissibles où l'apparition des enchevêtrements neurofibrillaires et des plaques amyloïdes sont des éléments importants des pathologies<sup>122</sup>.

Curieusement, les protéines entières ne sont pas essentielles à l'auto-assemblage. De petites séquences (deux à vingt acides aminés) de protéines sont responsables des auto-assemblages<sup>123,124</sup>. Ces peptides peuvent donc s'agréger et être étudiés *in vitro* où ils forment des fibrilles amyloïdes<sup>125,126</sup> ou, dans certains cas plus complexes, des nanoarchitectures telles que des nanotubes, des vésicules, des rubans hélicoïdaux ou des fibres twistées<sup>127</sup>. Cependant, il est très difficile d'accéder à la structure atomique et à l'organisation, aussi bien moléculaire que supramoléculaire, des nano-objets formés.

En effet, les auto-assemblages de protéines et de peptides n'ont pas de structure cristalline 2D ou 3D et ne sont pas solubles dans la plupart des solvants. Ils sont donc difficiles à étudier par diffraction des rayons X ou par RMN en solution. La plupart du temps, ces architectures sont caractérisées à l'échelle moléculaire à l'aide d'une large variété de techniques complémentaires : diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS en anglais : Small Angle X-ray Scattering), cristallographie bidimensionnelle, spectroscopies infrarouges et Raman,

---

<sup>120</sup> Capacité de se déplacer spontanément, par réaction à des stimuli ou activement en consommant de l'énergie.

<sup>121</sup> R. H. Garrett, C. M. Grisham. Les protéines : fonctions biologiques et structure primaire. *Biochimie*, **2000**, 124.

<sup>122</sup> a) E. Karran, M. Mercken, B. De Strooper, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 698–712. b) G. Invernizzi, E. Papaleo, R. Sabate, S. Ventura, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 1541–1554. c) M. Fändrich, M. Schmidt, N. Grigorieff, *Trends Biochem Sci.* **2011**, *36*, 338.

<sup>123</sup> K. E. Marshall, K. L. Morris, D. Charlton, N. O'Reilly, L. Lewis, H. Walden, L. C. Serpell, *Biochemistry* **2011**, *50*, 2061–2071.

<sup>124</sup> R. Friedman, *Biochem. J.* **2011**, *438*, 415–426.

<sup>125</sup> S. A. Sievers, J. Karanicolas, H. W. Chang, A. Zhao, L. Jiang, O. Zirafi, J. T. Stevens, J. Münch, D. Baker, D. Eisenberg, *Nature* **2011**, *475*, 96–100.

<sup>126</sup> T. P. J. Knowles, M. J. Buehler, *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 469–479.

<sup>127</sup> a) R. J. Swanekamp, J. T. M. DiMaio, C. J. Bowerman, B. L. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5556–5559. b) D. M. Ridgley, K. C. Ebanks, J. R. Barone, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3770–3779. c) K. Tao, J. Wang, P. Zhou, C. Wang, H. Xu, X. Zhao, J. R. Lu, *Langmuir* **2011**, *27*, 2723–2730. d) M. Reches, Y. Porat, E. Gazit, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35475–35480.

spectroscopies électroniques<sup>128</sup>. Mais ces techniques ne fournissent que des informations partielles.

La stratégie de l'équipe d'Eisenberg, par exemple, est d'utiliser la structure atomique du peptide déterminée par cristallographie pour ensuite construire des modèles structuraux de nanotubes<sup>129</sup>. Cependant, la conformation adoptée par le peptide dans l'assemblage n'est pas forcément la même que celle adoptée dans la maille cristalline<sup>130</sup>.

Une approche prometteuse pour la caractérisation de la structure et de la dynamique de ces assemblages est basée sur la RMN à l'état solide car les mesures peuvent être réalisées directement sur ces auto-assemblages<sup>131</sup>. Récemment, environ dix structures auto-assemblées ont été résolues par la RMN à l'état solide<sup>132</sup>. Cependant, la RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C ou <sup>15</sup>N n'est pas toujours suffisante pour positionner les chaînes latérales des peptides et, en particulier, les chaînes aromatiques. Le recours à la modélisation moléculaire est donc fréquent.

Dans la suite de cette thèse, nous proposerons le développement d'une nouvelle stratégie pour la résolution de la conformation d'une petite molécule en interaction avec un complexe large ou auto-assemblée pour former une grande architecture (Figure 103).

---

<sup>128</sup> a) N. Norlin, M. Hellberg, A. Filippov, A. a Sousa, G. Gröbner, R. D. Leapman, N. Almqvist, O. N. Antzutkin, *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 174–189. b) A. Loquet, N. G. Sgourakis, R. Gupta, K. Giller, D. Riedel, C. Goosmann, C. Griesinger, M. Kolbe, D. Baker, S. Becker, et al., *Nature* **2012**, *486*, 276–279. c) K.-N. Hu, R. Tycko, *Biophys. Chem.* **2010**, *151*, 10–21. d) E. Salnikov, C. Aisenbrey, V. Vidovic, B. Bechinger, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 258–265. e) S. Jehle, P. Rajagopal, B. Bardiaux, S. Markovic, J. R. Stout, V. A. Higman, R. E. Klevit, B. Van Rossum, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1037–1042. f) A. J. Nieuwkoop, C. M. Rienstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7570–7571. g) G. Floudas, H. W. Spiess, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 278–298. h) A. J. Nieuwkoop, B. J. Wylie, W. T. Franks, G. J. Shah, C. M. Rienstra, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 095101. i) J. Korukottu, R. Schneider, V. Vijayan, A. Lange, O. Pongs, S. Becker, M. Baldus, M. Zweckstetter, *PLoS One* **2008**, *3*, e2359. j) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523–1526. k) Y. Wang, M. Lingenfelder, T. Classen, G. Costantini, K. Kern, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15742–15743.

<sup>129</sup> C. Liu, M. R. Sawaya, D. Eisenberg, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 49–56.

<sup>130</sup> K. a Houton, K. L. Morris, L. Chen, M. Schmidtman, J. T. a Jones, L. C. Serpell, G. O. Lloyd, D. J. Adams, *Langmuir* **2012**, *28*, 9797–9806.

<sup>131</sup> a) O. N. Antzutkin, D. Iuga, A. V. Filippov, R. T. Kelly, J. Becker-Baldus, S. P. Brown, R. Dupree, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 10289–10292. b) V. Daebel, S. Chinnathambi, J. Biernat, M. Schwalbe, B. Habenstein, A. Loquet, E. Akoury, K. Tepper, H. Müller, M. Baldus, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13982–13989. c) G. Lv, A. Kumar, K. Giller, M. L. Orcelet, D. Riedel, C. O. Fernández, S. Becker, A. Lange, *J. Mol. Biol.* **2012**, *420*, 99–111. d) H. a Scheidt, I. Morgado, S. Rothmund, D. Huster, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2017–2021. e) S. Wang, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2848–2851. f) M. J. Bayro, G. T. Debelouchina, M. T. Eddy, N. R. Birkett, C. E. MacPhee, M. Rosay, W. E. Maas, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13967–13974. g) S. Jehle, P. Rajagopal, B. Bardiaux, S. Markovic, J. R. Stout, V. A. Higman, R. E. Klevit, B. Van Rossum, H. Oschkinat, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1037–1042.

<sup>132</sup> a) N. Ferguson, J. Becker, H. Tidow, S. Tremmel, T. D. Sharpe, G. Krause, J. Flinders, M. Petrovich, J. Berriman, H. Oschkinat, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 16248–53. b) K. Iwata, T. Fujiwara, Y. Matsuki, H. Akutsu, S. Takahashi, H. Naiki, Y. Goto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 18119–18124. c) C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 711–716. d) A. Loquet, B. Bardiaux, C. Gardienet, C. Blanchet, M. Baldus, M. Nilges, T. Malliavin, A. Böckmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3579–3589. e) J. T. Nielsen, M. Bjerring, M. D. Jeppesen, R. O. Pedersen, J. M. Pedersen, K. L. Hein, T. Vosegaard, T. Skrydstrup, D. E. Otzen, N. C. Nielsen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 2118–2121. f) A. T. Petkova, W. Yau, R. Tycko, *Biochemistry* **2006**, *45*, 498–512. g) H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13765–13775. h) C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, *319*, 1523–1526.

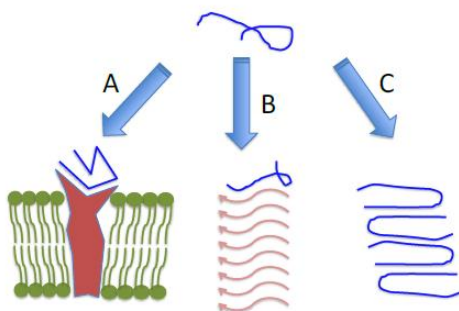


Figure 103 : Schéma présentant différents cas où il est important de déterminer la conformation d'une petite molécule en interaction avec (A) une macromolécule, (B) une autre petite molécule dans un auto-assemblage supramoléculaire ou (C) avec une architecture auto-assemblée.

## **I. A. La RMN du tritium à l'état solide, un nouvel outil potentiel d'analyse structurale**

### **I. A. 1. Les méthodes d'analyse structurale conventionnelles**

Un médicament exerce son activité pharmacologique par interaction avec sa cible biologique à laquelle il se lie. Lors de cette interaction, la molécule et sa cible doivent adapter leurs conformations mutuelles afin de minimiser l'énergie totale du complexe. La connaissance de la conformation de la molécule en interaction peut aider à mieux comprendre le mécanisme biologique, et également permettre de concevoir des médicaments de structures simplifiées ou possédant des propriétés biologiques améliorées. Ainsi, la détermination de cette conformation est un point essentiel. Une méthode permettant de déterminer ce type de conformation pourrait être également appliquée à des auto-assemblages responsables de maladies ou présentant des propriétés intéressantes dans le domaine des matériaux.

#### **I. A. 1. a) La cristallographie aux rayons X**

La cristallographie est la technique d'analyse qui étudie des substances cristallines à l'échelle atomique. La plus petite partie du réseau permettant de recomposer l'empilement est appelée

une maille. Lorsqu'un cristal est irradié par un faisceau de rayons X, chaque atome de l'échantillon diffuse une onde de faible amplitude dans toutes les directions. Ces ondes interfèrent et donnent lieu à la diffraction. À partir des intensités diffractées et d'une série d'images de diffraction, il est possible de déterminer l'arrangement tridimensionnel des atomes d'une structure cristalline. À l'aide des logiciels correspondants, il est possible de déterminer les axes et centres de symétrie du cristal, et de proposer le système cristallin le plus probable.

Depuis sa mise au point en 1912, l'utilisation de la cristallographie aux rayons X a été la principale méthode de détermination des structures des minéraux. La première structure d'un produit organique, la méthénamine, a été résolue en 1923. La cristallographie des rayons X est aussi utilisée pour les macromolécules biologiques. Les protéines solubles forment assez facilement des cristaux utilisables pour la cristallographie aux rayons X. En 1958, la myoglobine (Figure 104) est la première protéine dont la structure 3D exacte est déterminée par cette technique<sup>133</sup>.

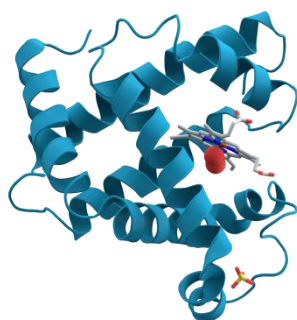


Figure 104 : Structure 3D de la myoglobine<sup>134</sup>.

Bien que des dizaines de milliers de structures de protéines solubles aient été résolues, l'utilisation de la cristallographie aux rayons X est encore limitée pour les protéines insolubles telles que les protéines membranaires. Ainsi la détermination de la conformation d'une petite molécule liée à une protéine membranaire est difficile par cristallographie aux rayons X. Ceci est un problème majeur car la découverte et la conception de médicaments ciblant des protéines membranaires seront des champs d'investigation importants pour l'industrie pharmaceutique dans les années à venir.

<sup>133</sup> J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dinzis, *et al. Nature* **1958**, *181*, 662-666.

<sup>134</sup> <http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMyoglobin.png>. AzaToth, Wikimedia Commons.

## I. A. 1. b) La RMN du liquide

### I. A. 1. b) i- Le principe de la RMN du liquide

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique d'analyse chimique et structurale non destructive utilisée en chimie, en biochimie et en physique. Elle utilise la propriété magnétique des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non-nul :  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , par exemple. Ces noyaux peuvent interagir avec un champ magnétique externe. Les noyaux absorbent puis réémettent l'énergie électromagnétique, à une fréquence de résonance spécifique.

Un noyau de spin non nul engendre un moment cinétique  $P$  et un moment magnétique  $\mu$  qui sont colinéaires. Le rapport gyromagnétique  $\gamma$  est le facteur de proportionnalité, soit :  $\mu = \gamma P$ .

Dans un champ magnétique externe d'intensité  $B_0$ , le mouvement des moments cinétiques et magnétiques est une précession autour de  $B_0$ , à la fréquence  $\nu_0$ . Elle est généralement nommée *la précession de Larmor*. La relation entre la fréquence de précession  $\nu_0$  et le champ  $B_0$  est donnée par l'équation :  $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ .

Chaque type de noyau possède un rapport gyromagnétique  $\gamma$  unique, c'est-à-dire que tous les noyaux d'un isotope, dans un champ magnétique externe  $B_0$ , ont la même fréquence de résonance. Toutefois, un noyau dans une molécule n'est pas soumis uniquement au champ  $B_0$ , mais également aux champs  $B_i$  locaux produits par les électrons autour du noyau, en réponse au champ magnétique externe.  $B_i$  est opposé à  $B_0$  et lui est proportionnel, avec une constante de proportionnalité dite constante d'écran  $\sigma_i$  qui caractérise la répartition électronique :

$$B = B_0 + B_i = B_0 + (-\sigma_i B_0) = B_0 (1 - \sigma_i)$$

Donc, il existe en principe autant de raies de résonance que d'écrans électroniques différents, ceux-ci constituent l'intérêt fondamental de la RMN pour les chimistes en permettant, en général, de voir séparément toutes les espèces de noyaux chimiquement distincts dans l'échantillon analysé, indiquant ainsi les groupes fonctionnels existants.

Les résonances sont caractérisées par une quantité adimensionnelle  $\delta_i$ , dit déplacement chimique, compté en ppm :

$$\delta_i = \sigma_{\text{ref}} - \sigma_i = (B_i - B_{\text{ref}}) / B_0 = (\nu_i - \nu_{\text{ref}}) / \nu_0$$

Dans le cas de la RMN du proton, la plupart des substances organiques possèdent des constantes d'écran inférieures à celles du tétraméthylsilane (TMS), rendant positive la majorité des déplacements chimiques, souvent compris entre 0 et +15 ppm.



Les noyaux les plus couramment étudiés en spectroscopie RMN sont :  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  et  $^{31}\text{P}$  de spin nucléaire égal à  $\frac{1}{2}$ , et particulièrement  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  qui permettent de déterminer la structure des molécules organiques (Tableau 12).

Noyau	Spin	$\gamma/2\pi$ (MHz/T)
$^1\text{H}$	1/2	42,58
$^{13}\text{C}$	1/2	10,71
$^{15}\text{N}$	1	3,08
$^{19}\text{F}$	1/2	40,05
$^{31}\text{P}$	1/2	17,24

Tableau 12 : Spins et rapports gyromagnétiques de noyaux couramment utilisés en RMN.

Le proton possède un rapport gyromagnétique  $\gamma$  très élevé par rapport aux autres noyaux, ce qui explique la grande sensibilité du proton lors des expériences RMN. La réalisation d'un spectre RMN  $^1\text{H}$  est généralement rapide (de quelques secondes à quelques minutes d'acquisition). L'interaction entre les moments magnétiques des noyaux peut exister soit directement à travers l'espace (couplage dipolaire direct) soit via le nuage électronique (couplage dipolaire indirect ou couplage  $J$ ). Grâce à l'analyse des déplacements chimiques de chaque résonance et de leur structure fine due aux couplages  $J$ , il est possible de déterminer la structure de nombreuses molécules organiques. Cette détermination est facilitée en utilisant aussi, en parallèle, la spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$ , bien que le rapport gyromagnétique du  $^{13}\text{C}$  soit environ quatre fois moins élevé que celui du proton et que son abondance naturelle soit très faible (1,1 %), ce qui augmente le temps d'acquisition du spectre. Une difficulté potentielle de la RMN  $^{13}\text{C}$  est la présence de forts couplages  $J$  avec les protons liés, donnant au spectre une structure de multiplets complexes, en phase liquide, ou un élargissement prohibitif, en phase solide. Des techniques de découplage permettent de supprimer les éclatements des résonances associés à ces couplages. Le spectre  $^{13}\text{C}$  présente des raies uniques car les couplages entre les noyaux  $^{13}\text{C}$  sont pratiquement inexistantes compte tenu de leur faible abondance naturelle.

I. A. 1. b) ii- La contribution de la RMN du liquide à l'étude de la structure des protéines

La spectroscopie RMN du liquide est appliquée à une grande variété d'échantillons à l'état liquide dans la recherche en synthèse organique. En étudiant les pics du spectre RMN d'un composé, les chimistes peuvent facilement déterminer sa structure moléculaire.

La RMN du liquide est largement utilisée dans l'étude de la structure 3D et de la dynamique des protéines solubles. Par rapport à la cristallographie aux rayons X, elle ne nécessite pas l'obtention de monocristaux et permet d'étudier des protéines à des concentrations millimolaires. Toutefois, le nombre de protons élevé (1200 environ pour une protéine de 150 résidus), conduit à l'apparition de nombreux signaux qui se superposent. Ainsi les applications des spectres RMN du proton à une dimension sont assez limitées pour l'étude des protéines. La RMN à multi-dimensions diminue la probabilité de la superposition des pics et fournit plus d'informations puisqu'elle montre les corrélations des signaux dans une partie spécifique de la molécule (Figure 105).

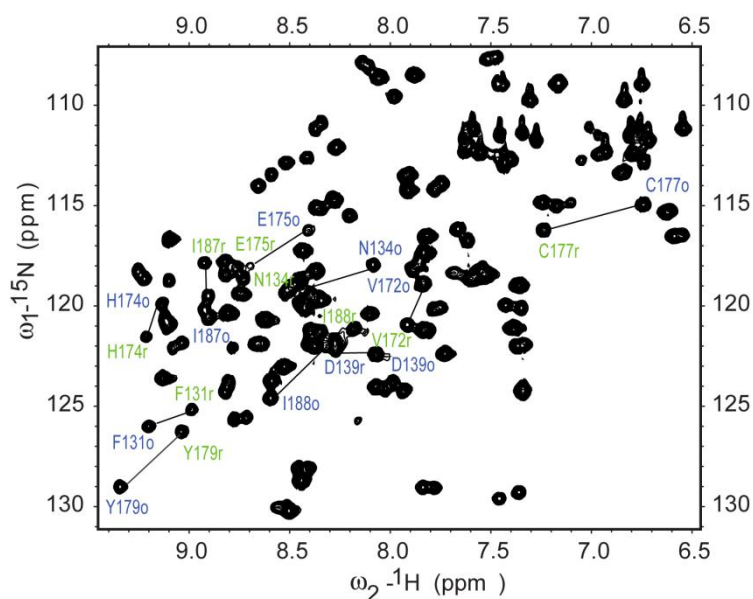


Figure 105 : Exemple d'un spectre à deux dimensions  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC d'un fragment de la protéine NleG3-2<sup>135</sup>.

L'étude d'une protéine peut donc être effectuée par RMN à deux dimensions homonucléaire ou hétéronucléaire, suivant que l'on observe les noyaux de protons seuls ou avec les noyaux  $^{13}\text{C}$  et/ou  $^{15}\text{N}$ . La spectroscopie de corrélation homonucléaire COSY (*Correlation spectroscopy*), par exemple, affiche des pics de corrélation (*cross-pics*) symétriques par

<sup>135</sup> B. Wu, et al. *PLoS Pathogens* **2010**, 6, e1000960.

rapport à la diagonale du spectre, qui résultent du transfert de magnétisation entre les protons couplés adjacents via la liaison chimique, ce qui permet de déterminer la connectivité des atomes.

Néanmoins, la RMN homonucléaire présente certaines limitations pour l'étude des protéines en solution, à cause du taux de superposition des pics sur les spectres et du mauvais transfert d'aimantation entre protons par couplage  $J$ . Ces problèmes, qui rendent difficile l'utilisation de la RMN pour l'étude de protéines de taille supérieure à cent résidus, ont été contournés par l'utilisation des propriétés RMN de noyaux autres que le proton. En effet, des noyaux différents résonnent dans des gammes de fréquences différentes, ce qui permet de résoudre les superpositions de déplacements chimiques. L'attribution par RMN hétéronucléaire peut s'effectuer à l'aide d'échantillons simplement marqués avec  $^{15}\text{N}$  ou doublement marqués avec  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ . Sur une protéine marquée  $^{15}\text{N}$ , la stratégie est basée sur l'expérience HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), qui détecte les corrélations entre deux noyaux différents séparés par une liaison. Cette technique permet d'observer les pics de corrélation dus aux couplages  $J$  entre l'hydrogène des fonctions amide et l'azote de chaque résidu.

Comme pour la cristallographie aux rayons X, la RMN du liquide est d'une utilisation limitée pour l'analyse structurale des molécules insolubles. Dans l'expérience de RMN du liquide, la faible solubilité des échantillons rend le rapport signal sur bruit de fond très faible. Il faut donc avoir recours à des techniques issues de la RMN du solide pour obtenir des données structurales pour les molécules insolubles.

## I. A. 1. c) La RMN du solide

### I. A. 1. c) i- Le principe de la RMN du solide

#### *La rotation à l'angle magique (MAS)*

La RMN du solide est une technique de RMN caractérisée par la présence des interactions anisotropes<sup>136</sup>. À l'état solide, où la mobilité moléculaire est faible, il existe principalement deux types d'interactions anisotropes : l'anisotropie de déplacement chimique et le couplage dipolaire internucléaire. Pour s'affranchir de l'élargissement des signaux, la technique dite de rotation de l'échantillon à l'angle magique (MAS en anglais : magic angle spinning) est très couramment utilisée (Figure 106).

---

<sup>136</sup> Les interactions RMN dépendent de l'orientation de la molécule par rapport à la direction du champ magnétique. En liquide, le mouvement brownien des molécules réduit ces interactions à leur partie (scalaire) isotrope.

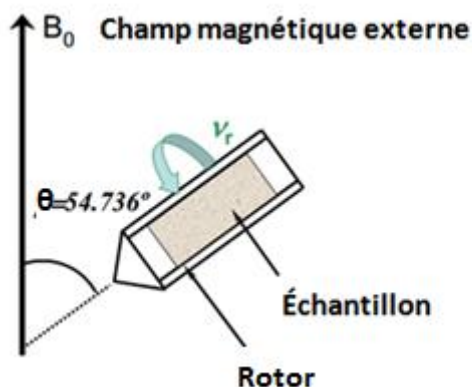


Figure 106 : Schéma d'un échantillon étudié en RMN du solide en rotation à l'angle magique.  $\nu_r$  : fréquence de rotation.  $\theta$  : angle magique.

L'échantillon à analyser, compacté dans un rotor en oxyde de zirconium  $ZrO_2$  (ou, dans notre cas, en nitrure de silicium  $Si_3N_4$ , une céramique plus résistante pour limiter les risques de casse), est fermé par un bouchon en Kel-F<sup>137</sup>. Ce rotor tourne dans le bloc stator de la sonde de RMN (Figure 107) orienté à l'angle magique. L'angle magique est un angle défini par la relation  $(3\cos^2\theta - 1)/2$ . À cet angle, l'anisotropie des interactions RMN est éliminée du spectre et seul reste le déplacement chimique isotrope (comme en liquide) donnant une raie fine. Cet angle a une valeur de 54,736 °.

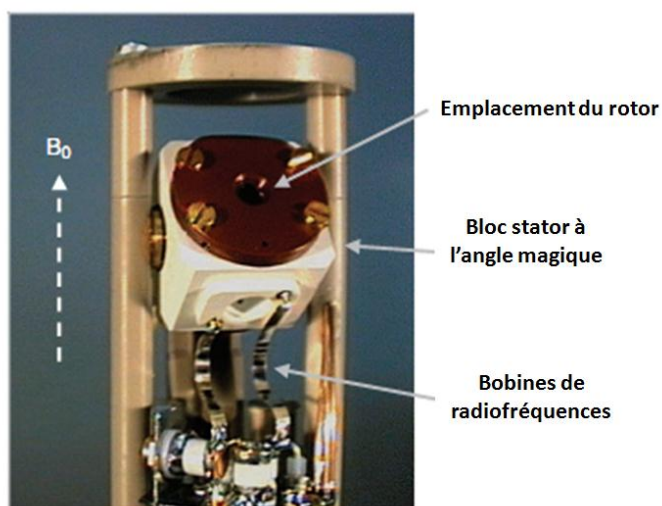


Figure 107 : Sonde de RMN MAS, incluant la position où le rotor est inséré, le bloc stator et les bobines de radiofréquence<sup>138</sup>.

<sup>137</sup> Kel-F est le nom commercial de la résine polymère PCTFE (polychlorotrifluoroéthène) ne contenant pas de proton pour limiter les signaux parasites.

<sup>138</sup> O. Beckonert, M. Coen, H. C. Keun, Y. Wang, T. M. D. Ebbels, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 1019–1032.

Le rotor est généralement composé d'oxyde de zirconium (ZrO<sub>2</sub>) ou de nitrure de silicium (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) et possède un volume de quelques dizaines de microlitres. La rotation du rotor s'effectue via un mécanisme de turbine à gaz (air ou azote). Les bobines autour du rotor permettent l'application d'impulsions radio-fréquences sur l'échantillon pour engendrer le signal RMN. Elles sont aussi utilisées comme bobines réceptrices. La fréquence de la rotation peut atteindre plusieurs dizaines de kiloHertz afin de minimiser les largueurs de raie pour obtenir un spectre comparable à celui de la RMN du liquide (Figures 108c et 108d).

#### *Les interactions dipolaires à l'état solide*

L'interaction dipolaire agit directement à travers l'espace, par opposition au couplage indirect  $J$  qui agit à travers la liaison chimique. Ce couplage direct dépend de la distance  $r_{ij}$  entre deux noyaux  $i$  et  $j$  en interaction, ainsi que leurs rapports gyromagnétiques  $\gamma_i$  et  $\gamma_j$ . L'intensité du couplage (souvent appelée constante dipolaire) est définie en Hertz par la relation :

$$D_{ij} = - \mu_0 h \gamma_i \gamma_j / 8\pi^2 r_{ij}^3 = -1,68 \times 10^{-42} \gamma_i \gamma_j / r_{ij}^3$$

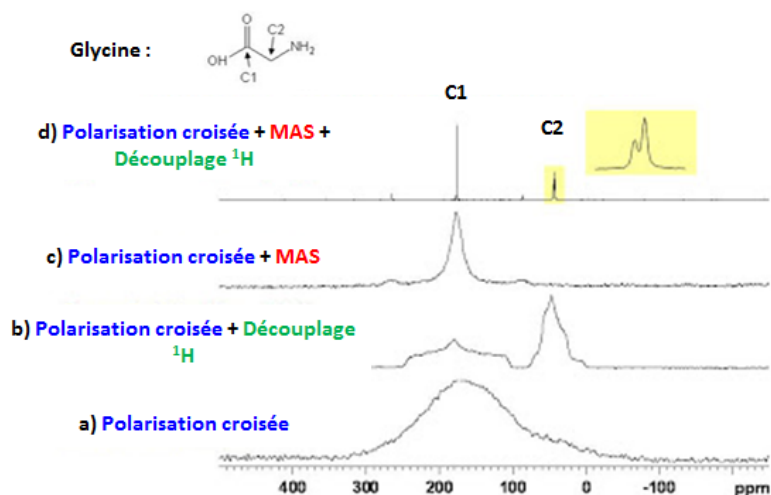
Ainsi, il est possible de déterminer des distances interatomiques par la mesure de l'interaction dipolaire et donc de déterminer la structure de la molécule. Pour cela, il faut que le couplage  $D_{ij}$  soit le plus élevé possible. Or, plus la distance entre les deux atomes  $i$  et  $j$  ( $r_{ij}$ ) est grande, plus ce couplage  $D_{ij}$  est faible. Pour mesurer de grandes distances, il faut donc que les rapports gyromagnétiques  $\gamma_i$  et  $\gamma_j$  soient les plus élevés possibles.

#### *La technique de polarisation croisée*

La polarisation croisée (CP en anglais : *cross-polarization*) est l'une des techniques les plus utilisées en RMN du solide. Cette technique permet d'augmenter le signal de certains noyaux de rapport gyromagnétique faible comme par exemple le <sup>13</sup>C par transfert de la polarisation des noyaux de rapport gyromagnétique élevé comme <sup>1</sup>H (Figure 108a).

#### *Le découplage et le recouplage*

Le découplage des protons en RMN consiste à irradier l'échantillon par un champ radiofréquence résonant avec les protons pour éliminer partiellement ou complètement les couplages des noyaux observés afin d'obtenir un spectre plus lisible (Figures 108b et 108d). Ce couplage direct est généralement trop fort pour être moyenné totalement par la technique de MAS, ce qui explique l'application supplémentaire du champ radiofréquence de découplage. Le couplage indirect, beaucoup plus faible, est éliminé par une irradiation.



Figures 108 : L'effet de la polarisation croisée, de la MAS et du découplage  $^1\text{H}$  sur la résolution du spectre du  $^{13}\text{C}$  à l'état solide de la glycine, à 4,7 T<sup>139</sup>. (a) Pas de MAS ni de découplage. (b) Découplage sans MAS. (c) MAS sans découplage. (d) MAS avec découplage.

Bien que l'expérience de RMN par rotation à l'angle magique découplée rende le spectre plus lisible, il est souvent intéressant de réintroduire sélectivement des couplages directs afin de mesurer les distances interatomiques. Plusieurs techniques ont été développées pour le recouplage hétéronucléaire comme REDOR (*rotational-echo double resonance*) et le recouplage homonucléaire comme HORROR (*homonuclear rotary resonance*).

I. A. 1. c) ii- L'application de la RMN du solide pour la détermination des conformations des drogues et des protéines insolubles

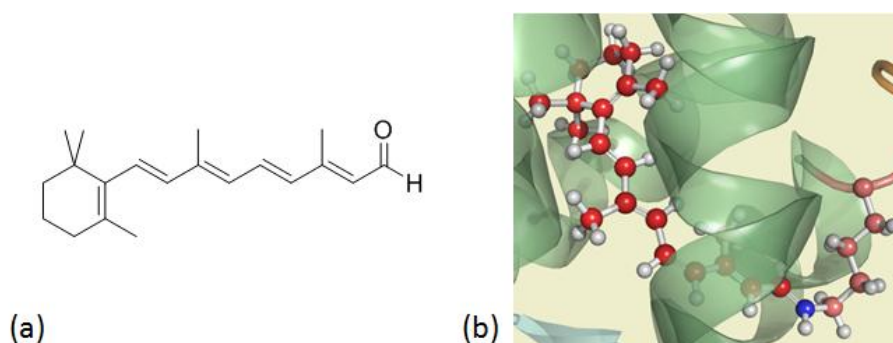
Il est estimé que les deux tiers des cibles pharmacologiques des futurs médicaments seront des protéines insolubles car la plupart (environ 85%) des signaux cellulaires sont générés à travers la membrane plasmique. L'importance de connaître la conformation des drogues liées aux protéines membranaires a été soulignée par plusieurs études au cours de ces 20 dernières années. Toutefois, le manque de détails structuraux à haute résolution, au niveau atomique, fournis par les techniques de cristallographie et de RMN du liquide a freiné la recherche dans ce domaine<sup>140</sup>.

La RMN du solide permet l'étude de la conformation de molécules liées à leurs protéines cibles en mesurant précisément les distances interatomiques entre deux noyaux sur les sites

<sup>139</sup> <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.fr/2009/01/effect-of-magic-angle-spinning-and-high.html>

<sup>140</sup> A. Watts, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4, 555-568.

particuliers de ces molécules. Par exemple, la base de Schiff créée à partir du rétinol et de la bactériorhodopsine (base anciennement utilisée pour la modélisation des récepteurs couplés aux protéines G<sup>141</sup>) puis de la rhodopsine (le modèle actuel) est le complexe protéine-ligand qui a été le plus largement étudié par RMN du solide (Figures 109).



Figures 109 : (a) Structure du rétinol. (b) Illustration de l'interaction entre le rétinol et la rhodopsine. La rhodopsine est en arc vert<sup>142</sup>.

Le rétinol est un dérivé de la Vitamine A. Il s'agit du premier ligand d'une protéine membranaire sur lequel des mesures de distances par RMN du solide ont été réalisées. L'orientation de l'anneau de  $\beta$ -ionone du rétinol (*cis* ou *trans* par rapport à la chaîne de polyène) a été résolue en utilisant les contraintes obtenues par la mesure précise de distances interatomiques entre des <sup>13</sup>C stratégiquement placés. Plus récemment, la RMN du solide a été utilisée pour déterminer des distances à haute résolution ainsi que les angles dièdres du rétinol lié à la protéine. Ces mesures ont donné des détails structuraux à haute résolution pour le chromophore.

I. A. 1. c) iii- Les noyaux utilisés en RMN du solide pour la mesure des distances et leurs performances

La formule décrivant la relation entre la constante dipolaire et la distance entre deux noyaux en interaction dont les rapports gyromagnétiques sont  $\gamma_i$  et  $\gamma_j$  est indiquée ci-dessous :

$$D_{ij} = -1,68 \times 10^{-42} \gamma_i \gamma_j / r_{ij}^3$$

Les noyaux de rapport gyromagnétique élevé permettent de mesurer de plus longues distances interatomiques. Considérant que le proton <sup>1</sup>H possède le rapport le plus élevé des isotopes communs, le couplage <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H peut théoriquement permettre de mesurer des distances

<sup>141</sup> Les RCPG sont une famille de récepteurs membranaires chez les mammifères.

<sup>142</sup> F. Kreuzet, *et al. Science* **1991**, 251, 783-786.

supérieures à 10 Å, permettant ainsi d'obtenir des informations critiques pour déterminer la structure de molécules. Cependant, un couplage à grande distance peut être atténué par les forts et nombreux couplages avec les autres protons de la molécule, rendant difficile l'utilisation du proton pour la mesure. Pour pallier ce problème, on peut tenter de marquer uniformément par du deutérium la molécule et la protéine à étudier en ne laissant que deux atomes d'hydrogène dont on mesurera la distance interatomique. Toutefois, la synthèse d'une molécule et de sa cible complètement marquées par du deutérium (sauf pour les deux sites entre lesquels la distance est mesurée) est rarement faisable.

L'atome de fluor  $^{19}\text{F}$  possède le deuxième rapport gyromagnétique le plus élevé des isotopes communs, ce qui permet également la mesure de longues distances<sup>143</sup>. Mais la modification indésirable de la structure de la molécule est inévitable lorsqu'un atome  $^{19}\text{F}$  est introduit en remplacement d'un atome  $^1\text{H}$ .

Les noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  sont les plus couramment choisis pour la détermination de structures en RMN du solide. Ces isotopes sont introduits par paire dans la molécule à étudier, remplaçant les  $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$  sur les sites particuliers dont on veut mesurer la distance. Avec les techniques développées, les distances interatomiques  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  seront obtenues.

La RMN du solide est considérée comme une méthode efficace, néanmoins peu de déterminations de la conformation d'une molécule liée à sa cible insoluble ou membranaire ont été rapportées. En effet, cette méthode présente des limitations :

- Les rapports gyromagnétiques des isotopes  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$  relativement bas rendent leur sensibilité en RMN faible. Cette faible sensibilité nécessite une grande quantité d'échantillons biologiques rarement disponibles. Par ailleurs, leur faible sensibilité augmente le temps d'acquisition, ce qui peut dégrader les produits biologiques instables.
- La détermination d'une conformation exige la mesure de longues distances avec une précision suffisante. Les distances maximales mesurables pour  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  sont limitées à 5-6 Å, avec une précision limitée.
- La synthèse de produits marqués par des isotopes  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  est souvent longue.

Pour améliorer l'efficacité de la RMN du solide dans ce domaine, il est nécessaire de trouver un isotope plus adapté. Le tritium  $^3\text{H}$  est un nouveau candidat dont les propriétés et les applications seront discutées dans la suite de cette thèse.

---

<sup>143</sup> A. A. Alcaraz, A. K. Mehta, S. A. Johnson, J. P. Snyder, *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 2478–2488.

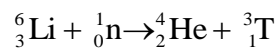


## I. A. 2. Le tritium, un atout idéal pour la RMN du solide

Le tritium (T ou  $^3\text{H}$ ) est, avec le deutérium (D ou  $^2\text{H}$ ), un des deux isotopes de l'hydrogène. Le noyau de tritium comporte un proton et deux neutrons. Par rapport à l'hydrogène et au deutérium, l'abondance naturelle du tritium est très faible (environ un atome de tritium pour  $10^{18}$  atomes d'hydrogène). L'atome de tritium a une masse atomique de 3,01 u. a.

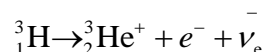
Le tritium existe communément à l'état gazeux ( $\text{T}_2$ ) ou à l'état liquide ( $\text{T}_2\text{O}$  ou HTO). Les propriétés chimiques du tritium sont essentiellement les mêmes que celles de l'hydrogène.

Le tritium est naturellement issu de l'interaction du rayonnement cosmique avec l'atmosphère. Par ailleurs, cet isotope peut être produit par l'Homme en bombardant du lithium 6 ( $^6\text{Li}$ ) par un flux neutronique, ce qui conduit à la formation de tritium et d'hélium ( $^4\text{He}$ ).



### I. A. 2. a) Les propriétés du tritium

Le tritium est un isotope radioactif qui émet un rayonnement  $\beta^-$  en se transformant en hélium 3 ( $^3\text{He}$ ) selon l'équation :



Cette réaction libère une énergie maximale de 18,6 keV et une énergie moyenne de 5,7 keV. Le rayonnement  $\beta^-$  étant de faible énergie, les électrons émis ne peuvent pénétrer plus de 6 mm dans l'air, et sont rapidement arrêtés par l'épaisseur de la peau humaine. Toutefois, la plupart des produits tritiés sont facilement absorbés à travers la peau, les membranes ou les tissus biologiques. Ainsi, les produits tritiés sont potentiellement dangereux s'ils sont inhalés ou ingérés.

La demi-vie du tritium est de 12,32 ans. Sa période biologique varie selon la forme sous laquelle le tritium est fixé :

- La période biologique de l'eau tritiée varie entre 6 et 12 jours.

- Le tritium organique en position non échangeable (lié au carbone) reste plus durablement présent que l'eau tritiée. Sa période biologique peut atteindre quelques centaines de jours.

L'activité spécifique du tritium est de  $3,59 \times 10^{14}$  Bq/g, soit  $9,7 \times 10^3$  Ci/g ou 29 Ci/mmol. Cette valeur indique qu'une masse de tritium faible correspond à un nombre de désintégration par seconde élevé. Cependant, l'énergie moyenne émise lors d'une désintégration est de l'ordre de 100 à 1000 fois plus faible que d'autres radionucléides bien connus, ce qui en fait un radionucléide de très faible radiotoxicité. Le tritium ne délivre (en moyenne, par personne au voisinage des installations concernées) qu'une dose annuelle d'environ 1 microsievert ( $\mu\text{Sv}$ ), mille fois moins élevée que le seuil limite pour le public qui est de 1 millisievert (mSv).

## I. A. 2. b) La RMN liquide du tritium

Le noyau de tritium a un spin nucléaire  $I = 1/2$ , comme le proton. Les propriétés magnétiques nucléaires du tritium sont semblables à celles du proton.

Le rapport gyromagnétique du tritium  $\gamma_T / 2\pi$  est de 45,429 MHz/T. Il est plus élevé que celui du proton ( $\gamma_T = 1,067 \gamma_H$ ). Le tritium possède donc le rapport gyromagnétique le plus élevé de tous les isotopes connus<sup>144</sup>. De plus, la constante de couplage entre deux noyaux tritium est plus élevée qu'entre deux protons par le facteur :  $\gamma_T / \gamma_H = 1,067$ . Une autre conséquence importante du rapport gyromagnétique élevé du tritium est la plus haute sensibilité de la RMN du tritium comparée à la RMN du proton.

Puisque le blindage d'un noyau d'hydrogène dans une molécule est presque entièrement une fonction de l'environnement local électronique, il n'y a aucun changement sur la constante d'écran après un remplacement isotopique par un tritium. En conséquence, le déplacement chimique du tritium est égal à celui du proton. Les données de déplacement chimique du proton peuvent être appliquées à la prédiction et l'attribution du spectre tritium. Le découplage du proton est couramment appliqué pour obtenir un spectre de raies uniques.

La RMN du tritium peut être bien plus sensible que la RMN du proton car, contrairement à celui du proton, le signal du tritium n'est pas perturbé par un bruit de fond élevé (protons résiduels). Quelques micromoles de produit tritié est suffisante pour une analyse de routine avec un temps d'acquisition raisonnable (spectre MAS en une heure).

---

<sup>144</sup> E. A. Evans, D. C. Warrell, J. A. Elvidge, J. R. Jones. *Handbook of Tritium NMR Spectroscopy and Applications*. John Wiley & Sons; Chichester, **1985**.

## I. A. 2. c) Les méthodes de marquage au tritium

Les produits marqués au tritium sont généralement obtenus par la création de liaisons carbone-tritium car celles-ci sont particulièrement stables. Les atomes de tritium des liaisons oxygène-tritium et azote-tritium sont labiles : ils peuvent facilement s'échanger avec les protons des solvants protiques, comme le méthanol.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la préparation des produits marqués au tritium mais seuls quelques laboratoires en France sont équipés pour les appliquer. Ces méthodes se divisent en deux catégories :

- le marquage par transformation d'un précurseur en produit désiré à l'aide de réactifs tritiés
- le marquage par échange isotopique sur la molécule-cible ou un intermédiaire à un stade avancé.

### 1. A. 2. c) i- Le marquage à partir d'un précurseur

Trois méthodes permettent de transformer un précurseur en produit tritié :

- La réduction de produits insaturés (alcynes, alcènes<sup>145</sup>, aldéhydes, cétones<sup>146</sup>, aldimines) par le tritium à l'état gazeux (T<sub>2</sub>), à l'aide de catalyseurs hétérogènes métalliques (platine ou palladium sur charbon, par exemple) (Figure 110) :

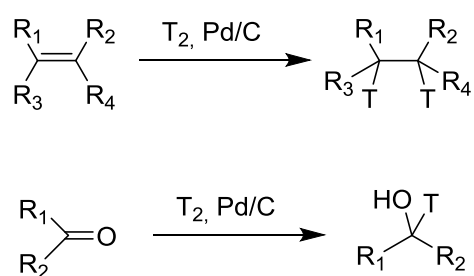


Figure 110 : Méthodes de réduction de molécules insaturées par le tritium gaz.

- La réaction d'échange halogène-tritium : le tritium remplace du chlore, du brome, ou de l'iode en présence d'un catalyseur, souvent à base de palladium (Figure 111). Cette méthode est couramment utilisée sur les halogènes en position aromatique. Pour le marquage de positions aliphatiques, cette méthode est moins satisfaisante.

<sup>145</sup> R. Voges, J. R. Heys, T. Moenius. Preparation of Tritium-Labeled Compounds by Chemical Synthesis. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*; John Wiley & Sons, **2009**, 111-125.

<sup>146</sup> R. Voges, J. R. Heys, T. Moenius. Preparation of Tritium-Labeled Compounds by Chemical Synthesis. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*; John Wiley & Sons, **2009**, 125-126.

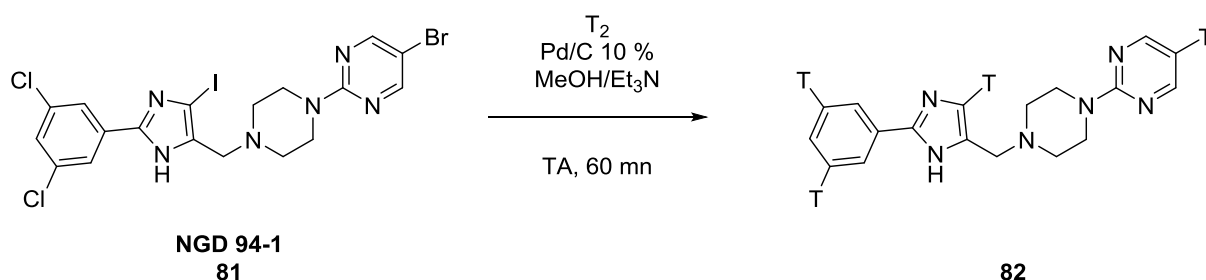


Figure 111 : Exemple de méthode d'échange halogène-tritium sur NGD 94-1, agoniste dopaminergique<sup>147</sup>.

- La réduction de groupements fonctionnels (aldéhydes<sup>148</sup>, cétones<sup>149</sup>, esters) par des hydrures métalliques tritiés : borotritures de lithium ou de sodium, tritures de lithium ou d'aluminium (Figure 112).

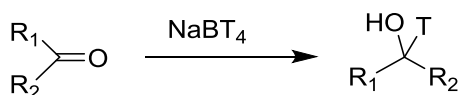


Figure 112 : Méthode de réduction d'un carbonyle par du borotriture de sodium.

#### 1. A. 2. c) ii- Le marquage par échange H/T

Le marquage au tritium peut être réalisé par échange catalytique hydrogène-tritium en utilisant du tritium à l'état gazeux ou un solvant tritié. Cet échange ne nécessite pas de précurseur et permet d'introduire un atome radioactif sans changer les propriétés chimiques de la molécule de départ.

- L'échange isotopique par le tritium gaz ( $T_2$ ) repose sur la capacité d'échanger des atomes d'hydrogène de positions aromatiques ou vinyliques en présence de catalyseurs métalliques homogènes, à base de Pt, Rh, Ru ou Ir, ou de catalyseurs supportés (Pd sur  $BaSO_4$  ou  $CaCO_3$ ) (Figure 113). Des glucides, des acides aminés, des purines, des nucléosides et des stéroïdes ont été marqués par cette méthode<sup>150</sup>.

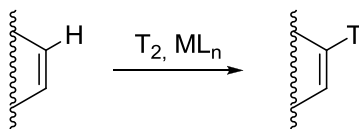


Figure 113 : Méthode d'échange H/T en position aromatique utilisant  $T_2$  gaz.

<sup>147</sup> A. Thurkauf, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1997**, 39, 123-128.

<sup>148</sup> G. J. Atwell, W. A. Denny, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 7-12.

<sup>149</sup> R. Faghih, C. Burnell-curty, B. Surber, S. Shoghi, A. Bore, Y. Yao, P. Lartey, H. Nellans, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1996**, 38, 687-692.

<sup>150</sup> E. A. Evans, H. C. Sheppard, J. C. Turner, D. C. Warrell, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1974**, 10, 569-587.

- La réaction acide-base avec un donneur de tritium labile ( $T_2O$ , MeOT ou  $CF_3COOT$ ) repose sur l'acidité de la liaison carbone-hydrogène dans certains produits<sup>151</sup>.

Par rapport à l'échange isotopique, les méthodes de transformation d'un précurseur permettent le marquage au tritium dans des positions bien définies. Mais la réduction d'insaturations nécessite une modification chimique de la molécule à marquer et donc plusieurs étapes de synthèse. Ces méthodes ne sont pas compatibles avec des substrats fonctionnalisés sensibles aux réducteurs.

L'échange catalytique halogène-tritium est très utile mais plutôt adapté au marquage de positions aromatiques.

Les réactions acides-bases utilisent des composés à protons labiles tritiés, qui ne sont pas disponibles commercialement à forte activité spécifique.

Aucune méthode de tritiation n'est systématiquement applicable. Le choix de la méthode dépend du substrat à marquer, de l'incorporation isotopique nécessaire et de la spécificité désirée.

## I. A. 2. d) Les avantages du tritium pour la RMN du solide

Après avoir discuté de ses propriétés, de son utilisation en RMN du liquide et des méthodes de marquage, nous considérons que le tritium est un isotope idéal pour la détermination de la conformation d'une molécule intégrée dans un auto-assemblage, par la mesure de distances interatomiques en RMN du solide :

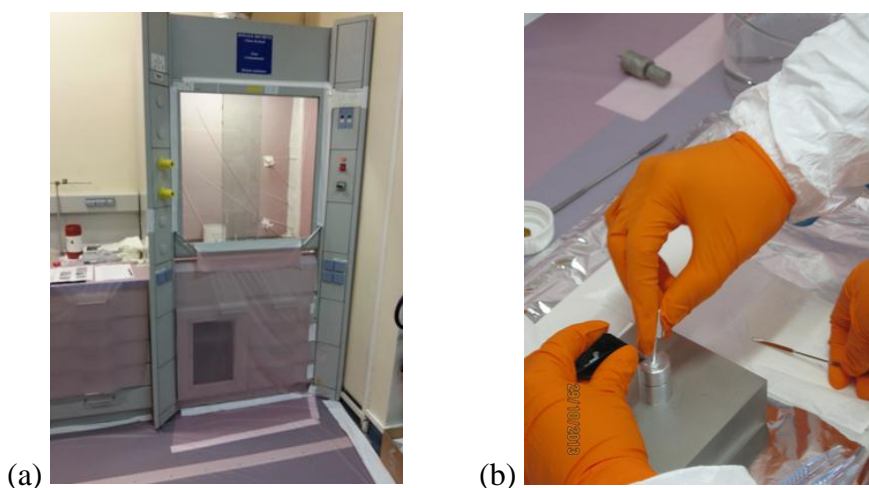
- Par rapport aux isotopes  $^{13}C$ ,  $^{15}N$  et  $^2H$  qui sont les plus couramment utilisés, le tritium  $^3H$  possède le rapport gyromagnétique le plus élevé de tous les isotopes connus ( $\gamma_T = 4,24 \gamma_C$ ,  $\gamma_T = 10,53 \gamma_N$ ,  $\gamma_T = 6,95 \gamma_D$ ). Ceci permet de mesurer des distances interatomiques supérieures à 10 Å, avec une précision élevée.
- Par ailleurs, la sensibilité de la RMN du tritium est excellente et permet d'obtenir un spectre rapidement, avec une petite quantité d'échantillon (quelques micromoles).
- De plus, il est assez facile d'introduire un tritium dans les positions nécessaires à la mesure de distances. La synthèse du produit tritié est plus rapide et flexible que l'introduction d'un atome de fluor traditionnellement utilisé pour la mesure de

---

<sup>151</sup> R. Voges, J. R. Heys, T. Moenius. *Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14*; John Wiley & Sons, 2009, 47-60.

distances interatomiques. Des produits tritiés peuvent également être achetés à des prix du même ordre de grandeur que les produits marqués au  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ .

- Par rapport à l'abondance de l'hydrogène, l'abondance naturelle du tritium est presque nulle, ce qui permet de s'affranchir du bruit de fond.
- Par rapport à l'atome  $^{19}\text{F}$ , l'introduction d'un tritium  $^3\text{H}$  en remplacement d'un hydrogène n'engendre aucune modification de structure de la molécule à étudier.
- Les règles de sécurité pour la manipulation du tritium sont connues dans notre laboratoire. Les réactions de tritiation sont réalisées en boîte à gants. Pour la manipulation de poudres tritiées, notamment pour les rotors utilisés en RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide, nous travaillons sous une sorbonne recouverte de film vinyle, avec la ventilation coupée (Figure 114a), avec un masque, des lunettes de protection, une combinaison et des gants nitrile jetables (Figure 114b).



Figures 114 : Équipements de protection utilisés lors de la manipulation de poudres tritiées. (a) Sorbonne recouverte de film vinyle, avec la ventilation coupée. (b) Gants nitrile jetables utilisés par deux manipulateurs.

En utilisant les techniques de la RMN du solide bien développées à ce jour, nous pouvons envisager que le tritium puisse contribuer de façon efficace à l'étude de conformations bioactives.

# I. B. Les travaux précédents au laboratoire

En 2010, notre équipe démontre que la RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide est un outil prometteur pour déterminer précisément de longues distances interatomiques sans modification de la structure moléculaire<sup>152</sup>.

## I. B. 1. Choix et synthèse de molécules modèles

Afin d'évaluer le potentiel de la technique de RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide, quatre petites molécules assez rigides pour présenter des distances  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  constantes dans une gamme comprise entre 4 et 14 Å environ sont choisies (Figure 115). Les composés **83** à **86**, incorporant deux atomes de tritium sont synthétisés par hydrogénolyse catalytique de leurs précurseurs bromés correspondant, à l'aide de  $\text{T}_2$  gaz et de  $\text{Pd/C}$ <sup>153</sup>.

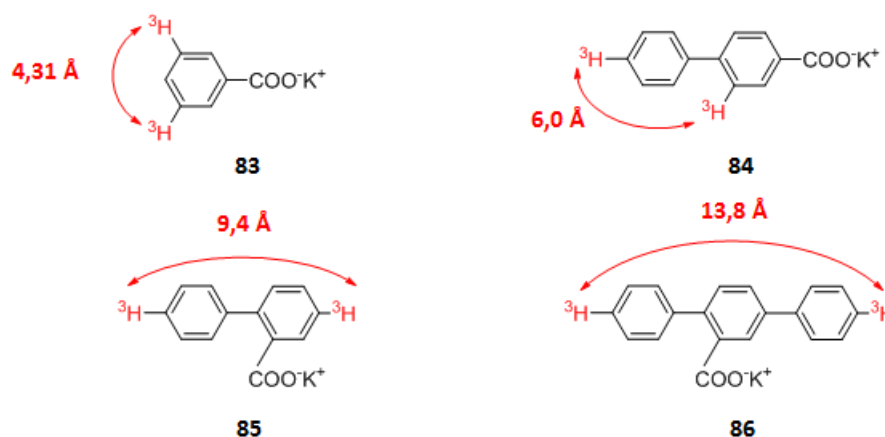


Figure 115 : Molécules modèles préparées pour la mesure de distances par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide. Les distances indiquées en rouge correspondent aux distances de référence.

Les synthèses des précurseurs sont réalisées en moins de quatre étapes. Les tritiations donnent une activité spécifique de 55 Ci/mmol en moyenne, soit 90 % de produit ditritié et 10 % de produit monotritié.

<sup>152</sup> A. K. L. Yuen, O. Lafon, T. Charpentier, M. Roy, F. Brunet, P. Berthault, D. Sakellariou, B. Robert, S. Rimsky, F. Pillon, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1734–1735.

<sup>153</sup> N. Faucher, Y. Ambroise, J.-C. Cintrat, E. Doris, F. Pillon, B. Rousseau, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 932–934.

## I. B. 2. Mesure de longues distances interatomiques par spectroscopie RMN du tritium à l'état solide

Pour chaque analyse RMN, un échantillon contenant 50 mCi de produit tritié (environ 0,15 à 0,3 mg), 40 mg de produit hydrogéné et 0,1 mg de nitrate de cuivre (II) est préparé et placé dans le rotor RMN. L'échantillon contient donc un atome de tritium pour 1000 atomes d'hydrogène.  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  permet de réduire le temps de relaxation. Les spectres RMN  $^3\text{H}$  du composé **83** sont obtenus en huit scans (Figure 116).

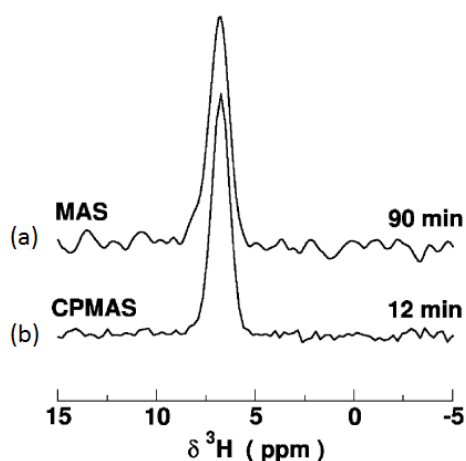


Figure 116 : Comparaison des spectres RMN  $^3\text{H}$  du composé **83**. (a) Acquisition directe. (b) Polarisation croisée  $^1\text{H}$ - $^3\text{H}$ . MAS : magic angle spinning. CP : cross-polarization.

Ces spectres présentent un fort rapport signal-sur-bruit malgré la très faible quantité de matière tritiée. De plus, l'utilisation de la polarisation croisée  $^1\text{H}$ - $^3\text{H}$  augmente significativement la sensibilité, ce qui permet d'obtenir le spectre en 12 minutes au lieu de 90 minutes.

Pour les mesures de distances interatomiques, de nombreuses techniques de recouplage RMN sont déjà décrites dans la littérature. Parmi les séquences d'impulsion courantes, les meilleurs résultats sont obtenus avec HORROR<sup>154</sup> (cf. I. A. 1. c).

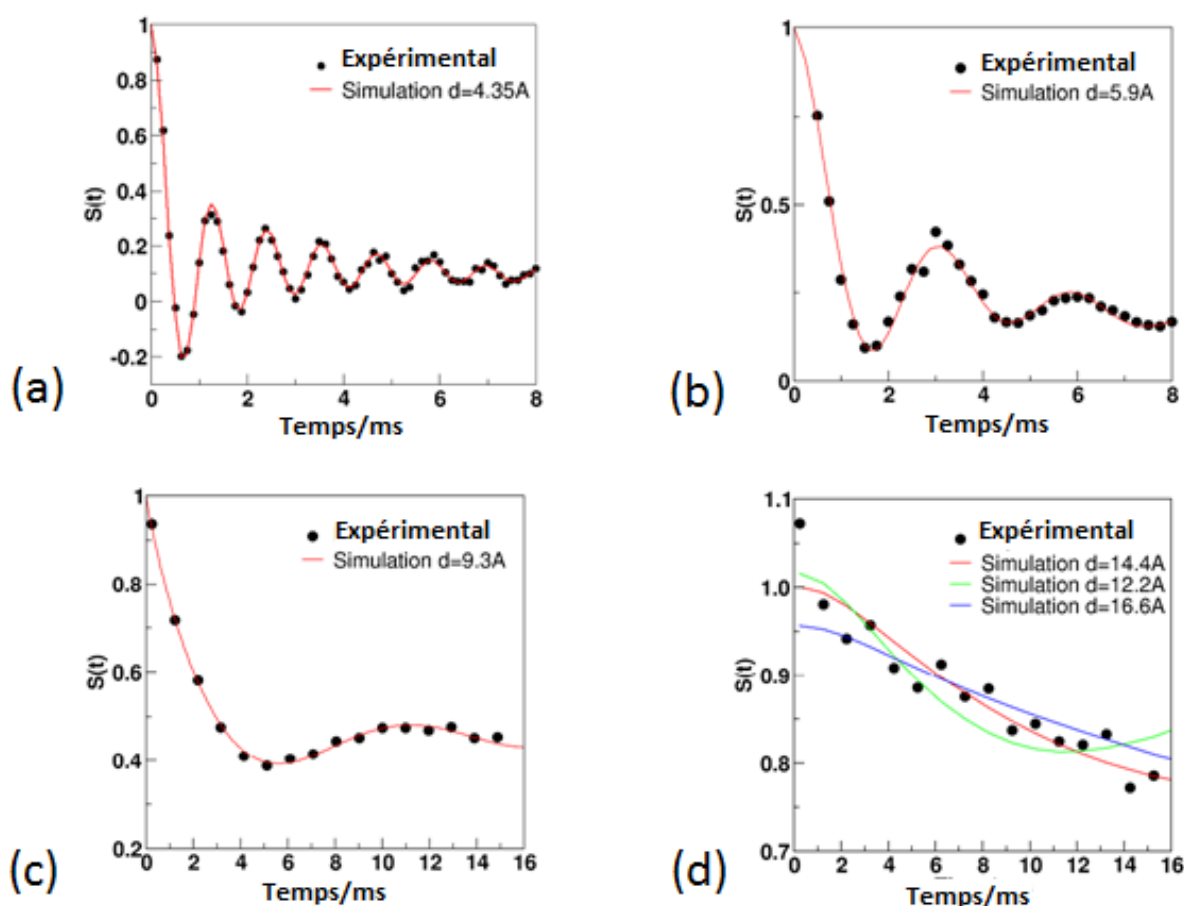
Des variations de l'intensité du signal  $^3\text{H}$   $S(t)$  en fonction du temps d'irradiation radiofréquence  $^3\text{H}$  sont alors obtenues (points noirs dans les figures 117). Pour déterminer des distances interatomiques, les points obtenus sont comparés à des oscillations dipolaires de

<sup>154</sup> Homonuclear rotary resonance



référence. Ces oscillations dipolaires sont obtenues en simulant une paire de spin avec un programme écrit par le Dr. Thibault Charpentier (rotation à l'angle magique, distance entre les spins et séquence d'impulsion radiofréquence). Ce programme est couplé à un programme d'ajustement qui va itérer en recherchant la distance qui donne le meilleur accord.

De longues oscillations dipolaires sont observées pour le composé **83**, ce qui permet une mesure de distance  $^3\text{H}-^3\text{H}$  précise (Figure 117a). L'écart entre la distance mesurée ( $4,35 \pm 0,02 \text{ \AA}$ ) et la distance de référence est inférieure à 1 % (Tableau 13). Pour la mesure de distances plus longues, sur les composés **84** et **85**, la précision reste excellente avec un écart de l'ordre de 2 %. À notre connaissance, il s'agit de la première mesure de longues distances interatomiques réalisée avec une aussi grande précision (Figures 117b et 117c).



Figures 117 : Variation de l'intensité du signal  $^3\text{H } S(t)$  (en unités arbitraires) pour les composés **83** à **86** en fonction du temps d'irradiation radiofréquence  $^3\text{H}$  sous conditions HORROR (ici 4 kHz). (a) Résultats pour le composé **83**. (b) Résultats pour le composé **84**. (c) Résultats pour le composé **85**.

(d) Résultats pour le composé **86**.

Dans le cas du composé **86**, même en l'absence d'une oscillation dipolaire complète, il est possible d'extraire une distance de  $14,4 \text{ \AA}$  avec une précision d'environ 15 % (Figure 117d).

Composé	1	2	3	4
Distance de référence <sup>a</sup> (Å)	4,31	6,0	9,4	13,8
Distance mesurée (Å)	4,35 ± 0,02	5,9 ± 0,1	9,3 ± 0,2	14,4 ± 2,2

Tableau 13 : Comparaison des distances  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  mesurées par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide aux distances de référence.

<sup>a</sup>Distances prédites pour les molécules **83** à **86** par calculs DFT.

La RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide représente donc une technique simple, sensible et précise pour la détermination de distances interatomiques courtes ou longues sur des molécules modèles. La distance de  $14,4 \pm 2,2$  Å est la plus longue distance mesurée par RMN à ce jour.

Afin de généraliser cette nouvelle approche et de l'améliorer, des modifications des conditions expérimentales sont envisageables :

- l'augmentation de la fréquence de rotation de l'échantillon
- un volume d'échantillon réduit
- l'utilisation de nouvelles séquences d'impulsion.

## I. C. Phe-Phe, un dipeptide aux propriétés remarquables

Parmi le grand nombre de molécules qui peuvent s'auto-assembler, le dipeptide Phe-Phe (ou L-Phe-L-Phe ou FF) est un des plus mystérieux en dépit des nombreuses études qui ont été réalisées ces dix dernières années. La séquence Phe-Phe **87** est présente dans différents peptides, en particulier les peptides amyloïdes et anti-amyloïdes<sup>155</sup> (Figure 118).

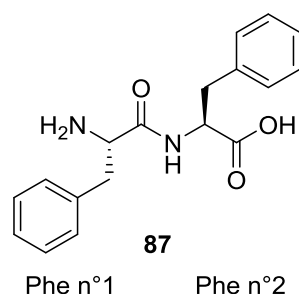


Figure 118 : Structure du dipeptide Phe-Phe **87**. Chacune des phénylalanines est numérotée (Phe n°1 et Phe n°2).

<sup>155</sup> L. Adler-Abramovich, L. Vaks, O. Carny, D. Trudler, A. Magno, A. Caflisch, D. Frenkel, E. Gazit, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 701–706.

Des dérivés de Phe-Phe capables de former des structures supramoléculaires ont également été étudiés<sup>156,157</sup>. Selon le solvant utilisé, ce dipeptide peut cristalliser ou s'auto-assembler en nanotubes monodisperses<sup>158</sup>. Si la structure du cristal de Phe-Phe est connue, seuls des modèles moléculaires existent pour les nanotubes de Phe-Phe<sup>159</sup>.

De plus, le dipeptide Phe-Phe peut être marqué sélectivement sur diverses positions, ce qui en fait un modèle intéressant pour le développement de notre méthodologie de mesure de longues distances interatomiques par spectroscopie RMN du tritium à l'état solide.

## **I. C. 1. Les études de Phe-Phe par l'équipe de Gazit**

### **I. C. 1. a) La formation de nanotubes de Phe-Phe**

En 2003, l'équipe de Gazit observe la formation de nanotubes de diphenylalanine (Phe-Phe) par dilution d'une solution de ce dipeptide dans le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (ou HFIP ou hf-2-p) avec de l'eau<sup>160</sup>. L'analyse par microscopie électronique en transmission MET (TEM en anglais : transmission electron microscopy) indique que ces nanotubes possèdent une longueur de l'ordre du micromètre (Figure 119a). De plus, le contour clair et le centre foncé de ces structures suggèrent qu'elles sont creuses. L'analyse par MET à haute-résolution montre que la structure des nanotubes est régulière et plutôt rigide (Figure 119b).

---

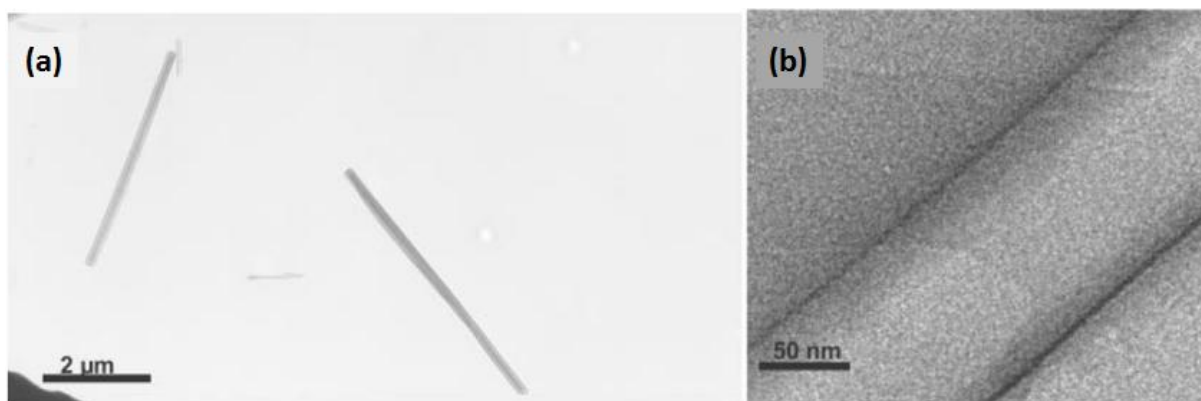
<sup>156</sup> M. Reches, E. Gazit, *Phys. Biol.* **2006**, *3*, S10–S19.

<sup>157</sup> M. Reches, E. Gazit, *Nat. Nanotechnol.* **2006**, *1*, 195–200.

<sup>158</sup> a) E. Karran, M. Mercken, B. De Strooper, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 698–712. b) M. Fändrich, M. Schmidt, N. Grigorieff, *Trends Biochem Sci.* **2011**, *36*, 338. c) K. Biswas, C. N. R. Rao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 811–815. d) N. S. de Groot, T. Parella, F. X. Aviles, J. Vendrell, S. Ventura, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 1732–1741.

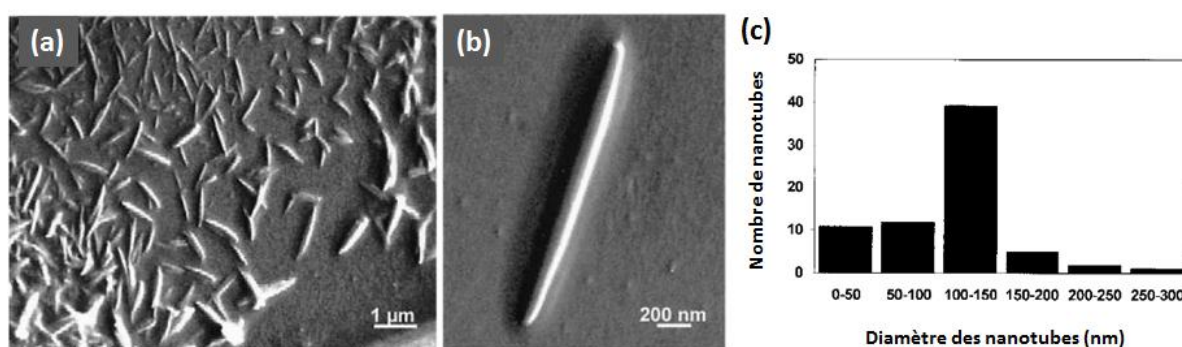
<sup>159</sup> N. Santhanamoorthi, P. Kolandaivel, L. Adler-Abramovitch, E. Gazit, S. Filipek, S. Viswanathan, A. Strzelczyk, V. Renugopalakrishnan, *Adv. Mater. Lett.* **2011**, *2*, 100–105.

<sup>160</sup> M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*.



Figures 119 : Nanotubes de Phe-Phe observés par microscopie électronique en transmission. (a) Image MET des nanotubes. (b) Image MET à haute résolution des nanotubes.

L'analyse par microscopie électronique à balayage MEB (SEM en anglais : scanning electron microscopy) permet d'observer que les nanotubes présentent une forme et une longueur homogènes (Figures 120a et 120b), et que la distribution du diamètre des nanotubes est comprise principalement entre 100 et 150 nm (Figure 120c).



Figures 120 : Nanotubes de Phe-Phe observés par microscopie électronique à balayage. (a) Image MEB des nanotubes. (b) Image MEB d'un nanotube à grossissement élevé. (c) Distribution statistique des diamètres des nanotubes.

L'analyse par spectroscopie infrarouge permet aussi d'obtenir des informations sur la configuration moléculaire des nanotubes (Figure 121).

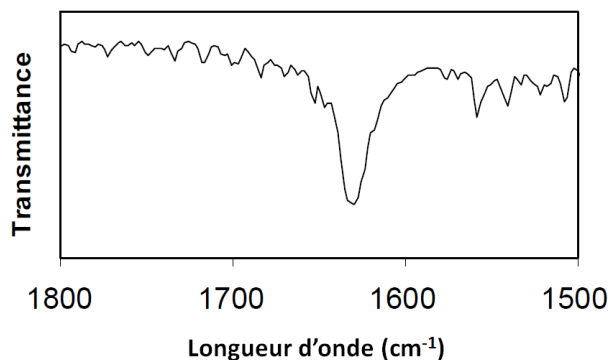


Figure 121 : Analyse spectrale infrarouge à transformée de Fourier dans la zone des amides primaires.

Le pic à  $1630\text{ cm}^{-1}$  correspond à une conformation feuillet  $\beta$  de la liaison simple amide. Comme aucun autre pic vibrationnel n'est observé, on peut supposer que la conformation est uniforme sur toutes les unités Phe-Phe constituant les nanotubes (Figure 122).

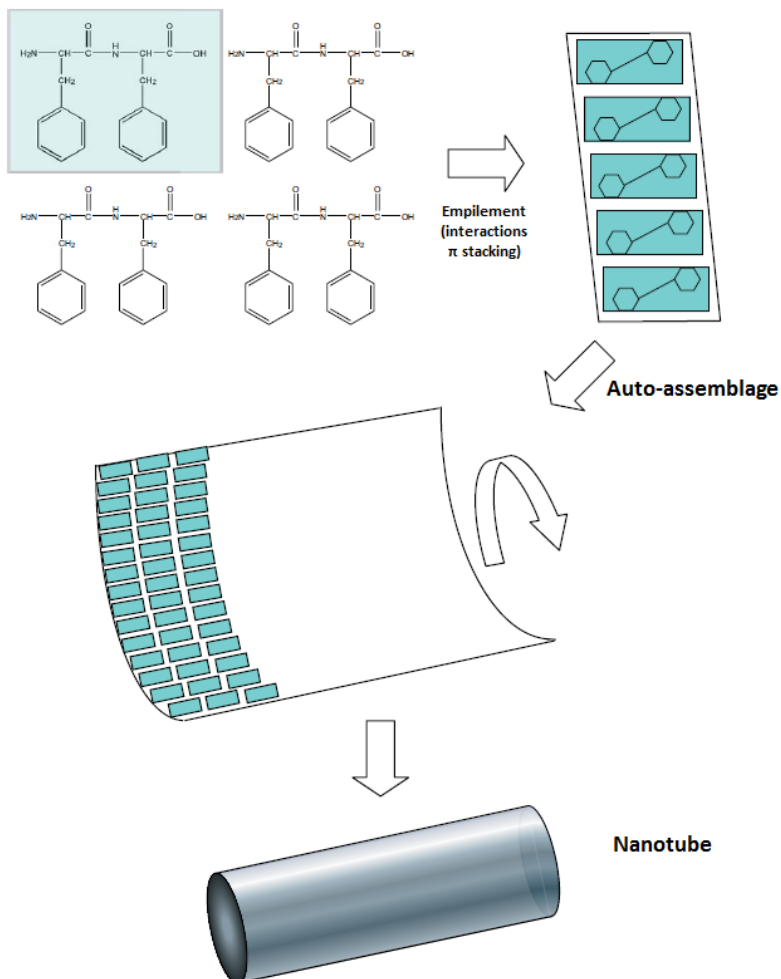


Figure 122 : Mécanisme d'assemblage proposé pour la formation des nanotubes de Phe-Phe. L'interaction  $\pi$  stacking entre les groupements aromatiques permet l'empilement des unités Phe-Phe, tandis que les liaisons hydrogènes permettent la fermeture du feuillet.

## I. C. 1. b) Les propriétés chimiques et physiques des nanotubes de Phe-Phe

Afin de déterminer si les nanotubes de Phe-Phe sont bien creux et contiennent de l'eau, l'équipe de Gazit montre que ces nanotubes peuvent servir de moules pour la formation de nanocâbles d'argent d'environ 20 nm de diamètre, après réduction d'ions argent à l'intérieur des nanotubes à l'aide de citrate de sodium (Figure 123).

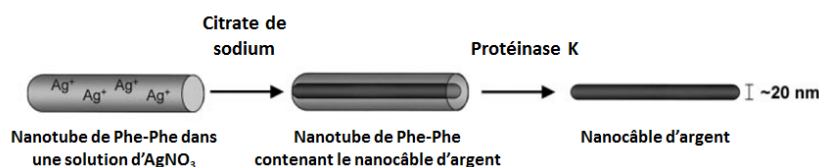


Figure 123 : Formation de nanocâbles d'argent par la réduction d'ions argent dans les nanotubes de Phe-Phe suivie de la dégradation enzymatique des nanotubes.

Les analyses MET montrent que les assemblages métalliques se forment dans la majorité des tubes (80 à 90 %) (Figure 118a). Après lyse protéolytique du moule peptidique par l'enzyme protéinase K<sup>161</sup>, il est possible d'observer que les nanocâbles d'argent présentent un diamètre (environ 20 nm) plus petit que le diamètre des nanotubes (100 à 150 nm), ce qui confirme que la formation des nanocâbles a bien lieu dans les nanotubes.

D'autres études montrent que les nanotubes de Phe-Phe possèdent des propriétés mécaniques, piézoélectriques, électriques et optiques remarquables<sup>162</sup>. L'une de leurs propriétés les plus intéressantes est leur grande rigidité<sup>163</sup>.

Phe-Phe est également considéré par certaines équipes de recherche comme le fragment aromatique central du polypeptide amyloïde- $\beta$  responsable de la formation de fibrilles amyloïdes caractéristiques de diverses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète de type II et les maladies à prions (Figure 124).

<sup>161</sup> La protéinase K est une enzyme de la famille des protéases à sérine qui coupe les liaisons peptidiques, de préférence au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique.

<sup>162</sup> a) N. Kol, L. Adler-Abramovich, D. Barlam, R. Z. Shneck, E. Gazit, I. Rouso, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1343–6. b) N. Amdursky, P. Beker, I. Koren, B. Bank-Srour, E. Mishina, S. Semin, T. Rasing, Y. Rosenberg, Z. Barkay, E. Gazit, et al. *Biomacromolecules*. **2011**, *12*, 1349–54. c) L. Niu, L. X. Chen, S. Allen, S. J. B. Tandler, *Langmuir* **2007**, *23*, 7443–7446. d) C. A. E. Hauser, S. Zhang, *Nature*. **2010**, *468*, 516–517. e) A. Kholkin, N. Amdursky, I. Bdikin, E. Gazit, G. Rosenman, *ACS Nano*. **2010**, *4*, 610–614. f) I. Bdikin, V. Bystrov, S. Kopyl, R. P. G. Lopes, I. Delgadillo, J. Gracio, E. Mishina, A. Sigov, A. L. Kholkin, *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *100*, 0437021. f) N. Amdursky, M. Molotskii, E. Gazit, G. J. Rosenman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15632–15636.

<sup>163</sup> I. Azuri, L. Adler-Abramovich, E. Gazit, O. Hod, L. Kronik, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 963–9.

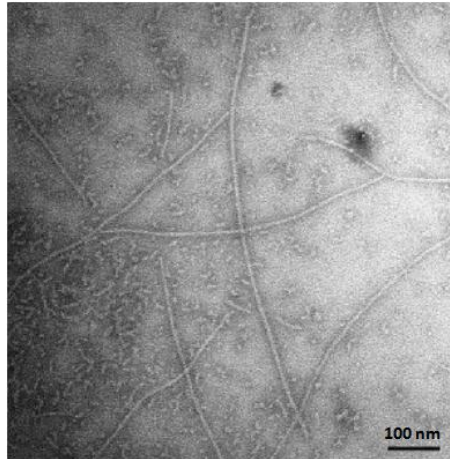


Figure 124 : Micrographie électronique de fibrilles amyloïdes formées dans l'eau<sup>164</sup>.

Ce dipeptide est donc d'un grand intérêt car diverses études montrent en plus que des peptides plus grands et certaines molécules organiques contenant Phe-Phe sont capables d'inhiber la formation des fibrilles par le polypeptide A- $\beta$  (Figure 125).

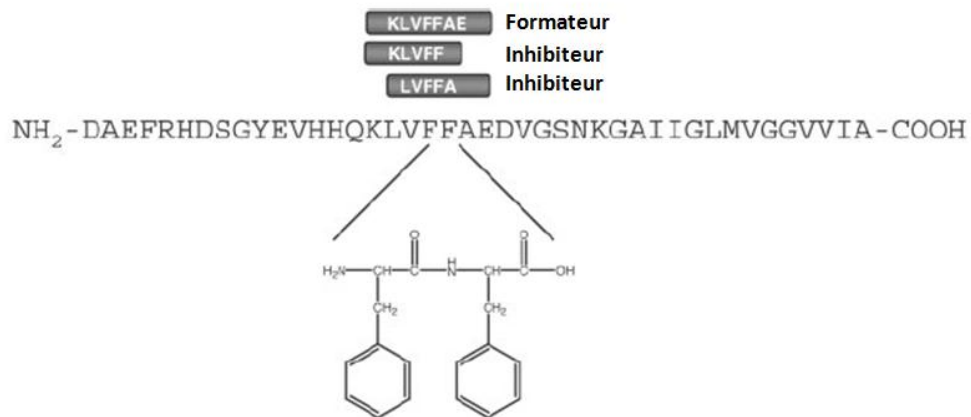


Figure 125 : Le fragment Phe-Phe du polypeptide A- $\beta$  est impliqué dans le processus de reconnaissance moléculaire conduisant à la formation de fibrilles amyloïdes. Divers fragments forment des fibrilles amyloïdes ou inhibent leur formation.

Certains de ces inhibiteurs représentent donc des candidats-médicaments potentiels contre la maladie d'Alzheimer.

<sup>164</sup> R. Friedman, *The Biochemical journal* **2011**, 438, 415–426.

## I. C. 2. Les études de Phe-Phe par l'équipe de Görbitz

En 2001, l'équipe de Görbitz décrit la structure cristalline du dipeptide Phe-Phe, formée par évaporation d'une solution aqueuse à 80 °C, à l'aide de la cristallographie aux rayons X (Figure 126). Selon Görbitz, la structure de Phe-Phe cristallisé est identique à la structure de Phe-Phe auto-assemblé en nanotubes.

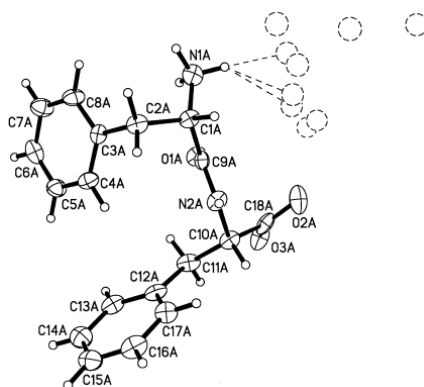


Figure 126 : Structure moléculaire du dipeptide Phe-Phe cristallisé. Les liaisons H sont représentées par des lignes pointillées et les positions occupées par de l'eau par des cercles pointillés de taille arbitraire<sup>165</sup>.

Une description simplifiée pour la conformation d'un dipeptide est fournie par sa torsion d'angle  $\theta = C_1^\beta - C_1^\alpha \dots C_2^\alpha - C_2^\beta$  qui définit les positions relatives des deux chaînes latérales (Figure 127).

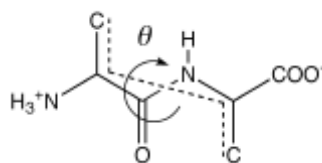


Figure 127 : Définition de l'angle de torsion  $\theta$  pour les dipeptides<sup>165</sup>.

Généralement, les chaînes latérales des dipeptides pointent dans des directions opposées. L'angle de torsion du dipeptide Phe-Phe est de 40,2 °. Il présente donc une conformation inhabituelle avec ses chaînes latérales localisées du même côté du plan défini par la liaison peptidique. Cette conformation particulière s'explique lorsque l'on observe sa maille cristalline (Figure 128).

<sup>165</sup> C. H. Görbitz, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 5153–5159.



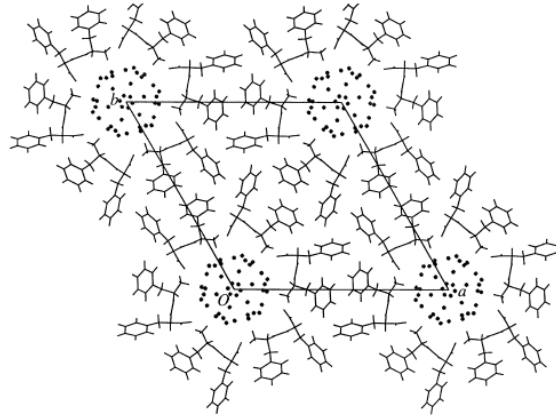


Figure 128 : Maille cristalline du dipeptide Phe-Phe. Les molécules d'eau sont représentées par de petites sphères<sup>165</sup>.

En effet, six molécules de Phe-Phe forment la circonférence d'une région hydrophile. Les chaînes latérales émanent du centre des tubes contenant des molécules d'eau. Les liaisons H entre les peptides forment deux hélices, l'une avec un pas à droite et l'autre avec un pas à gauche, qui sont à l'origine de la structure tubulaire (Figure 129).

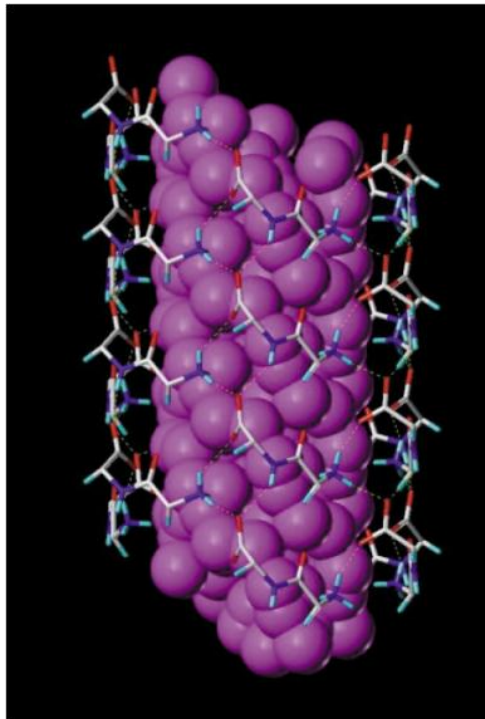


Figure 129 : Molécules d'eau au sein d'un tube de Phe-Phe. Les chaînes latérales ont été supprimées pour plus de clarté<sup>165</sup>.

Selon, l'équipe de Gazit, les nanotubes de Phe-Phe auto-assemblé, préparés en 2003 et utilisés pour former des nanocâbles d'argent, présentent un arrangement moléculaire différent des nanotubes de Phe-Phe cristallisé de l'équipe de Görbitz préparés en 2001.

En 2006, l'équipe de Görbitz compare le diffractogramme de nanotubes de Phe-Phe de l'équipe de Gazit avec le diffractogramme simulé du cristal de Phe-Phe (Figure 130).

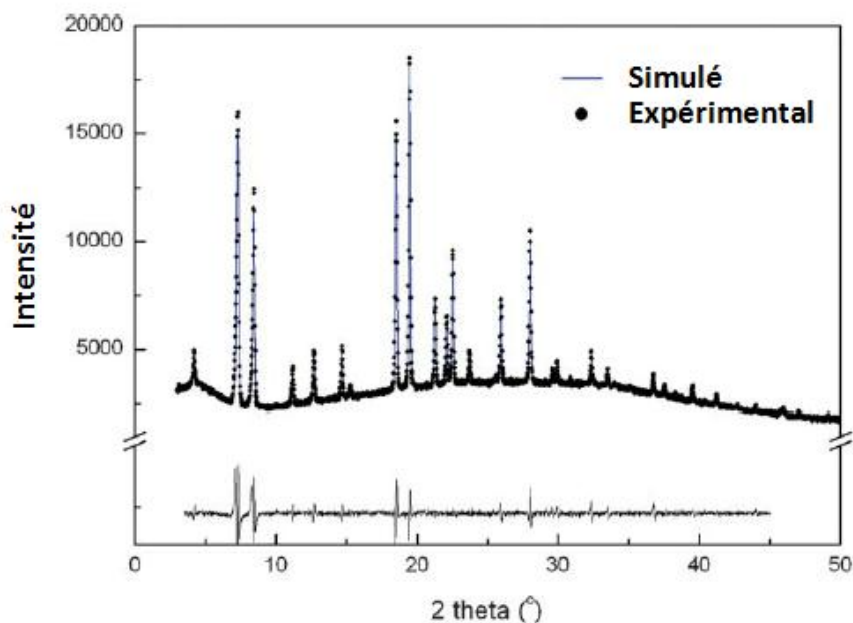


Figure 130 : Diffractogramme aux rayons X des nanotubes de Phe-Phe préparés selon la méthode de l'équipe de Gazit comparé au diffractogramme simulé de Phe-Phe cristallisé<sup>166</sup>.

Les deux diffractogrammes sont identiques, ce qui conduit l'équipe de Görbitz à conclure que les structures moléculaires de Phe-Phe, auto-assemblé ou cristallisé, sont les mêmes. Certes, les structures de Phe-Phe sont peut-être identiques au sein du cristal et des nanotubes, mais cette analyse ne permet pas d'expliquer la différence d'assemblage/d'empilement.

## I. D. Objectifs de la thèse

Déterminer la conformation d'une petite molécule au sein d'une structure à haut poids moléculaire est crucial pour comprendre quelles sont les interactions et les processus moléculaires qui y sont mis en jeu. Ces complexes, ni cristallins ni solubles, sont difficilement étudiés par les méthodes d'analyse structurales classiques. Notre ambition est de proposer une nouvelle méthode d'analyse basée sur la combinaison de différentes disciplines :

<sup>166</sup> C. H. Görbitz, *Chem. Commun.* **2006**, 2332–2334.

- la synthèse organique (marquage au tritium  $^3\text{H}$  chimio-, régio- et stéréospécifique, marquage au  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ )
- la RMN à l'état solide
- la modélisation moléculaire.

Pour développer notre stratégie, nous avons choisi une petite molécule modèle, le dipeptide Phe-Phe qui forme, selon le solvant utilisé, soit des cristaux soit des nanotubes auto-assemblés. Si la structure atomique cristalline de Phe-Phe a déjà été résolue, la structure des nanotubes auto-assemblés reste inconnue, malgré les études des équipes de Gazit et de Görbitz (figure 131).

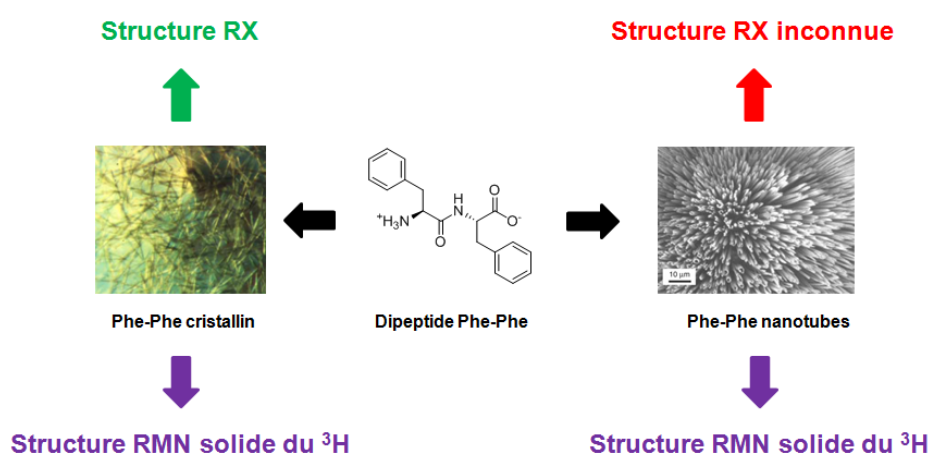


Figure 131 : Mise au point de notre nouvelle stratégie d'étude structurale et application à la détermination de la structure de Phe-Phe à l'échelle atomique.

Pour résoudre ces structures, des distances intra- et intermoléculaires doivent être mesurées pour déterminer non seulement la conformation de la molécule mais également son arrangement dans l'assemblage.

Nous envisageons de développer notre stratégie sur Phe-Phe cristallisé afin de démontrer, dans un premier temps, que notre méthode permet bien de mesurer des distances interatomiques au sein d'une molécule d'intérêt chimique et biologique. Notre deuxième objectif est de retrouver la conformation de Phe-Phe cristallisé, déjà déterminée par la diffraction des rayons X, à l'aide de notre stratégie. Cette dernière pourrait être alors considérée comme une nouvelle méthode d'analyse structurale (Figure 132). Le troisième objectif, à plus long terme, est d'utiliser notre méthode pour déterminer la structure atomique des nanotubes auto-assemblés de Phe-Phe.

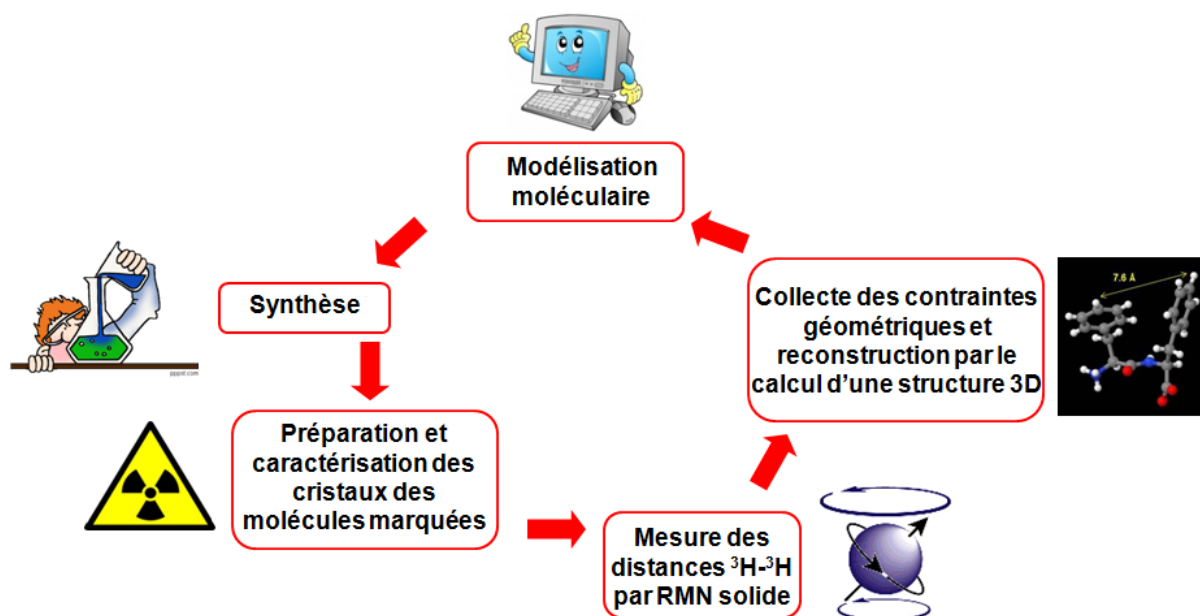


Figure 132 : Nouvelle méthode d'analyse structurale pour la détermination de la conformation d'une petite molécule en interaction avec une macromolécule ou un objet supramoléculaire.

Notre méthode repose donc sur quatre phases :

- la modélisation moléculaire qui permet de déterminer les positions à marquer au tritium
- la synthèse de précurseurs suivie du marquage au tritium (Figure 133). Le marquage  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , déjà très utilisé par d'autres équipes de recherche pour étudier la conformation de squelettes peptidiques, ne sera pas examiné dans cette thèse.
- la mesure des distances inter-tritiums par RMN du tritium à l'état solide
- La reconstruction de la structure moléculaire et de la comparaison à la structure cristalline de référence.

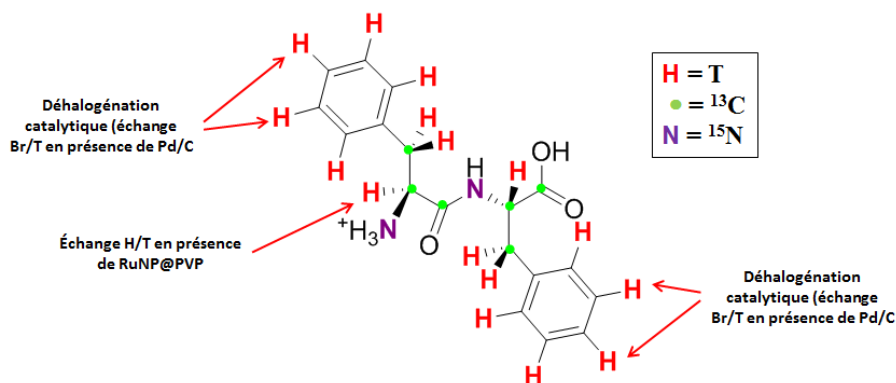


Figure 133 : Positions de marquage potentielles et méthodes utilisées pour le marquage au tritium.

La synthèse de précurseurs et le marquage au tritium constitue la phase principale de mon travail de thèse. Dans notre laboratoire, le marquage au tritium de peptides est développé depuis le début des années 1980 et transposé sur des molécules aussi bien aromatiques que non-aromatiques. Les peptides et les molécules peptidomimétiques peuvent être marqués au tritium sélectivement sur les positions *ortho*-, *mé*ta- et *para*- des cycles aromatiques par déhalogénéation catalytique de précurseurs bromés.

Dans une première partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la synthèse de précurseurs di-bromés sur les positions aromatiques de Phe-Phe pour avoir accès aux Phe-Phe tritiés correspondants et aux distances interatomiques par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide, afin de positionner les chaînes latérales.

Par la suite, nous nous sommes penchés sur le marquage de Phe-Phe sur deux positions différentes : l'une sur un cycle aromatique et l'autre sur le  $\text{C}_\alpha$ . Ce double marquage permettrait de positionner le cycle aromatique par rapport au squelette peptidique. Pour parvenir au marquage du  $\text{C}_\alpha$ , nous avons décidé d'utiliser un catalyseur inédit : RuNP@PVP dont l'activité est décrite dans le premier chapitre de cette thèse.

Enfin, en dernière partie, nous nous sommes fixés comme objectif de synthétiser un précurseur mono-bromé en position aromatique de Phe-Phe afin d'avoir accès à des distances intermoléculaires et donc au mode d'empilement de Phe-Phe dans le cristal.

**II. Le marquage au tritium de Phe-Phe  
cristallisé pour la détermination de  
distances intramoléculaires par RMN  $^3\text{H}$   
à l'état solide**



# II. Le marquage au tritium de Phe-Phe cristallisé pour la détermination de distances intramoléculaires par RMN $^3\text{H}$ à l'état solide

Pour déterminer la structure précise d'un auto-assemblage par RMN à l'état solide, il est nécessaire de réunir un ensemble de distances intra- et inter-moléculaires. Ces distances sont obtenues grâce aux molécules marquées sur des positions précises. Pour nous aider à choisir les positions les plus pertinentes et à prévoir le nombre minimal de molécules marquées à préparer, nous tirons avantage du fait que la structure cristalline de Phe-Phe est connue et utilisons la modélisation moléculaire (Figure 134).

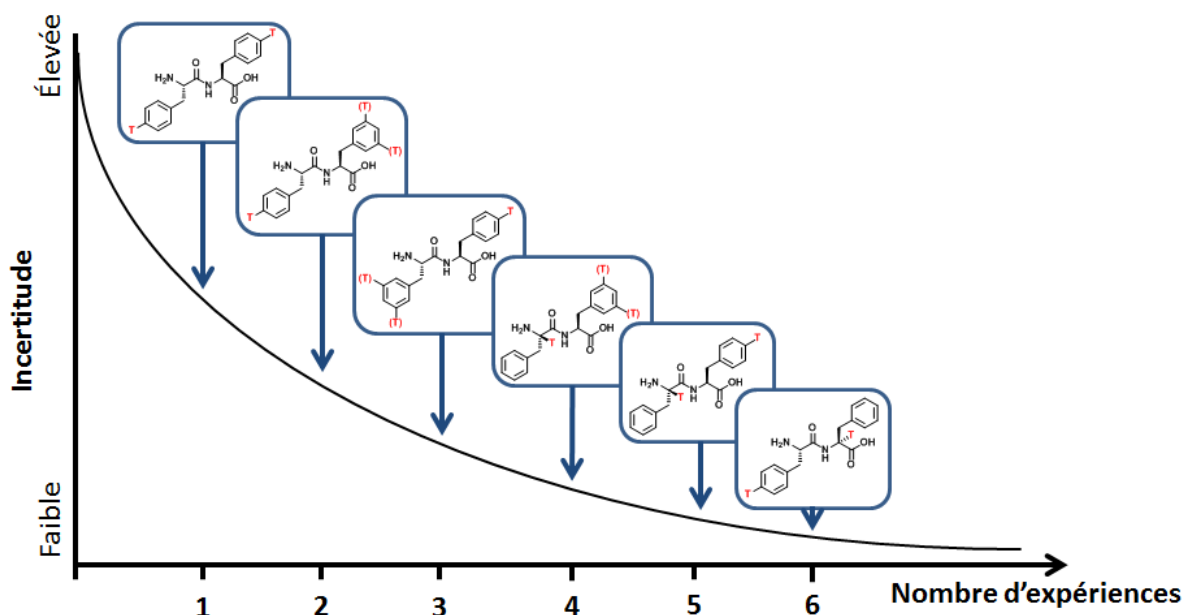


Figure 134 : Incertitude théorique sur la conformation de Phe-Phe au sein des cristaux en fonction du nombre d'expériences de marquages au tritium et de mesures de distances réalisées.



## II. A. La modélisation moléculaire de Phe-Phe cristallisé (travail réalisé par le Dr. Yves Boulard au CEA-Saclay)

Une expérience préliminaire de calculs est réalisée sur 1000 structures de Phe-Phe avec un protocole de recuit simulé. Le recuit simulé est une méthode empirique inspirée d'un processus utilisé en métallurgie qui alterne des cycles de refroidissement lent et de réchauffage (recuit) qui ont pour effet de minimiser l'énergie du matériau. Pour ces premiers calculs de modélisation moléculaire permettant de tester si l'on peut parvenir à une conformation de Phe-Phe, une contrainte de distance de 7,6 Å est appliquée. Cette distance de référence, entre les deux protons des positions *para* des cycles aromatiques des deux phénylalanines qui constituent Phe-Phe, a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Figure 135).

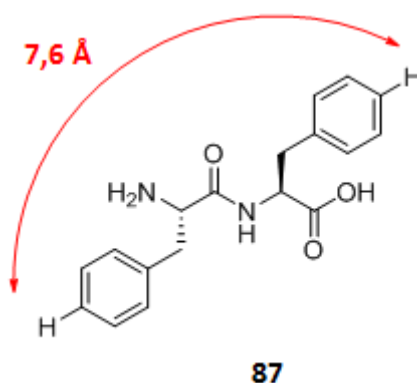
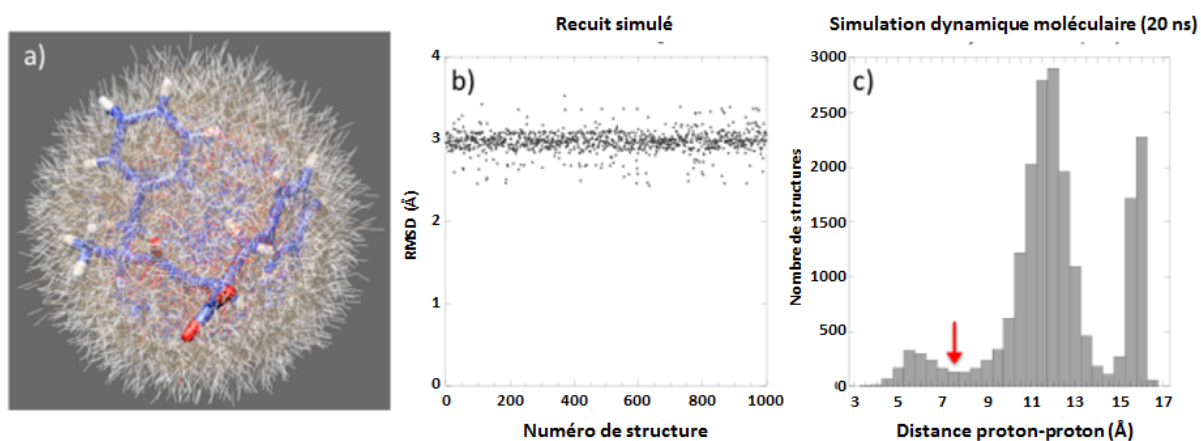


Figure 135 : Structure de Phe-Phe avec la distance de référence entre les deux *para*-hydrogènes.

Cette distance permet l'exploration d'un large espace conformationnel démontrant l'efficacité de la méthode de modélisation, mais aucune des structures calculées ne permet d'accéder à la structure cristalline de référence (Figure 136a). En effet, la déviation de l'écart quadratique moyen (RMSD en anglais : Root-Mean-Square Deviation) permet la comparaison quantitative entre les structures calculées et la structure de référence. La structure calculée est considérée comme similaire à la structure de référence lorsque la valeur du RMSD est la plus faible possible. La figure 136b montre qu'avec une seule contrainte de distance de 7,6 Å la valeur

du RMSD est d'environ 3 Å. Ce résultat préliminaire montre que la mesure d'une seule distance n'est pas suffisante pour retrouver la structure de référence. Il soulève aussi certains problèmes qui devront être résolus pour parvenir à nos objectifs :

- Les positions à marquer au tritium doivent être judicieusement choisies afin d'éviter la synthèse difficile ou non-informatives de molécules. La modélisation moléculaire nous aide donc à définir les positions les plus pertinentes et les plus compatibles avec la chimie de marquage au tritium et la spectroscopie RMN à l'état solide.
- La structure de référence correspond à la conformation énergétiquement stable du peptide diphenylalanine déterminée dans une structure cristalline. Dans cet arrangement défini, les unités sont combinées pour former un assemblage moléculaire avec des liaisons non-covalentes. Les résultats de simulation préliminaire montrent que la conformation énergétiquement stable ne correspond pas à celle observée en solution pour une molécule isolée (Figure 136c). Il semble que la structure de référence ne peut être stabilisée en solution à cause de l'absence d'interactions, telles que les interactions  $\pi$  stacking, qui permettent l'arrangement cristallin. Il est donc difficile d'extrapoler la structure d'une unité moléculaire dans un assemblage supramoléculaire à partir de sa conformation isolée.



Figures 136 : L'apport de la modélisation moléculaire à notre projet. (a) Les 1000 structures calculées avec un protocole de recuit simulé. La structure de référence déterminée par cristallographie aux rayons X est représentée en bleu. La distance de référence entre les protons *para* est de 7,6 Å. (b) Valeurs du RMSD calculées entre la structure de référence et les structures générées par le recuit simulé. (c) Distribution des distances  $H_{para}$ - $H_{para}$  entre les deux cycles phénylalanine observées par simulation dynamique moléculaire à 300 K. La flèche rouge indique la distance de référence mesurée dans la structure cristalline (7,6 Å).

## II. B. La synthèse des Phe-Phe cristallisés ditritiés à partir de précurseurs dibromés par échange Br/T

À l'aide de la modélisation moléculaire, trois molécules tritiées sont définies pour la mesure de distances intramoléculaires (Figure 137). Ces trois molécules sont marquées au tritium sur les cycles aromatiques de chacune des phénylalanines du dipeptide Phe-Phe. Elles permettraient de positionner les cycles aromatiques l'un par rapport à l'autre. Le double marquage de ces positions aromatiques peut être réalisé par déhalogénéation catalytique de précurseurs dibromés.

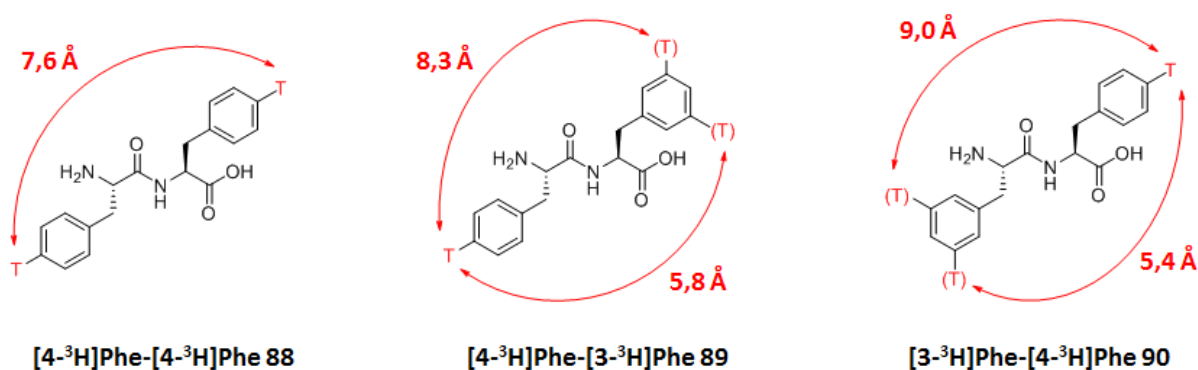


Figure 137 : Structures de Phe-Phe marquées au tritium définies pour la mesure de distances intramoléculaires. Les distances indiquées en rouge correspondent aux distances de référence déterminées par cristallographie aux rayons X.

### II. B. 1. Synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe 88

#### II. B. 1. a) Approche rétrosynthétique

Cette approche vise à synthétiser Phe-Phe tritié sur les positions *para* des cycles aromatiques des deux phénylalanines sans changement structural par rapport au Phe-Phe original et à réduire au minimum le nombre d'étapes radioactives. Notre stratégie permet de réaliser le marquage en dernière étape (Figure 138).

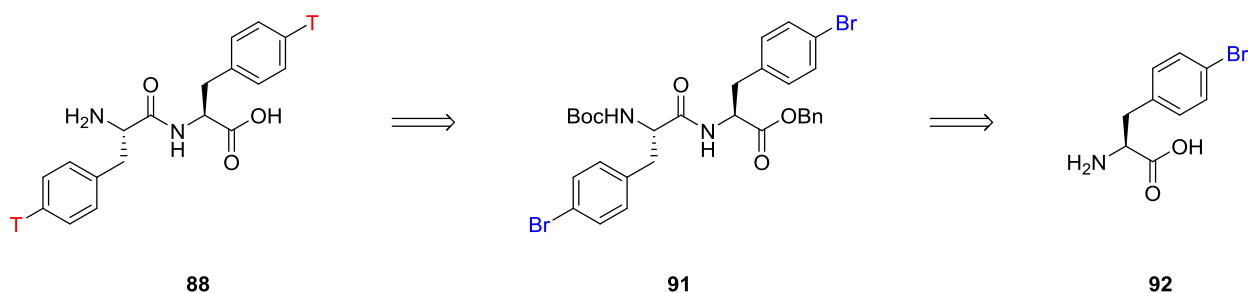


Figure 138 : Schéma de rétrosynthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88**.

## II. B. 1. b) Synthèse du précurseur Boc-[4-Br]Phe-[4-Br]Phe-OBn **91** et marquage au tritium

Le schéma de synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88** est rappelé dans la Figure 139. La fonction amine de la phénylalanine bromée commerciale **92** est d'abord protégée par le groupement Boc pour donner l'intermédiaire **93a**. Une partie de cet intermédiaire est ensuite protégée par un ester benzylique pour obtenir l'intermédiaire **94**. Après un couplage peptidique entre les intermédiaires **93a** et **94**, en présence de DIPEA, HOBT et EDC.HCl, le précurseur dibromé **91** est obtenu. La molécule-cible [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88** est préparée par acidolyse du groupement Boc du précurseur **91** puis débromation catalytique, en présence de T<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon. À l'issue de cette étape de débromation, l'ester benzylique est hydrogénéolysé.

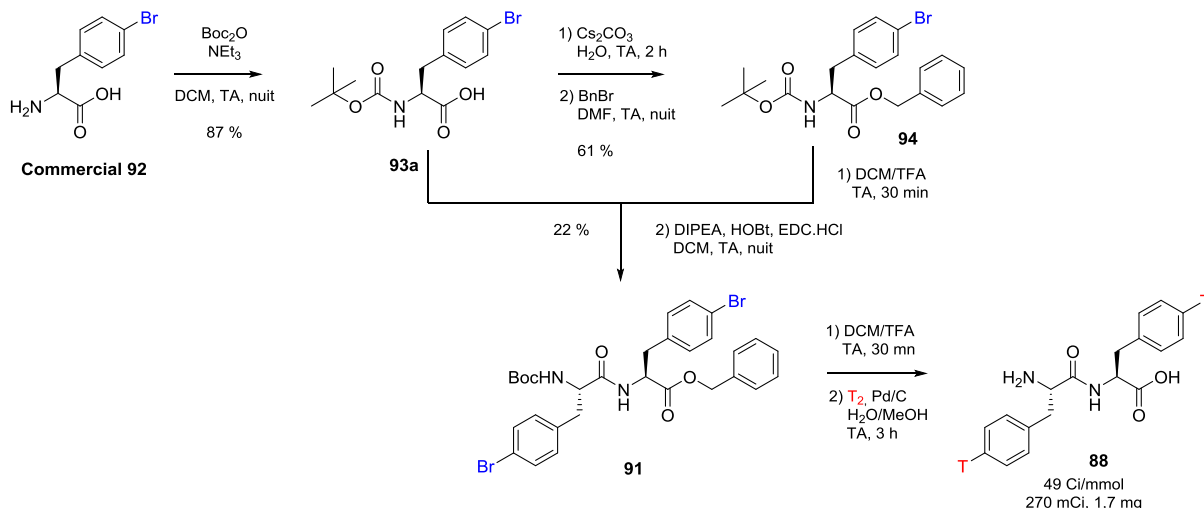


Figure 139 : Synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88**.

Le dipeptide Phe-Phe ditritié **88** est donc obtenu avec un rendement radiochimique et une radioactivité spécifique élevés ainsi qu'une pureté supérieure à 99 %, déterminés par <sup>3</sup>H

RMN, HPLC et spectrométrie de masse. Il est ensuite dilué dans un échantillon de Phe-Phe non-marqué (1 mCi/mg soit 1 molécule de Phe-Phe ditritié pour 150 molécules de Phe-Phe non-tritié) dissous dans l'eau. Le mélange de Phe-Phe ditritié **88** et de Phe-Phe non-tritié est cristallisé par évaporation de l'eau à 80 °C.

## II. B. 2. Synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89**

L'approche rétrosynthétique pour préparer [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** est la même que celle mise au point pour [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88**. Elle repose sur la préparation d'un précurseur dibromé permettant d'obtenir le Phe-Phe ditritié correspondant, par échange Br/T. Le schéma de synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** est rappelé dans la Figure 140. La fonction amine de la phénylalanine bromée commerciale **92** est d'abord protégée par le groupement Boc pour donner l'intermédiaire **93b**. En parallèle, la phénylalanine bromée commerciale **95** est protégée par un ester benzylique, à l'aide d'alcool benzylique et de chlorure de thionyle, pour obtenir l'intermédiaire **96a**<sup>167</sup>. Après un couplage peptidique entre les intermédiaires **93b** et **96a**, en présence de DIPEA, HOBt et EDC.HCl, le précurseur dibromé **97** est obtenu avec un rendement de 64 %. La molécule-cible [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** est préparée par acidolyse du groupement Boc du précurseur **97** puis débromation catalytique, en présence de T<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon. À l'issue de cette étape de débromation, l'ester benzylique est hydrogénéolysé.

---

<sup>167</sup> J. You, B. Liu, Y. Wang, *J. Chinese Chem. Soc.* **2009**, *56*, 1010–1017.

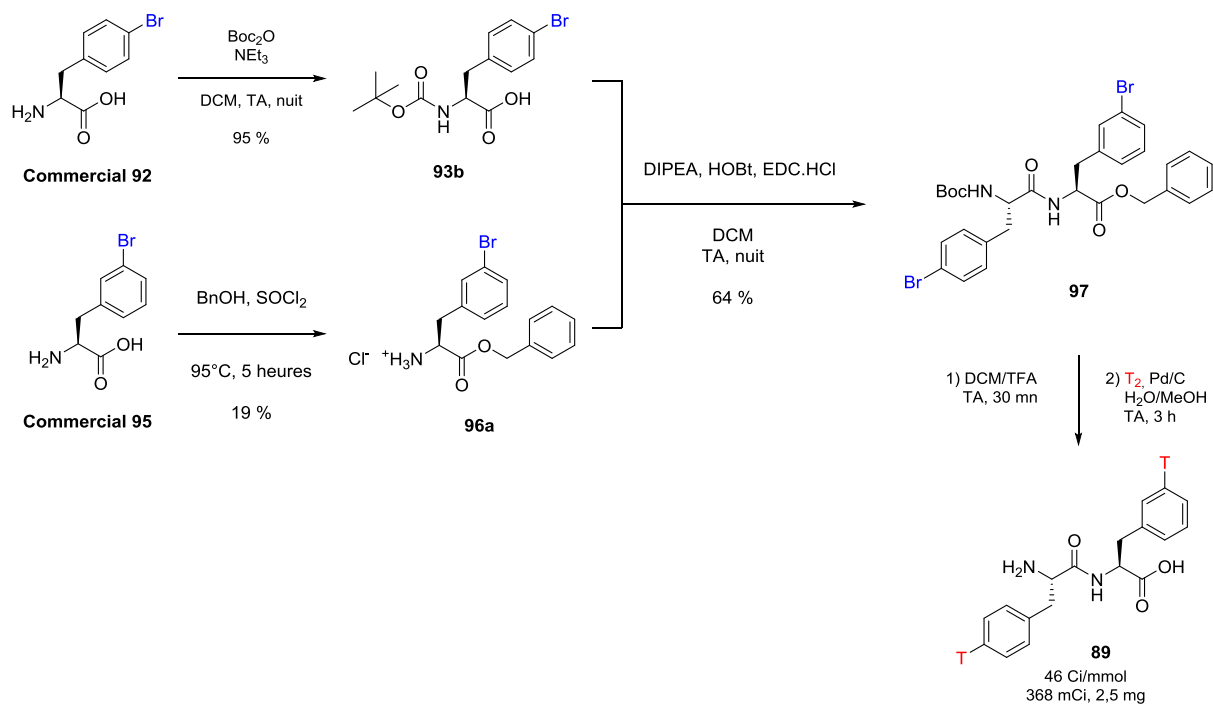


Figure 140 : Synthèse de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89**.

Le dipeptide Phe-Phe ditritié **89** est lui aussi obtenu avec un rendement radiochimique et une radioactivité spécifique élevés ainsi qu'une pureté supérieure à 99 %. Il est ensuite dilué dans échantillon de Phe-Phe non-marqué dans les mêmes conditions que celles mises au point pour le dipeptide Phe-Phe ditritié **88** (1 mCi/mg).

## II. B. 3. Synthèse de [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90**

L'approche rétrosynthétique pour préparer [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** est identique à celle décrite précédemment pour [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88** et [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89**. Le schéma de synthèse du [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** est rappelé dans la Figure 141. Après un couplage peptidique entre l'intermédiaire **94** et le réactif commercial **98**, en présence de DIPEA, HOBT et EDC.HCl, le précurseur dibromé **99** est obtenu avec un rendement de 67 %. La molécule-cible [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** est préparée par acidolyse du groupement Boc du précurseur **99** puis débromation catalytique, en présence de T<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon. À l'issue de cette étape de débromation, l'ester benzylique est hydrogénolysé.

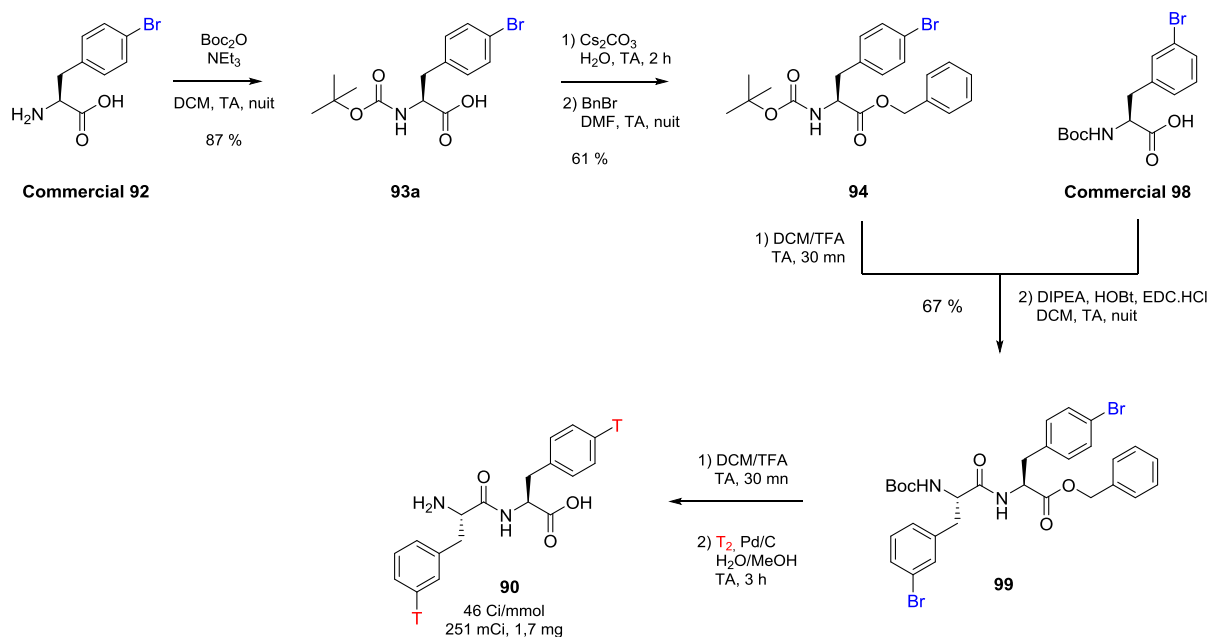


Figure 141 : Synthèse de  $[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **90**.

Le dipeptide Phe-Phe ditritié **90** est ensuite dilué dans un échantillon de Phe-Phe non-marqué dans les mêmes conditions que celles mises au point pour le dipeptide Phe-Phe ditritié **88** (1 mCi/mg).

## II. C. Conclusions

Le premier objectif de ce travail consistait à réaliser la synthèse de précurseurs di-bromés sur les positions aromatiques de Phe-Phe pour avoir accès aux Phe-Phe tritiés correspondant, par débromation en présence de  $\text{T}_2$  gaz et de Pd/C. Trois Phe-Phe ditritiés ont été préparés afin de mesurer les distances interatomiques par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide et de positionner les chaînes latérales des deux phénylalanines de Phe-Phe (Figure 142).

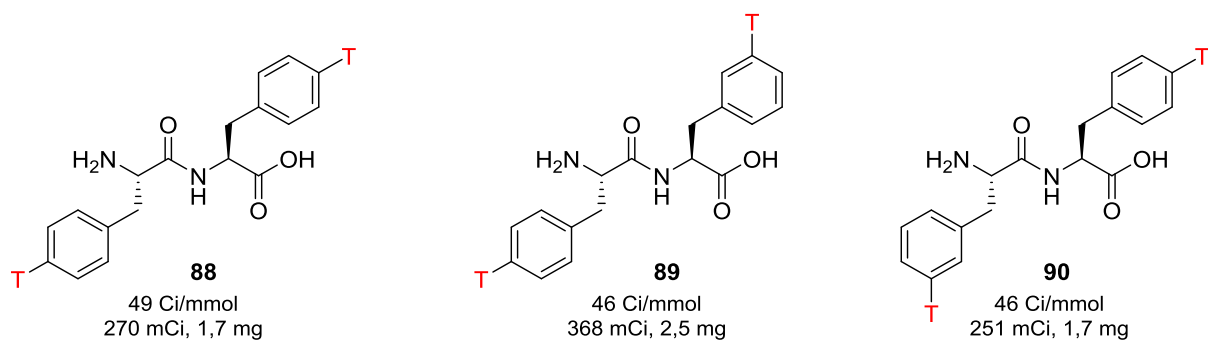


Figure 142 : Structures des trois Phe-Phe ditritiés préparés par échange Br/T sur les précurseurs dibromés correspondant pour la mesure de distances intramoléculaires.

Après avoir synthétisé les dipeptides Phe-Phe ditritiés souhaités et procédé à leur cristallisation, selon les conditions décrites par l'équipe de Görbitz, avec du Phe-Phe non-marqué, il s'agit, pour la suite de ce travail de thèse, de mesurer les distances inter-tritiums par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide.



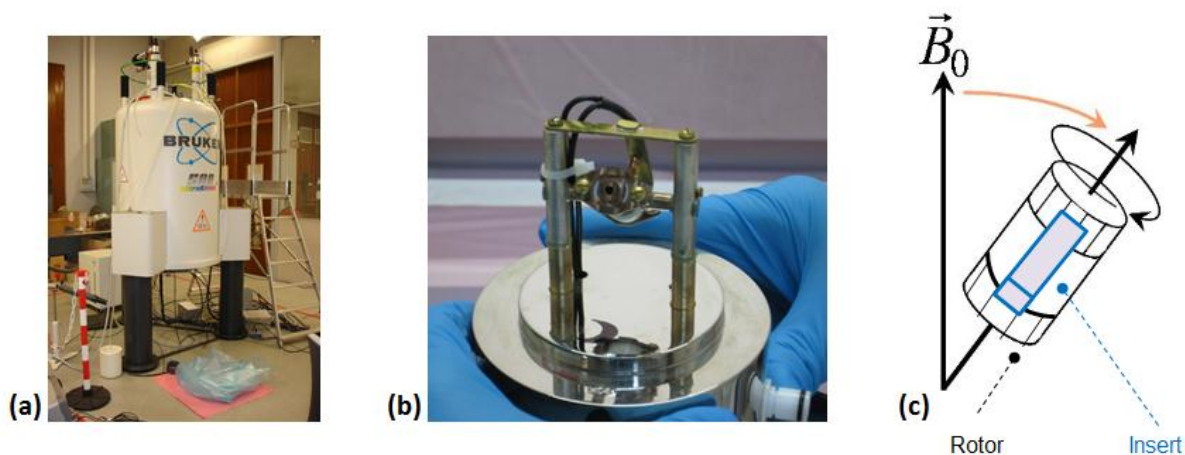


**III. La mesure des distances  
interatomiques  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  par RMN  $^3\text{H}$  à  
l'état solide (travail réalisé à Saclay par  
l'équipe du Dr. Thibault Charpentier)**



# III. La mesure des distances interatomiques $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$ par RMN $^3\text{H}$ à l'état solide (travail réalisé à Saclay par l'équipe du Dr. Thibault Charpentier)

Après avoir cristallisé les dipeptides Phe-Phe ditritiés avec du Phe-Phe non-marqué (ou « froid »), notre objectif est de mesurer les distances inter-tritiums par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide (Figure 143a). Nos trois produits marqués au tritium, dilués avec du Phe-Phe « froid » sont donc conditionnés dans un double conteneur : l'insert contenant les cristaux est lui-même introduit dans le rotor. Le rotor permet la rotation pour améliorer l'analyse RMN à l'angle magique (Figures 143b et 143c). La mesure des distances par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide est réalisée par le Dr. Thibault Charpentier et Mélanie Moskura au CEA-Saclay.



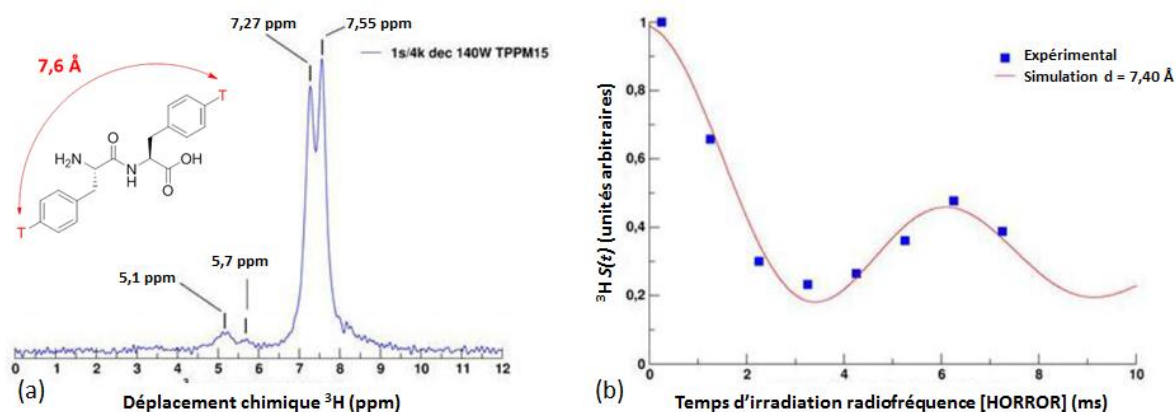
Figures 143 : (a) Spectromètre RMN 500 MHz. (b) Tête de sonde (spinner bench). (c) Double barrière de confinement de l'échantillon tritié (insert et rotor).

### III. A. Mesure de la distance $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$ de $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ - $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ **88**

Les cristaux du dipeptide Phe-Phe ditritié **88** dilué dans un échantillon de Phe-Phe non-marqué (14 mg, 14 mCi) sont analysés par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide et montrent trois points importants :

Une haute résolution sans précédent peut être atteinte de manière simple et robuste pour les déplacements chimiques. Pour  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ - $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **88**, une résolution de pic de 0,1 à 0,2 ppm est observée avec un découplage  $^1\text{H}$  régulier (l'optimisation de ce découplage est l'un des objectifs de notre projet), une fréquence de rotation modérée (8 kHz) et un champ magnétique d'environ 11,7 T (soit 500 MHz  $^1\text{H}$ ) (Figure 144a).

- L'oscillation dipolaire  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  peut être bien résolue et permet la mesure de la distance  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  en accord avec la distance de référence (distance de 7,4 Å déterminée par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide et distance de 7,6 Å déterminée par cristallographie aux rayons X) (Figure 144b).
- La haute sensibilité de la technique RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide permet d'utiliser une faible quantité de radioactivité, inférieure à 14 mCi (soit moins de 0,5  $\mu\text{mole}$  de produit tritié).



Figures 144 : Résultats obtenus par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide pour la mesure de la distance inter-tritium sur  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ - $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **88**. (a) Spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide de  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ - $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **88** présentant une résolution d'environ 0,2 ppm (7,27 et 7,55 ppm). Deux sites additionnels à 5,1 et 5,7 ppm correspondant au marquage résiduel des positions benzyliques sont présents (< 2 %). La distance indiquée en rouge correspond à la distance de référence déterminée par cristallographie (7,6 Å). (b) Oscillations dipolaires entre les deux atomes  $^3\text{H}$  (7,22 et 7,55 ppm) permettant la mesure de distance de  $7,4 \pm 0,2$  Å.

D'après la modélisation moléculaire, cette première mesure de distance intramoléculaire sur le dipeptide ditritié Phe-Phe n'est pas suffisante pour déterminer la conformation de Phe-Phe cristallisé. Nous supposons que la mesure de distances sur [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** et [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **90** fournira des informations supplémentaires sur le positionnement relatif des cycles aromatiques des phénylalanines.

### **III. B. Mesure de distances <sup>3</sup>H-<sup>3</sup>H de [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89****

Les cristaux du dipeptide Phe-Phe ditritié **89** sont préparés dans les mêmes conditions que celles décrites pour Phe-Phe ditritié **88**. Mais, sur cette molécule, deux distances peuvent être mesurées. En effet, contrairement au [4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88** dont le double marquage sur les positions *para* assure une distance relativement constante car elles se situent sur les axes de rotation des cycles aromatiques, [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** est doublement marqué sur une position *para* de l'aromatique d'une unité phénylalanine et sur une position *méta* de l'aromatique de l'autre phénylalanine. Ce marquage en position *méta* conduit, à l'état liquide, à une distance variable à cause de la rotation du cycle aromatique mais, à l'état solide, à deux distances fixes car Phe-Phe est dans une conformation cristalline figée. Ici, le défi de la RMN <sup>3</sup>H à l'état solide est de mesurer deux distances sur une même molécule doublement marquée. Le spectre RMN <sup>3</sup>H à l'état solide obtenu pour [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** montre qu'il est possible de distinguer chacune des deux positions *méta* sur le même cycle aromatique, à 8,3 et 8,5 ppm (Figure 145).

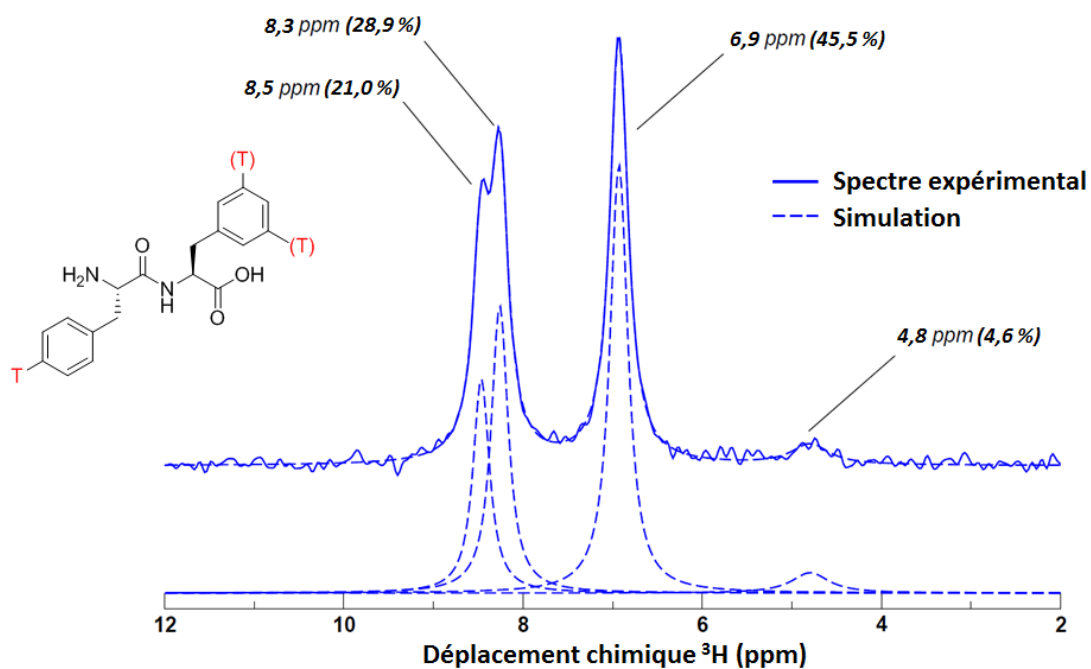


Figure 145 : Spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide de  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **89**. Le pic à 6,9 ppm correspond à l'atome de tritium situé en position *para* du cycle aromatique, tandis que les pics à 8,3 et 8,5 ppm correspondent à l'atome de tritium situé en position *mé*ta. Un pic additionnel à 4,8 ppm est également présent (< 4,6 %).

Les oscillations dipolaires obtenues permettent de mesurer deux distances inter-tritiums « *para-mé*ta » sur une même molécule : 5,83 Å et 8,2 Å. Ces distances mesurées sont très proches des distances de référence (5,8 Å et 8,3 Å) (Figure 146). Il s'agit du premier exemple de mesure de deux distances sur une seule molécule tritiée sur une position mobile.

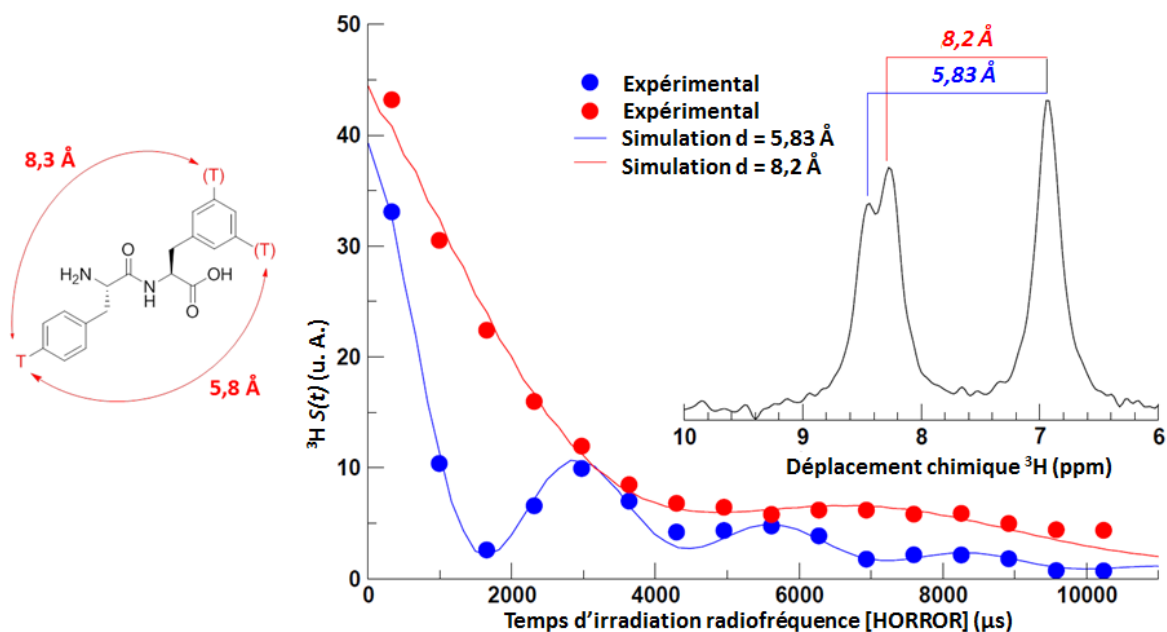


Figure 146 : Oscillations dipolaires entre les deux atomes  $^3\text{H}$  (6,9 ppm et 8,3 ou 8,5 ppm) permettant la mesure de deux distances de 5,83 Å et 8,2 Å. Les deux distances indiquées en rouge sur la structure de  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **89** correspondent aux distances de référence déterminées par cristallographie (5,8 Å et 8,3 Å).

Les résultats obtenus pour  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **89** sont très encourageants et montrent que la RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide est un outil précieux pour la mesure de distances précises. Elle est de plus très efficace car, sur une seule molécule marquée comme  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **89**, deux distances peuvent être mesurées. Ces deux distances additionnées à celle mesurée pour  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **88** apportent des informations complémentaires nécessaires à la détermination de la conformation de Phe-Phe cristallisé. L'analyse par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide de  $[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **90** devrait nous fournir deux distances supplémentaires.

### III. C. Mesure de distances $^3\text{H}\text{-}^3\text{H}$ de $[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$ **90**

Les cristaux du dipeptide Phe-Phe ditritié **90** sont préparés dans les mêmes conditions que celles décrites pour Phe-Phe ditritié **88**. Sur cette molécule, comme sur le Phe-Phe ditritié **89**, deux distances peuvent être mesurées.

Malheureusement, le spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide obtenu pour  $[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **90** présente un seul pic correspondant à l'atome de tritium en position *para* ainsi qu'un pic très large qui s'étend de 6 à 9 ppm (Figure 147). Il semble que les deux signaux des tritiums en



*mé*ta pour [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** ne soient pas distingués par RMN <sup>3</sup>H à l'état solide. La mesure des deux distances sur [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** est donc impossible à partir du spectre RMN <sup>3</sup>H à l'état solide obtenu.

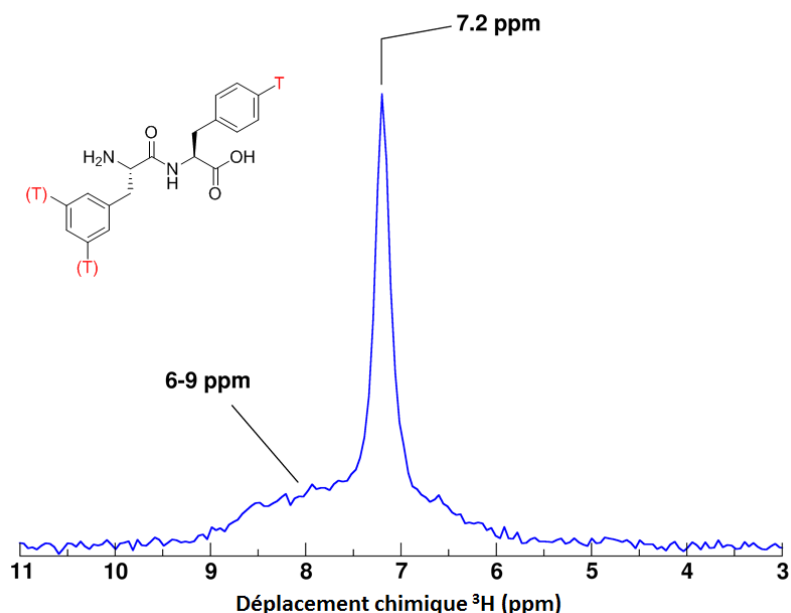


Figure 147 : Spectre RMN <sup>3</sup>H à l'état solide de [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90**. Le pic à 7,2 ppm correspond à l'atome de tritium situé en position *para* du cycle aromatique, tandis qu'un large pic de 6 et 9 ppm ne permet pas de distinguer l'atome de tritium situé en position *mé*ta.

Trois hypothèses peuvent expliquer pourquoi la mesure de deux distances n'est pas possible sur [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** :

- La cristallisation du dipeptide [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** n'a pas été effectuée correctement. Un solide hétérogène a été obtenu au lieu des cristaux attendus.
- Le dipeptide [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** a subi une dégradation à cause de la radiolyse.
- Le cycle aromatique marqué en position *mé*ta (sur Phe n°1) du [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** présente un désordre conformationnel à l'échelle de temps de la RMN (ici de l'ordre des millisecondes).

La première hypothèse est, selon nous, la moins probable car la cristallisation de [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** a eu lieu dans les mêmes conditions que celles décrites pour les deux autres dipeptides ditritiés **88** et **89**. De plus, le pic fin du spectre RMN <sup>3</sup>H à l'état solide, correspondant au tritium en position *para* du cycle aromatique de Phe n°2, montre que le solide analysé n'est pas totalement amorphe.

La seconde hypothèse nous semble aussi peu vraisemblable car l'analyse  $^3\text{H}$  RMN à l'état liquide de l'échantillon ne permet pas d'identifier d'éventuels produits de dégradation.

La troisième hypothèse nous paraît la plus plausible. En effet, le spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide du dipeptide ditritié **88**, avec le double marquage au tritium sur les positions *para* des deux cycles aromatiques, ne peut pas rendre compte du désordre conformationnel du cycle aromatique de Phe n°1 si la position *para* se trouve dans son axe de rotation. Dans ce cas, la distance inter-tritium est fixe. Le marquage en position *mé*ta sur le cycle aromatique de Phe n°1 dans [3- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe **90** permettrait donc d'observer un désordre conformationnel. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour confirmer notre hypothèse. Mais s'il s'avère que le cycle aromatique de Phe n°1 est bien mobile, la RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide représenterait une méthode d'analyse structurale très précise puisqu'elle rendrait compte du désordre de certains groupements dans une molécule.

### **III. D. Conclusions**

Le second objectif de cette thèse était, après avoir synthétisé trois dipeptides Phe-Phe ditritiés (Figure 148) et procédé à leur cristallisation diluée avec du Phe-Phe non-marqué, de mesurer les distances inter-tritiums par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide.

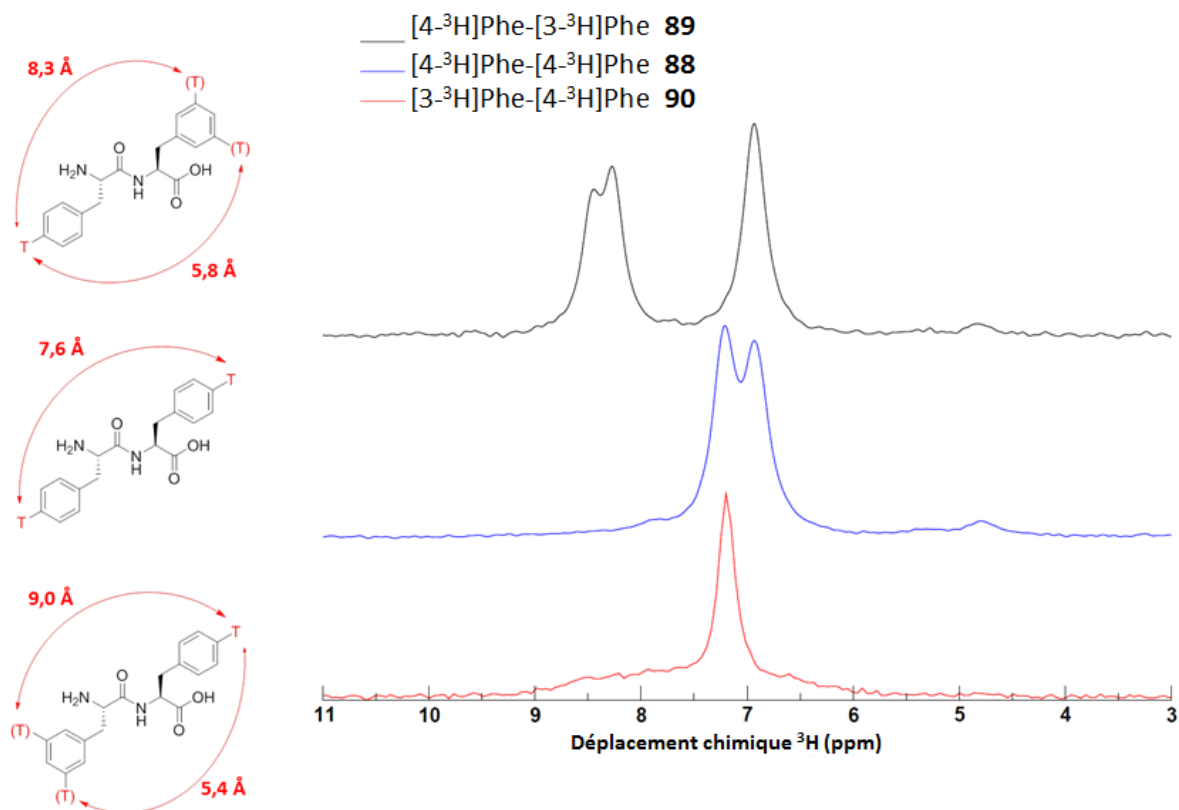


Figure 148 : Comparaison des spectres RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide obtenus pour les trois Phe-Phe dinitroés. Les distances indiquées en rouge sur les structures de Phe-Phe dinitroés correspondent aux distances de référence déterminées par cristallographie.

Ces distances, comparées aux distances de référence connues grâce à la technique de cristallographie aux rayons X, nous permettraient d'apporter des informations indispensables pour la reconstitution de la conformation de Phe-Phe à l'état cristallin (Tableau 14).

Composé	[4- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe 88	[4- $^3\text{H}$ ]Phe-[3- $^3\text{H}$ ]Phe 89	[3- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe 90
Distances de référence <sup>a</sup> (Å)	7,6	5,8 et 8,3	5,4 et 9,0
Distances mesurées (Å)	7,4 ± 0,02	5,83 et 8,2	Non mesurable

Tableau 14 : Comparaison des distances  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  mesurées par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide aux distances de référence.

<sup>a</sup>Distances de référence déterminées par cristallographie aux rayons X.

Dans le cas de la molécule [4- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe **88**, la RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide permet d'observer le double marquage et d'obtenir des oscillations dipolaires permettant de mesurer une distance intramoléculaire de  $7,4 \pm 0,2$  Å très proche de la distance de référence déterminée par cristallographie aux rayons X (7,6 Å). Cette expérience démontre que notre

méthode d'analyse structurale permet d'obtenir le même type d'information que celles fournies par une méthode couramment utilisée comme la cristallographie aux rayons X et peut être appliquée sur une molécule d'intérêt chimique et biologique.

Dans le cas de la molécule [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89**, deux distances intramoléculaires ont pu être mesurées grâce à notre méthode. Ces deux distances de 5,83 et 8,2 Å sont très proches des distances de référence (5,8 et 8,3 Å), ce qui montre que notre méthode basée sur la RMN <sup>3</sup>H à l'état solide est fiable sur différentes positions de marquage. Il s'agit en plus du premier exemple de mesure de deux distances sur une seule molécule tritiée grâce à notre méthode d'analyse. L'incertitude sur la mesure des distances pour [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** reste à préciser.

Dans le cas de la molécule [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90**, le spectre RMN <sup>3</sup>H à l'état solide ne permet pas de mesurer de distance intramoléculaire. En effet, si le signal de l'atome de tritium positionné en *para* sur le cycle aromatique de Phe n°2 est bien détecté, celui positionné en *méta* sur le cycle aromatique de Phe n°1 ne donne pas de pic mais plutôt une large bande s'étendant sur 3 ppm. Notre hypothèse pour expliquer ce spectre inattendu est que le marquage en position *méta* sur le cycle aromatique de Phe n°1 dans [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** permet d'observer le désordre d'orientation du cycle aromatique, même en phase cristalline. Ce désordre entraîne de nombreuses variations de distances entre les positions relatives des deux phénylalanines constituant Phe-Phe qui ne peuvent être distinguées par notre méthode. Si notre hypothèse était vérifiée, la RMN <sup>3</sup>H à l'état solide représenterait une méthode de choix pour étudier précisément la structure à l'échelle atomique de molécules auto-assemblées.

Ainsi, après avoir procédé à la synthèse de trois Phe-Phe ditritiés sur les cycles aromatiques des unités phénylalanines et à la mesure de trois distances intramoléculaires pour positionner les cycles aromatiques l'un par rapport à l'autre pour connaître la conformation de Phe-Phe à l'état cristallin, nous poursuivons notre étude avec la synthèse d'un nouveau Phe-Phe ditritié avec un tritium sur le noyau aromatique de Phe n°2 et un autre tritium sur le squelette peptidique, et plus précisément sur le C<sub>α</sub> de Phe n°1.



## **IV. Essai de marquage au tritium de Phe-Phe utilisant RuNP@PVP**



# IV. Essai de marquage au tritium de Phe-Phe utilisant RuNP@PVP

Trois molécules tritiées ont été synthétisées pour la mesure de distances intramoléculaires (cf. II. B.). Ces trois molécules sont marquées au tritium sur les cycles aromatiques de chacune des phénylalanines du dipeptide Phe-Phe afin de positionner les cycles aromatiques l'un par rapport à l'autre.

À l'aide de la modélisation moléculaire, nous avons identifié un nouveau Phe-Phe ditritié pertinent pour notre étude avec un tritium sur un cycle aromatique et un autre tritium sur le C $\alpha$  du squelette peptidique (Figure 149).

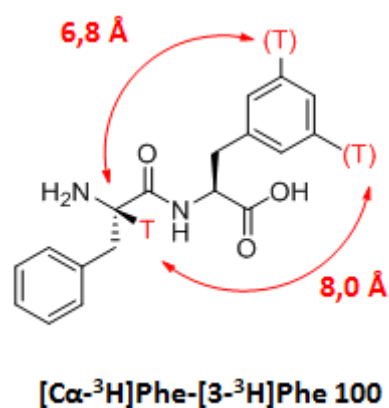


Figure 149 : Nouvelle structure de Phe-Phe marqué au tritium définie pour la mesure de distances intramoléculaires. Les distances indiquées en rouge correspondent aux distances de référence déterminées par cristallographie aux rayons X.

Ce dipeptide Phe-Phe ditritié possède donc un tritium en position *méta* sur le cycle aromatique de Phe n°2 ainsi qu'un tritium sur le C $\alpha$  de Phe n°1. Chacun de ces deux tritiums est donc placé sur deux régions différentes de la molécule de Phe-Phe. L'objectif est ici de mesurer les distances entre le cycle aromatique et le squelette peptidique nécessaires à la détermination de la conformation de Phe-Phe cristallisé.

Le choix de positionner l'atome de tritium en *méta* sur le cycle aromatique de Phe n°2 repose sur les résultats obtenus précédemment sur [4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89** (cf. III. B.). En effet,



grâce au marquage au tritium en position *méta* sur le Phe n°2, deux distances très proches des distances de référence ont pu être mesurées par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide, sur une seule molécule  $[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **89**. En gardant cette position de marquage au tritium en *méta* sur Phe n°2, nous souhaitons parvenir une nouvelle fois à la mesure de plusieurs distances avec une seule molécule. Le marquage de cette position aromatique peut être réalisé par déhalogénéation catalytique d'un précurseur bromé.

La deuxième position de marquage au tritium, sur le  $\text{C}_\alpha$  de Phe n°1, est plus originale. En effet, le  $\text{C}_\alpha$  de Phe n°1 est un carbone asymétrique. Le marquage sur ce type de position est plutôt fastidieux car, à l'aide des méthodes de marquage conventionnelles, il requiert de nombreuses étapes de synthèse et de purifications ainsi que l'utilisation d'auxiliaires chiraux. Le marquage au deutérium, isotope stable de l'hydrogène serait envisageable par des méthodes de marquage pH-dépendantes ou catalysées par des métaux de transition (cf. Partie 1. I. A. 2.). Par contre, pour du marquage au tritium, nous devons nous efforcer de concevoir une voie de synthèse courte et techniquement simple en privilégiant l'échange H/T sur la molécule-cible plutôt que de choisir une synthèse multi-étape. L'utilisation de nanoparticules de ruthénium RuNP@PVP, décrites dans la première partie de cette thèse, nous paraît intéressante dans cette optique. Nous avons démontré son activité catalytique envers la réaction d'échange H/D, par activation C-H, sur des molécules azotées. De plus, nous avons montré que la deutération d'acides aminés et de peptides par les RuNP@PVP s'effectue avec rétention totale de la configuration du  $\text{C}_\alpha$ . Le  $\text{C}_\alpha$  du dipeptide Phe-Phe représente donc une position très intéressante de marquage au tritium par RuNP@PVP.

## **IV. A. La synthèse du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn 102**

### **IV. A. 1. Approche rétrosynthétique**

Notre approche rétrosynthétique vise à synthétiser Phe-Phe tritié sur la position *méta* du cycle aromatique de Phe n°2 et sur le  $\text{C}_\alpha$  de Phe n°1, sans changement structural par rapport au Phe-Phe original et à réduire au minimum le nombre d'étapes radioactives. Pour la synthèse de  $[\text{C}_\alpha\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **100**, nous décidons de passer par un précurseur bromé en position *méta* du cycle aromatique de Phe n°2 (molécule **102**). Notre stratégie permet de réaliser le double

marquage sur les deux dernières étapes : la première par échange Br/T avec Pd/C, la seconde par échange H/T avec RuNP@PVP (Figure 150).

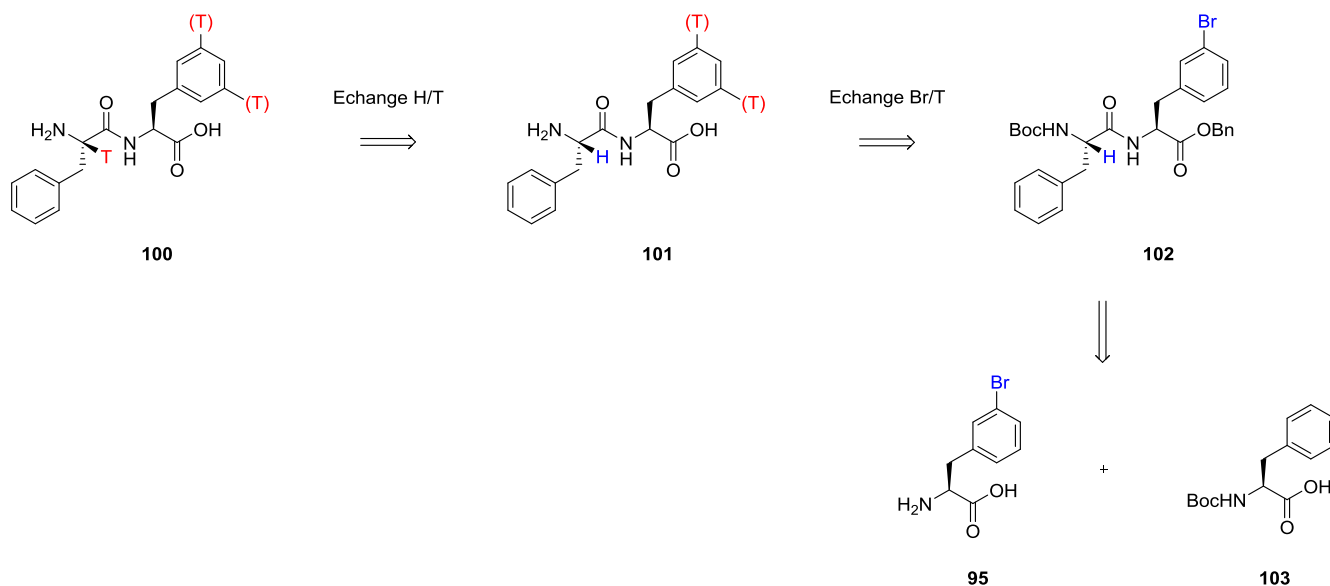


Figure 150 : Schéma de rétrosynthèse de  $[C_{\alpha}\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **100**.

## IV. A. 2. Synthèse du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**

Le schéma de synthèse du Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** est rappelé dans la Figure 151. La fonction acide carboxylique de la phénylalanine bromée commerciale **95** est d'abord transformée en ester benzylique pour donner l'intermédiaire **96b**. Après un couplage peptidique entre l'intermédiaire **96b** et le réactif commercial **103**, en présence de DIPEA, HOBT et EDC.HCl, le précurseur bromé **102** est obtenu.

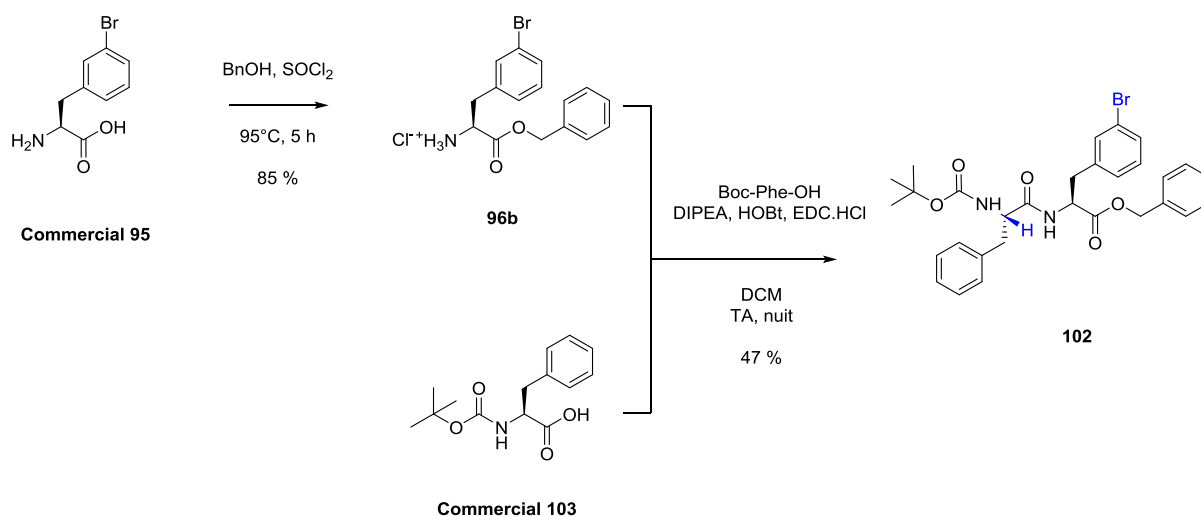


Figure 151 : Synthèse de Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**.

Avant de réaliser le double marquage au tritium à partir du précurseur **102**, nous décidons de tester notre voie de synthèse avec du deutérium. En effet, la réaction d'échange H/T, par C-H activation, en présence de RuNP@PVP, n'a jamais été réalisée auparavant. La mise au point du marquage au deutérium, isotope stable de l'hydrogène, servira donc de modèle pour l'optimisation du marquage au tritium, isotope radioactif nécessitant des conditions de manipulation particulières.

## IV. B. Double marquage au deutérium du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**

### IV. B. 1. Mise au point de l'étape 1 : échange Br/D

Nous choisissons de procéder à l'échange Br/D en premier car il s'agit d'un échange conventionnel et nous en maîtrisons bien les conditions.

En effet, pour réaliser l'étape de débromation catalytique, nous décidons de garder la même stratégie que celle mise au point pour le marquage des trois dipeptides ditritiés en positions aromatiques (molécules **88**, **89** et **90**) en utilisant du palladium sur charbon et D<sub>2</sub> gaz (cf. II. B.).

Après déprotection du groupement Boc du précurseur **102** puis débromation catalytique, en présence de D<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon, provoquant également l'hydrogénolyse de l'ester benzylique, nous obtenons le dipeptide monodeutééré Phe-[3-<sup>2</sup>H]Phe **104a** (Figure 152). Le traitement consiste en une simple filtration du mélange réactionnel sur un filtre de seringue puis sur résine échangeuse d'ions DOWEX 50W-X8, ce qui permet de poursuivre le marquage sans passer par une étape de purification par chromatographie.

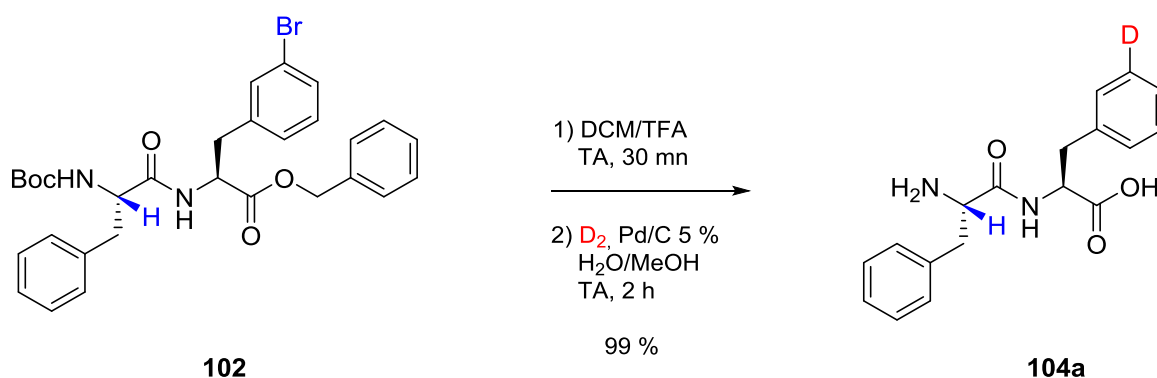


Figure 152 : Marquage au deutérium du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** par échange Br/D.

L'étape 1 du double marquage au deutérium du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**, reposant sur une réaction d'échange Br/D en présence de Pd/C et de D<sub>2</sub> gaz utilise des conditions qui pourraient être transposées au marquage au tritium par échange Br/T. Nous décidons alors de conserver ces conditions pour le marquage au tritium.

## IV. B. 2. Mise au point de l'étape 2 : échange H/D

Nous choisissons de procéder à l'échange H/D en dernière étape car il s'agit d'un échange plus délicat à mettre au point et à réaliser. En effet, même si nous sommes parvenus à mettre au point des conditions de réaction satisfaisantes pour l'échange H/D sur des acides aminés et des peptides, en présence de RuNP@PVP (cf. Partie 1. III.), la transposition à l'échange H/T nécessite de réadapter ces conditions.

### IV. B. 2. a) Choix du réacteur

Dans le but de transposer les conditions mises au point à l'échange H/T, nous allons devoir abandonner l'utilisation des bouteilles Fischer&Porter qui servent habituellement de réacteurs pour l'échange H/D en présence de RuNP@PVP (cf. Partie 1. III. A.). Ce type de réacteur n'est pas homologué pour une utilisation sur le banc de tritiation de notre laboratoire.

En effet, lorsque l'on réalise une expérience de tritiation, nous utilisons comme réacteur un ballon classique, avec le plus petit volume possible. Par exemple, pour une expérience de tritiation dans 2 mL de solvant, nous utilisons un ballon de moins de 5 mL de volume. Le volume de T<sub>2</sub> gaz à l'intérieur du ballon (appelé volume mort) est donc réduit au maximum. Cette condition ne peut être modifiée : pour des raisons de sécurité, nous devons mettre au point des conditions de réaction mettant en jeu le moins de T<sub>2</sub> gaz possible. Cette condition ne peut pas être satisfaite si nous utilisons une bouteille Fischer&Porter.

Nous devons donc mettre au point notre réaction d'échange H/D sur le dipeptide Phe-Phe dans un ballon classique.

#### IV. B. 2. b) Choix du solvant

Toujours dans le but de transposer les conditions mises au point à l'échange H/T, nous allons devoir chercher une alternative à l'utilisation de T<sub>2</sub>O. En effet, même si nous avons démontré que l'utilisation de D<sub>2</sub>O était parfaitement adaptée à la réaction d'échange H/D sur les acides aminés et les peptides (cf. Partie 1. III.), la transposition de T<sub>2</sub>O comme solvant pour l'étape d'échange H/T est inenvisageable, pour des raisons de sécurité : 1 mL de T<sub>2</sub>O présenterait une radioactivité de plus de 3000 Ci (soit plus de 111 TBq).

Heureusement, nous avons aussi démontré qu'il était possible d'utiliser un solvant non-deutééré pour la deutération des aminoacides (cf. Partie 1. III. B. 5.). Il s'agit de NaOH 0,01M. Nous avons observé que ce solvant favorisait la forme NH<sub>2</sub>, plutôt que NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, de l'amine qui jouait alors au mieux son rôle d'hétéroatome coordonnant et directeur pour la C-H activation catalysée par les RuNP@PVP.

La deutération de la L-leucine, avec RuNP@PVP 3 %, sous D<sub>2</sub> (2 bar), à 55 °C, pendant 36 heures, dans NaOH 0,01M, permettait d'obtenir un marquage régiosélectif (en α de l'atome d'azote) avec une incorporation en deutérium de 83 %. Cet exemple de marquage d'un acide aminé dans NaOH 0,01M nous pousse donc à choisir ce solvant pour la réaction d'échange H/T, en présence de RuNP@PVP, à l'étape 2 du double marquage sur le composé **104**.

#### IV. B. 2. c) Deutération par échange H/D sur le C<sub>α</sub> de Phe-Phe non marqué

Afin de confirmer notre hypothèse selon laquelle NaOH 0,01M est un solvant adapté pour la réaction d'échange H/T, en présence de RuNP@PVP, en étape 2 du double marquage sur le

précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**, nous procédons à la réaction d'échange H/D, en présence de RuNP@PVP 16 %, à 55 °C, pendant 2 heures, sur le dipeptide Phe-Phe non marqué, dans un ballon classique (Figure 153). Le substrat est au préalable traité sur résine échangeuse d'ions Dowex 50W-X8 pour s'assurer que l'extrémité N-terminale est sous forme d'amine libre.

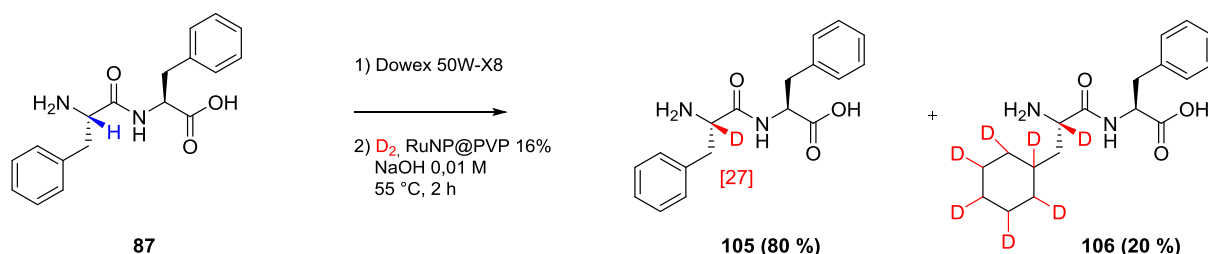


Figure 153 : Marquage au deutérium du dipeptide Phe-Phe non marqué **87** par échange H/D.

Deux produits sont alors obtenus avec un ratio de 80/20 : Phe-Phe avec un enrichissement isotopique d'environ 27 % sur le C<sub>α</sub> (déterminé par <sup>1</sup>H RMN et spectrométrie de masse) et un dérivé présentant un cycle totalement réduit par des deutériums. Ainsi, lors de la réaction catalysée par RuNP@PVP dans NaOH 0,01M sur le dipeptide Phe-Phe, la réaction de réduction du cycle aromatique entre en compétition avec la réaction d'échange H/D sur le C<sub>α</sub>. Le même type de résultat a été observé pour la réaction d'échange H/D catalysée par RuNP@PVP dans l'eau (H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O) sur la L-phénylalanine (cf. Partie 1. III. B. 2.). Le résultat de la deutération par échange H/D catalysée par RuNP@PVP dans NaOH 0,01M sur le dipeptide Phe-Phe est donc en cohérence avec le résultat obtenu dans l'eau (H<sub>2</sub>O et D<sub>2</sub>O) sur la L-phénylalanine.

Nous estimons que les conditions mises au point pour l'échange H/D catalysé par RuNP@PVP 16 %, dans NaOH 0,01M, sur le dipeptide Phe-Phe, constituent un bon compromis pour le marquage au tritium : il s'agit de conditions douces, permettant a priori un marquage C<sub>α</sub> modéré mais régiosélectif et stéréospécifique. De plus, malgré la réduction parasite du cycle aromatique, les produits obtenus peuvent être séparés par chromatographie HPLC. Nous choisissons de conserver le temps de réaction à 2 heures afin d'éviter de former davantage de produit de réduction.

## IV. B. 3. Résultat de la double deutération par échanges Br/D puis H/D à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**

Après avoir mis au point les deux étapes de marquage au deutérium, nous procédons au double marquage à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** (Figure 154).

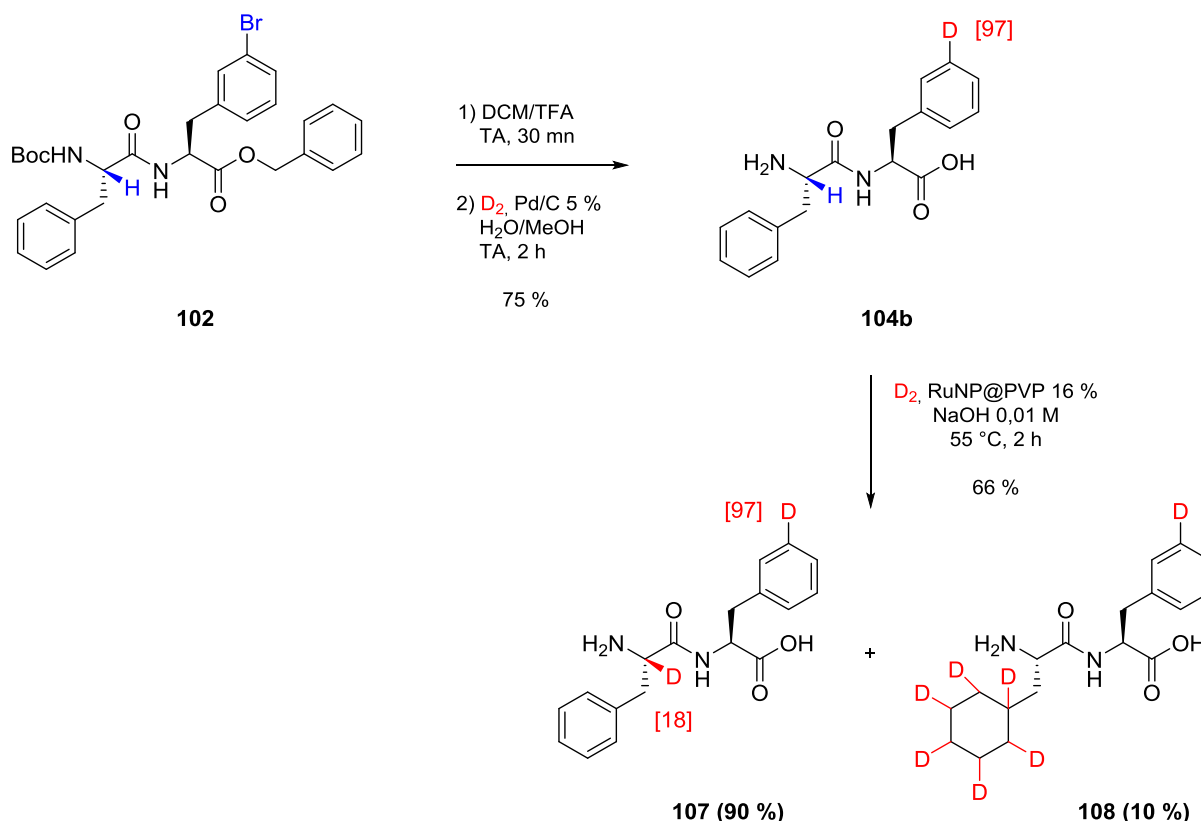


Figure 154 : Marquage au deutérium du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** par échange Br/D utilisant Pd/C 5 % suivi du marquage au deutérium de l'intermédiaire **104b** par échange H/D utilisant RuNP@PVP 16 %.

Après acidolyse du groupement Boc du précurseur **102** puis débromation catalytique, en présence de D<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon, provoquant également l'hydrolyse de l'ester benzylique, nous obtenons le dipeptide Phe-Phe monodeutééré Phe-[3-<sup>2</sup>H]Phe **104b**. Le traitement consiste en une simple filtration du mélange réactionnel sur un filtre de seringue puis sur résine échangeuse d'ions DOWEX 50W-X8. Nous procédons ensuite à la réaction d'échange H/D, en présence de RuNP@PVP 16 %, à 55 °C, pendant 2 heures, sur le dipeptide Phe-Phe monodeutééré Phe-[3-<sup>2</sup>H]Phe **104b**. Deux produits sont alors obtenus avec un ratio de 90/10 : Phe-Phe dideutééré avec un enrichissement isotopique d'environ 18 % sur le C<sub>α</sub> et de

97 % sur le cycle aromatique de Phe n°2, et un dérivé présentant un cycle réduit par des deutériums.

Les deux étapes mises au point pour la synthèse de  $[C_{\alpha}\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **100** permettent donc le double marquage régiosélectif sur deux positions différentes, l'un sur un cycle aromatique et l'autre sur le  $C_{\alpha}$  du squelette peptidique. L'incorporation en deutérium sur le  $C_{\alpha}$  est certes modérée mais suffisante pour l'application au marquage par du tritium. Notre stratégie de double marquage au deutérium peut donc être appliquée au double marquage au tritium.

## IV. C. Essai de double marquage au tritium du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**

Après avoir mis au point le double marquage au deutérium, nous procédons au double marquage au tritium à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** (Figure 155).

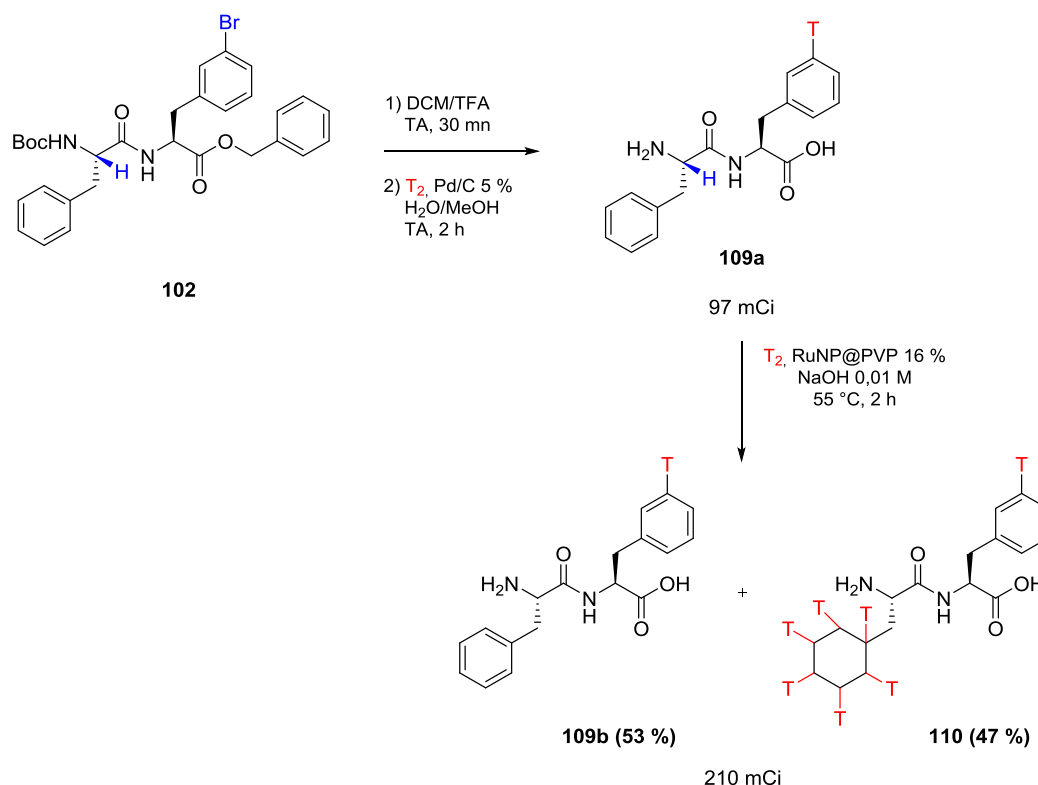


Figure 155 : Marquage au tritium du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** par échange Br/T utilisant Pd/C 5 % suivi du marquage au tritium de l'intermédiaire **109a** par échange H/T utilisant RuNP@PVP 16 %.



Après acidolyse du groupement Boc du précurseur **102** puis débromation catalytique, en présence de T<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon, provoquant également l'hydrogénolyse de l'ester benzylique, nous obtenons le dipeptide Phe-Phe monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109a**. Le traitement consiste en une simple filtration du mélange réactionnel sur un filtre de seringue puis sur résine échangeuse d'ions DOWEX 50W-X8. Nous procédons ensuite à la réaction d'échange H/T, en présence de RuNP@PVP 16 %, à 55 °C, pendant 2 heures, sur le dipeptide Phe-Phe monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109a**. Deux produits sont alors obtenus avec un ratio de 53/47 : Phe-Phe monotritié sur le cycle aromatique de Phe n°2, ainsi qu'un dérivé présentant un tritium sur le cycle aromatique de Phe n°2 et un cycle réduit par des tritiums.

Ainsi, la première étape de tritiation par échange Br/T permet bien d'obtenir l'intermédiaire monotritié **109a** souhaité. Par contre, la deuxième étape de tritiation par échange H/T ne permet pas de réaliser le marquage sur le C<sub>α</sub>. En effet, le spectre RMN <sup>3</sup>H ne présente aucun signal correspondant à cette position (4,10 ppm). Nous constatons que les conditions mises au point pour l'étape 2 sur le marquage au deutérium ne sont pas satisfaisantes sur le marquage au tritium. Le volume de gaz utilisé lors de la tritiation n'est peut-être pas adapté à la réaction d'échange H/T en présence de RuNP@PVP. L'effet isotopique cinétique du tritium peut également être à l'origine de la différence de résultat entre échange H/D et échange H/T sur le C<sub>α</sub> du dipeptide Phe-Phe.

## IV. D. Conclusions

Après avoir synthétisé trois dipeptides Phe-Phe ditritiés sur les cycles aromatiques de chacune des phénylalanines et avoir mesuré les distances inter-tritiums par RMN <sup>3</sup>H à l'état solide, nous avons conçu une nouvelle stratégie de marquage afin d'obtenir un dipeptide Phe-Phe ditritié sur deux positions de natures différentes : l'une sur un cycle aromatique et l'autre sur le C<sub>α</sub> du squelette peptidique. L'objectif est ici de mesurer les distances entre le cycle aromatique et le squelette peptidique nécessaires à la détermination de la conformation de Phe-Phe cristallisé. Si la première position peut être facilement marquée par débromation catalytique du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**, en présence de Pd/C et de T<sub>2</sub> gaz, la deuxième position est plus originale. En effet, il s'agit d'effectuer un échange H/T sur le centre stéréogène (le C<sub>α</sub>) d'une molécule-cible complexe (le dipeptide Phe-Phe) dans le but de suivre une voie de synthèse courte. L'utilisation de nanoparticules de ruthénium RuNP@PVP, décrites dans la première partie de cette thèse, nous a paru adaptée pour

atteindre notre objectif : elle a permis la deutération régiosélective (sur le C<sub>α</sub>) d'acides aminés et de peptides avec rétention totale de leur configuration.

Après avoir synthétisé le précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**, notre stratégie consiste à réaliser le double marquage en deux étapes : la première par échange Br/T avec Pd/C, la seconde par échange H/T avec RuNP@PVP.

L'essai de double marquage au deutérium à partir du précurseur bromé **102** montre que notre stratégie permet la double deutération régiosélective sur la position *mé*ta du cycle aromatique de Phe n°2, avec un enrichissement isotopique de 97 %, et sur le C<sub>α</sub> de Phe n°1, avec un enrichissement isotopique de 18 %. Les conditions choisies pour la deuxième étape d'échange H/D qui a lieu sous D<sub>2</sub> gaz, dans NaOH 0,01M, à 55 °C, pendant 2 heures, remplissent les conditions nécessaires à une réaction de tritiation.

Pourtant, l'essai de double marquage au tritium à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** ne permet pas d'obtenir le dipeptide ditritié [C<sub>α</sub>-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **100**. En effet, à l'issue de l'essai de double marquage au tritium, seule la position aromatique est bien marquée. Même si l'on obtient, en deuxième étape, du produit de réduction sur le cycle aromatique de Phe n°1, nous n'observons pas de marquage sur la position C<sub>α</sub>. Il se peut que les cinétiques d'échange et de réductions soient différentes selon les conditions de marquage (deutérium ou tritium).

Notre stratégie, qui donne le double marquage au deutérium souhaité, nécessite donc une mise au point plus approfondie pour le marquage au tritium du C<sub>α</sub> du dipeptide Phe-Phe. Des études complémentaires sont en cours dans notre laboratoire pour parvenir au marquage de cette position cruciale, afin d'obtenir de nouvelles distances inter-tritiums et déterminer la conformation du dipeptide Phe-Phe à l'état cristallin.

Enfin, même si le double marquage au tritium pour obtenir le dipeptide ditritié [C<sub>α</sub>-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **100** n'a pas été réalisé, nous avons quand même démontré qu'il est possible d'obtenir le dipeptide monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109a** par échange Br/T à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**. Cet intermédiaire représente une molécule intéressante car il devrait nous permettre d'avoir accès à des distances intermoléculaires supplémentaires et donc de pouvoir déduire le mode d'empilement de Phe-Phe dans le cristal.



**V. Le marquage au tritium de Phe-Phe  
cristallisé pour la détermination de  
distances intermoléculaires par RMN  $^3\text{H}$   
à l'état solide**



# V. Le marquage au tritium de Phe-Phe cristallisé pour la détermination de distances intermoléculaires par RMN $^3\text{H}$ à l'état solide

Pour déterminer la structure précise d'un auto-assemblage par RMN à l'état solide, il est nécessaire de réunir un ensemble de distances intra- et inter-moléculaires. Dans le cas du dipeptide Phe-Phe, nous avons réussi à réaliser la synthèse de trois Phe-Phe di-tritiés sur des positions aromatiques précises et à mesurer trois distances interatomiques intramoléculaires par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide (cf. II. et III.). D'autres distances intramoléculaires sont encore à déterminer (cf. IV.) et des études sont toujours en cours au laboratoire pour déterminer la conformation de Phe-Phe cristallisé.

Dans la dernière partie de cette thèse nous avons décidé de nous intéresser à la mesure de distances intermoléculaires afin d'étudier l'empilement des molécules de Phe-Phe au sein de la maille cristalline décrite par l'équipe de Görbitz. Pour parvenir à la mesure de distances intermoléculaires, nous devons procéder au marquage de dipeptides de Phe-Phe mono-tritiés afin d'être sûrs que les distances mesurées par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide correspondent bien à des positions situées sur deux molécules de Phe-Phe distinctes.

Or, nous avons démontré précédemment que la synthèse d'un tel Phe-Phe mono-tritié était possible (cf. IV. C.). En effet, nous avons obtenu le dipeptide monotritié Phe-[ $3\text{-}^3\text{H}$ ]Phe **109a** par échange Br/T, à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** en utilisant du palladium sur charbon et du  $\text{T}_2$  gaz. Ce dipeptide monotritié constituerait un bon moyen d'explorer les potentialités de la RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide pour la mesure de distances intermoléculaires et la détermination de la conformation d'une petite molécule au sein d'un auto-assemblage.

# V. A. Synthèse de Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe

## 109b

La synthèse du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** a déjà été décrite précédemment (cf. IV. A). Le marquage au tritium pour l'obtention du dipeptide monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109c** est rappelé dans la Figure 156.

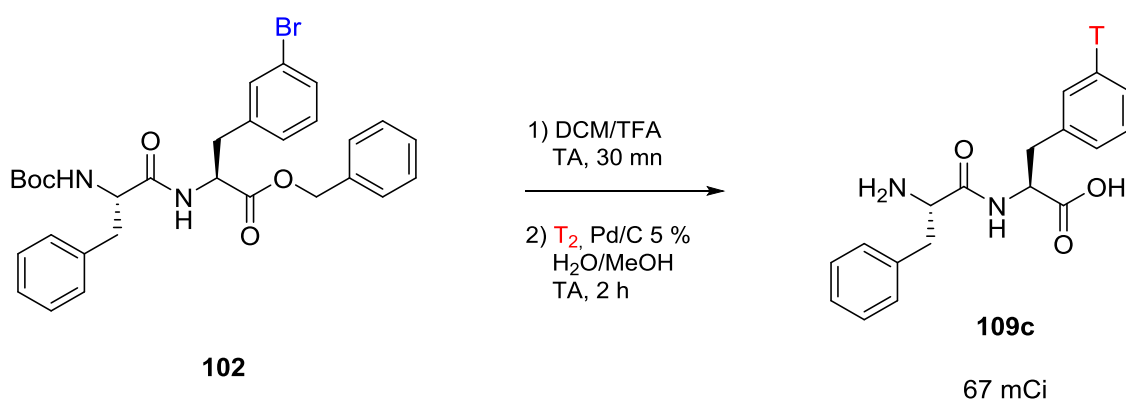


Figure 156 : Marquage au tritium du précurseur Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102** par échange Br/T utilisant Pd/C 5 % et T<sub>2</sub> gaz.

Après déprotection du groupement Boc du précurseur **102** puis débromation catalytique, en présence de T<sub>2</sub> gaz et de palladium sur charbon, provoquant également l'hydrogénolyse de l'ester benzylique, nous obtenons le dipeptide monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109c** (67 mCi).

Les cristaux du dipeptide Phe-Phe monotritié **109c** dilué dans un échantillon de Phe-Phe non-marqué (11 mg, 15 mCi, dilution 1,4 mCi/mg) ont été préparés et placés dans le rotor. Les analyses par RMN <sup>3</sup>H à l'état solide sont en cours pour mesurer des distances intermoléculaires.

## V. Conclusions

Le but de la dernière partie de cette thèse était de synthétiser le dipeptide monotritié Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109b**, par échange Br/T, à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**. Nous avons bien obtenu le Phe-Phe souhaité. L'analyse RMN <sup>3</sup>H à l'état solide est en cours pour parvenir à la mesure de distances intermoléculaires afin d'étudier l'empilement des molécules de Phe-Phe au sein de la maille cristalline.

## **Conclusions et perspectives**



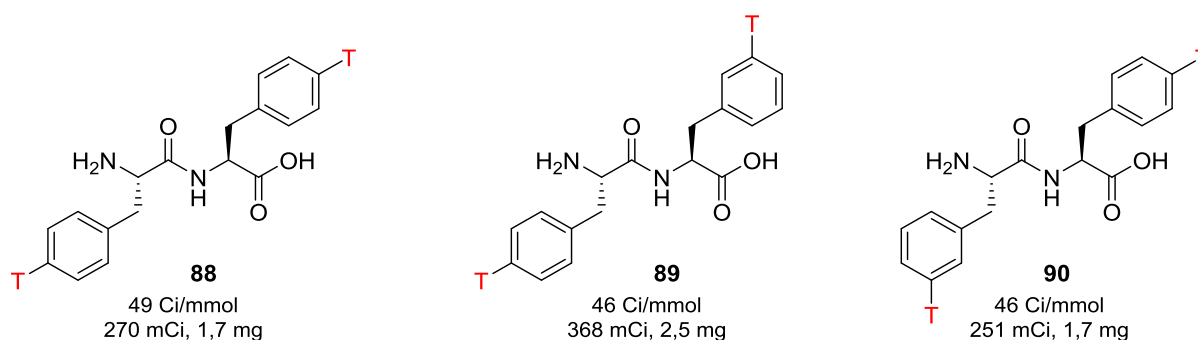


# Conclusions

L'ambition de notre équipe est développer une nouvelle méthode visant à déterminer la conformation et l'arrangement relatif de petites molécules auto-assemblées qui repose sur la synergie entre chimie de marquage, RMN du tritium à l'état solide et modélisation moléculaire. Pour cela, nous avons choisi une petite molécule modèle, le dipeptide Phe-Phe qui forme, selon le solvant utilisé, soit des cristaux soit des nanotubes auto-assemblés. Durant ces travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur la structure atomique cristalline de Phe-Phe. En effet, comme celle-ci a déjà été résolue, elle nous sert de structure de référence.

Le premier objectif de la thèse consistait à synthétiser des dipeptides Phe-Phe ditritiés sur des positions aromatiques stratégiques, définies à l'aide de la modélisation moléculaire, afin de mesurer par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide des distances intramoléculaires.

- La réaction d'échange Br/T sur des précurseurs dibromés appropriés nous a permis d'obtenir trois dipeptides Phe-Phe ditritiés.



- Après avoir procédé à la cristallisation de ces composés dilués avec du dipeptide Phe-Phe non-marqué, nous avons pu mesurer, par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide trois distances intramoléculaires très proches des distances de référence.

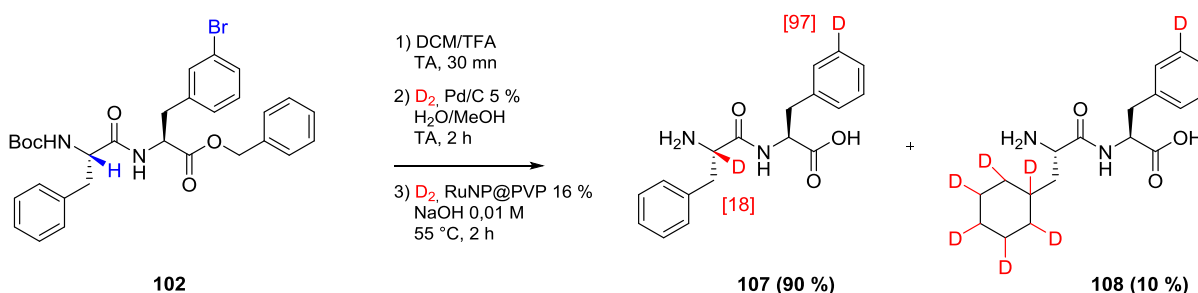
Composé	[4- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe 88	[4- $^3\text{H}$ ]Phe-[3- $^3\text{H}$ ]Phe 89
Distances de référence (Å)	7,6	5,8 et 8,3
Distances mesurées (Å)	7,4 ± 0,02	5,83 et 8,2

- Dans le cas de la molécule [3- $^3\text{H}$ ]Phe-[4- $^3\text{H}$ ]Phe **90**, le spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide n'a pas permis de mesurer de distance intramoléculaire. Il est possible que le

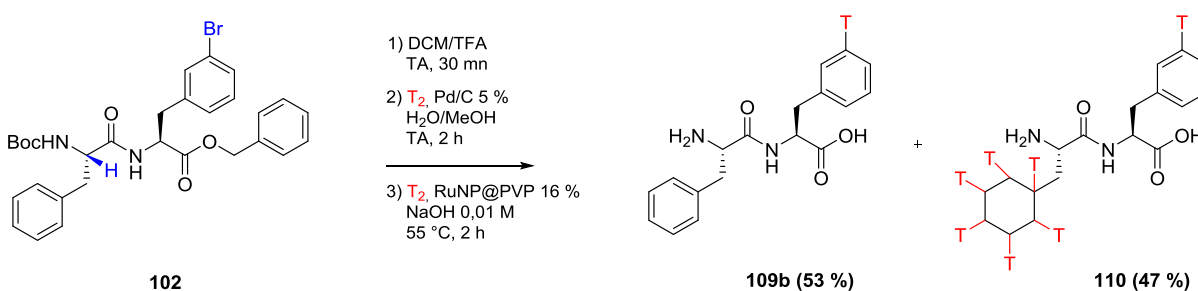
marquage en position *mé*ta du cycle aromatique de [3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90** permette d'observer le désordre d'orientation de ce cycle aromatique, même en phase cristalline.

Le second objectif de ce travail de recherche était de synthétiser un quatrième dipeptide Phe-Phe ditritié sur deux positions de la molécule très différentes : l'une sur un cycle aromatique et l'autre sur le C<sub>α</sub> du squelette peptidique, afin d'avoir accès à de nouvelles distances intramoléculaires.

- L'essai préliminaire de double marquage au deutérium en deux étapes, par échange Br/D utilisant Pd/C puis échange H/D en présence de RuNP@PVP, à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**, permet de réaliser la double deutération régiosélective en position *mé*ta du cycle aromatique de Phe n°2, avec un enrichissement isotopique de 97 %, et sur le C<sub>α</sub> de Phe n°1, avec un enrichissement isotopique de 18 %.



- Malheureusement, les conditions mises au point pour le marquage au deutérium n'ont pas permis de réaliser le marquage au tritium souhaité. La première étape de tritiation par échange Br/T permet bien d'obtenir l'intermédiaire monotritié souhaité. Par contre, la deuxième étape de tritiation par échange H/T ne permet pas de réaliser le marquage sur le C<sub>α</sub>. Notre stratégie, qui donne le double marquage au deutérium souhaité, nécessite de nouveaux essais pour le marquage au tritium du C<sub>α</sub> du dipeptide Phe-Phe. Des études complémentaires sont en cours dans notre laboratoire pour parvenir au marquage de cette position cruciale mais difficile.



Nous avons quand même démontré qu'il est possible d'obtenir le dipeptide monotrilité Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **109b** par échange Br/T à partir du précurseur bromé Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**. Cet intermédiaire représente une molécule intéressante car il nous permettrait d'avoir accès à des distances intermoléculaires et donc au mode d'empilement de Phe-Phe dans le cristal. Les analyses par RMN <sup>3</sup>H à l'état solide de cet intermédiaire sont en cours pour mesurer des distances intermoléculaires.



# Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisagées pour la suite de ces travaux :

- Nous avons démontré que la mesure de distances intramoléculaires dans une molécule modèle (le dipeptide Phe-Phe cristallisé) pouvait être réalisée par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide. Trois distances intramoléculaires très proches des distances de référence ont été obtenues, mais nous manquons encore de distances pour déterminer le positionnement relatif des chaînes latérales. D'autres synthèses de Phe-Phe ditritiés sur les cycles aromatiques des chaînes latérales pourraient apporter des mesures de distance supplémentaires.
- Dans le cas de la molécule  $[3\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}\text{-}[4\text{-}^3\text{H}]\text{Phe}$  **90**, le spectre RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide ne permet pas de mesurer de distance intramoléculaire. Il serait intéressant d'approfondir l'étude par RMN  $^3\text{H}$  à l'état solide de cette molécule marquée car elle permettrait de mettre en évidence un désordre d'orientation du cycle aromatique de la chaîne latérale de Phe n°1, même en phase cristalline.
- Notre stratégie de double marquage, utilisant RuNP@PVP en deuxième étape, n'a pas permis d'obtenir de marquage au tritium du  $\text{C}_\alpha$ . Des travaux sont en cours pour améliorer les conditions de réaction. Ce marquage au tritium sur le  $\text{C}_\alpha$  serait très intéressant puisqu'il nous fournirait des informations précieuses sur le positionnement des chaînes latérales par rapport au squelette peptidique.
- Une autre stratégie de marquage nous semble intéressante. Il s'agit du double marquage  $^{13}\text{C}/^3\text{H}$  qui nous conduirait à la mesure de nouvelles distances jusqu'alors inatteignables.
- Enfin, l'étude approfondie, par cristallographie aux rayons X avec l'aide du Dr. Pierre Thuéry (CEA Saclay) et par microscopie des cristaux et des nanotubes de Phe-Phe, par notre laboratoire, nous permettrait de recueillir d'autres informations utiles sur le dipeptide Phe-Phe.



**PARTIE EXPÉRIMENTALE**  
**PARTIE 1 : DÉVELOPPEMENT**  
**D'UNE NOUVELLE**  
**MÉTHODOLOGIE DE**  
**DEUTÉRATION PAR ÉCHANGE**  
**H/D CATALYSÉE PAR DES**  
**NANOPARTICULES DE**  
**RUTHÉNIUM**





## Reagents and general procedures

RuNp@PVP nanoparticles were synthesized as described elsewhere<sup>168</sup> and stored in a glove box under an argon atmosphere ( $O_2 < 0.1$  ppm). All operations relating to nanoparticles synthesis or catalysis were carried out in a Fischer-Porter glassware or in a glove-box under argon.

If not indicated, all substrates purchased from Aldrich and Bachem were used without further purification. When Paroxetine hydrochloride hemihydrate, Papaverine hydrochloride, Dextromethorphan hydrobromide and Protriptyline hydrochloride have been received as ammonium salts they were solubilized in water and free bases were precipitated by addition of  $Na_2CO_3$  and extracted with ethyl acetate. When L-Tyrosine tert-butyl ether tert-butyl ester hydrochloride, L-Phenylalanine benzyl ester hydrochloride, L-Tryptophane benzyl ester hydrochloride, His-Phe peptide amide hydrochloride and Tuftsin acetate have been received as ammonium salts they were solubilized in the minimum of methanol with 2 mL of DCM and free bases were obtained after filtration over Amberlyst A-21 ion-exchange resin.

THF was dried over sodium and benzophenone, distilled and then thoroughly degassed before use.  $D_2O$  and anhydrous DMF were commercially available.

$^1H$  NMR (400 MHz),  $^{13}C$  NMR (100 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvent peaks and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Direct liquid introduction electrospray mass spectra were recorded using an ESI/ZQ Waters Mass Spectrometer. For compounds **48** to **72** HPLC chromatograms were recorded using Astec Chirobiotic T chiral column (25 cm  $\times$  4.6 mm), the mobile phase consists of water and methanol with 2 % formic acid, flow rate 1.0 ml.min<sup>-1</sup> at 25 °C, ZQ and ELS detections.

### Deuterium incorporation quantification:

Deuterium incorporation was quantified by mass spectrometry and by the decrease of  $^1H$  NMR integral intensities at the specified positions compared to the starting material. Integral intensities were calibrated against hydrogen signals that do not undergo H/D-exchange. Mass

---

<sup>168</sup> C. Pan, K. Pelzer, K. Philippot, B. Chaudret, F. Dassenoy, P. Lecante, M.-J. Casanove, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7584-7593.

spectrometry quantification was performed by subtraction of the mean molecular masses of the product and substrate isotopologue clusters in order to eliminate the contribution of the natural isotope abundance to the total mass.

**General procedures for H/D exchanges:**

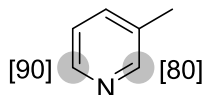
A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.15 mmol) in the solvent was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at room temperature or 55°C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated.

Procedure	Charge of RuNP@PVP	Solvent	Temperature	Pressure of D <sub>2</sub>	Treatment
A	8 mg, 3%	THF (1 mL)	RT	1 bar	Filtration on a small neutral alumina pad (Pasteur pipette, solvent of elution: THF, 10 mL).
B	8 mg, 3%	THF (1 mL)	55°C	1 bar	Filtration on a small neutral alumina pad (Pasteur pipette, solvent of elution: THF, 10 mL).
C	8 mg, 3%	THF (1-2 mL)	55°C	2 bar	Filtration on a small neutral alumina pad (Pasteur pipette, solvent of elution: THF, 10 mL).
D	8 mg, 3%	D <sub>2</sub> O (2 mL)	55°C	2 bar	Treatment with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H <sub>2</sub> O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL).
E	24 mg, 9%	DMF (2 mL)	55°C	2 bar	Treatment with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H <sub>2</sub> O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL).

**Table S1:** Procedures for H/D exchanges.

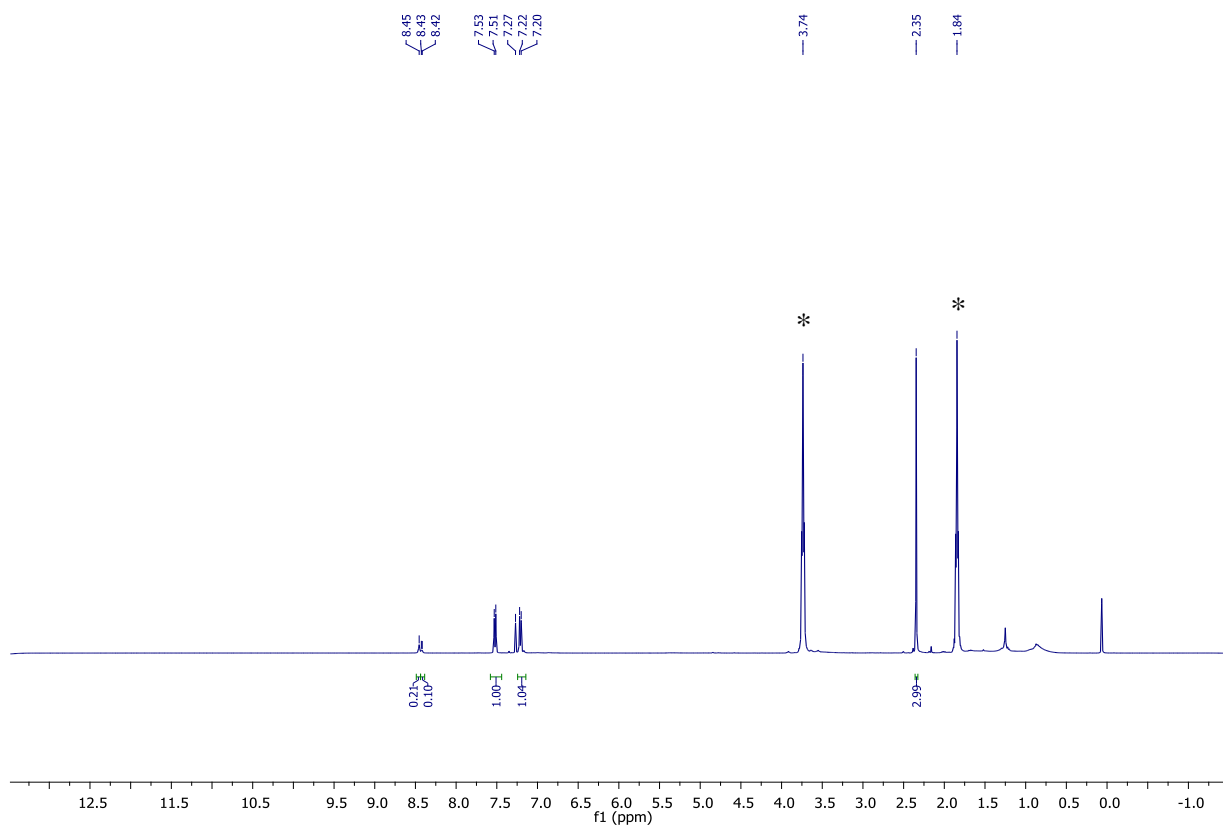
## Experimental details and characterization for compounds 24 to 37:

### 3-picoline 24 (procedure A):



After the filtration, THF was gently evaporated under reduced pressure and then a  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the residue was recorded.

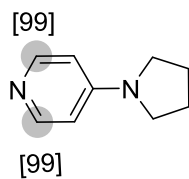
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.45 (s, 0.2H), 8.42 (d,  $J = 4.3$  Hz, 0.1H), 7.52 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 2.35 (s, 3H)



$^1\text{H}$  NMR spectrum of 24

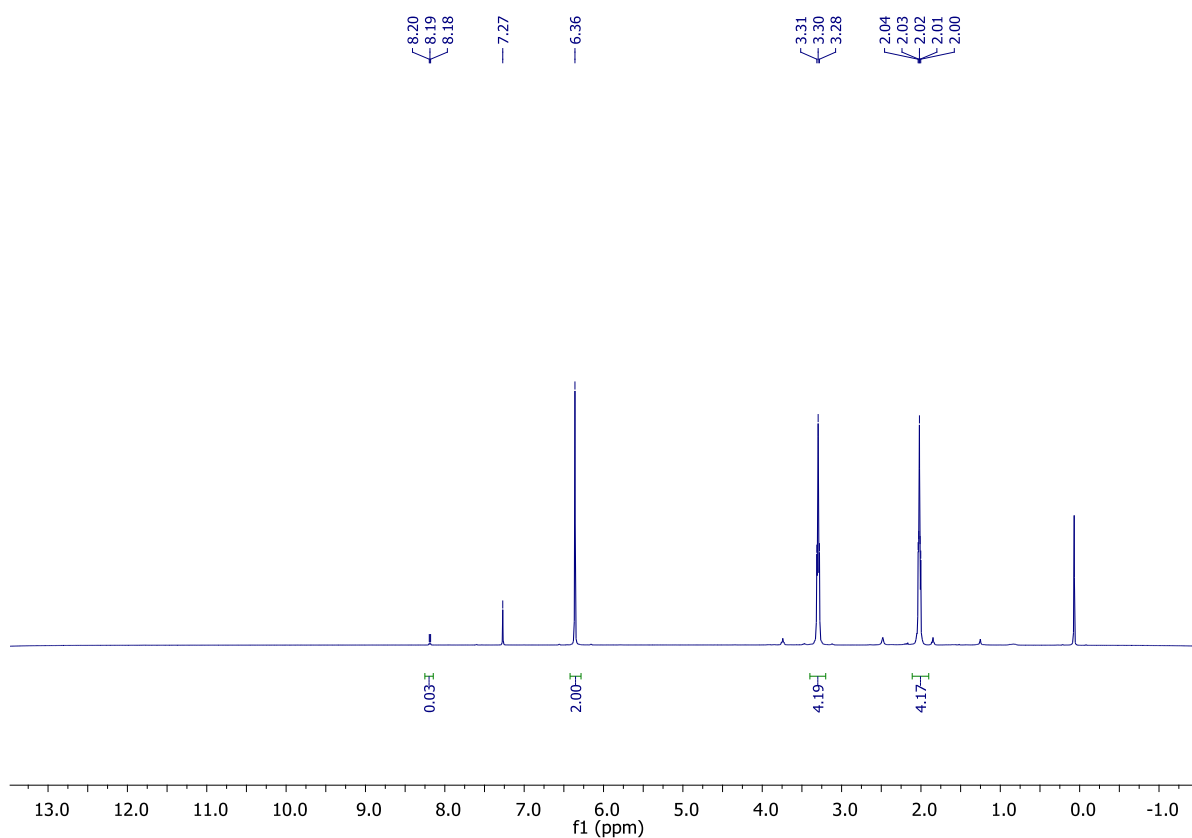
\*Due to the low boiling point of 3-picoline (144 °C) the sample was not put to high vacuum: this explains the presence of residual THF.

#### 4-pyrrolidinopyridine **25** (procedure B):



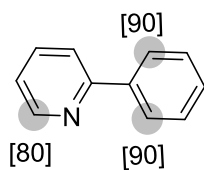
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the solvent was evaporated in vacuo to give a yellow oil (18 mg; 81% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.23 – 8.14 (m, 0.02H), 6.36 (s, 2H), 3.30 (t,  $J = 6.6$  Hz, 4H), 2.13 – 1.95 (m, 4H)



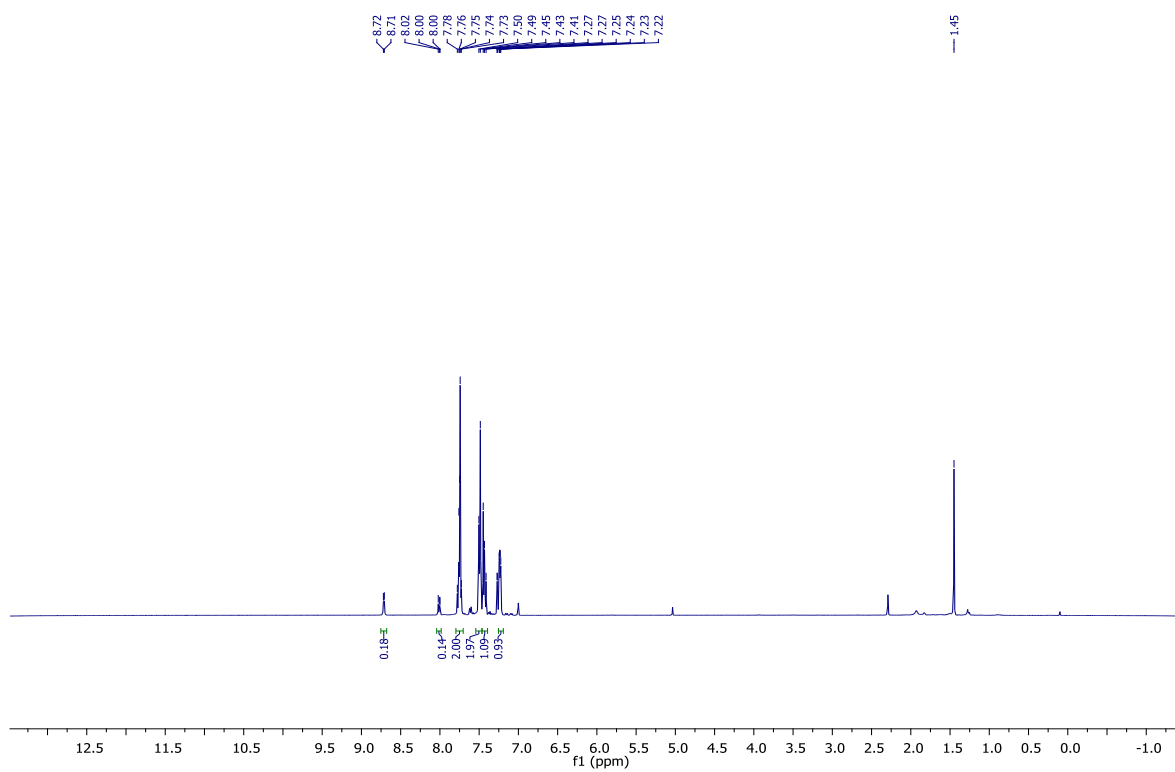
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **25**

## 2-phenylpyridine **26** (procedure B):



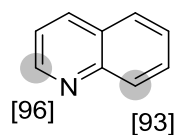
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a brown oil (20 mg; 84% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.71 (d,  $J = 4.7$  Hz, 0.18H), 8.10 – 7.96 (m, 0.14H), 7.86 – 7.69 (m, 2H), 7.49 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.47 – 7.39 (m, 1H), 7.24 (m, 1H)



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **26**

## Quinoline 27 (procedure A):



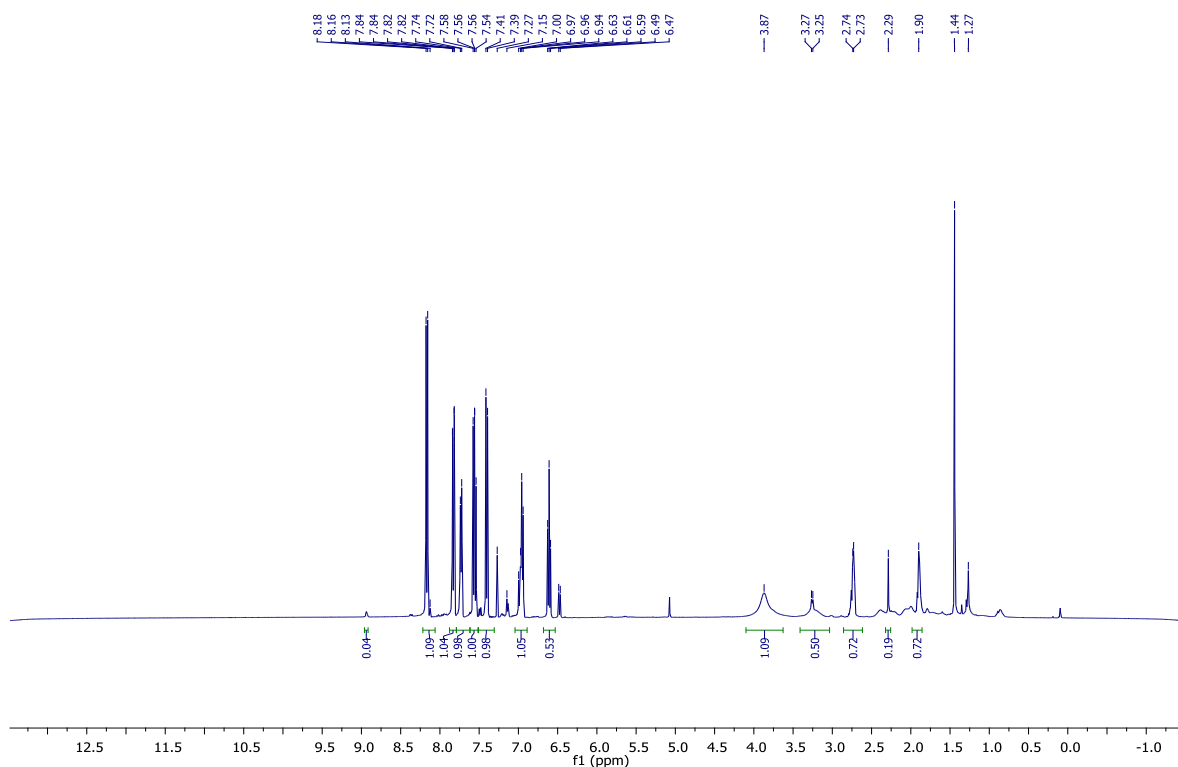
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a dark oil containing the desired deuterated quinoline along with reduction products. Quinoline **27** has been isolated by preparative TLC (eluent CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

For quinoline **27**:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.93 (dd, *J* = 4.1, 1.5 Hz, 0.04H), 8.17 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 0.07H), 7.83 (dd, *J* = 8.2, 1.2 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 8.0, 7.1 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H)

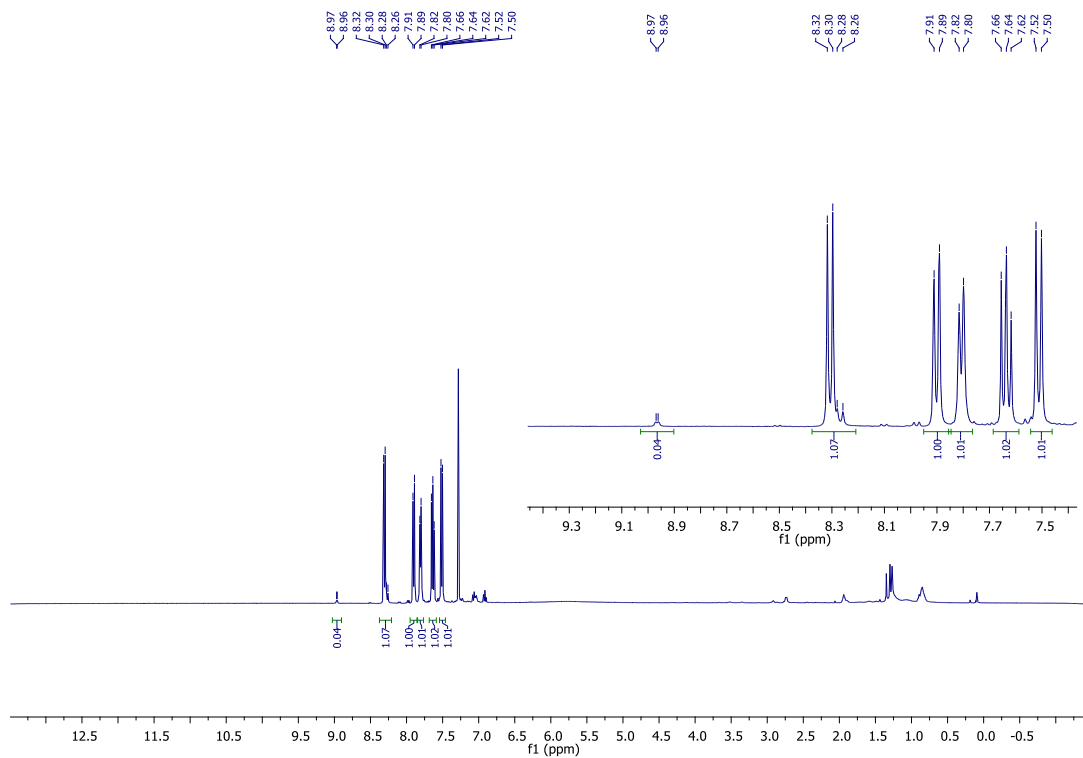
Tetrahydroquinoline **27'**:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.02 – 6.93 (m, 2H), 6.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 0.2H), 3.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 0.14H), 2.76 (s, 1H), 1.93 (s, 1H)

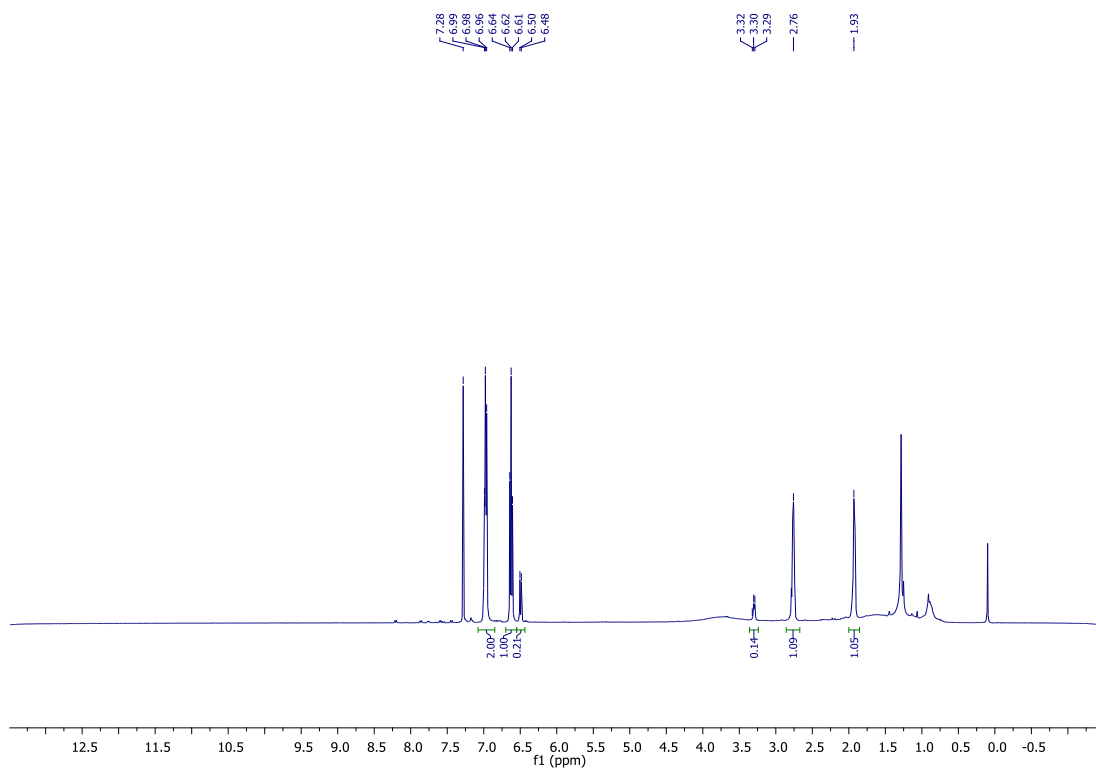


<sup>1</sup>H NMR spectrum of crude mixture



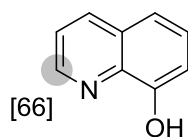


$^1\text{H}$  NMR spectrum of **27**



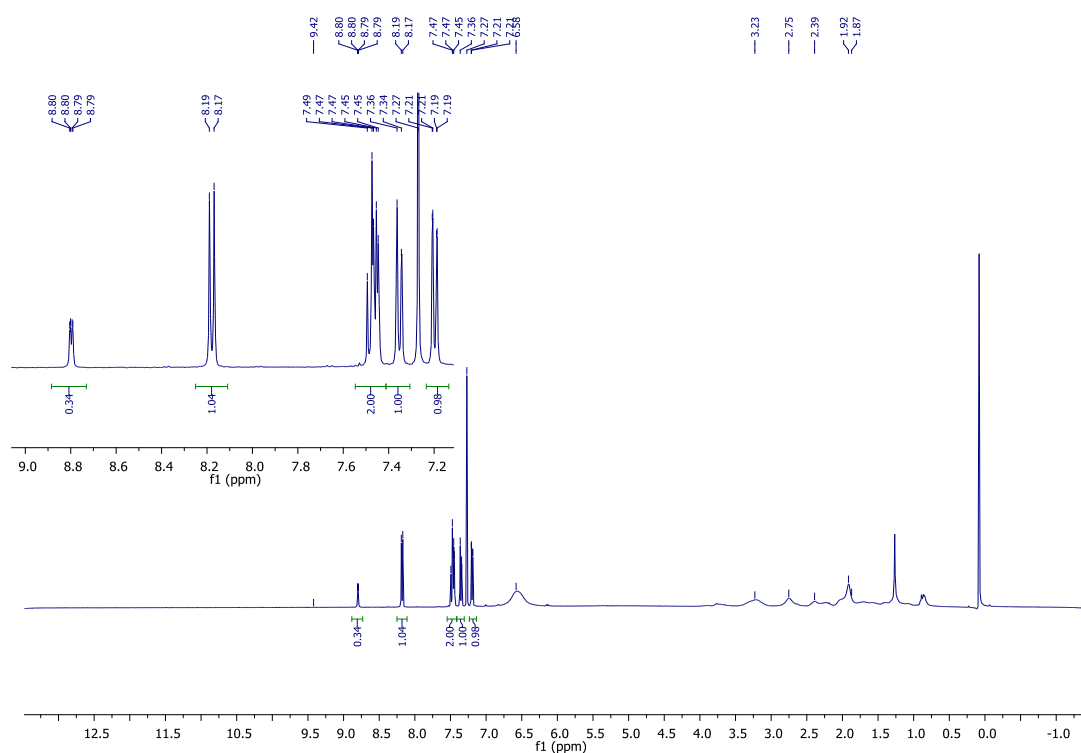
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **27'**

## 8-hydroxyquinoline 28 (procedure A):



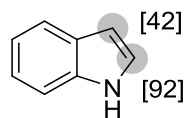
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a black oil containing the desired deuterated 8-hydroxyquinoline along with reduction products.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.80 (dd, *J* = 4.2, 1.4 Hz, 0.34H), 8.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.54 – 7.42 (m, 2H), 7.35 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (dd, *J* = 7.6, 0.9 Hz, 1H)



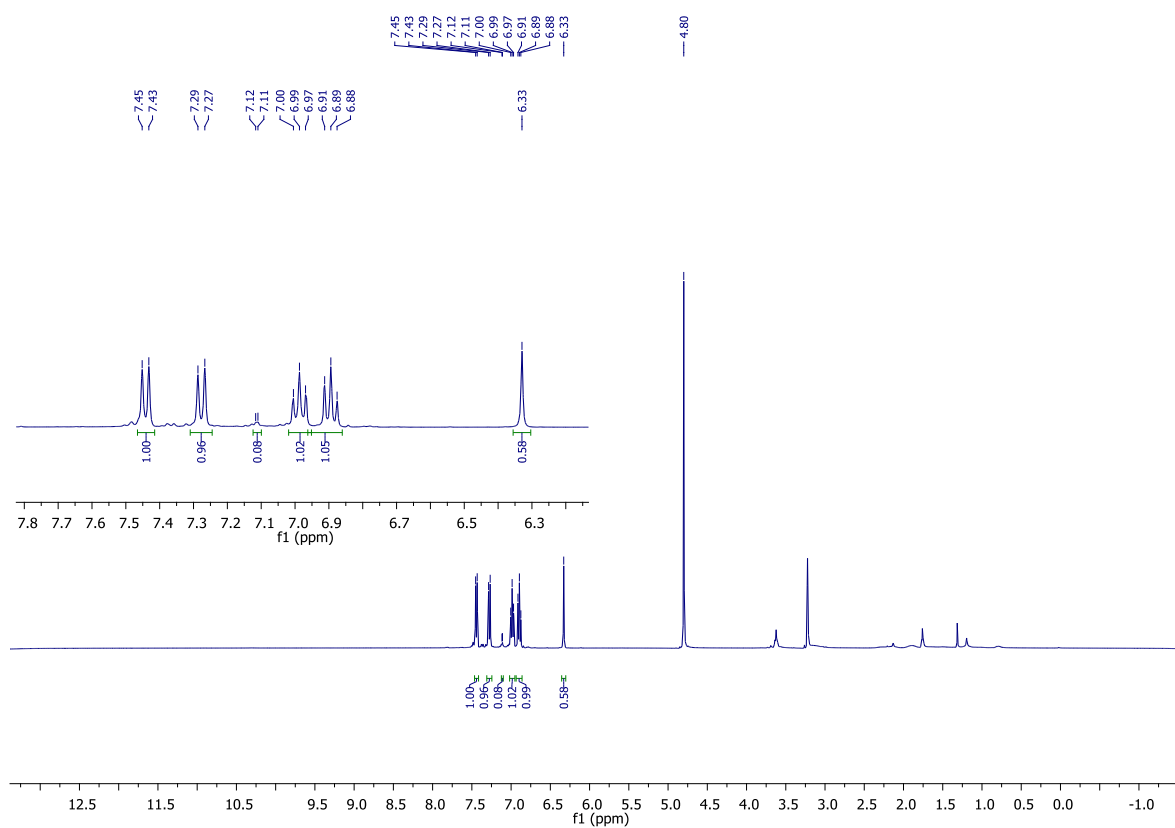
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **28**

## Indole 29 (procedure B):



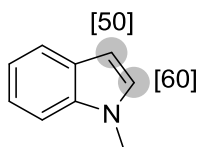
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a brown solid (13 mg; 77% yield).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)**  $\delta$  7.44 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.11 (m, 0.08H), 6.99 (t,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 6.89 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 6.33 (s, 0.58H)



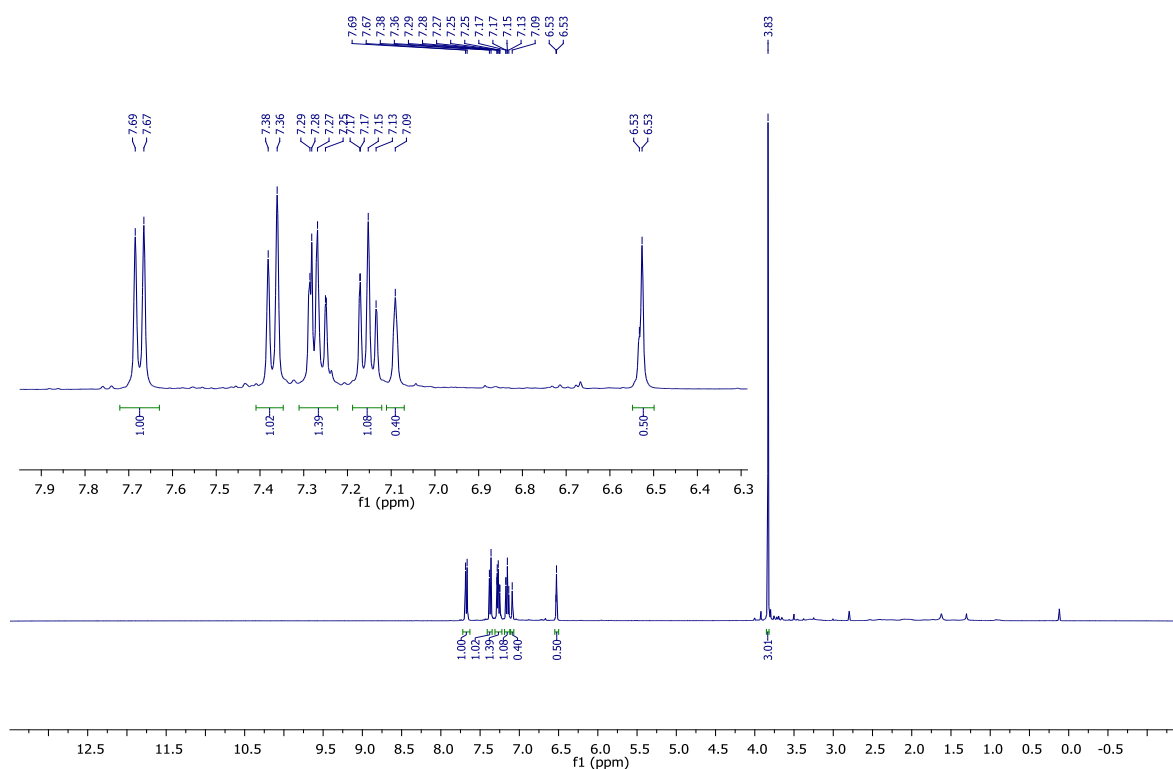
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **29**

***N*-methylindole 30 (procedure B):**



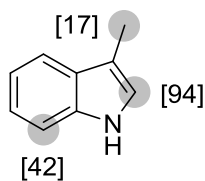
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a brown oil (16 mg; 83% yield).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.68 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 7.37 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.30 – 7.23 (m, 1H), 7.16 (dd,  $J = 11.0, 3.8$  Hz, 1H), 7.09 (s, 0.4H), 6.53 (s, 0.5H), 3.83 (s, 3H)



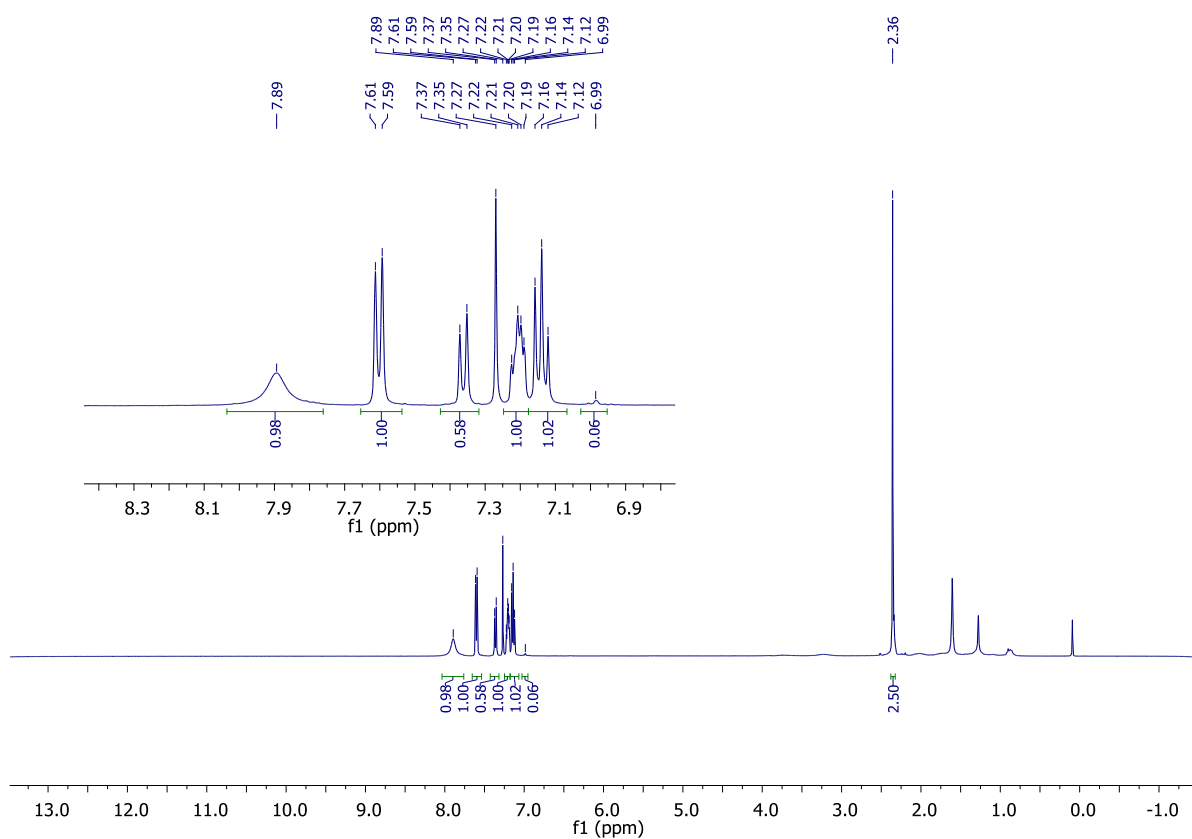
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **30**

### Skatol 31 (procedure C):



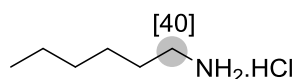
After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a white solid (16 mg; 80% yield).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.89 (s<sub>br</sub>, 1H), 7.60 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.0$  Hz, 0.58H), 7.21 (dd,  $J = 9.1, 5.4$  Hz, 1H), 7.15 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 6.99 (s, 0.06H), 2.36 (s, 2.50H)



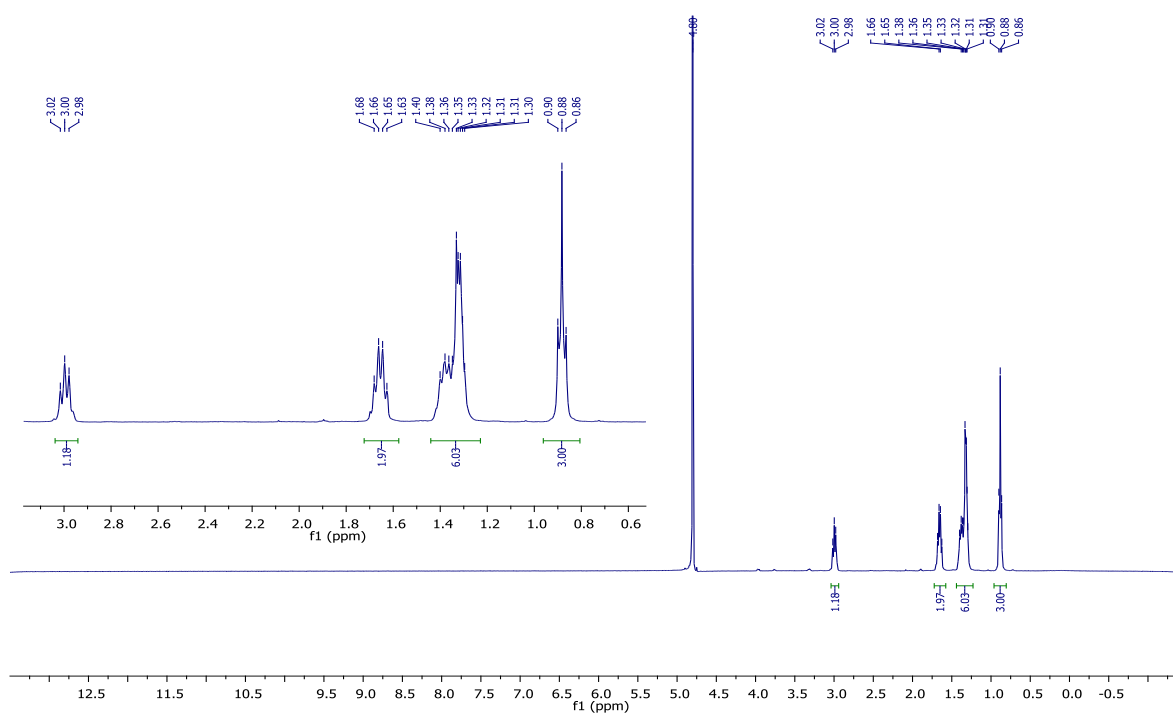
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **31**

## Hexylamine 32 (procedure B):



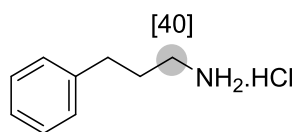
After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a brown oil. Water (2 ml) was added and the resulting suspension was filtrated with a syringe filter. The filtrate was evaporated to dryness to give a white paste (5 mg; 25% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.06 – 2.90 (m, 1.2H), 1.65 (m, 2H), 1.34 (m, 6H), 0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H)



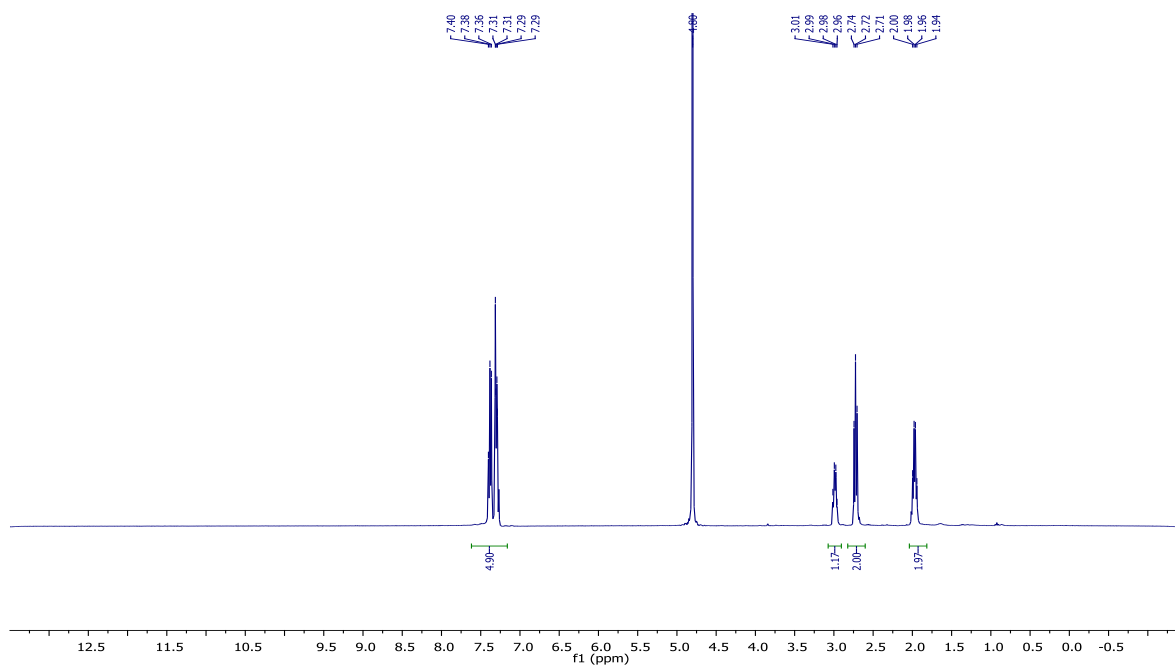
$^1\text{H NMR}$  spectrum of 32

### 3-Phenyl-1-propylamine 33 (procedure B):



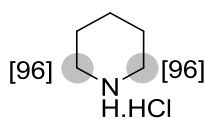
After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a brown oil. Water (2 ml) was added and the resulting suspension was filtrated with a syringe filter. The filtrate was evaporated to dryness to give a white solid (9 mg; 34% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.50 – 7.15 (m, 5H), 2.99 (m, 1.2H), 2.72 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 1.97 (m, 2H)



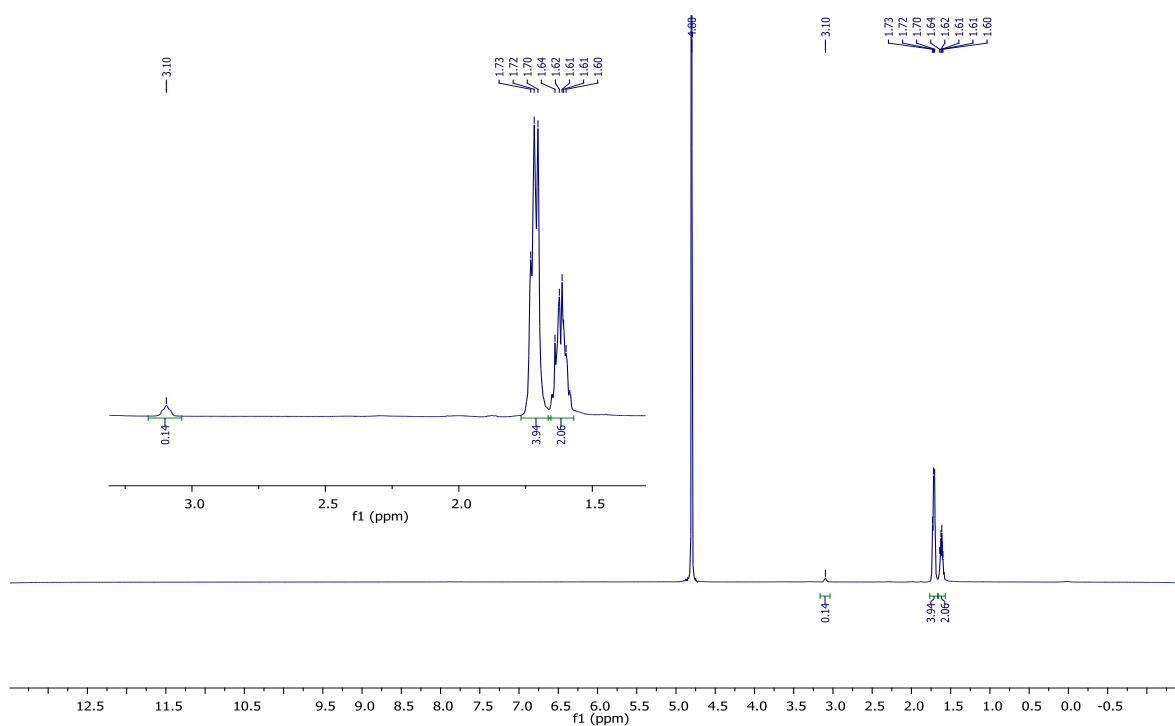
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **33**

### Piperidine 34 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (16 mg; 88% yield).

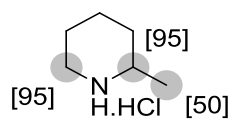
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.10 (m, 0.1H), 1.79 – 1.67 (m, 4H), 1.68 – 1.55 (m, 2H)



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **34**

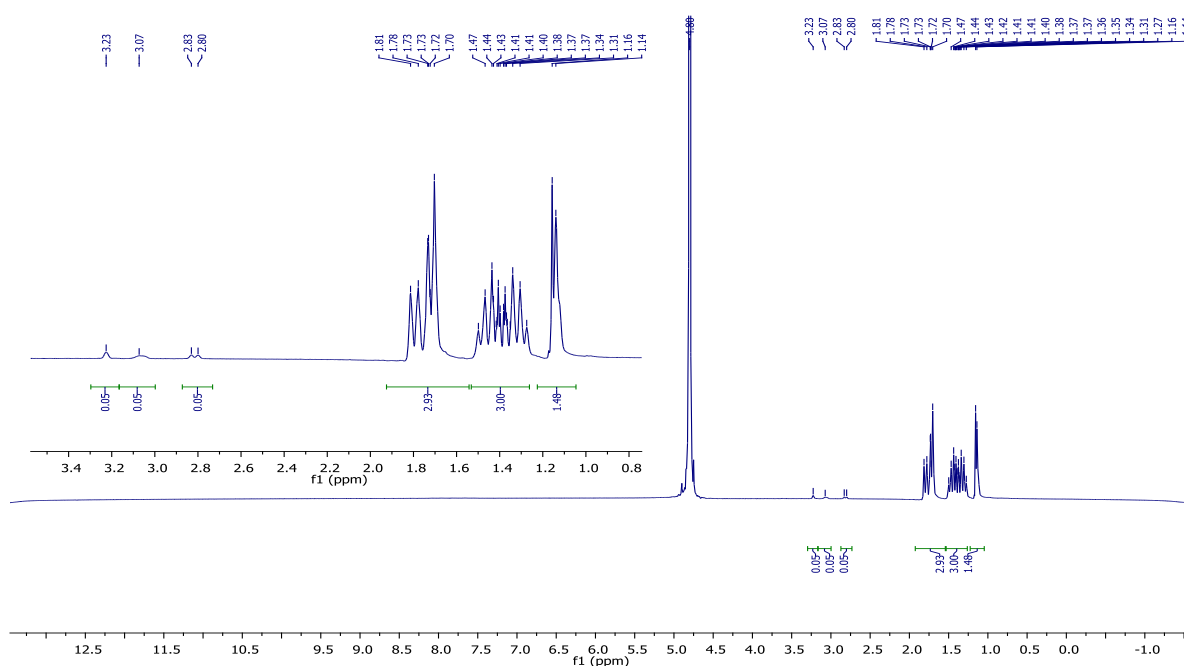


## 2-methylpiperidine 35 (procedure C):



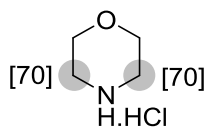
After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (18 mg; 90% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.23 (m, 0.05H), 3.07 (m, 0.05H), 2.81 (d,  $J = 12.3$  Hz, 0.05H), 1.86 – 1.62 (m, 3H), 1.60 – 1.23 (m, 3H), 1.15 (2s, 1.5H).



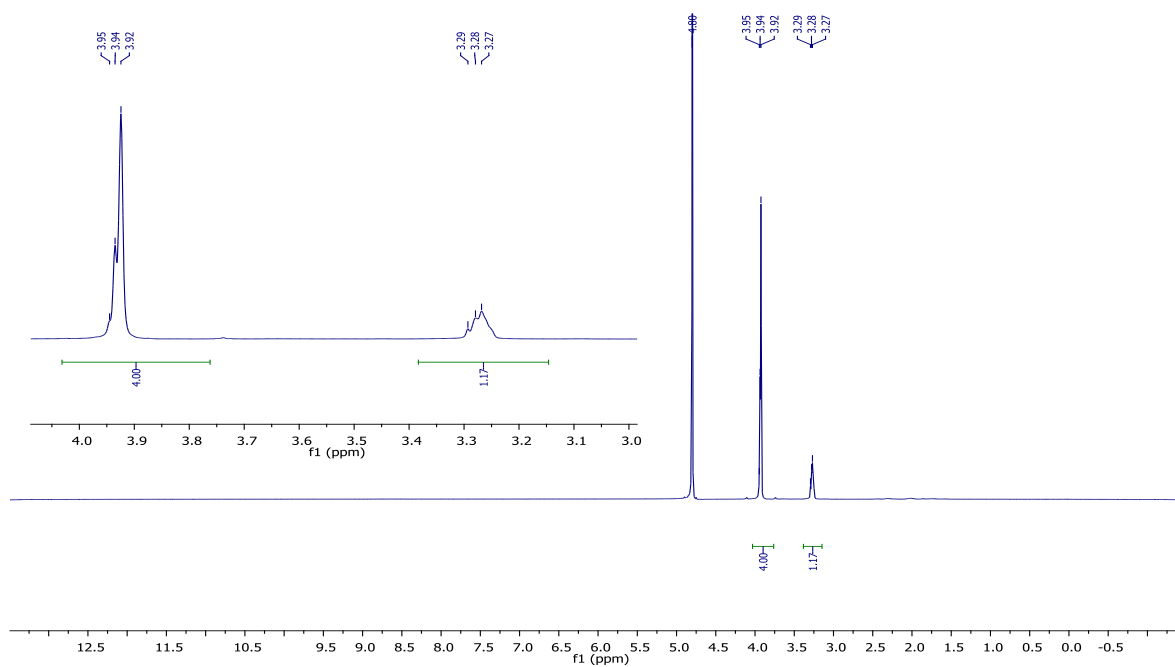
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **35**

### Morpholine 36 (procedure C):



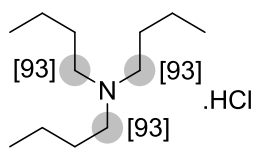
After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (17 mg; 93% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.96 – 3.80 (m, 4H), 3.34 – 3.22 (m, 1.2H)



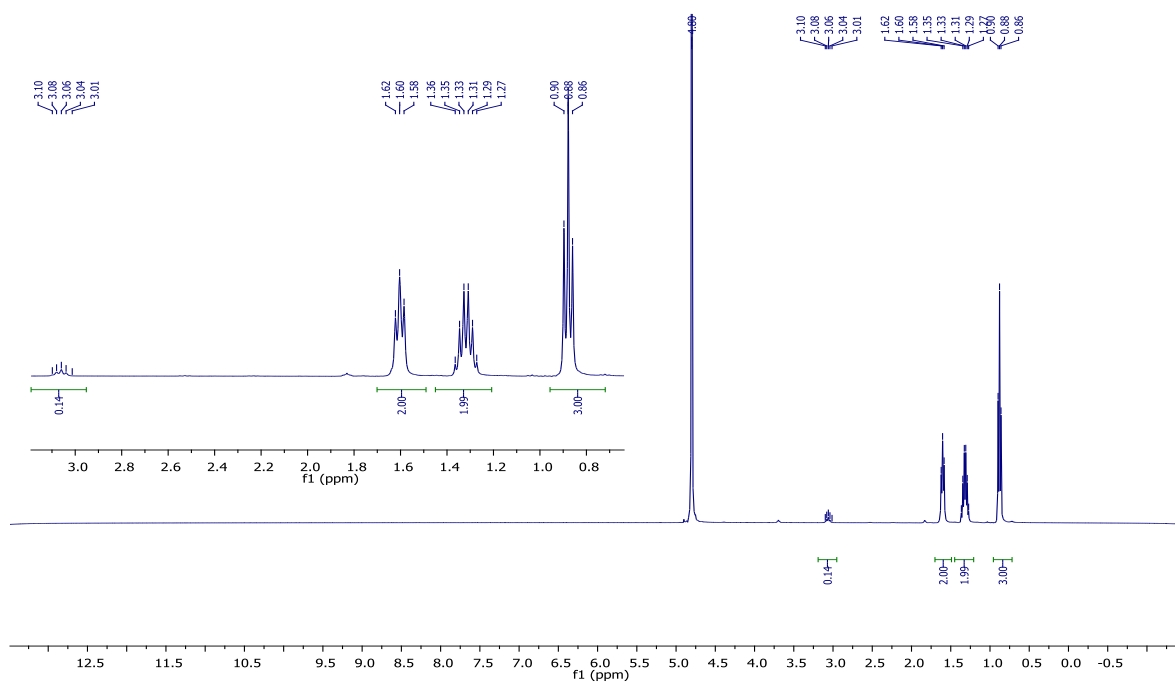
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **36**

### Tributylamine 37 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (1M; 1 mL) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 5 minutes at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (23 mg; 70 % yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.14 – 2.95 (m, 0.14H), 1.60 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.40 – 1.24 (m, 2H), 0.88 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H)



$^1\text{H NMR}$  spectrum of 37

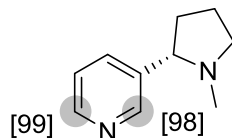
**Data of mass analysis for compounds 25 to 37**

<b>Compound</b>	$M_0$	$M_{+1}$	$M_{+2}$	$M_{+3}$	$M_{+4}$	$M_{+5}$	$M_{+6}$	$M_{+7}$
<b>25</b>	1.8	3.2	<b>93.3</b>	1.8				
<b>26</b>	0.1	3.7	24.2	<b>48.8</b>	19.4	4.5		
<b>27</b>	0.9	6.9	<b>89.8</b>	2.4				
<b>28</b>	27.6	<b>58.5</b>	6.4	6.3	1.2			
<b>29</b>	2.9	<b>44.6</b>	36.1	9.9	1.5	5.0		
<b>30</b>	17.2	<b>48.8</b>	33.3	0.7				
<b>31</b>	4.5	31.0	<b>35.6</b>	13.5	9.4	5.0		
<b>32</b>	<b>44.6</b>	43.8	11.6					
<b>33</b>	36.3	<b>45.9</b>	17.2					
<b>34</b>	7.3	3.8	2.0	13.3	<b>72.4</b>	1.2		
<b>35</b>	3.4	1.0	3.1	19.0	<b>34.1</b>	27.2	11.8	0.4
<b>36</b>	2.6	9.6	27.5	<b>32.5</b>	27.6	0.3		
<b>37</b>	0.1	0.4	1.0	2.4	4.8	17.0	<b>73.4</b>	0.8

**Table S2:** Relative amount in percent of the non-deuterated ( $M_0$ ) and deuterated ( $M_{(0+x)}$ ) isotopologues for compounds **25** to **37**.

## Experimental details and characterization for compounds 38 to 45:

### (S)-nicotine 38 (procedure C):

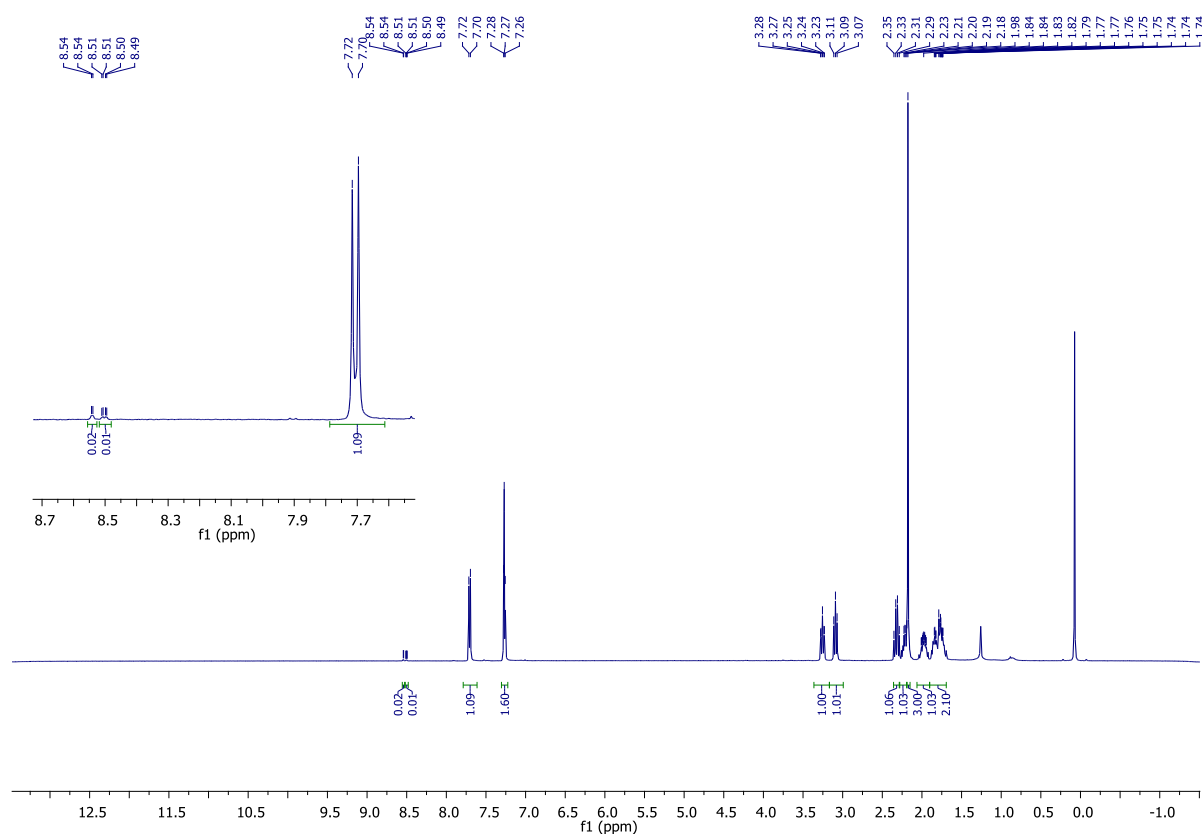


After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a yellow oil (22 mg; 88% yield).

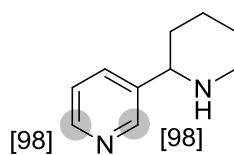
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.56 – 8.54 (m, 0.02H), 8.52-8.48 (dd, 0.01H), 7.71 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 3.34 – 3.19 (m, 1H), 3.09 (t,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 2.32 (m, 1H), 2.28 – 2.19 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.09 – 1.90 (m, 1H), 1.91 – 1.61 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138.2, 134.9, 123.5, 68.9, 56.9, 40.2, 35.0, 22.5

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -176.5$  ( $c = 0.5$ ,  $\text{CHCl}_3$ )



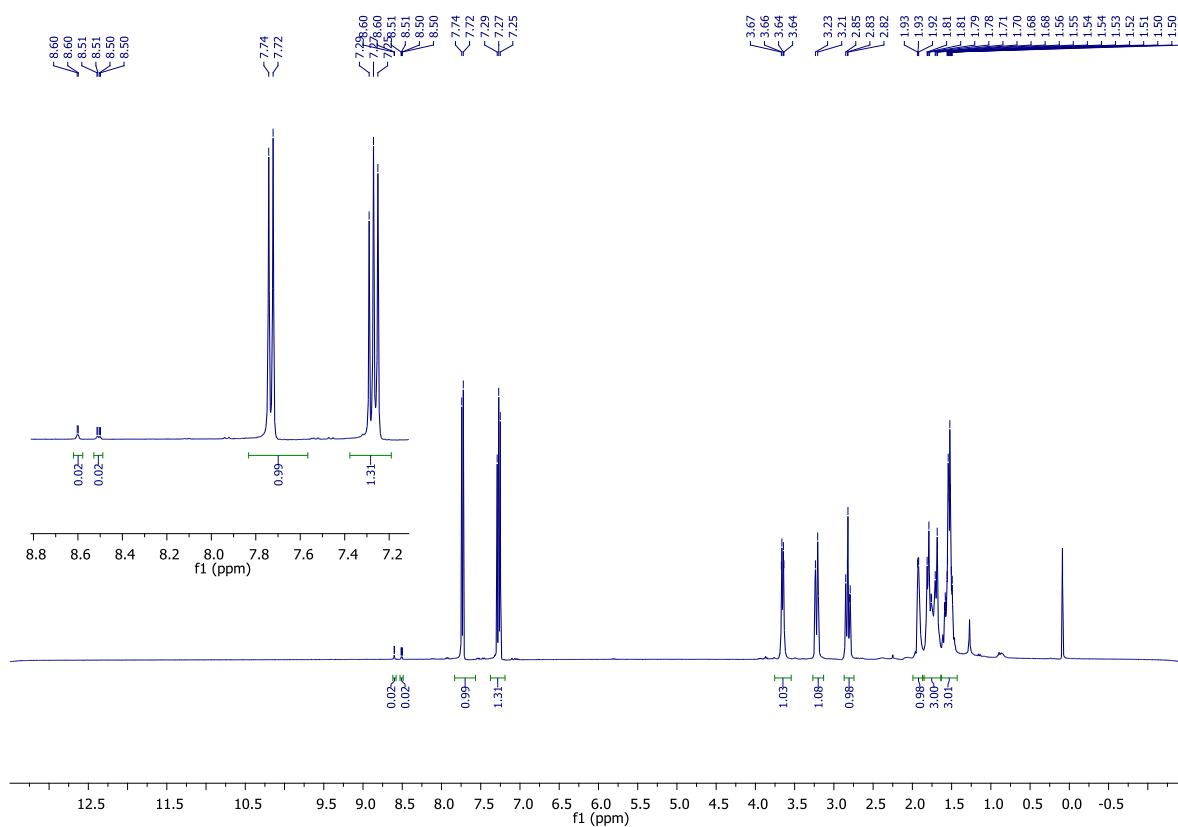
### Anabasine 39 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a yellow oil (21 mg; 87% yield).

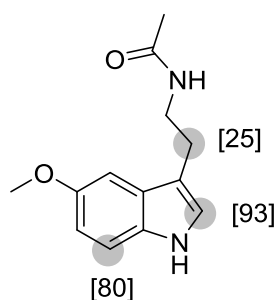
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.60 (m, 0.02H), 8.51 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 0.02H), 7.73 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.7 – 3.6 (m, 1H), 3.22 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H), 2.99 – 2.71 (m, 1H), 1.97 – 1.87 (m, 1H), 1.86 – 1.63 (m, 3H), 1.62 – 1.40 (m, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 140.5, 135.2, 123.7, 59.1, 46.8, 33.6, 28.9, 24.65



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **39**

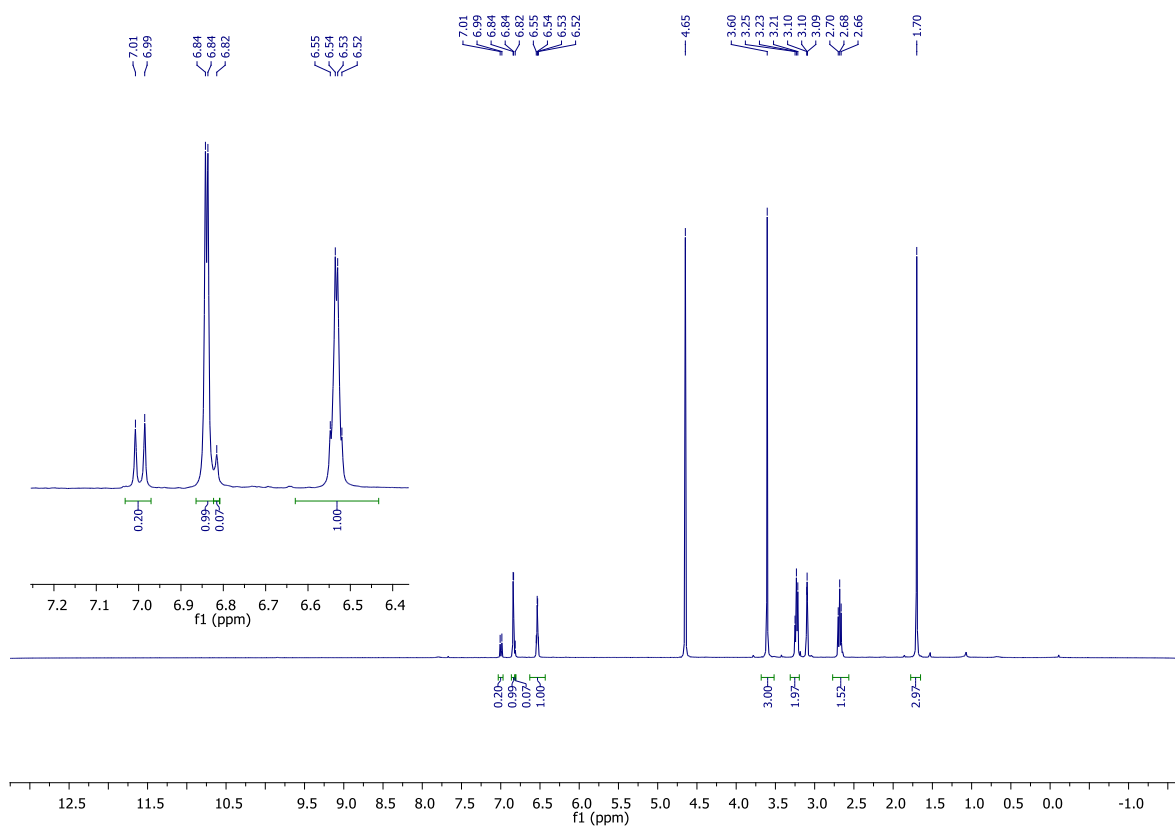
## Melatonin 40 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a brown solid (28 mg; 83% yield). Note that in this case the product was obtained using 6 % of RuNp@PVP.

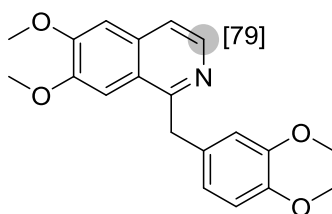
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)**  $\delta$  7.00 (d,  $J = 8.8$  Hz, 0.2H), 6.84 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.82 (s, 0.07H), 6.55 – 6.52 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.23 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.68 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1.5H), 1.70 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)**  $\delta$  171.8, 153.5, 131.9, 127.7, 122.8, 122.7, 122.5, 122.4, 122.2, 111.4, 111.1, 111.0, 99.8, 54.9, 40.1, 40.0, 39.9, 24.8, 21.2



<sup>1</sup>H NMR spectrum of 40

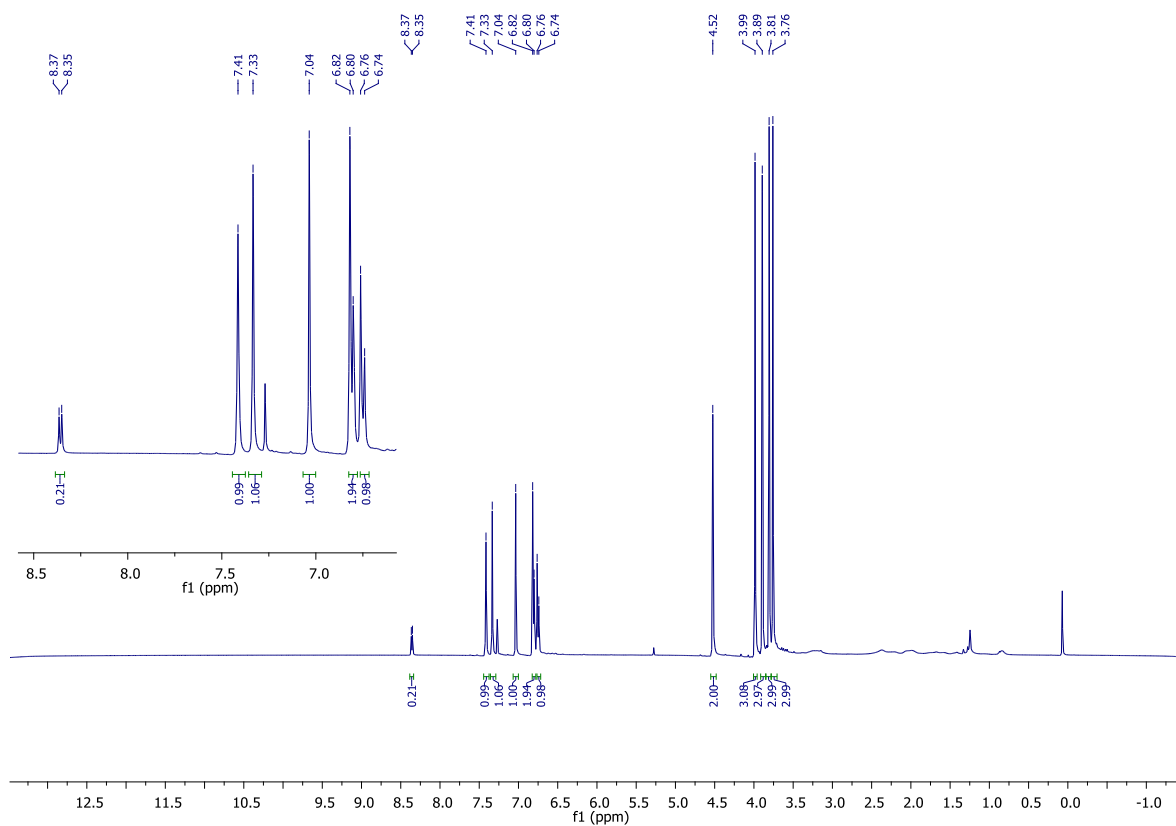
### Papaverine 41 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a white solid (41 mg; 82 % yield). Note that due to poor solubility of the product, 4 mL of distilled THF were used in this case (instead of 1 mL indicated in the general procedure).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 8.36 (d, *J* = 5.6 Hz, 0.2H), 7.41 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.52 (s, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.76 (s, 3H)

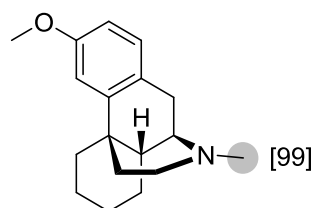
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 157.7, 152.4, 149.8, 149.0, 147.5, 140.9, 140.6, 140.3, 133.5, 132.2, 122.9, 120.5, 118.7, 118.6, 111.9, 111.2, 105.3, 104.2, 56.0, 55.9, 55.8, 55.7, 42.2



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **41**



## Dextrometorphan 42 (procedure C):

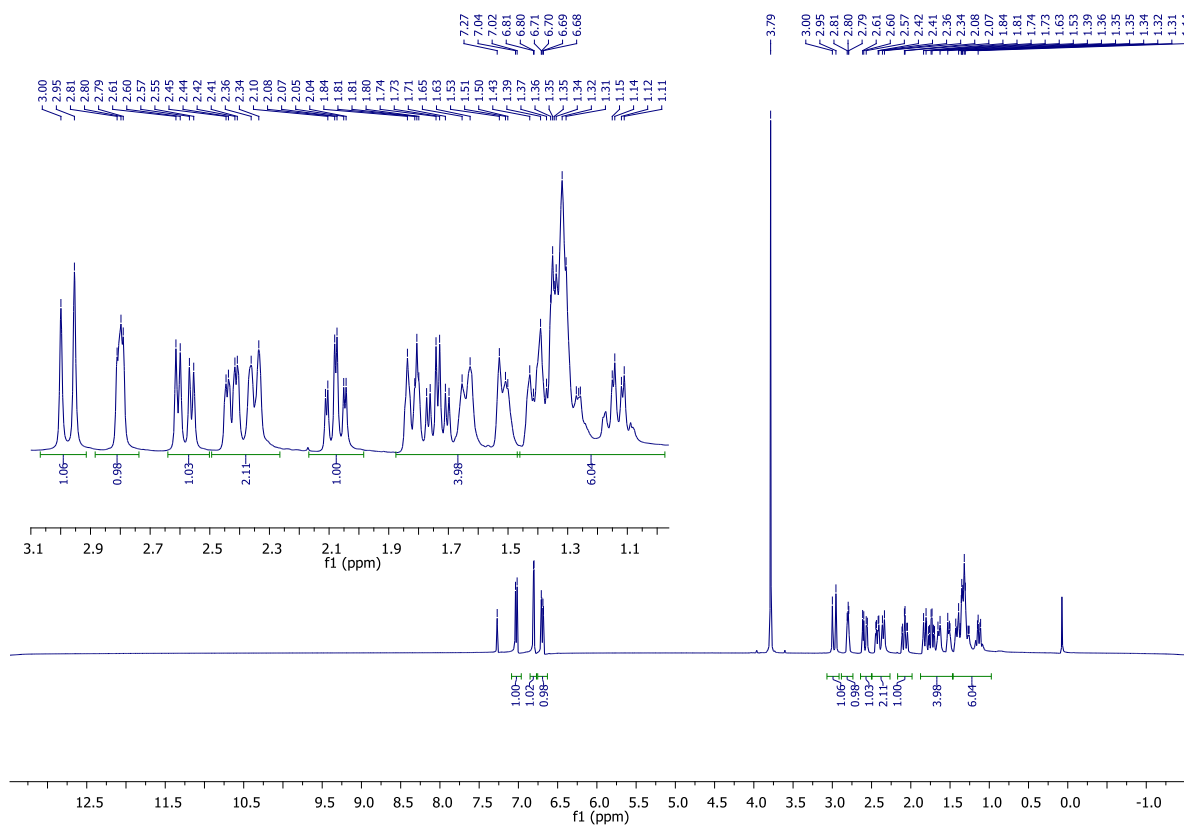


After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a white solid (38 mg; 92% yield).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.03 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 2.5$  Hz, 1H), 6.69 (dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.98 (d,  $J = 18.1$  Hz, 1H), 2.86 – 2.75 (m, 1H), 2.58 (dd,  $J = 18.1, 5.8$  Hz, 1H), 2.46 – 2.29 (m, 2H), 2.08 (td,  $J = 12.3, 3.2$  Hz, 1H), 1.87 – 1.48 (m, 4H), 1.45 – 1.03 (m, 6H)

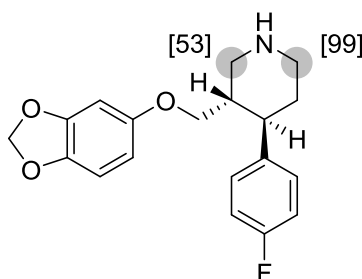
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  158.1, 141.7, 129.9, 128.4, 111.0, 110.6, 57.9, 55.1, 47.2, 45.4, 42.1, 37.2, 36.6, 26.8, 26.6, 23.3, 22.2

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +65.1$  ( $c = 1.0, \text{CHCl}_3$ )



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **42**

### Paroxetine 43 (procedure C):

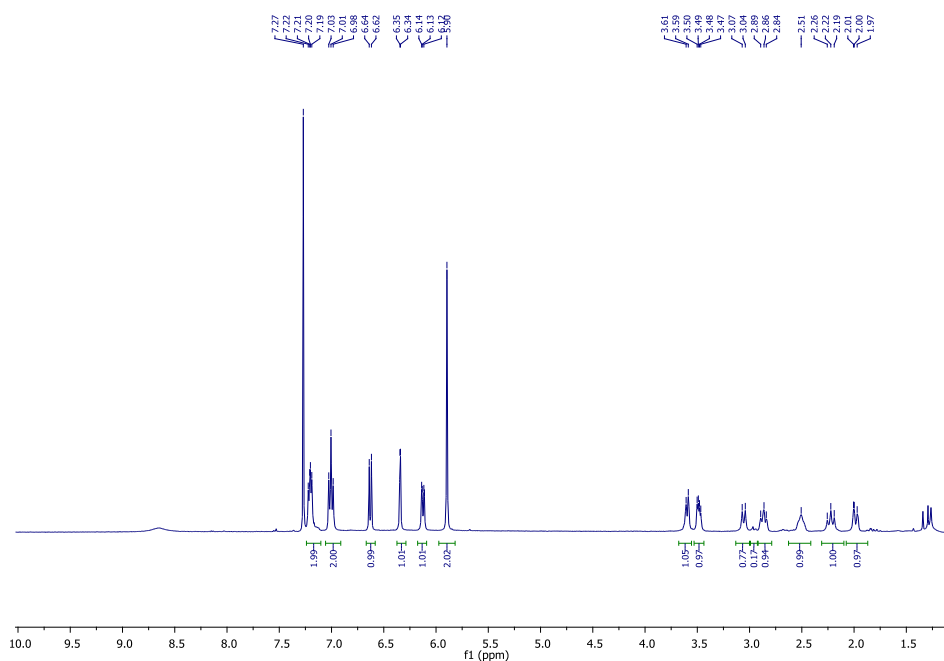


After filtration over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give an orange oil (43 mg) containing deuterated paroxetine along with a small amount of an unidentified impurity detected by LC/MS analysis ( $m/z = 405$ ). An analytical sample of this oil was purified by preparative HPLC (column: long 60 Luna PFP Phenomenex 150x21.2x5, flow 17 mL/min, gradient: 95/5 to 60/40 H<sub>2</sub>O/ACN + 1% HCOOH).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.21 (dd,  $J = 8.1, 5.4$  Hz, 2H), 7.01 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 6.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.34 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.12 (dd,  $J = 8.5, 2.3$  Hz, 1H), 5.90 (s, 2H), 3.60 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.06 (d,  $J = 11.9$  Hz, 0.77H), 2.96 (m, 0.17H), 2.87 (t,  $J = 10.7$  Hz, 1H), 2.51 (m, 1H), 2.22 (t,  $J = 13.3$  Hz, 1H), 2.08 – 1.93 (m, 1H)

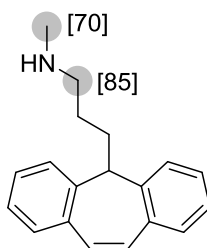
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  163.1, 160.6, 153.8, 148.2, 141.9, 137.4, 128.9, 128.8, 115.9, 115.7, 107.9, 105.5, 101.2, 97.9, 67.7, 41.9, 39.6, 30.3

$[\alpha]_D^{25} = -78.5$  ( $c = 1.0$ , CHCl<sub>3</sub>).



<sup>1</sup>H NMR spectrum of 43

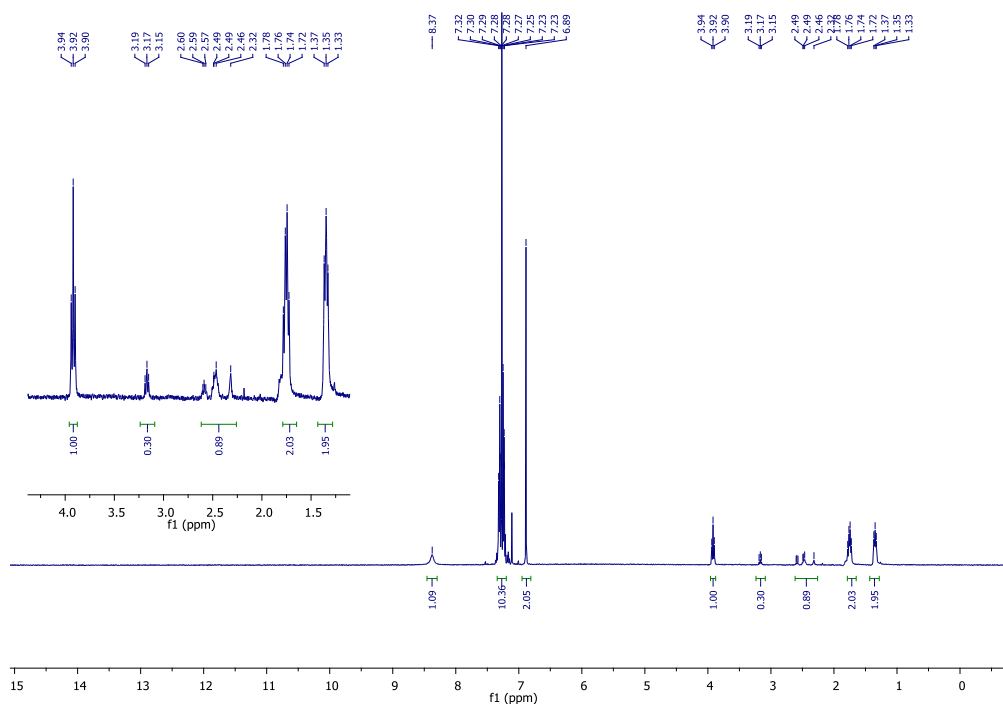
### Protryptiline 44 (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, the filtrate was evaporated to dryness to give a greenish oil (37 mg) containing a mixture of deuterated protryptiline (around 75% based on  $^1\text{H}$  NMR) and reduced deuterated protryptiline (around 25% based on  $^1\text{H}$  NMR). An analytical sample of this oil was purified by preparative HPLC (column long 60 C<sub>18</sub> waters X.bridge 19x150x5 mm, flow 17 mL/min, gradient: 95/5 to 60/40 H<sub>2</sub>O/ACN + 1% HCOOH).

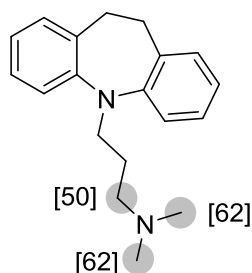
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35 – 7.19 (m, 8H), 6.89 (s, 2H), 3.92 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 3.17 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 0.3H), 2.66 – 2.27 (m, 0.9H), 1.75 (dd,  $J$  = 15.1, 7.8 Hz, 2H), 1.38 – 1.28 (m, 2H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  140.2, 139.6, 135.4, 131.3, 130.8, 129.9, 129.5, 128.8, 128.5, 127.7, 126.6, 125.4, 122.9, 54.4, 26.8, 24.1



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **44**

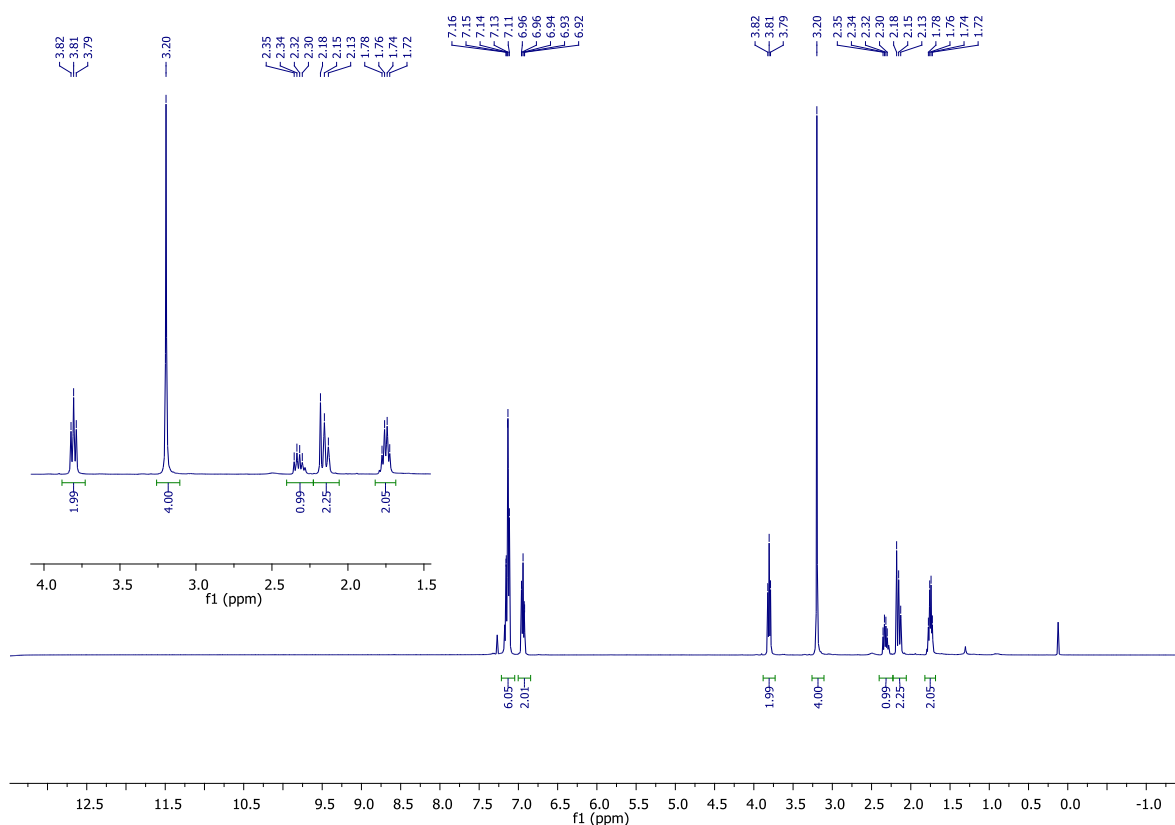
### Imipramine 45 (procedure C):



After filtration of the product over a small activated neutral alumina pad, the residue was evaporated to dryness to give a light yellow oil (35 mg; 84% yield). Repeating the reaction with this material (using standard conditions) has led to higher deuterium incorporation.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.22 – 7.10 (m, 6H), 7.01 – 6.89 (m, 2H), 3.81 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.20 (s, 4H), 2.43 – 2.25 (m, 0.99H), 2.21 – 2.04 (m, 2.25H), 1.76 (m, 2H)

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  148.3, 134.2, 129.8, 126.3, 122.4, 120.0, 57.7, 57.4, 57.2, 57.0, 48.9, 45.6, 45.0, 44.7, 44.6, 32.2, 26.3, 26.1, 26.0



$^1\text{H}$  NMR spectrum of 45

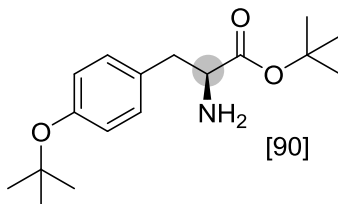
**Data of mass analysis for compounds 38 to 45'**

<b>Compound</b>	$M_0$	$M_{+1}$	$M_{+2}$	$M_{+3}$	$M_{+4}$	$M_{+5}$	$M_{+6}$	$M_{+7}$	$M_{+8}$	$M_{+9}$
<b>38</b>	1.1	6.3	<b>90.0</b>	1.3	1.3					
<b>39</b>	3.2	3.3	<b>90.2</b>	2.1	1.2					
<b>40</b>	1.2	14.9	<b>50.3</b>	25.5	7.7	0.4				
<b>41</b>	22.3	<b>68.4</b>	7.9	1.4						
<b>42</b>	0.4	0.4	7.3	<b>86.9</b>	4.3	0.7				
<b>43</b>	0.5	1.4	15.3	<b>70.7</b>	11.9	0.1				
<b>44</b>	0.0	0.0	0.0	2.6	21.1	<b>74.4</b>	1.6	0.3		
<b>45</b>	2.6	5.8	8.8	11.2	12.9	13.9	15.7	<b>15.9</b>	12.3	0.8
<b>45'</b>	0.3	0.6	1.6	3.4	6.0	10.4	17.1	26.3	<b>29.4</b>	3.6

**Table S3:** Relative amount in percent of the non-deuterated ( $M_0$ ) and deuterated ( $M_{(0+x)}$ ) isotopologues in compounds **38** to **45'**.

## Experimental details and characterization for compounds 47 to 54:

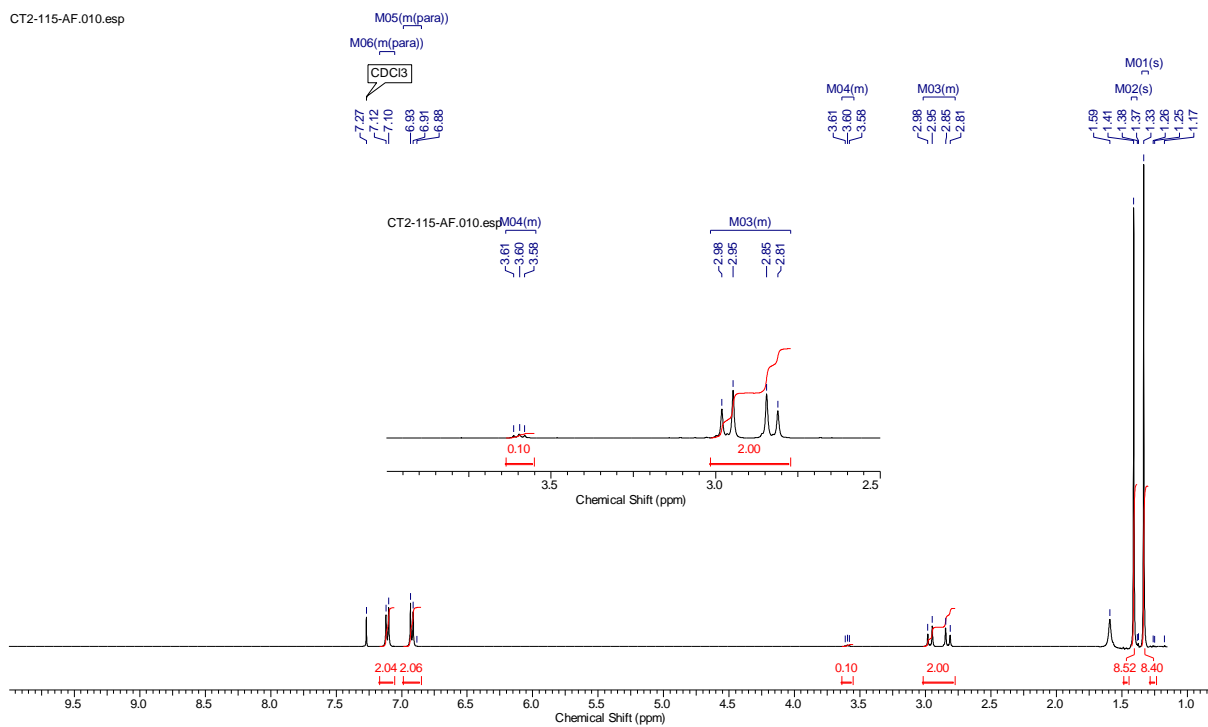
### L-Tyrosine tert-butyl ether tert-butyl ester 47 (Procedure C):



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a brown solid (21 mg; 43% yield).

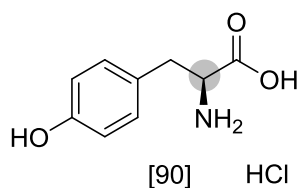
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.05 – 7.17 (m,  $J = 8.42$  Hz, 2H), 6.85 – 6.99 (m, 2H), 3.55 – 3.64 (m, 0.1H), 2.77 - 3.02 (m, 2H), 1.59 (br. s., 2H), 1.41 (s, 9H), 1.33 (s, 9H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.4, 154.1, 132.3, 129.8, 124.2, 81.1, 78.3, 40.6, 28.8, 28.0



$^1\text{H NMR}$  spectrum of 47

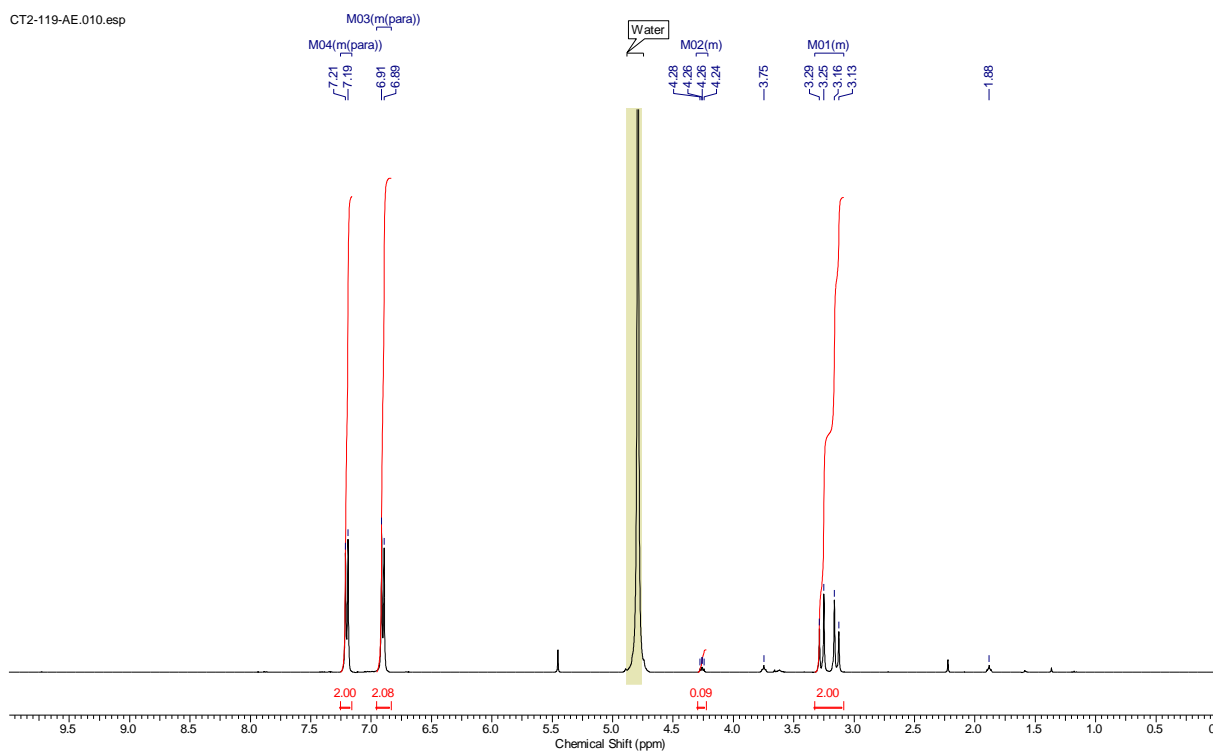
## L-Tyrosine hydrochloride **48** (Hydrolysis):



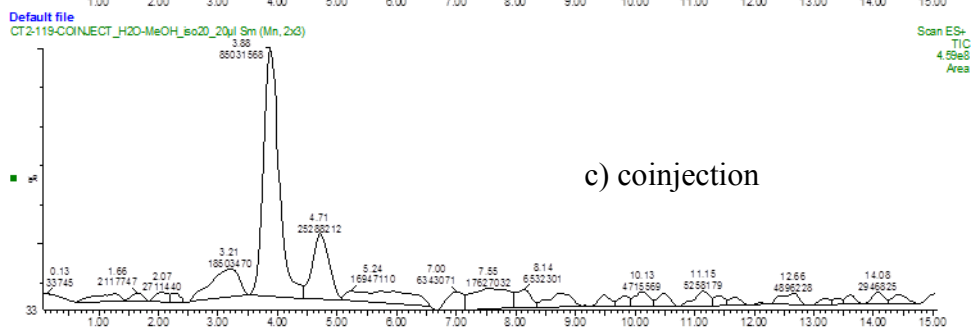
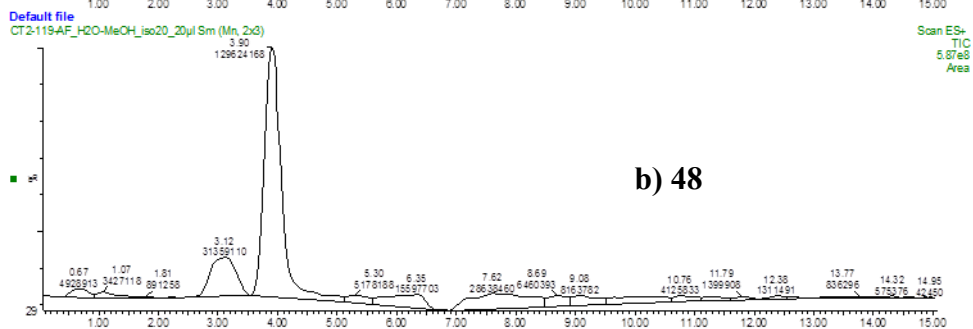
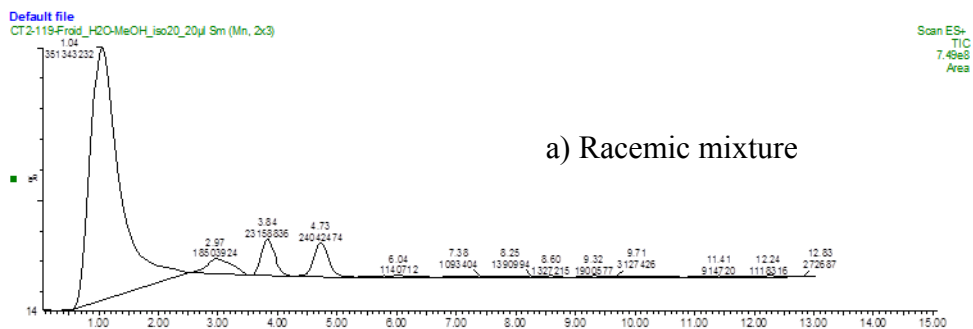
0.065 mmol of **L-Tyrosine tert-butyl ether tert-butyl ester 47** (19 mg) were dissolved in 2 mL of HCl 6M solution. The reaction was stirred at reflux for 3 hours. The mixture was then concentrated to give a white solid (10 mg; 85% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.16 – 7.25 (m,  $J = 8.42$  Hz, 2H), 6.83 – 6.95 (m,  $J = 8.42$  Hz, 2H), 4.21 – 4.31 (m, 0.1H), 3.09 – 3.33 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  171.7, 155.2, 130.9, 125.8, 116.0, 34.8



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **48**

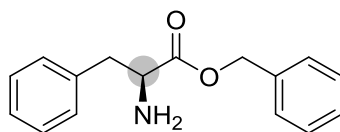


HPLC chromatograms of **48**: a) racemic mixture, b) **48** and c) coinjection.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 20:80:0.02



### L-Phenylalanine benzyl ester **50** (Procedure E):

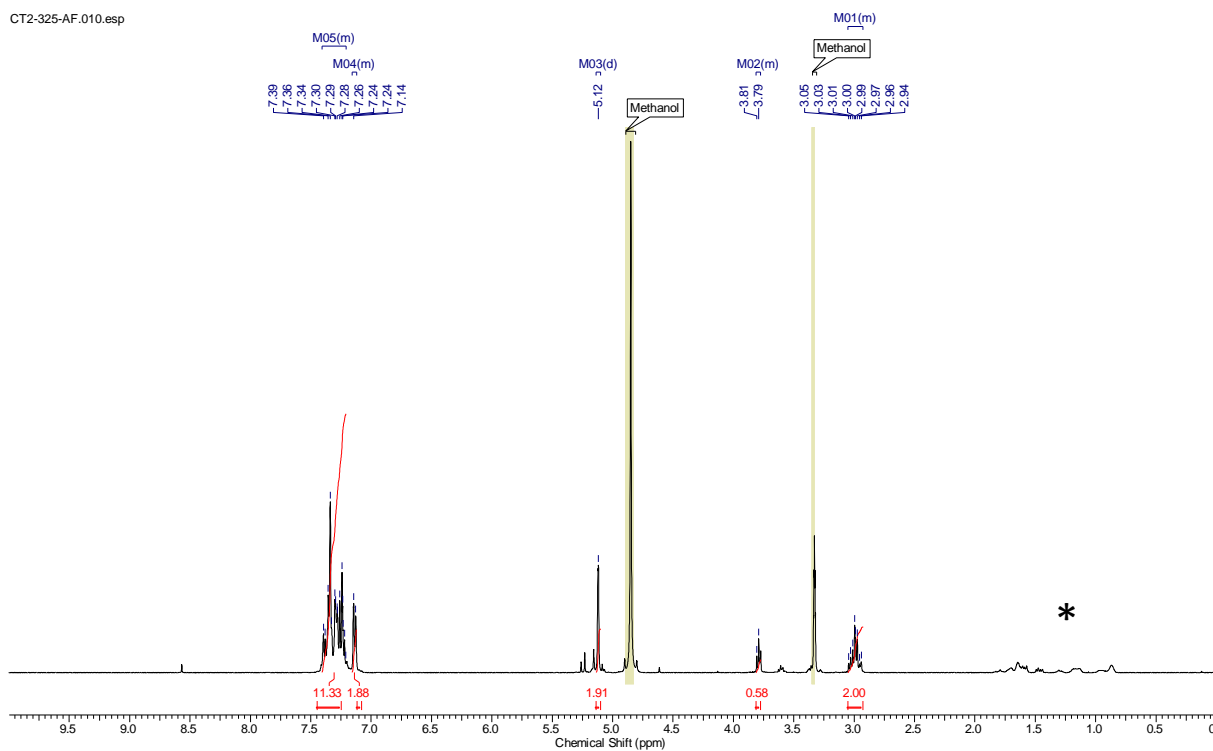


[42]

After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a brown solid (10 mg; 26% yield).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)** δ 7.21 – 7.41 (m, 10 H), 7.12 – 7.16 (m, 2 H), 5.12 (d, *J* = 1.6 Hz, 2 H), 3.77 – 3.81 (m, 0.58 H), 2.93 – 3.05 (m, 2 H)

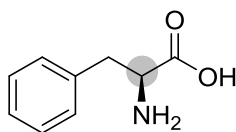
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)** δ 174.0, 136.6, 135.7, 129.0, 128.9, 128.2, 128.1, 127.9, 126.6, 126.5, 66.4, 55.3, 40.2



\*Presence of residual by-product of deuteration on aromatic ring

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **50**

### L-Phenylalanine 51 (Debenzylation):

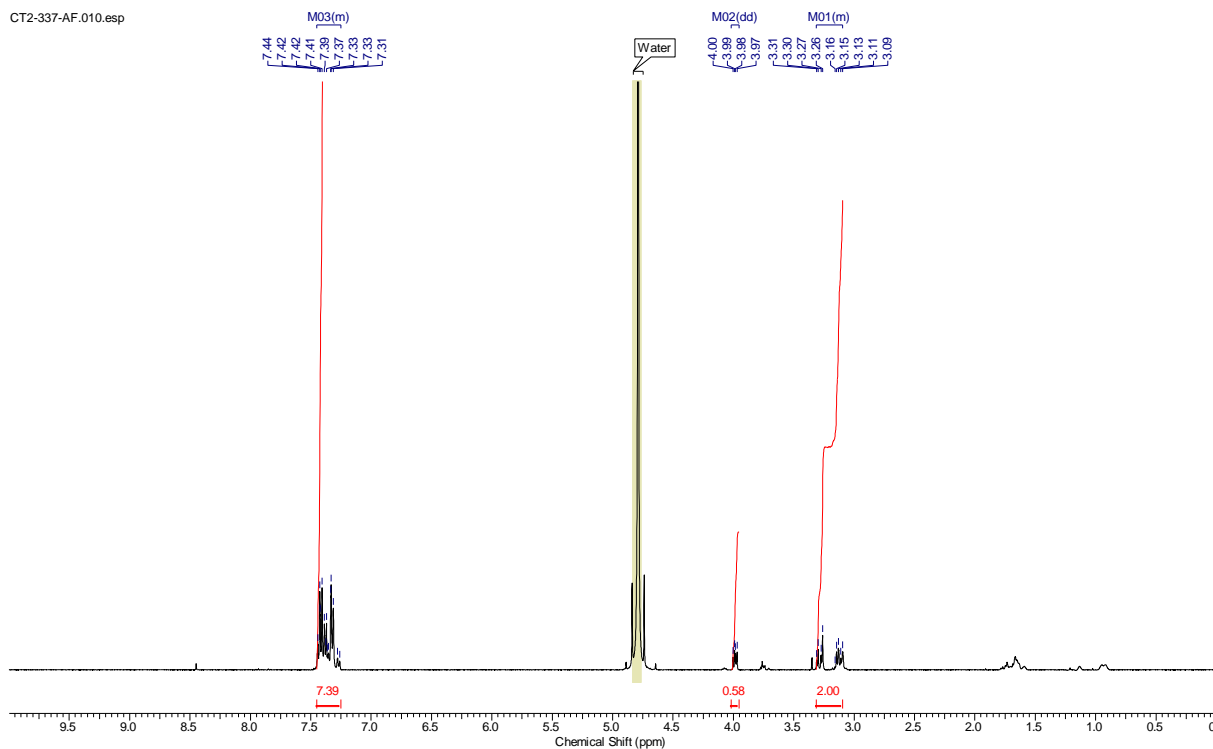


[42]

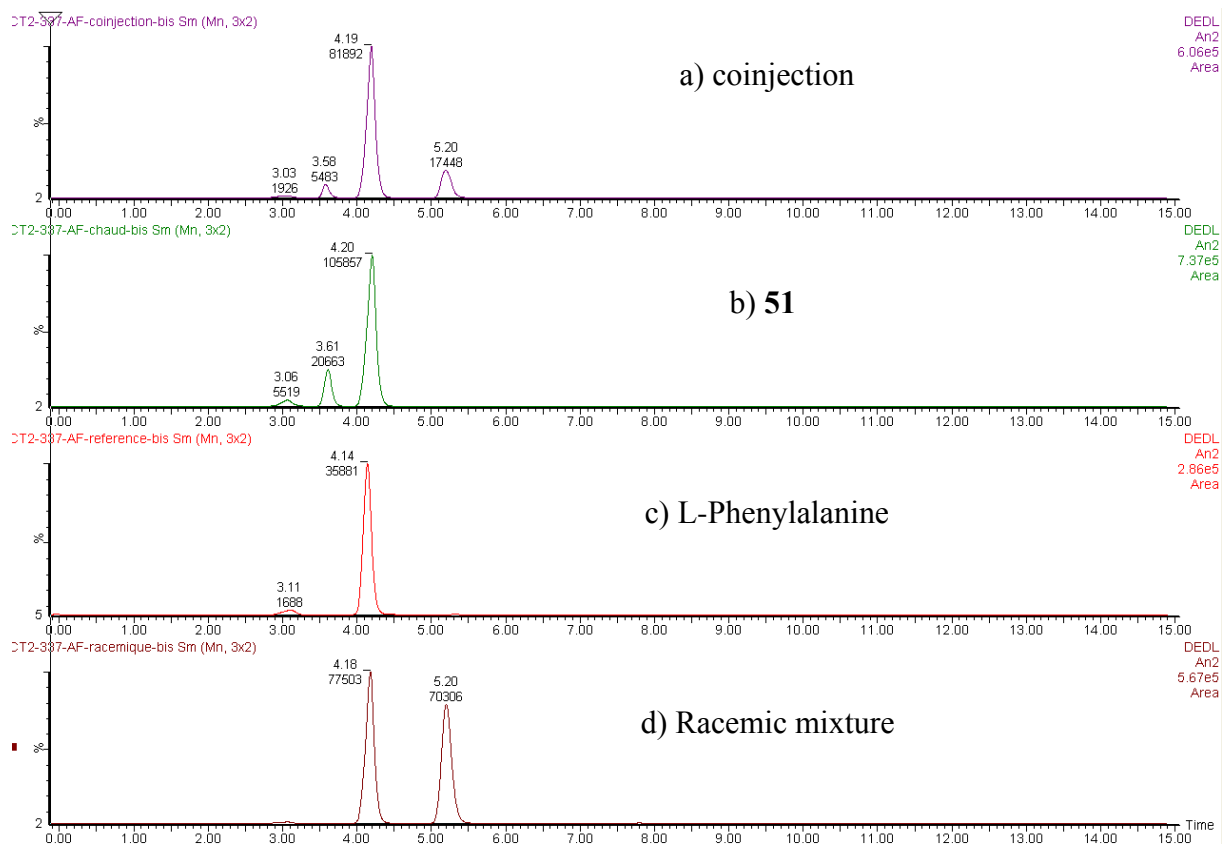
0.039 mmol of L-Phenylalanine benzyl ester **50** (10 mg) were dissolved in 4 mL of water:MeOH 2:2 solution with 10 mg of Pd/C 5%. A hydrogen atmosphere was added (balloon pressure) and the reaction was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was then filtered to remove the solid and concentrated to give a white solid (4 mg; 62% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.25 – 7.45 (m, 5 H), 3.99 (dd,  $J = 8.1, 5.1$  Hz, 0.58 H), 3.09 – 3.31 (m, 2 H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  174.0, 135.2, 129.4, 129.2, 127.7, 36.3



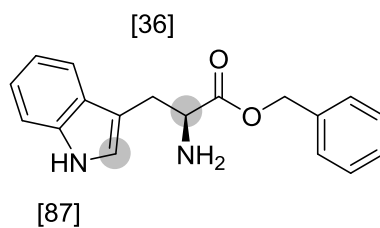
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **51**



HPLC chromatograms of **51**: a) coinjection, b) **51**, c) commercially available L-Phenylalanine and d) racemic mixture.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

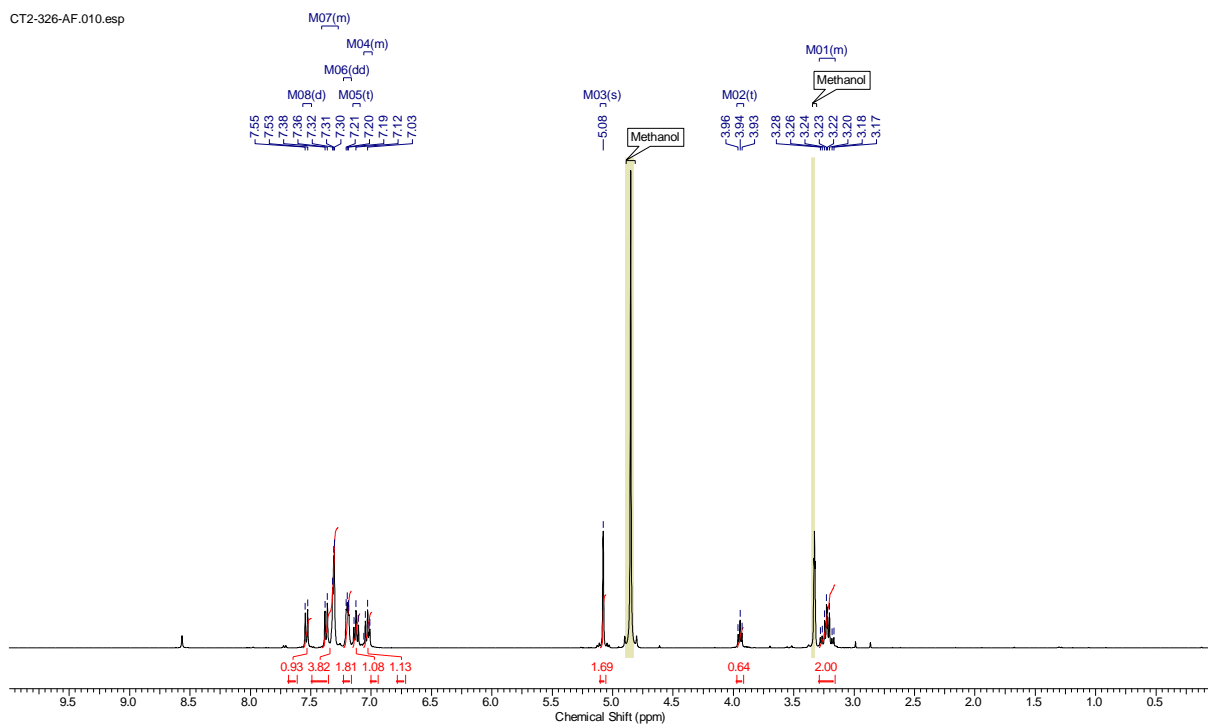
## L-Tryptophan benzyl ester **53** (Procedure E):



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a brown solid (9 mg; 20% yield).

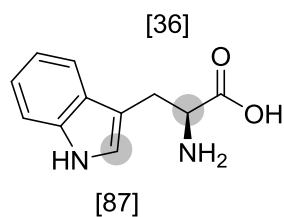
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)**  $\delta$  7.54 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1 H), 7.27 – 7.41 (m, 4 H), 7.19 (dd,  $J = 6.1, 2.7$  Hz, 2 H), 7.12 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1 H), 6.99 – 7.06 (m, 1.13 H), 5.08 (s, 2 H), 3.94 (t,  $J = 6.3$  Hz, 0.64 H), 3.16 – 3.29 (m, 2 H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)**  $\delta$  175.5, 142.8, 138.2, 129.4, 128.7, 128.3, 128.1, 122.7, 120.0, 119.2, 112.5, 109.8, 65.3, 55.7, 30.6



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **53**

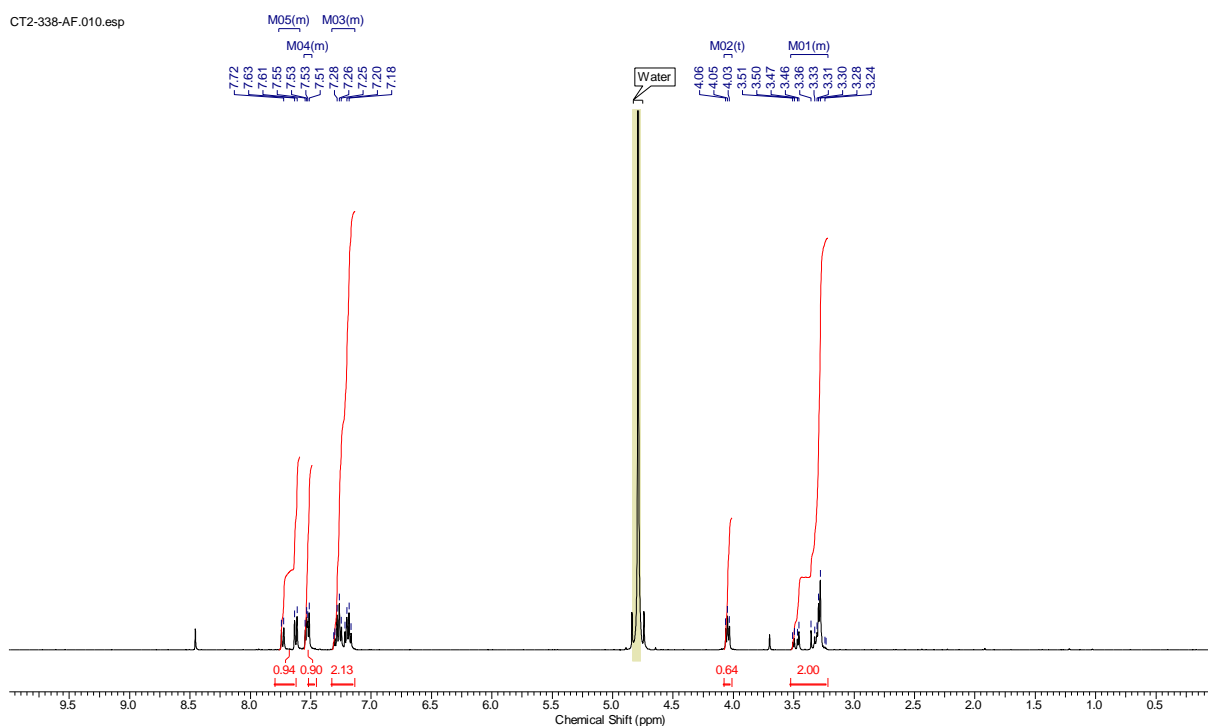
## L-Tryptophan 54 (Debenzylation):



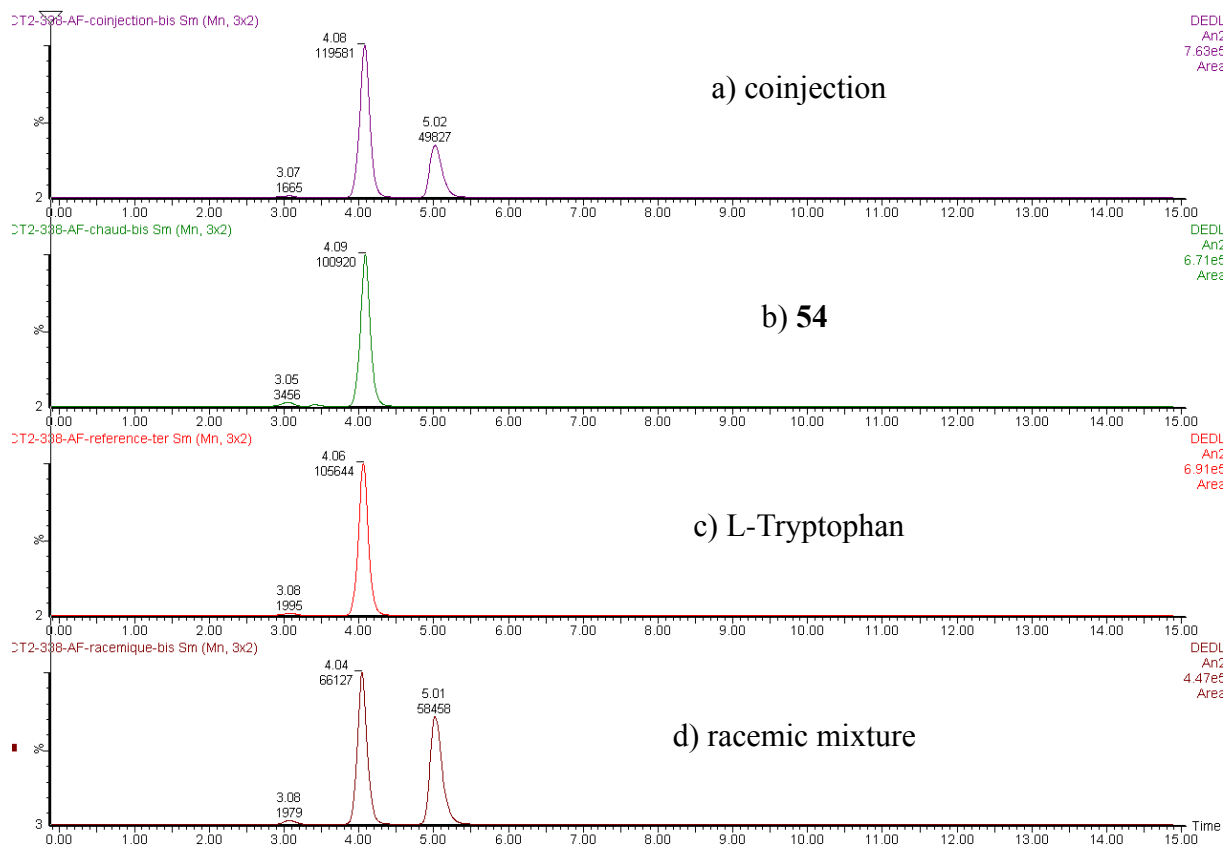
0.030 mmol of L-Tryptophan benzyl ester **53** (9 mg) were dissolved in 4 mL of water:MeOH 2:2 solution with 9 mg of Pd/C 5%. A hydrogen atmosphere was added (balloon pressure) and the reaction was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was then filtered to remove the solid and concentrated to give a white solid (6 mg; 99% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.59 – 7.77 (m, 1 H), 7.49 – 7.56 (m, 1 H), 7.14 – 7.33 (m, 2.13 H), 4.05 (t,  $J = 6.2$  Hz, 0.64 H), 3.22 – 3.53 (m, 2 H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  136.2, 126.8, 122.2, 119.5, 118.5, 112.0, 107.4, 55.1, 26.5



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **54**



HPLC chromatograms of **54**: a) coinjection, b) **54**, c) commercially available L-Tryptophan and d) racemic mixture.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

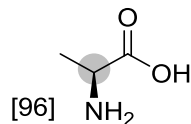
### Data of mass analysis for compounds 47 to 54

Compound	M <sub>0</sub>	M <sub>+1</sub>	M <sub>+2</sub>	M <sub>+3</sub>	M <sub>+4</sub>	M <sub>+5</sub>
<b>47</b>	9.7	<b>86.5</b>	3.0	0.8		
<b>48</b>	10.3	<b>85.9</b>	3.8			
<b>50</b>	<b>41.8</b>	39.1	14.0	4.5		
<b>51</b>	39.7	<b>41.4</b>	13.8	5.1		
<b>53</b>	10.3	<b>62.5</b>	24.5	2.8		
<b>54</b>	43.2	<b>43.3</b>	12.4	1.1		

**Table S4:** Relative amount in percent of the non-deuterated (M<sub>0</sub>) and deuterated (M<sub>(0+x)</sub>) isotopologues for compounds **47** to **54**.

## Experimental details and characterization for compounds 55 to 68 (Procedure D):

### L-Alanine 55:

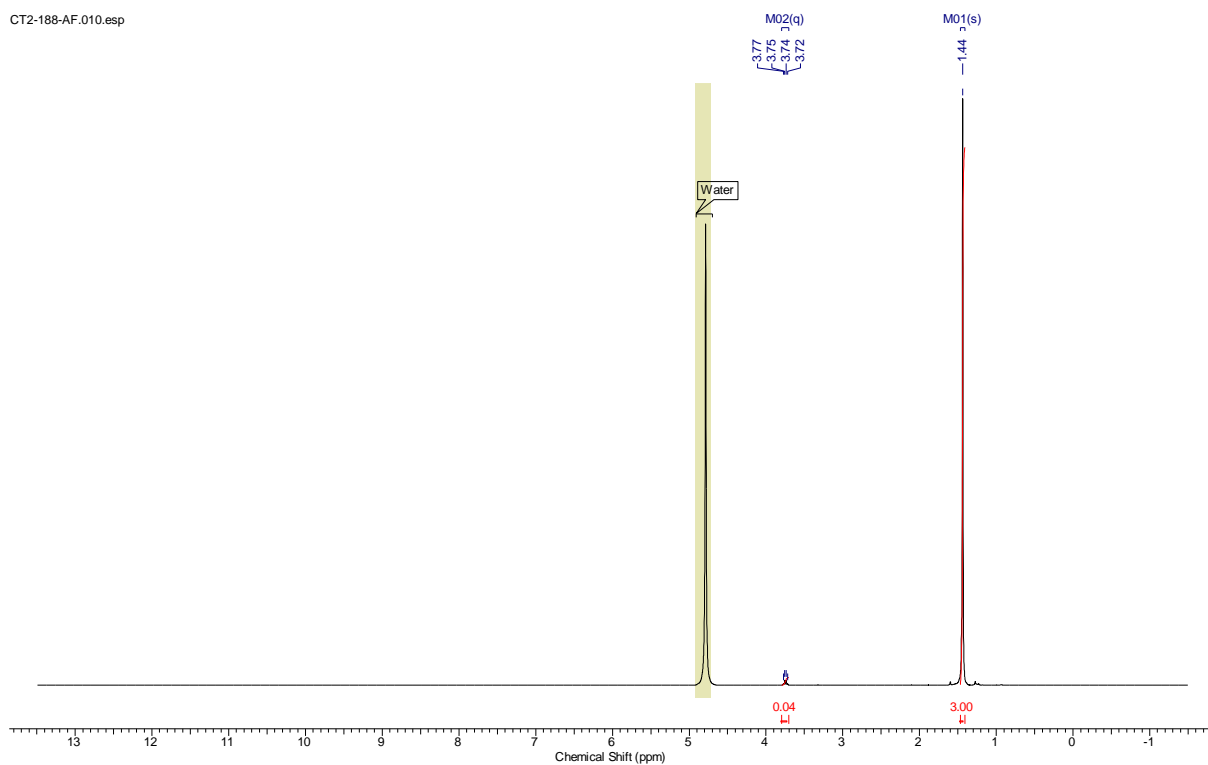


After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (12 mg; 92% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.75 (q,  $J = 7.32$  Hz, 0.04H), 1.44 (s, 3H)

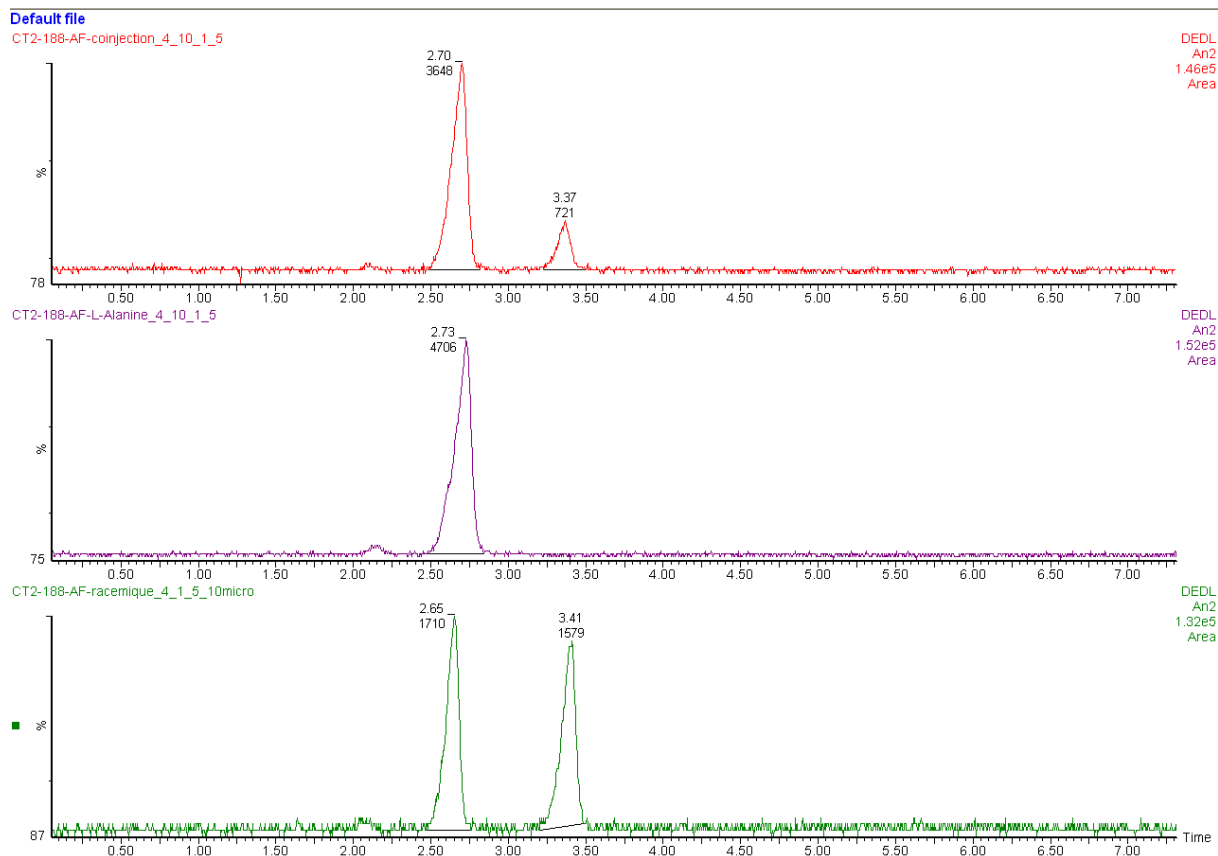
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  175.9, 50.2, 16.1

CT2-188-AF.010.esp



$^1\text{H}$  NMR spectrum of 55

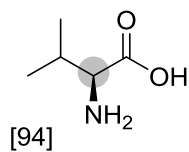




HPLC chromatograms of **55**: coinjection (top), **55** (middle) and racemic mixture (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>

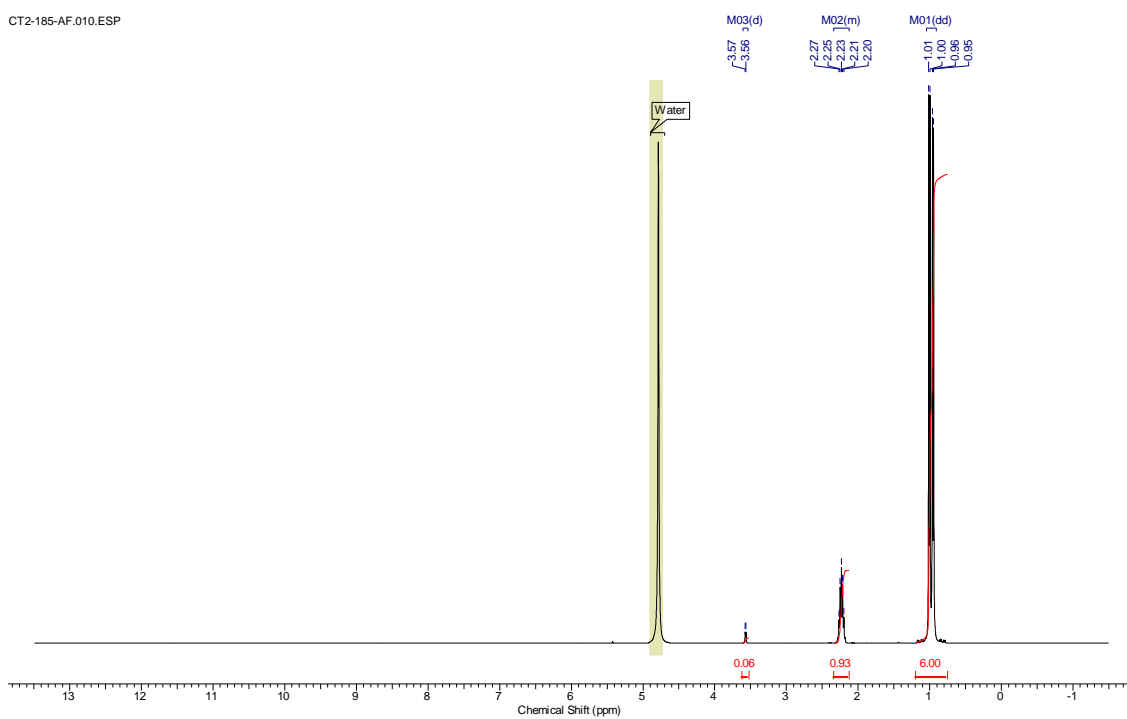
## L-Valine **56**:



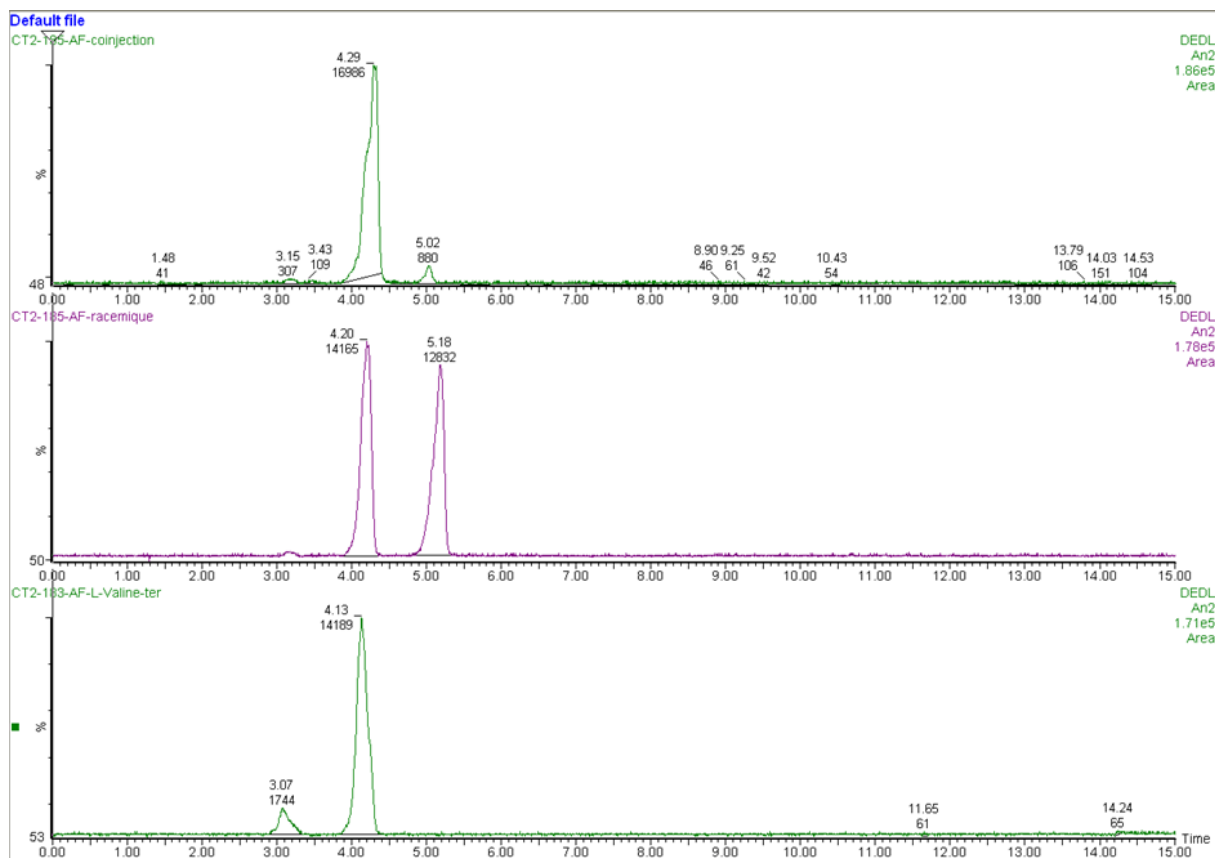
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (16 mg; 89% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.57 (d, *J* = 4.39 Hz, 0.06H), 2.12 – 2.34 (m, 1H), 0.98 (dd, *J* = 7.00, 20.30 Hz, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 174.3, 29.0, 17.9, 16.6



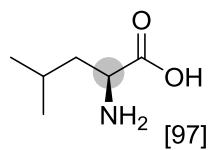
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **56**



HPLC chromatograms of **56**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **56** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

## L-Leucine 57:

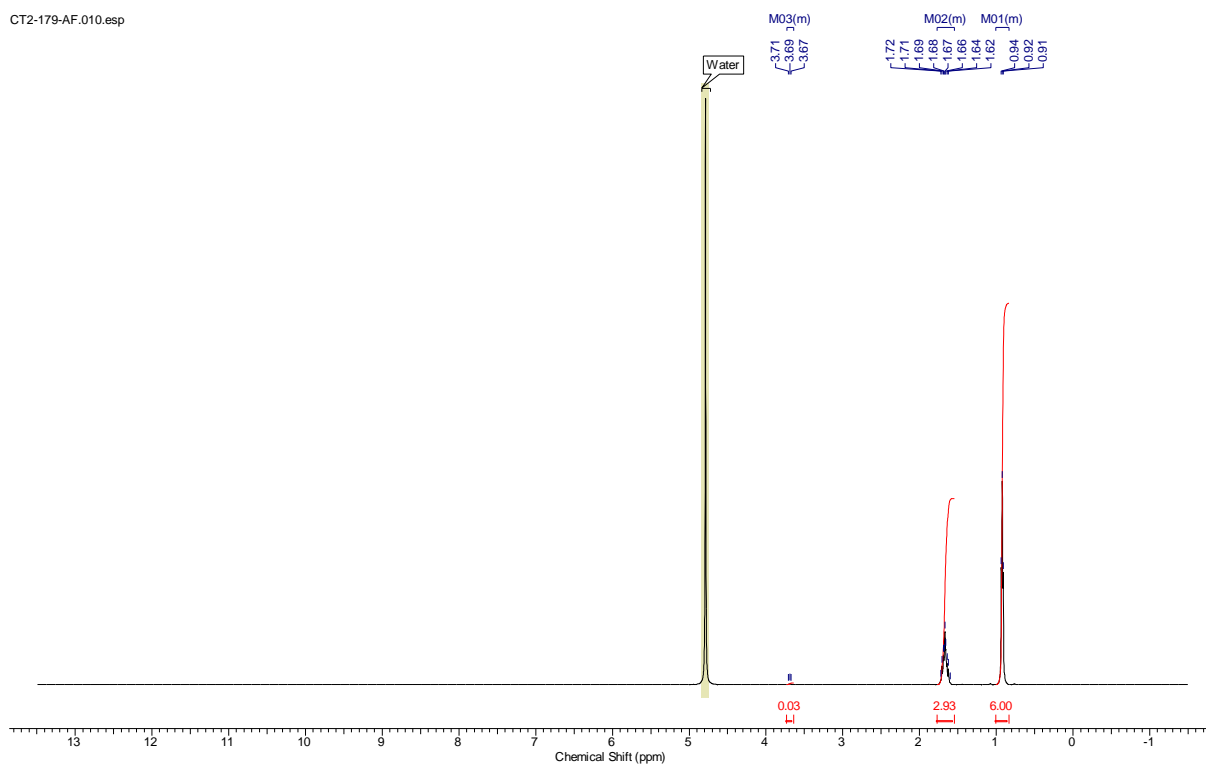


After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (13 mg; 65% yield).

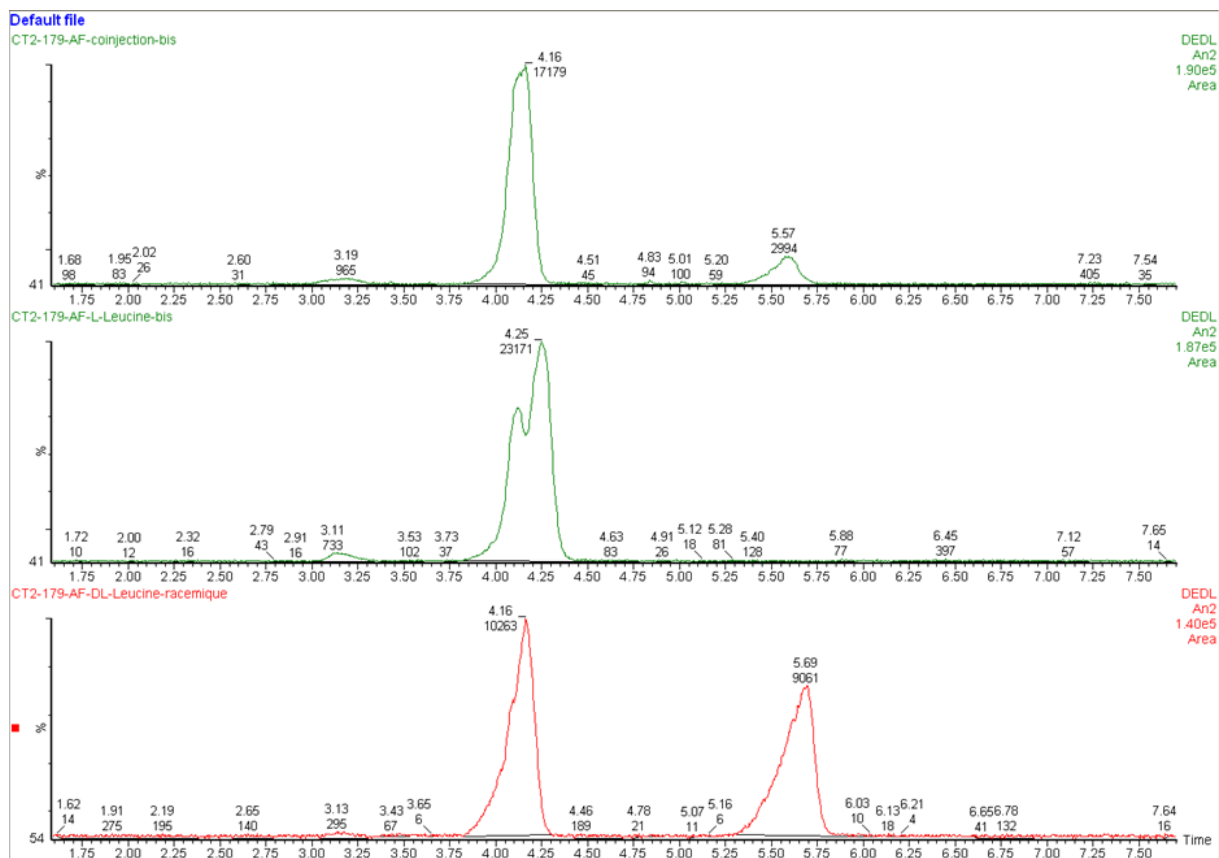
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.64 – 3.73 (m, 0.03H), 1.55 – 1.77 (m, 3H), 0.83 – 1.01 (m, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 175.7, 39.8, 24.2, 22.0, 20.9

CT2-179-AF.010.esp



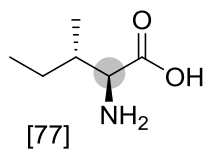
<sup>1</sup>H NMR spectrum of 57



HPLC chromatograms of **57**: coinjection (top), **57** (middle) and racemic mixture (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

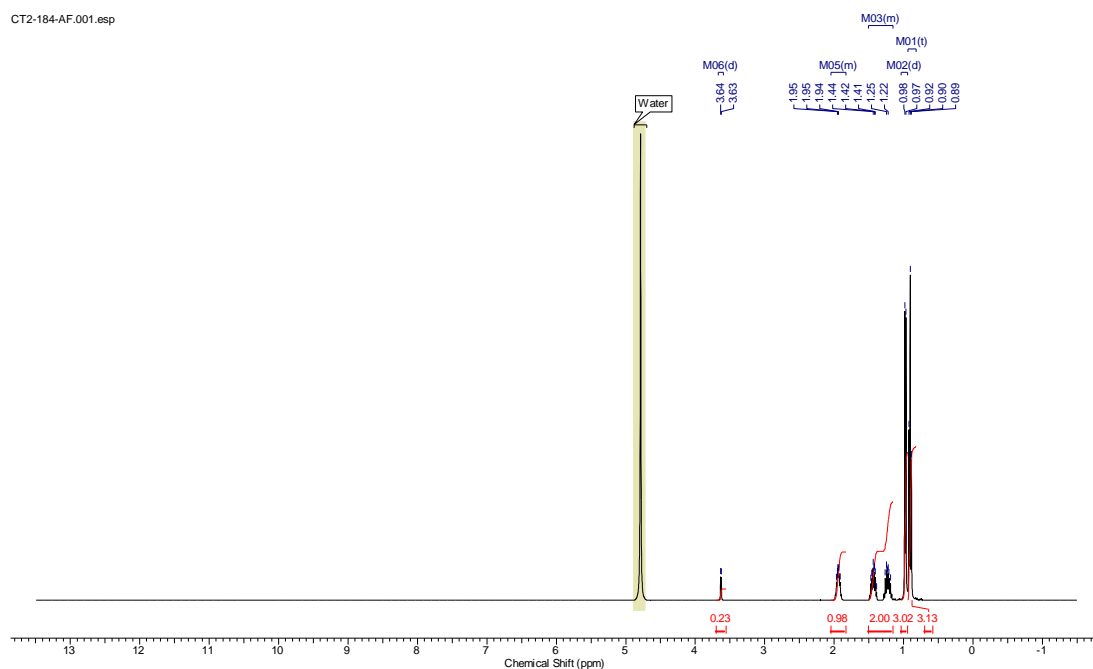
## L-Isoleucine **58**:



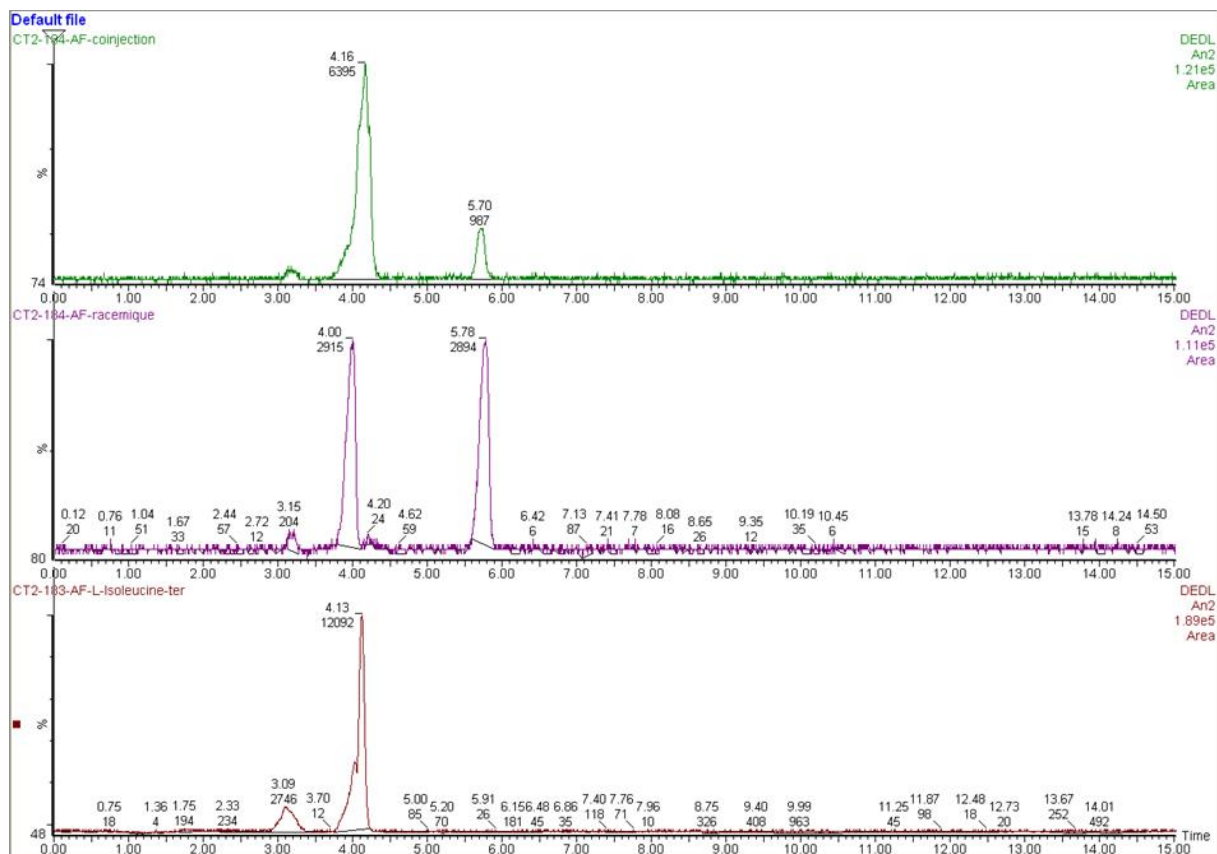
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (15 mg; 75% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.63 (d,  $J = 3.84$  Hz, 0.23H), 1.83 – 2.05 (m, 1H), 1.15 – 1.51 (m, 2H), 0.97 (d,  $J = 6.95$  Hz, 3H), 0.90 (t,  $J = 7.41$  Hz, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  174.3, 59.6, 35.8, 24.5, 14.7, 11.1



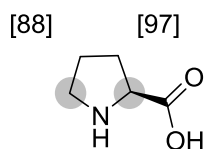
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **58**



HPLC chromatograms of **58**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **58** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

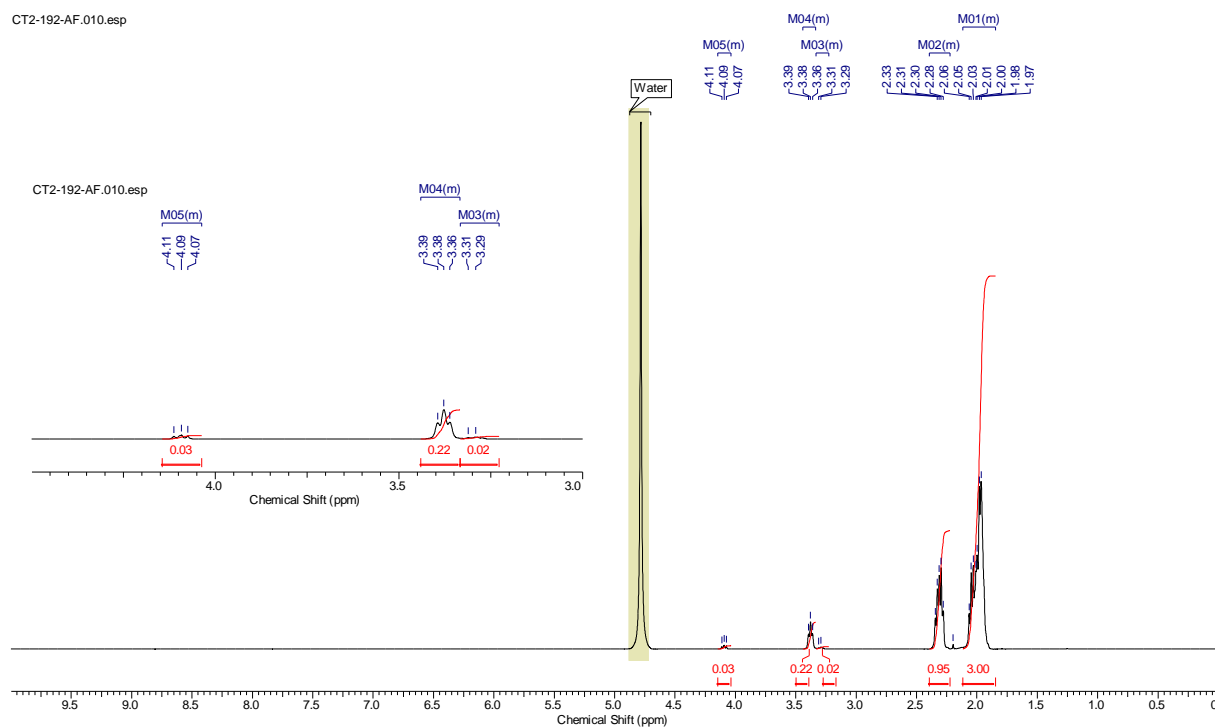
## L-Proline 59:



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (12 mg; 92% yield).

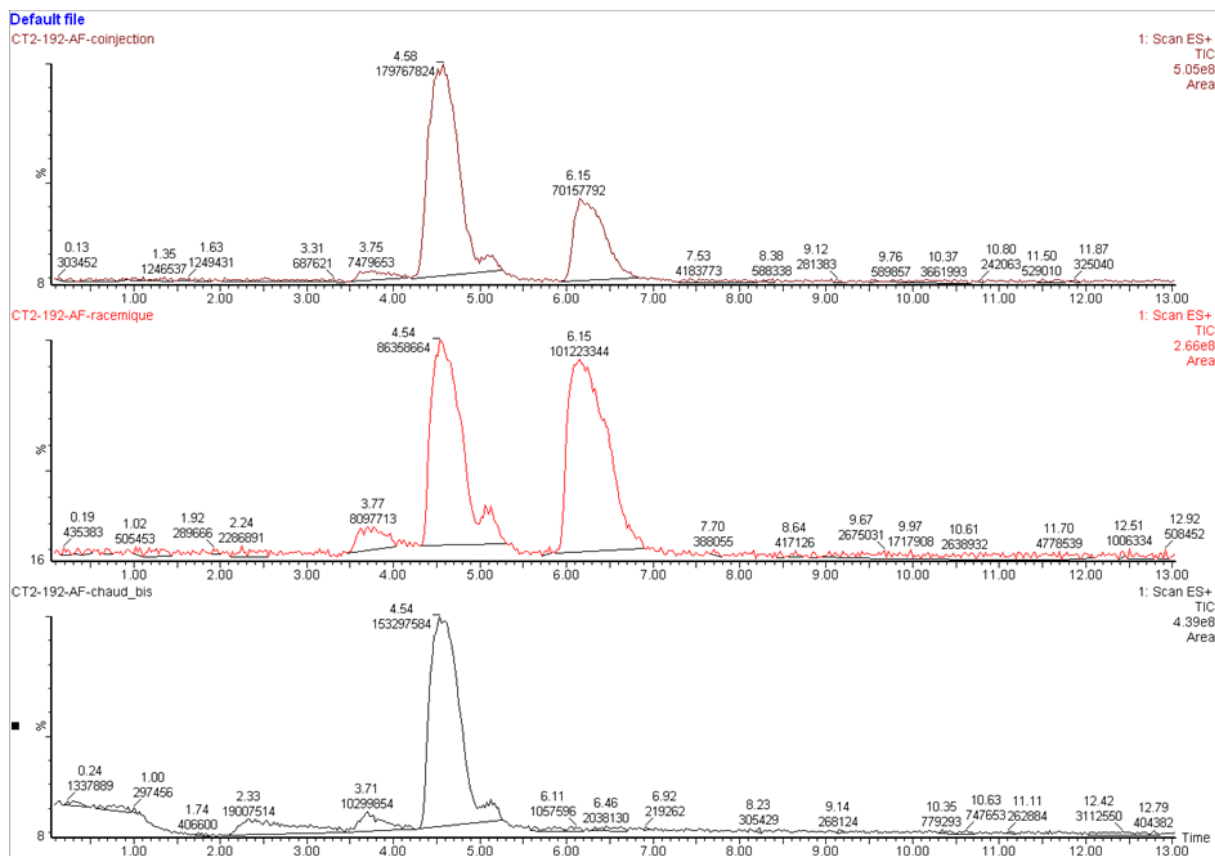
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.04 – 4.14 (m, 0.03H), 3.33 – 3.44 (m, 0.22 $\text{H}_{\text{proS}}$ ), 3.23 – 3.33 (m, 0.02 $\text{H}_{\text{proR}}$ ), 2.22 – 2.39 (m, 1H), 1.85 – 2.12 (m, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  174.7, 60.9, 45.8, 28.9, 23.6



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **59**

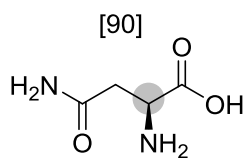




HPLC chromatograms of **59**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **59** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:ACN 95:5

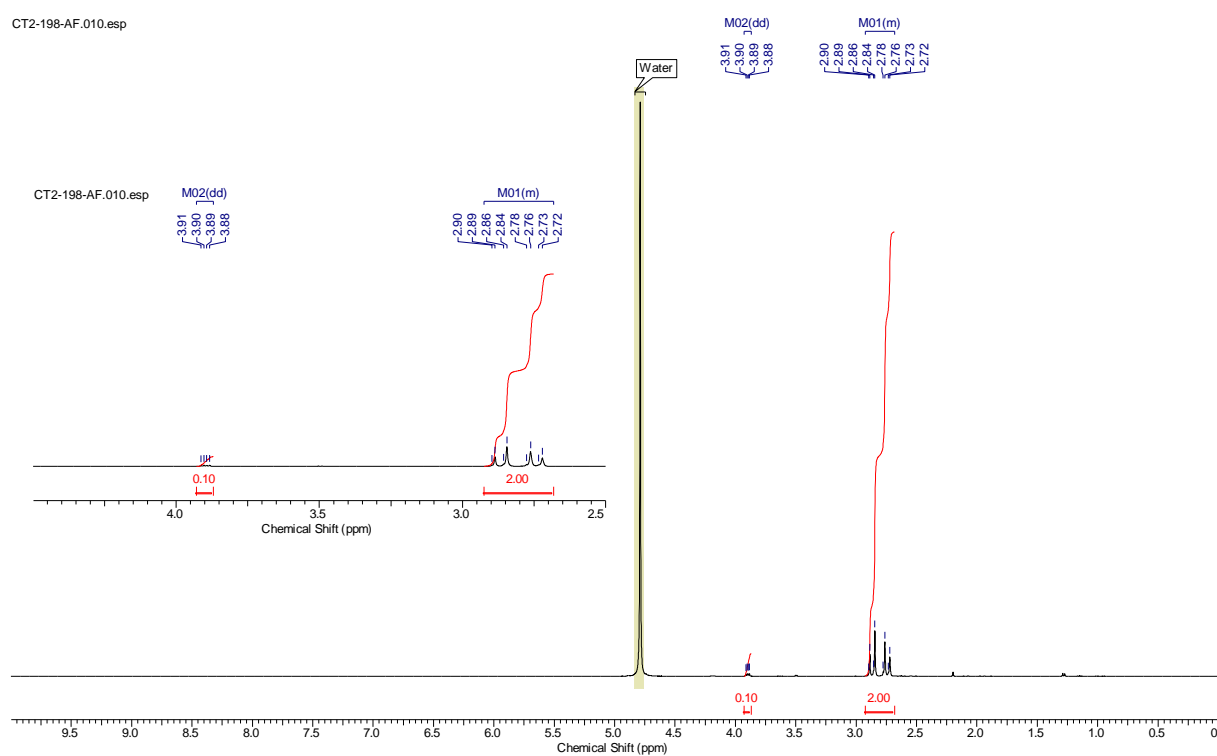
## L-Asparagine 60:



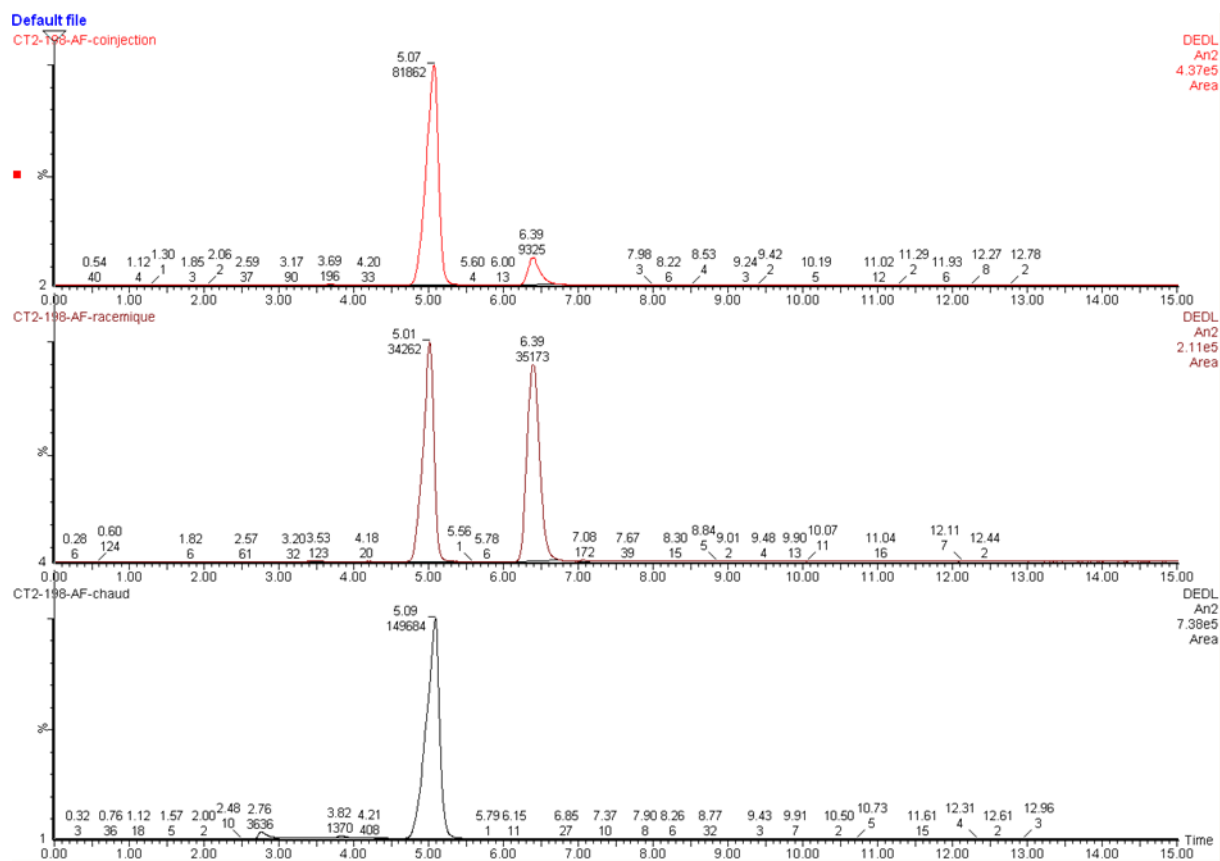
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (18 mg; 90% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.90 (dd,  $J = 4.39, 7.87$  Hz, 0.10H), 2.69 – 2.91 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  174.9, 51.4, 35.6



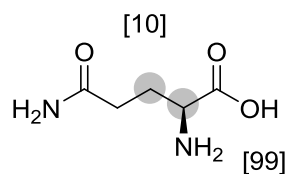
$^1\text{H NMR}$  spectrum of **60**



HPLC chromatograms of **60**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **60** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

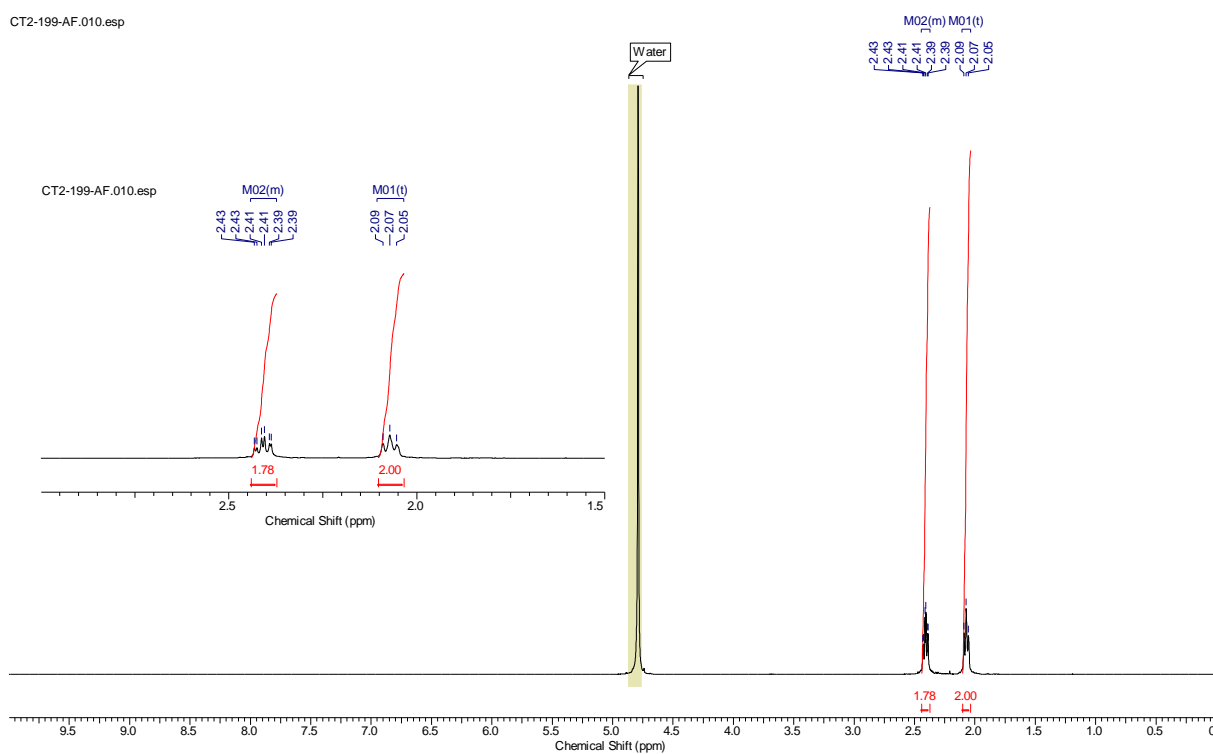
## L-Glutamine 61:



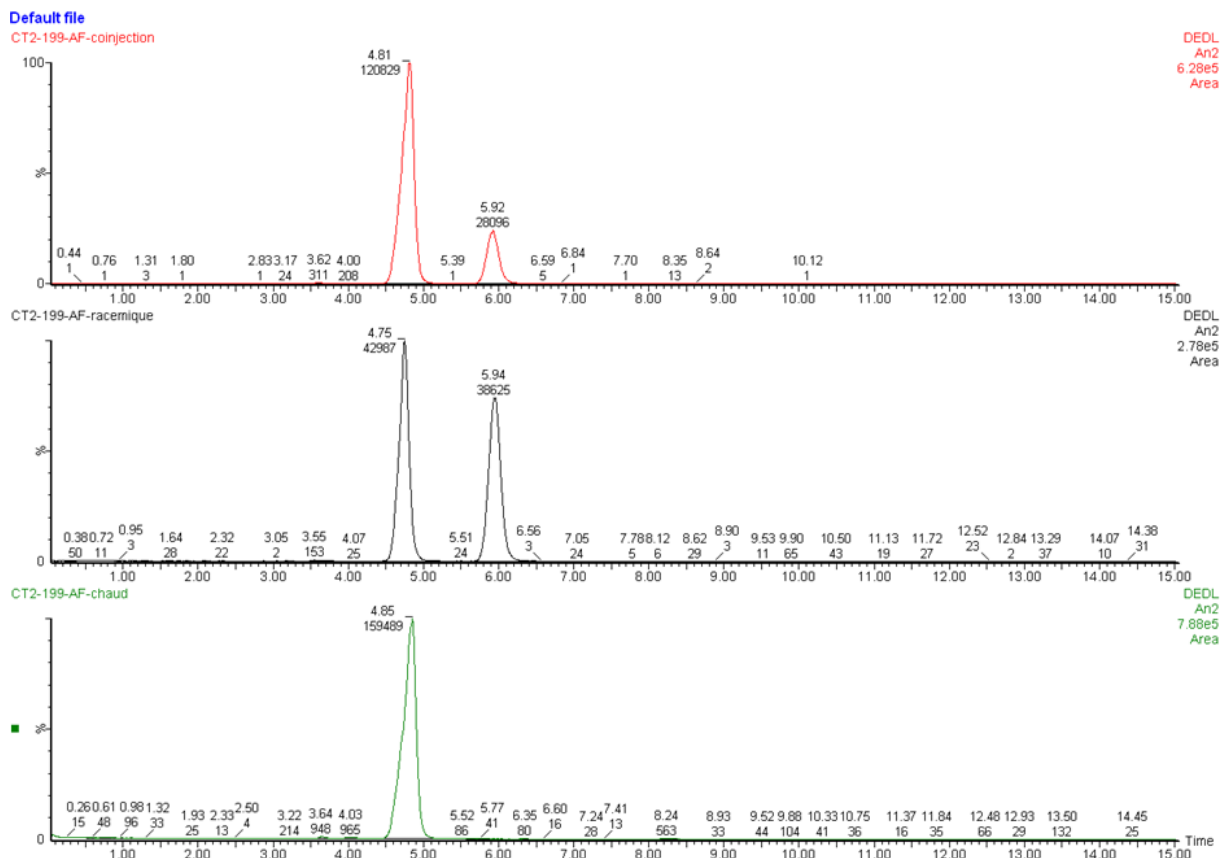
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (13 mg; 59% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 2.37 – 2.44 (m, 1.8H), 2.07 (t, *J* = 7.32 Hz, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 177.9, 175.3, 30.9, 26.8



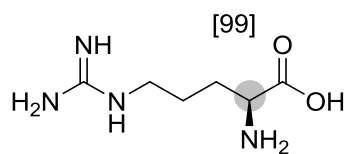
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **61**



HPLC chromatograms of **61**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **61** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

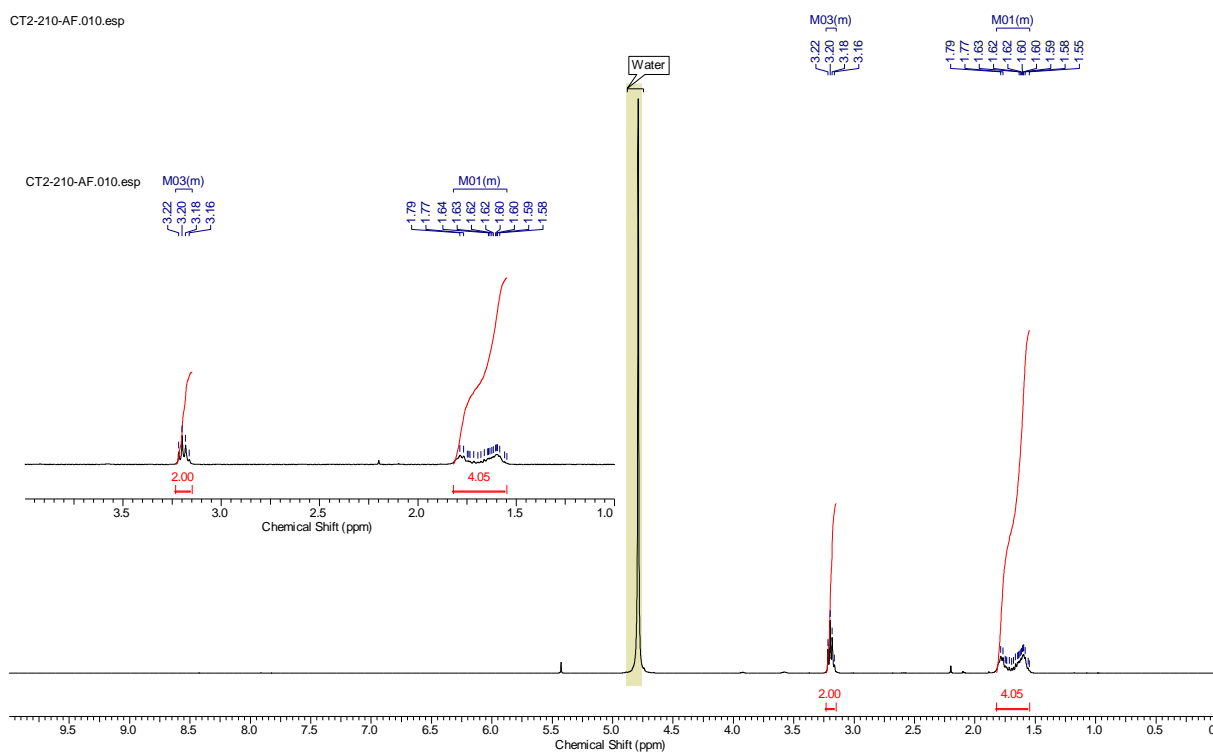
## L-Arginine 62:



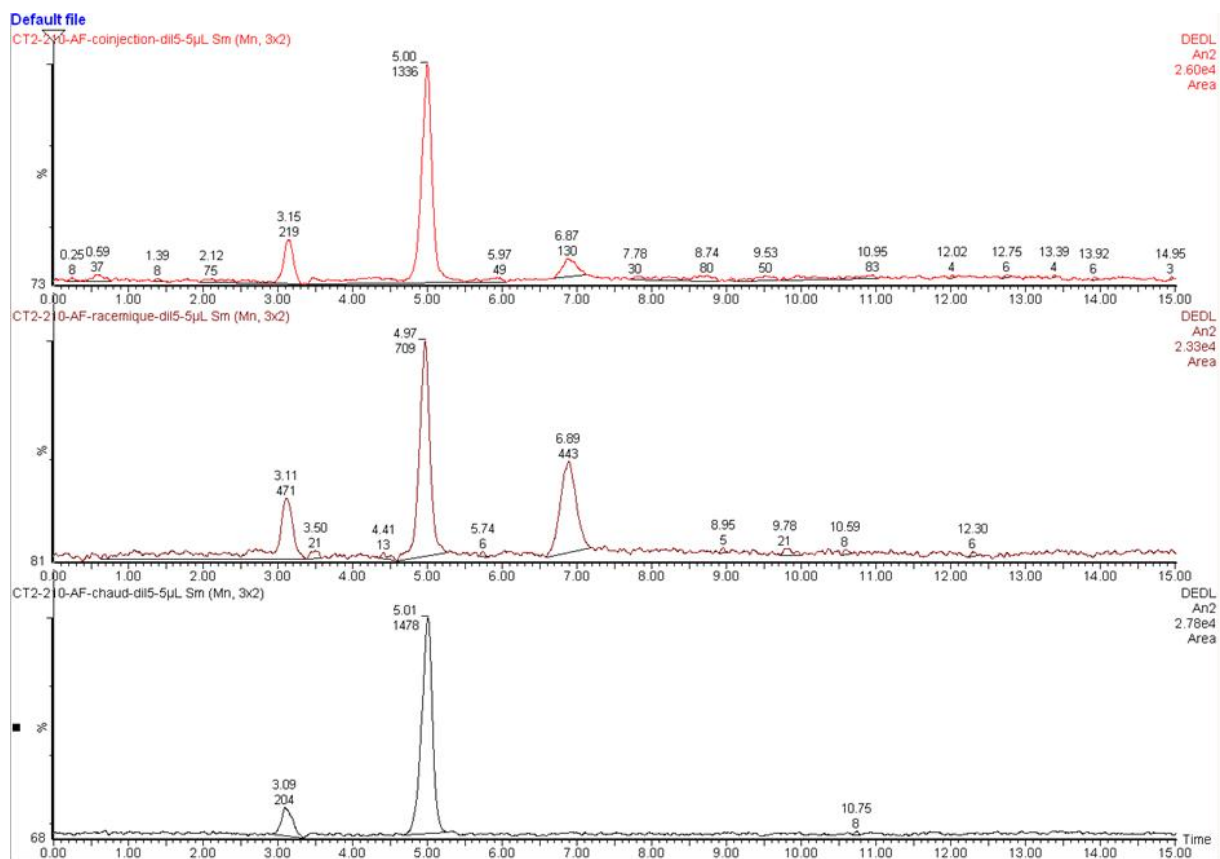
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (15 mg; 68% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.15 – 3.23 (m, 2H), 1.55 – 1.82 (m, 4H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  160.9, 156.8, 40.7, 29.1, 24.1



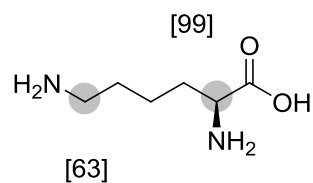
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **62**



HPLC chromatograms of **62**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **62** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

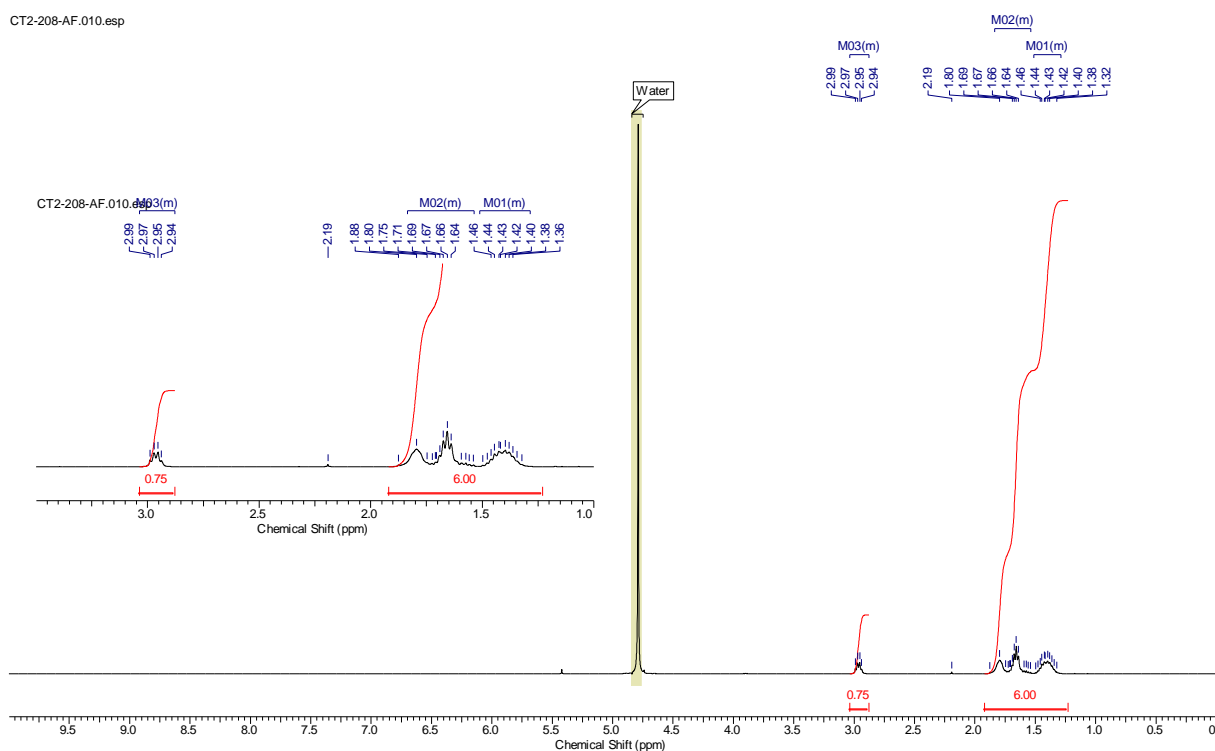
## L-Lysine 63:



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (18 mg; 82% yield).

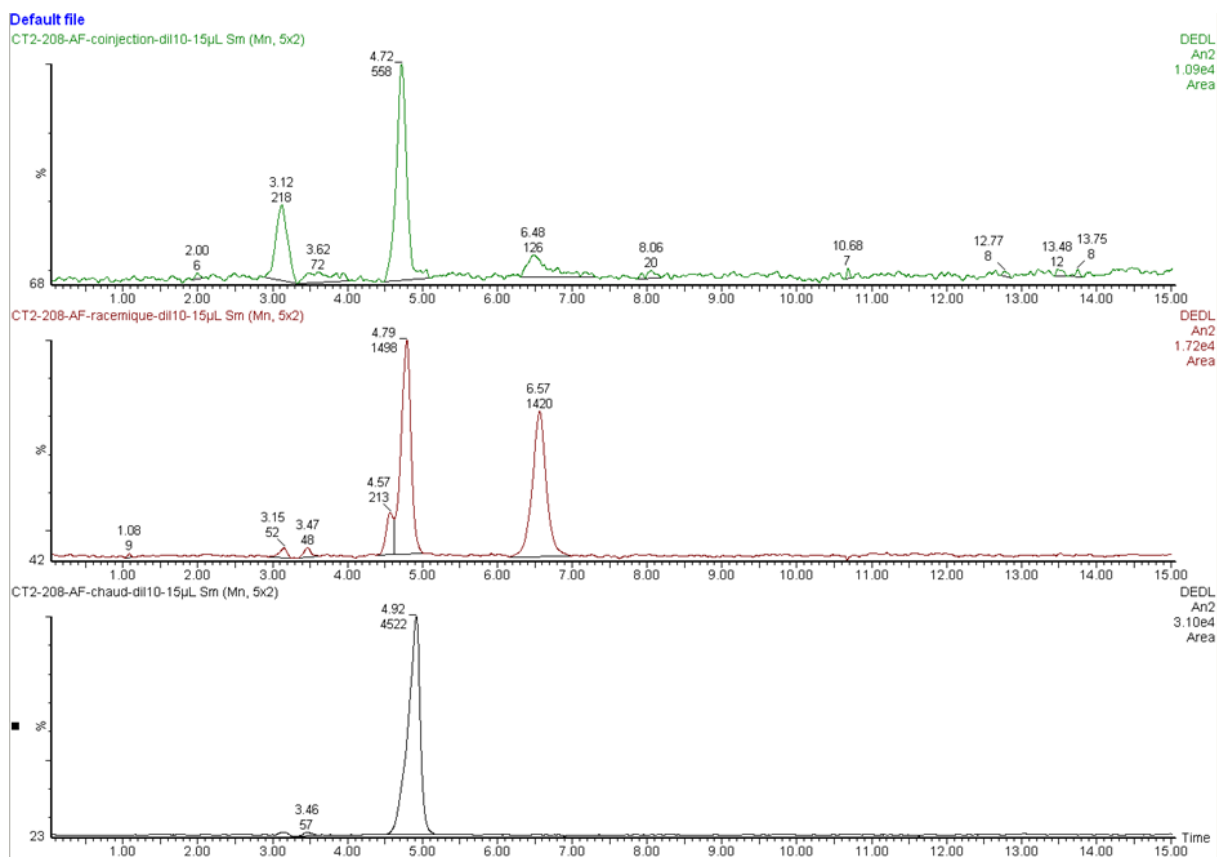
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  2.88 – 3.04 (m, 0.75H), 1.54 – 1.84 (m, 4H), 1.29 – 1.51 (m, 2H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  38.9, 32.3, 31.1, 26.5, 21.6



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **63**

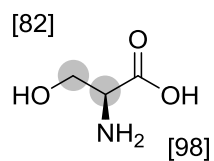




HPLC chromatograms of **63**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **63** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

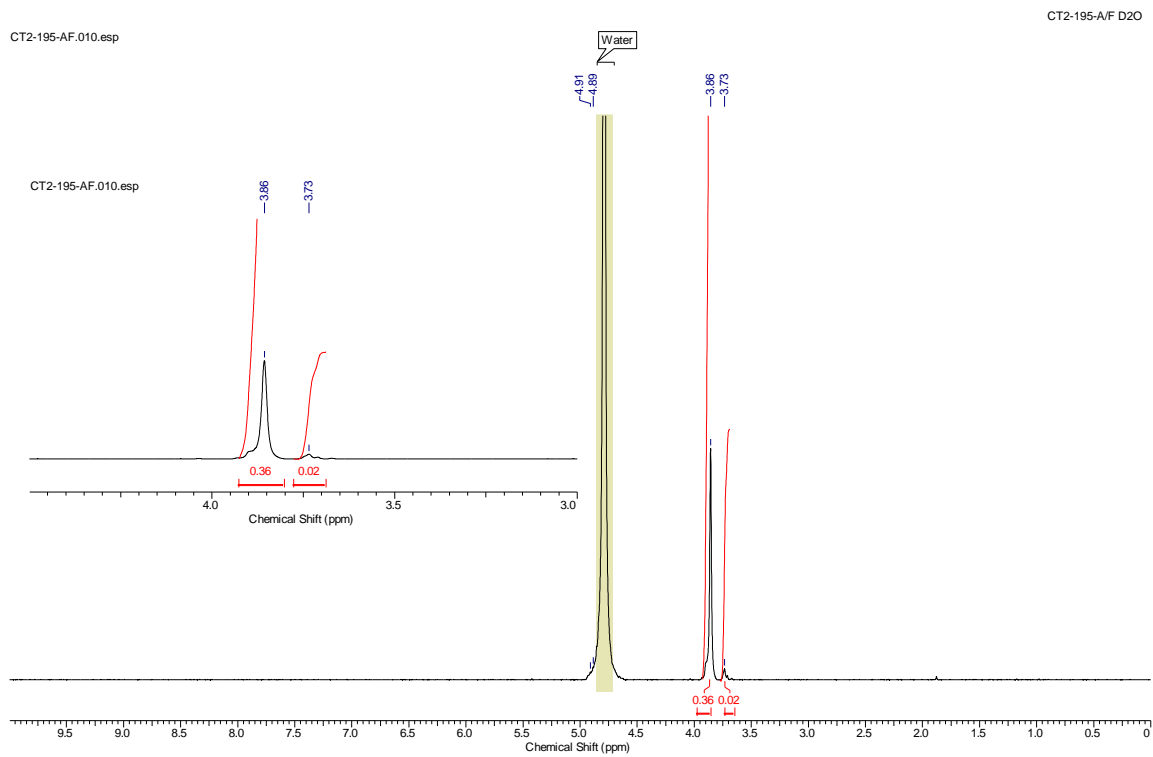
## L-Serine 64:



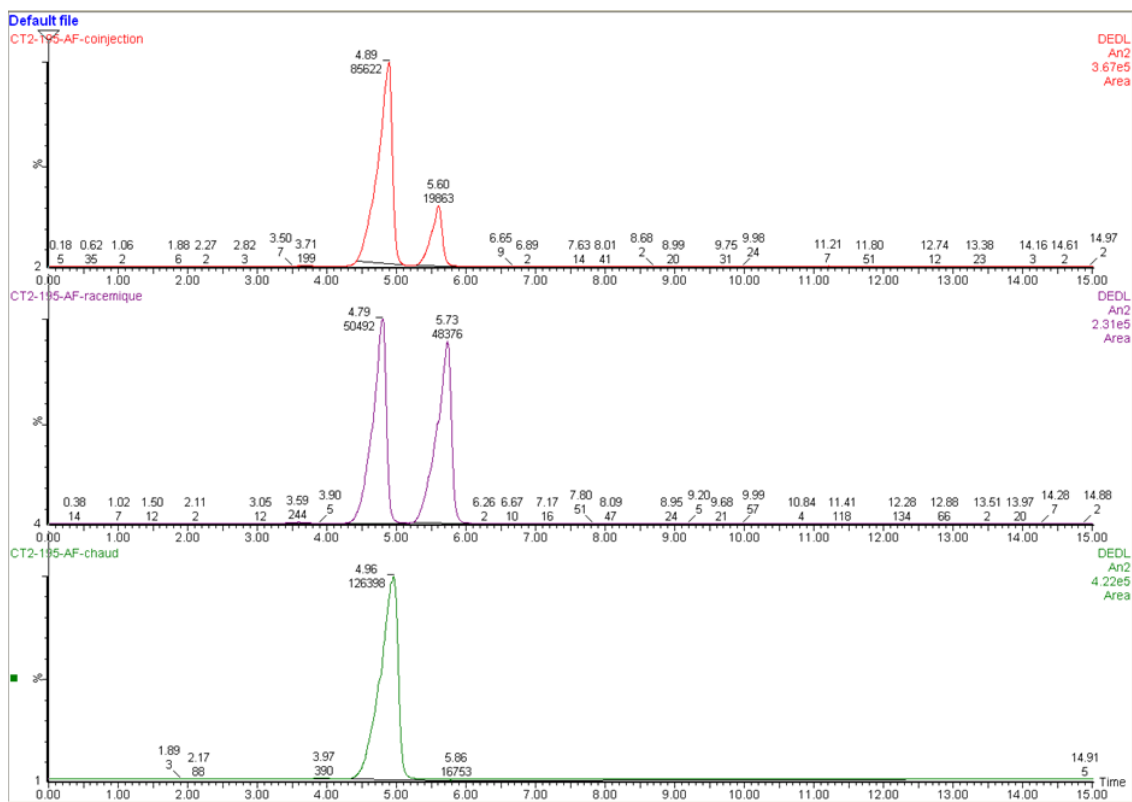
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (16 mg; 99% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.86 (br. s., 0.36H), 3.73 (br. s., 0.02H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 173.5, 60.4



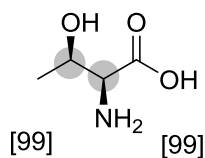
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **64**



HPLC chromatograms of **64**: coinjection (top), racemic mixture (middle) and **64** (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 20:80:0.02

## L-Threonine 65:

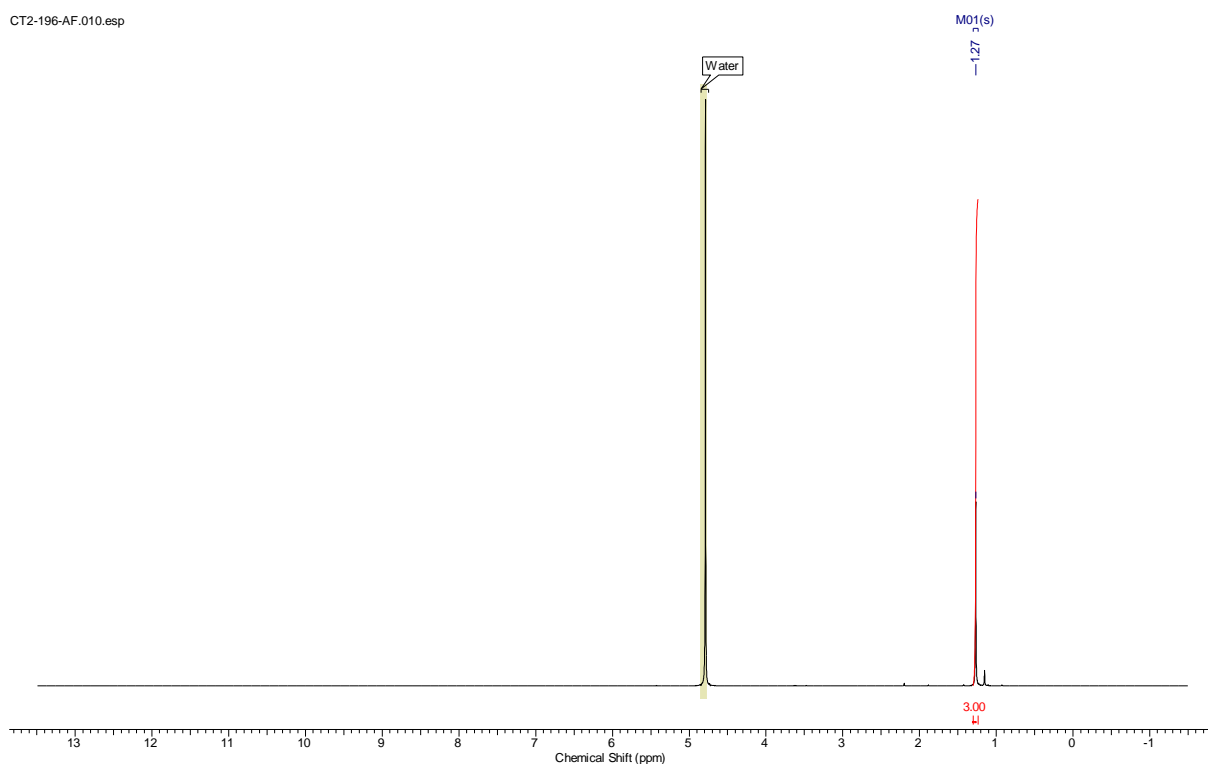


After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (13 mg; 72% yield).

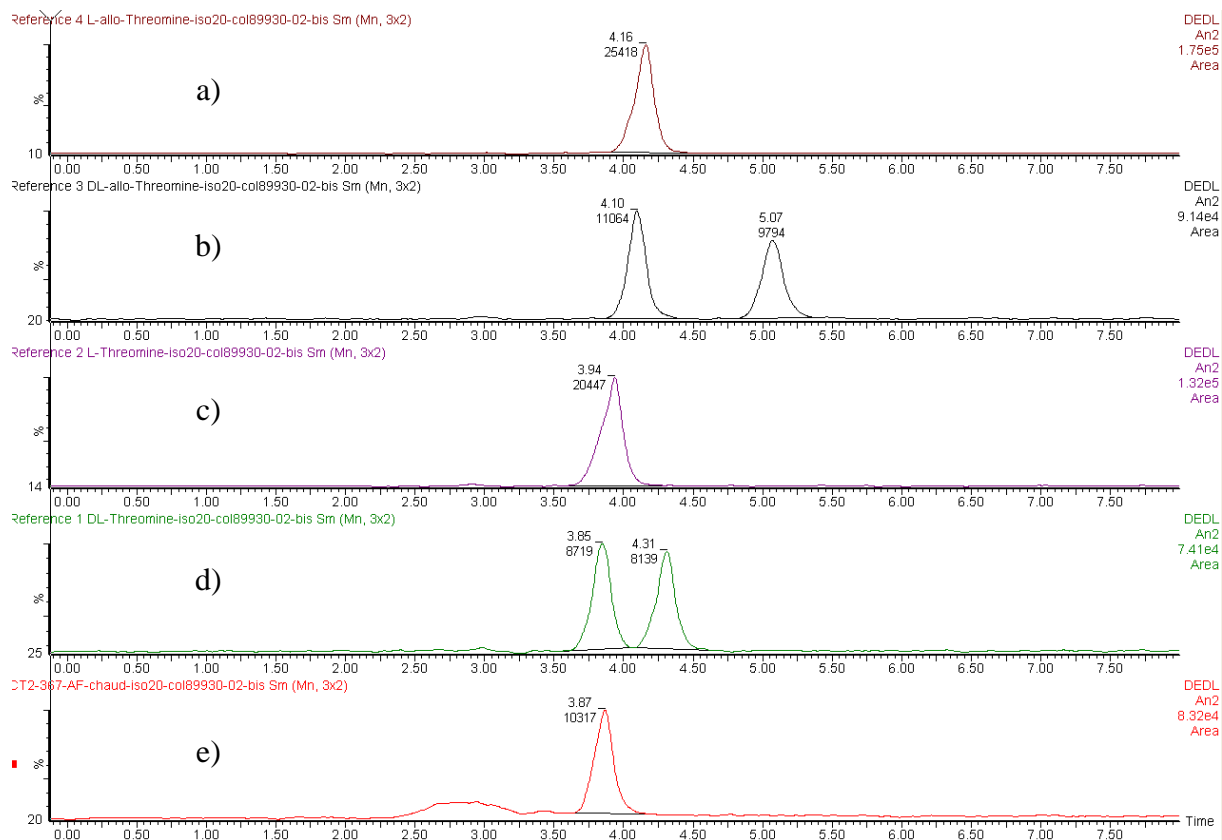
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 1.27 (s, 3H)**

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 19.2**

CT2-196-AF.010.esp



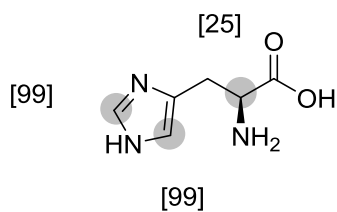
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **65**



HPLC chromatograms of **65**: a) commercially available L-allo-Threonine, b) D,L-allo-Threonine, c) L-Threonine, d) D,L-Threonine and e) **65**.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 20:80:0.02

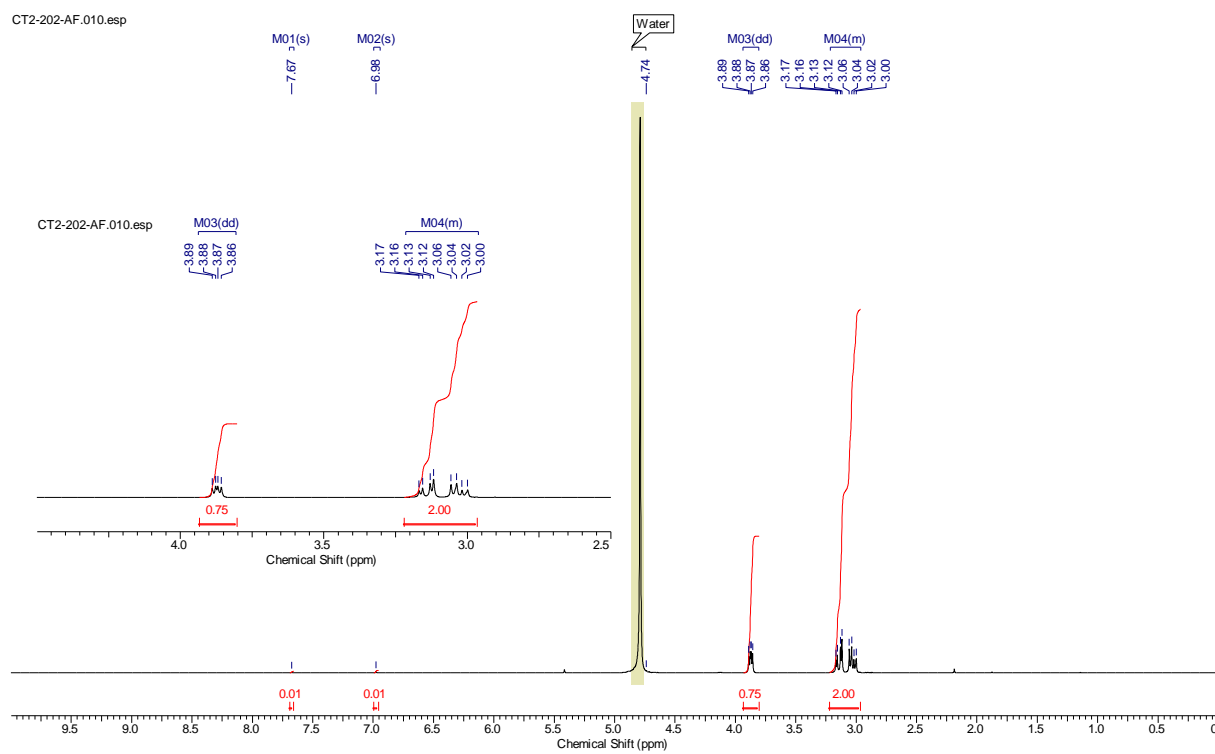
## L-Histidine 66:



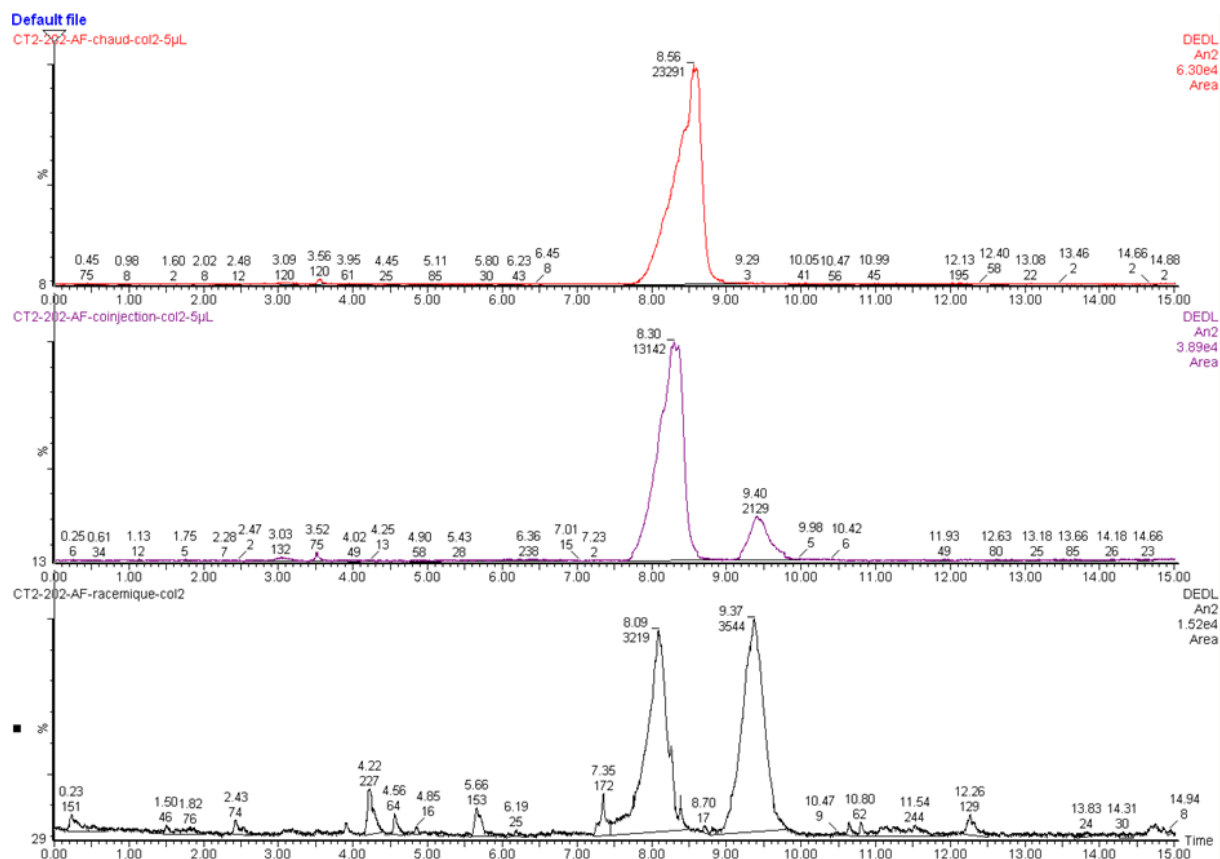
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (20 mg; 87% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.67 (s, 0.01H), 6.98 (s, 0.01H), 3.87 (dd,  $J = 4.85, 7.96$  Hz, 0.75H), 2.98 – 3.20 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  175.1, 132.2, 55.0, 28.7



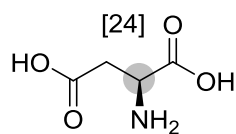
$^1\text{H NMR}$  spectrum of 66



HPLC chromatograms of **66: 66** (top), coinjection (middle) and racemic mixture (bottom).

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 25:75:0.02

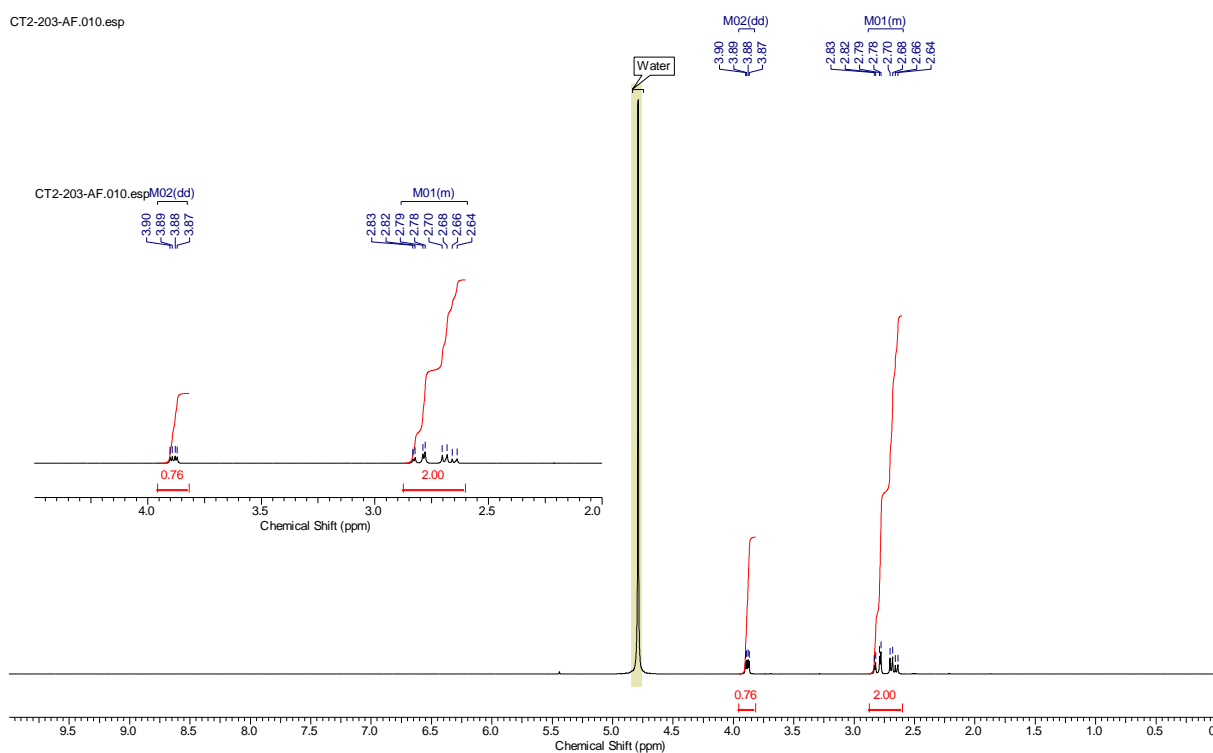
## L-Aspartic acid **67**:



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a brown solid (19 mg; 95% yield).

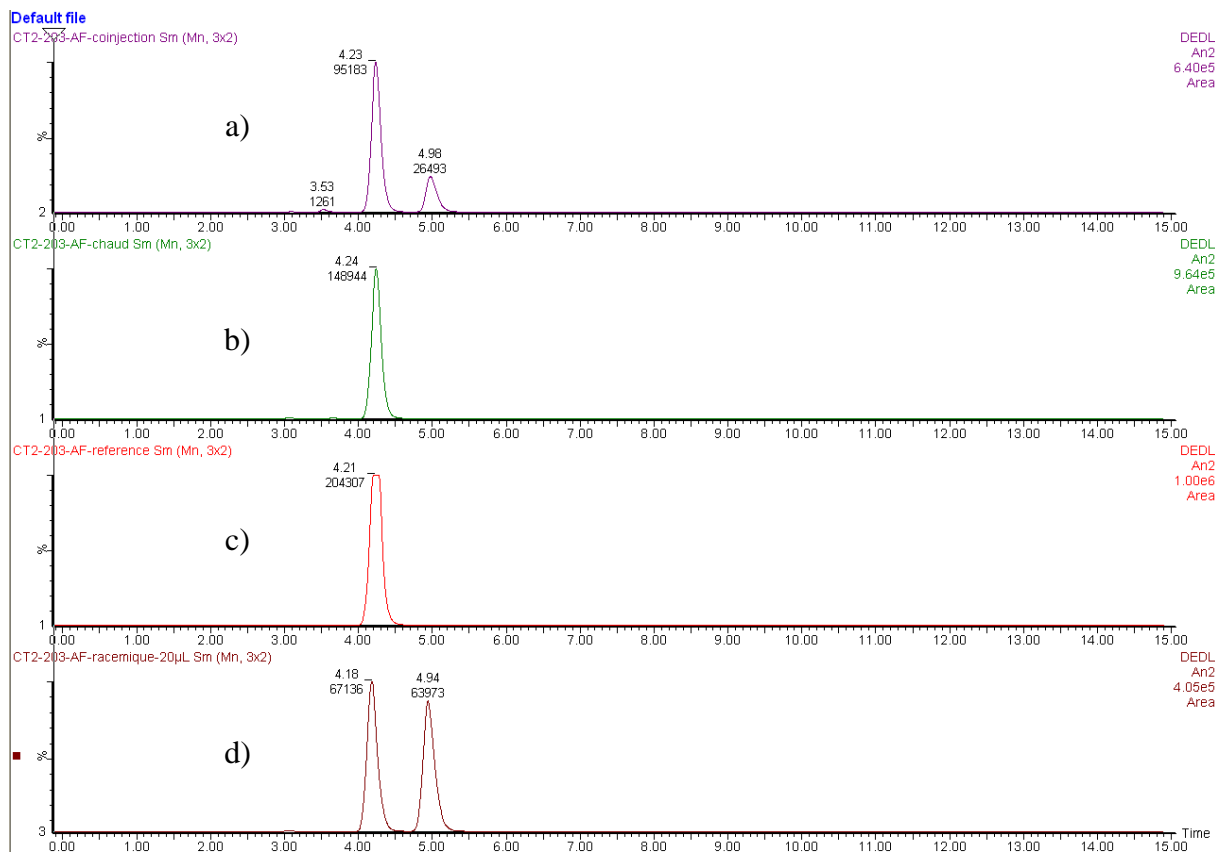
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.89 (dd, *J* = 3.75, 8.69 Hz, 0.76H), 2.59 – 2.88 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 177.4, 174.2, 52.2, 36.5



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **67**

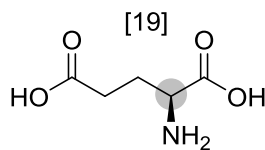




HPLC chromatograms of **67**: a) coinjection, b) **67**, c) commercially available aspartic acid and d) racemic mixture.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

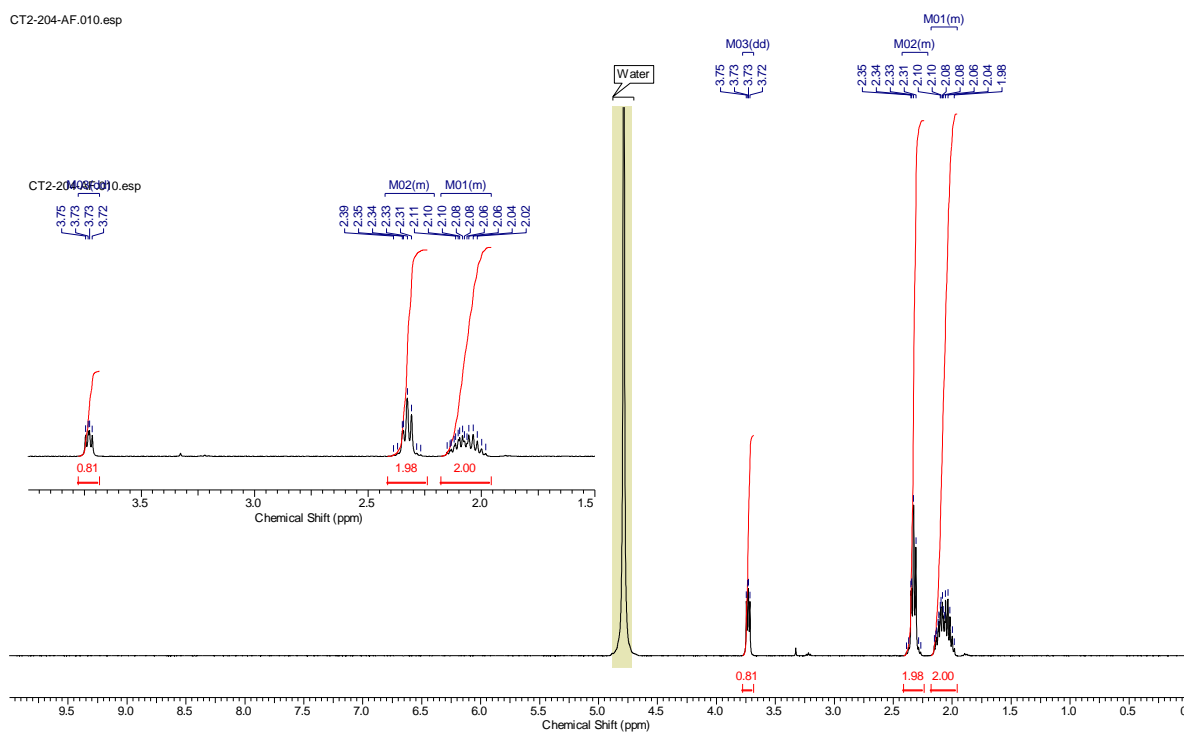
## L-Glutamic acid **68**:



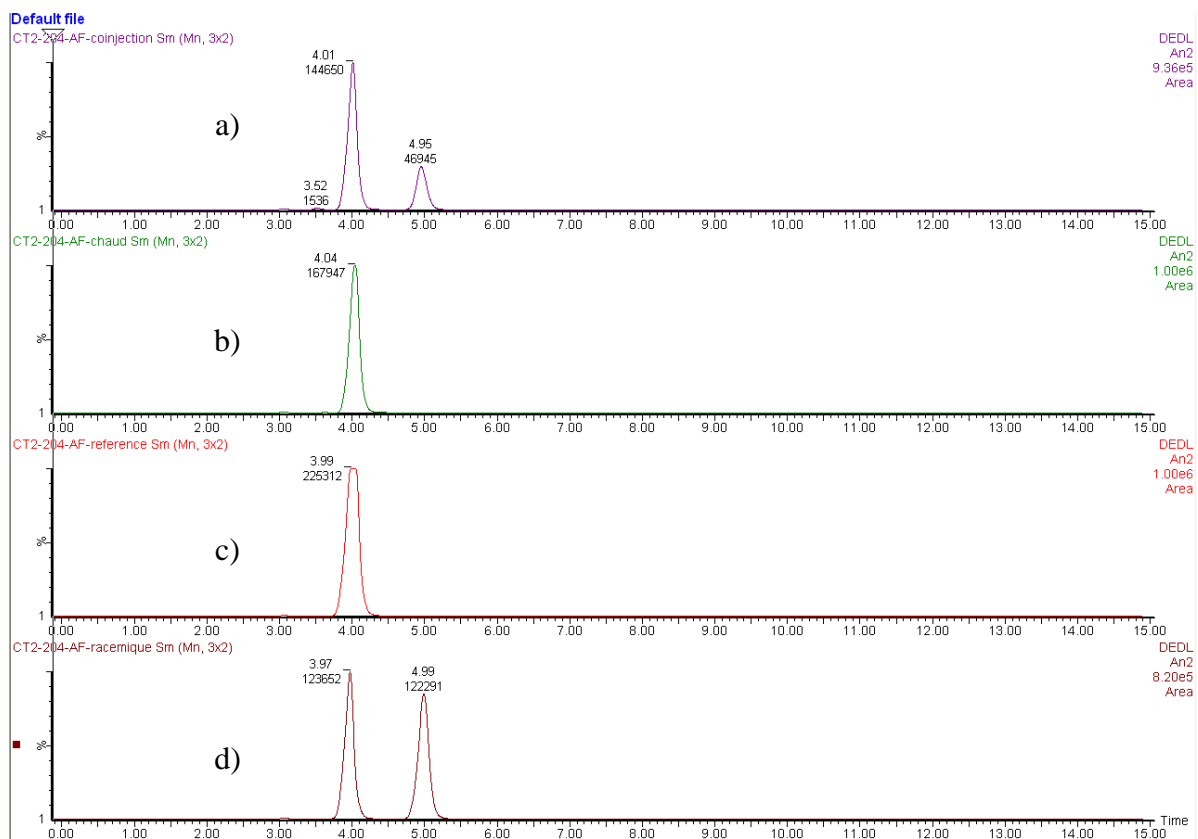
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (15 mg; 68% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.73 (dd, *J* = 4.85, 7.04 Hz, 0.81H), 2.27 – 2.39 (m, 2H), 1.98 – 2.15 (m, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 181.3, 174.6, 54.6, 33.5, 27.0



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **68**



HPLC chromatograms of **68**: a) coinjection), b) **68**, c) commercially available L-glutamic acid and d) racemic mixture.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02

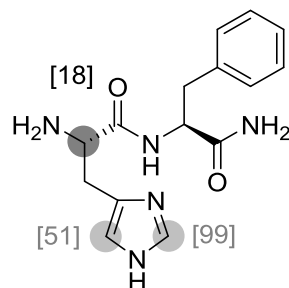
**Data of mass analysis for compounds 55 to 68**

<b>Compound</b>	$M_0$	$M_{+1}$	$M_{+2}$	$M_{+3}$	$M_{+4}$	$M_{+5}$
<b>55</b>	4.5	<b>93.2</b>	1.3	1.0		
<b>56</b>	6.5	<b>87.8</b>	4.3	1.4		
<b>57</b>	3.7	<b>95.1</b>	1.1			
<b>58</b>	22.6	<b>74.4</b>	2.3	0.7		
<b>59</b>	0.9	1.1	25.0	<b>65.0</b>	7.1	0.8
<b>60</b>	8.6	<b>77.1</b>	12.6	1.7		
<b>61</b>	1.0	<b>79.2</b>	16.9	2.8		
<b>62</b>	12.4	<b>84.3</b>	2.3	0.9		
<b>63</b>	1.1	14.3	38.5	<b>39.3</b>	5.7	1.1
<b>64</b>	2.2	4.3	42.9	<b>47.0</b>	0.7	2.9
<b>65</b>	2.0	2.1	<b>89.8</b>	2.5	1.7	2.0
<b>66</b>	0.4	4.4	<b>70.2</b>	22.0	2.8	0.2
<b>67</b>	<b>71.4</b>	25.8	2.9			
<b>68</b>	<b>81.2</b>	17.6	1.2			

**Table S5:** Relative amount in percent of the non-deuterated ( $M_0$ ) and deuterated ( $M_{(0+x)}$ ) isotopologues for compounds **55** to **68**.

## Experimental details and characterization for compounds 69 to 72:

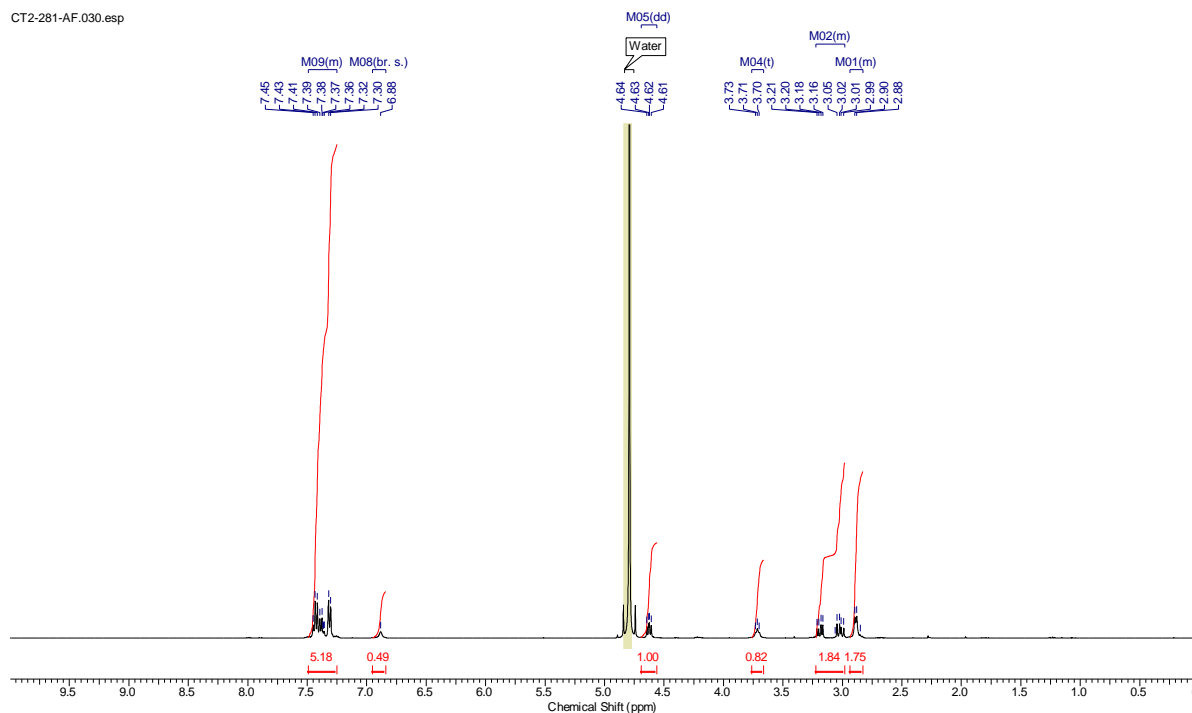
### His-Phe peptide amide 69:



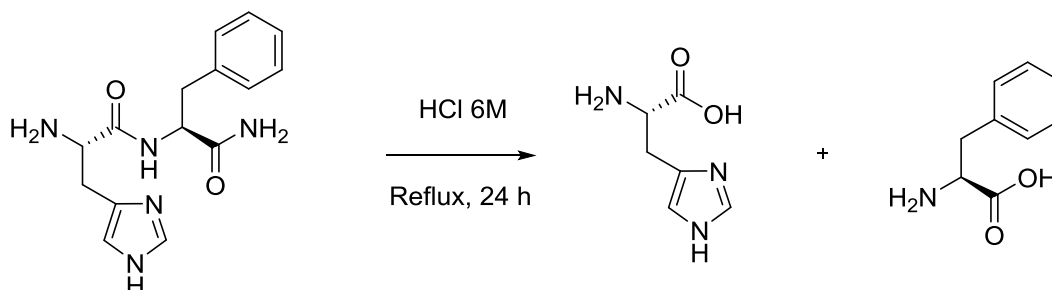
A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP (8 mg, 5%) and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.09 mmol, 28 mg) in D<sub>2</sub>O (2 mL) was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at 55°C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> (2 bar) during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL). After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (5 mg; 18% yield).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 7.25 – 7.49 (m, 5H), 6.88 (br. s., 0.49H), 4.63 (dd, *J* = 6.22, 8.60 Hz, 1H), 3.71 (t, *J* = 5.95 Hz, 0.82H), 2.98 – 3.22 (m, 2H), 2.83 – 2.94 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 175.6, 136.5, 129.2, 128.8, 127.2, 54.5, 37.1

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **69**

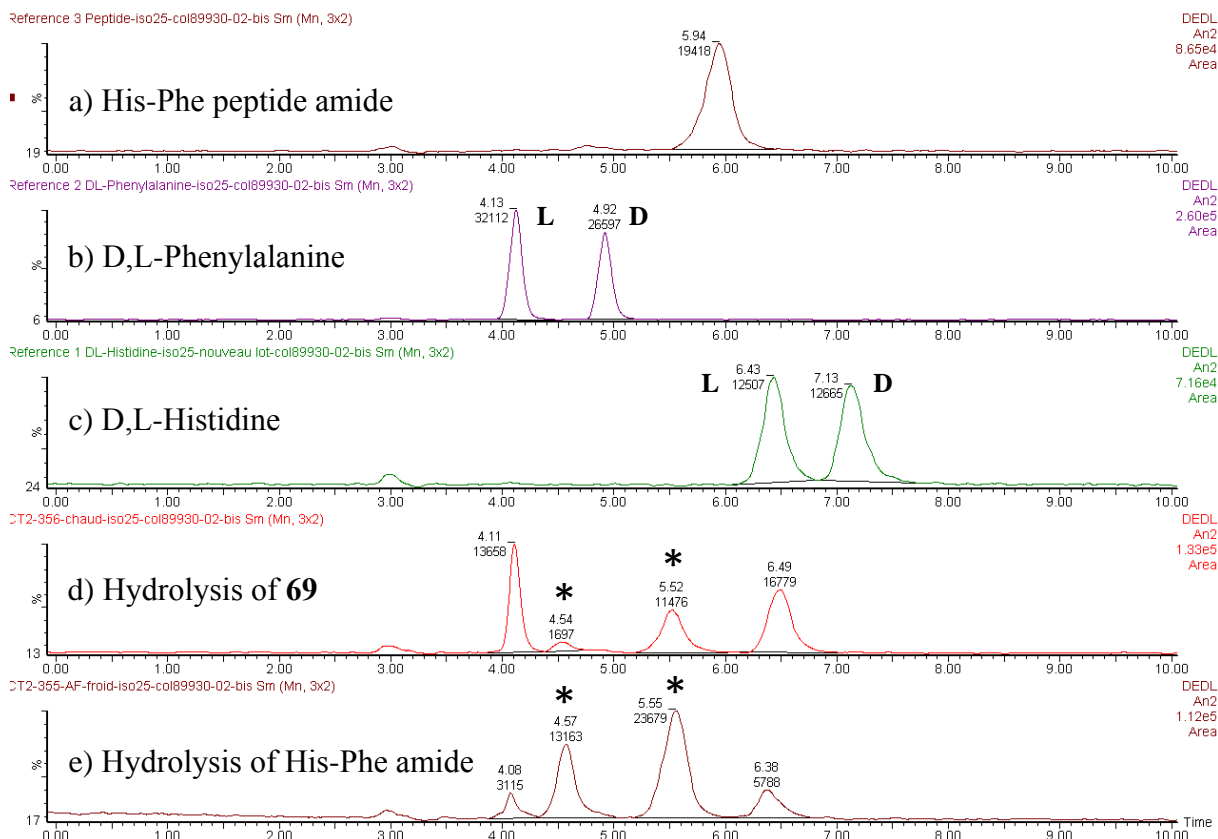
### Chromatographic separation of aminoacids after hydrolysis of peptides:



Commercially available His-Phe peptide amide  
or His-Phe peptide amide **69**

For the hydrolysis of commercially available His-Phe peptide amide: 0.06 mmol of the peptide (20 mg) were heated with 4 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (8 mg).

For the hydrolysis of His-Phe peptide amide **69**: 0.06 mmol of the peptide (18 mg) were heated with 4 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (6 mg).

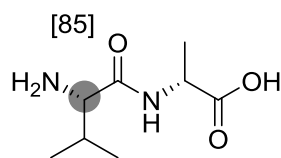


\*Presence of residual His-Phe peptide amide

HPLC chromatograms: a) commercially available His-Phe peptide amide, b) reference D,L-Phenylalanine, c) reference D,L-Histidine, d) aminoacids of His-Phe amide **69** after hydrolysis and e) aminoacids of His-Phe amide after hydrolysis.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 25:75:0.02, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>

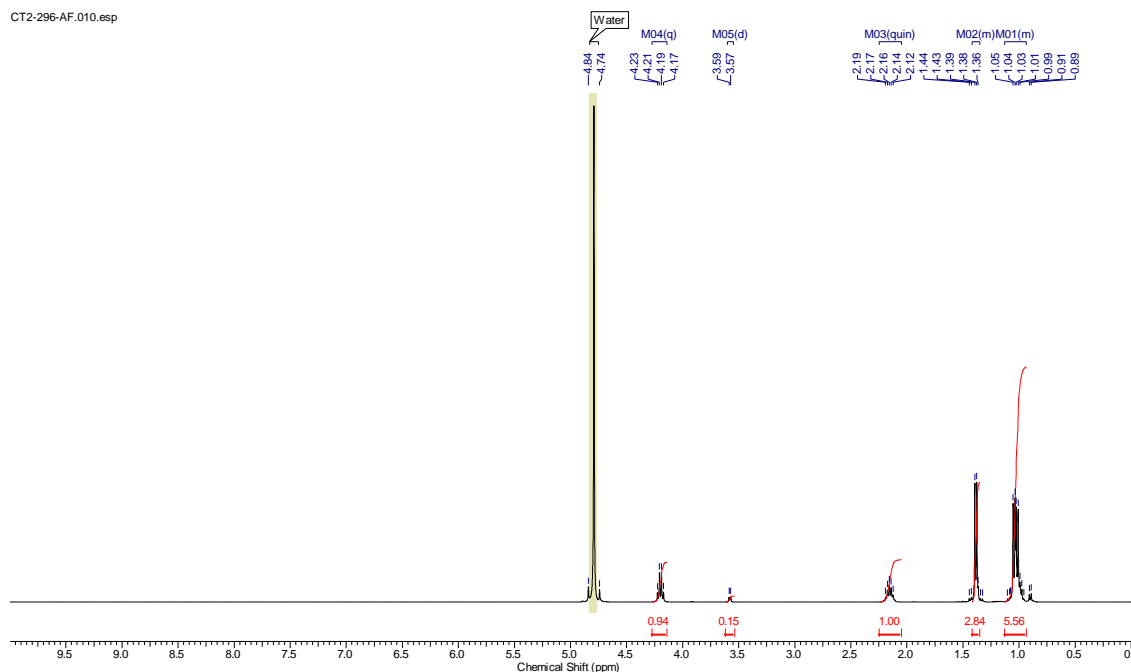
## Val-Ala 70:



A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP (16 mg, 6%) and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.15 mmol, 28 mg) in D<sub>2</sub>O (2 mL) was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at 55°C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> (2 bar) during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL). After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (22 mg; 79% yield).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4.20 (q, *J* = 7.32 Hz, 1H), 3.58 (d, *J* = 5.85 Hz, 0.85H), 2.16 (quin, *J* = 6.72 Hz, 1H), 1.35 – 1.42 (m, 3H), 0.93 – 1.13 (m, 6H)

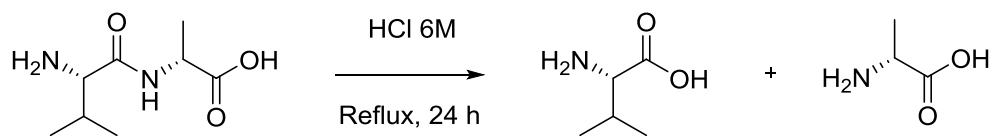
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 179.8, 172.5, 59.7, 51.2, 30.9, 18.3, 17.6, 16.9



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **70**



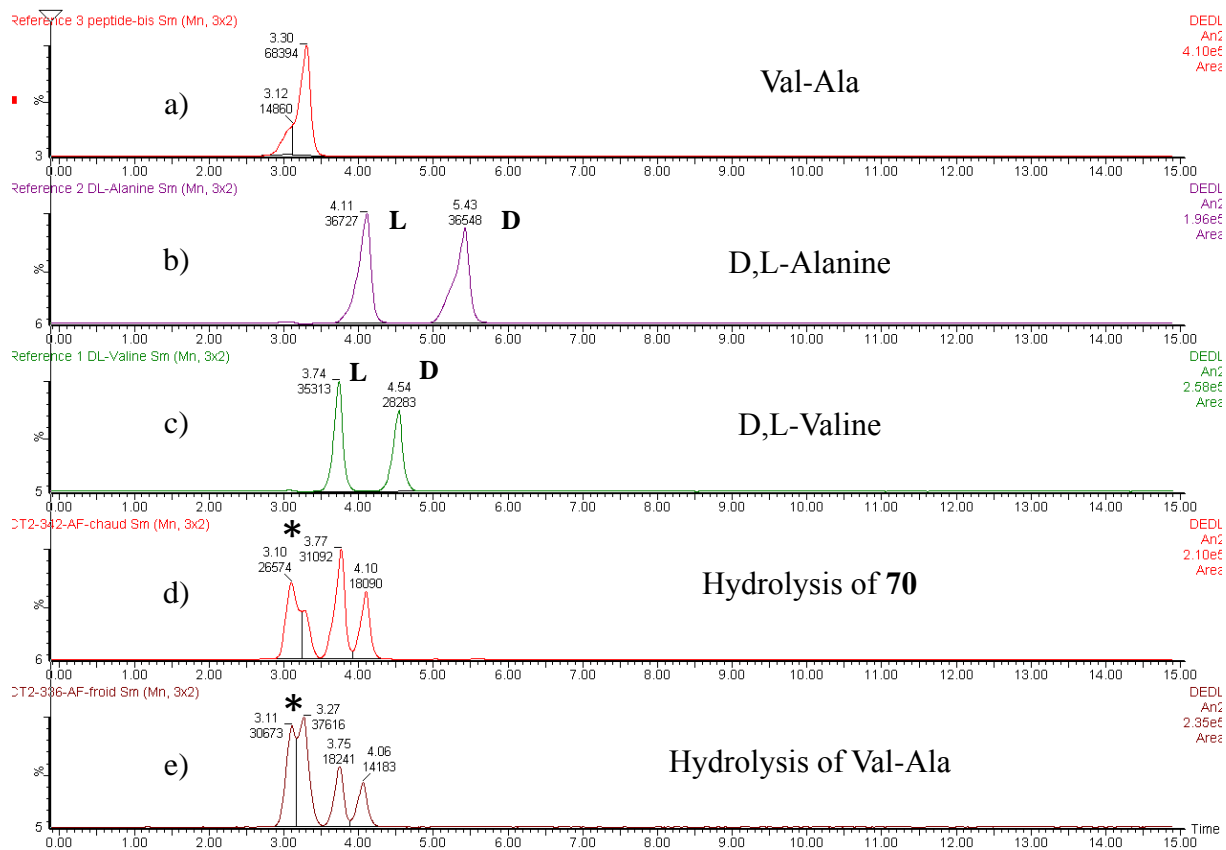
### Chromatographic separation of aminoacids after hydrolysis of peptides:



Commercially available Val-Ala  
or Val-Ala **70**

For the hydrolysis of commercially available Val-Ala peptide: 0.05 mmol of the peptide (9 mg) were heated with 2 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (5 mg).

For the hydrolysis of Val-Ala **70**: 0.12 mmol of the peptide (22 mg) were heated with 2 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (14 mg).

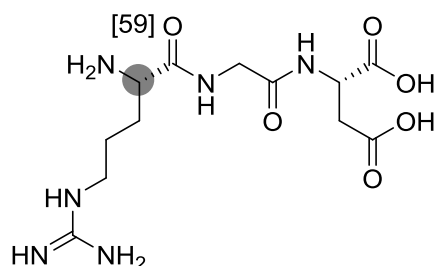


\*Presence of residual Val-Ala peptide

HPLC chromatograms: a) commercially available Val-Ala peptide, b) reference D,L-Alanine, c) reference D,L-Valine, d) aminoacids of Val-Ala **70** after hydrolysis and e) aminoacids of Val-Ala after hydrolysis.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>

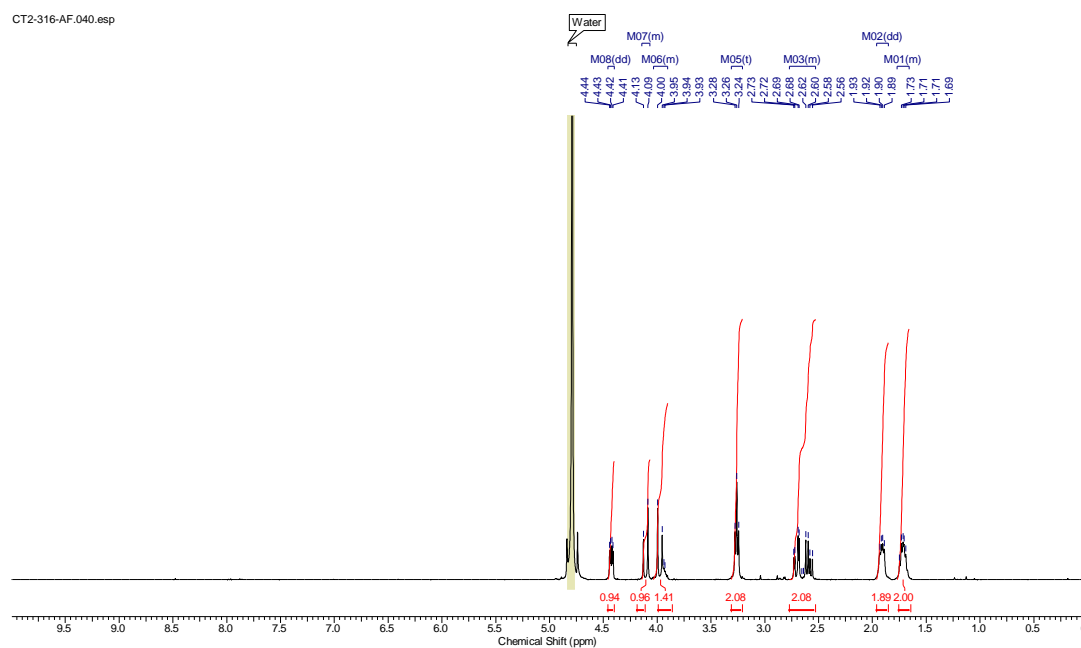
## Arg-Gly-Asp 71:



A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP (8 mg, 6%) and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.075 mmol, 26 mg) in D<sub>2</sub>O (2 mL) was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at 55°C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> (2 bar) during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL). After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (11 mg; 42% yield).

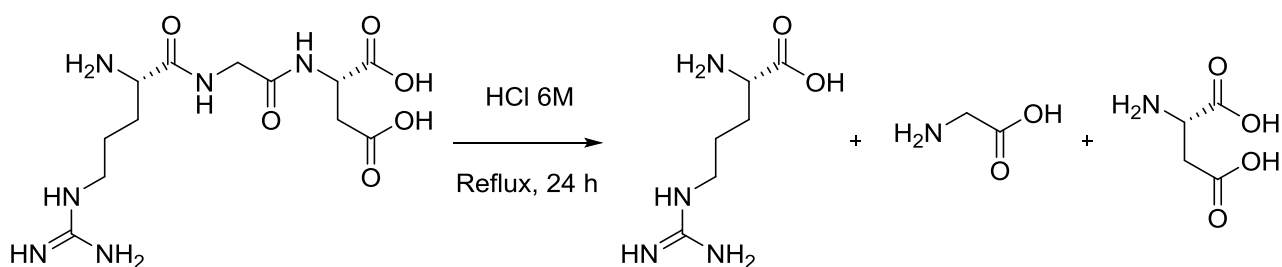
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4.43 (dd, *J* = 4.03, 8.78 Hz, 1H), 4.07 – 4.14 (m, 1H), 3.90 – 4.03 (m, 1.41H), 3.26 (t, *J* = 6.77 Hz, 2H), 2.53 – 2.77 (m, 2H), 1.91 (dd, *J* = 5.21, 10.34 Hz, 2H), 1.66 – 1.77 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 179.0, 178.4, 170.2, 157.0, 53.0, 42.6, 40.7, 39.6, 29.2, 23.8



<sup>1</sup>H NMR spectrum of **71**

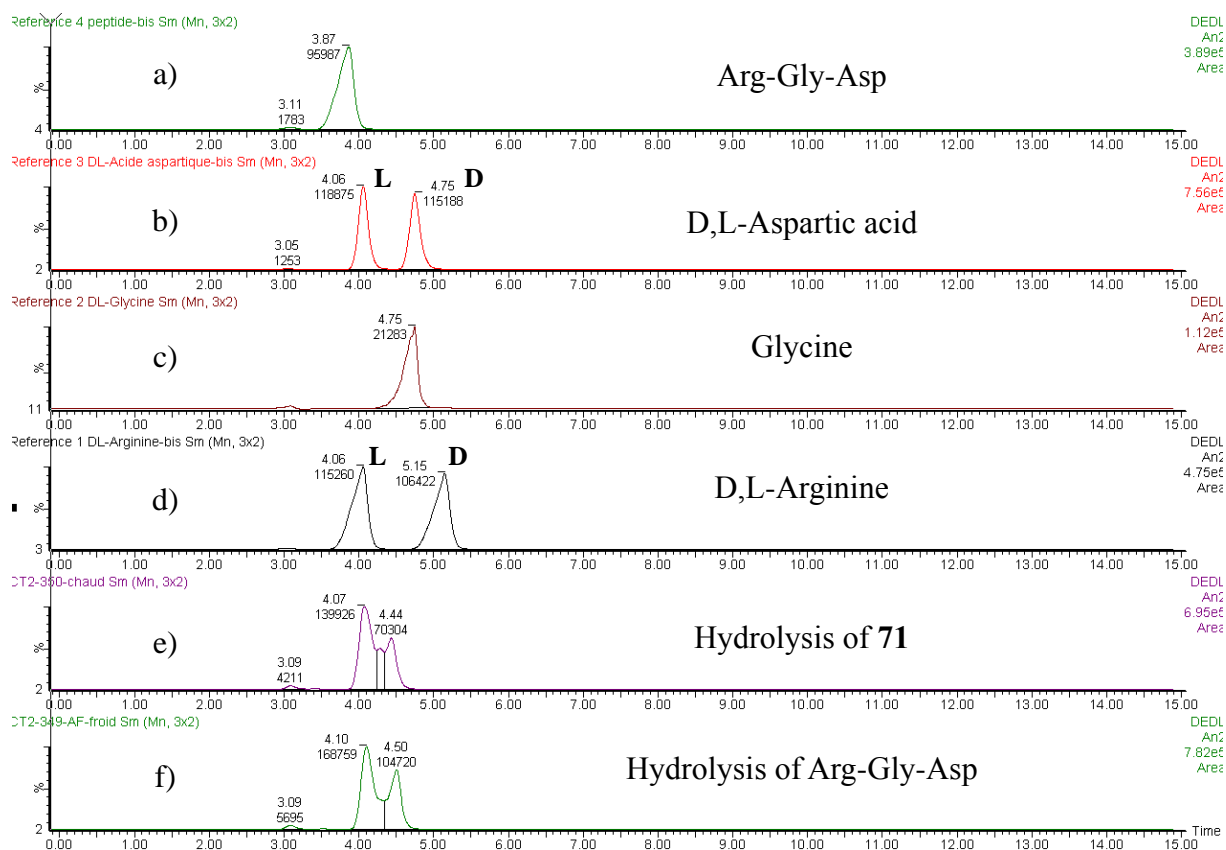
### Chromatographic separation of aminoacids after hydrolysis of peptides:



Commercially available Arg-Gly-Asp  
or Arg-Gly-Asp **71**

For the hydrolysis of commercially available Arg-Gly-Asp peptide: 0.012 mmol of the peptide (4 mg) were heated with 1 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (2 mg).

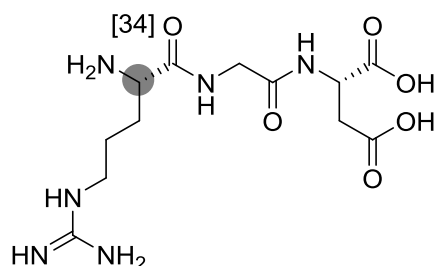
For the hydrolysis of Arg-Gly-Asp **71**: 0.012 mmol of the peptide (4 mg) were heated with 1 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (2 mg).



HPLC chromatograms: a) commercially available Arg-Gly-Asp peptide, b) reference D,L-Aspartic acid, c) reference Glycine, d) reference D,L-Arginine, e) aminoacids of Arg-Gly-Asp **71** after hydrolysis and f) aminoacids of Arg-Gly-Asp after hydrolysis.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>

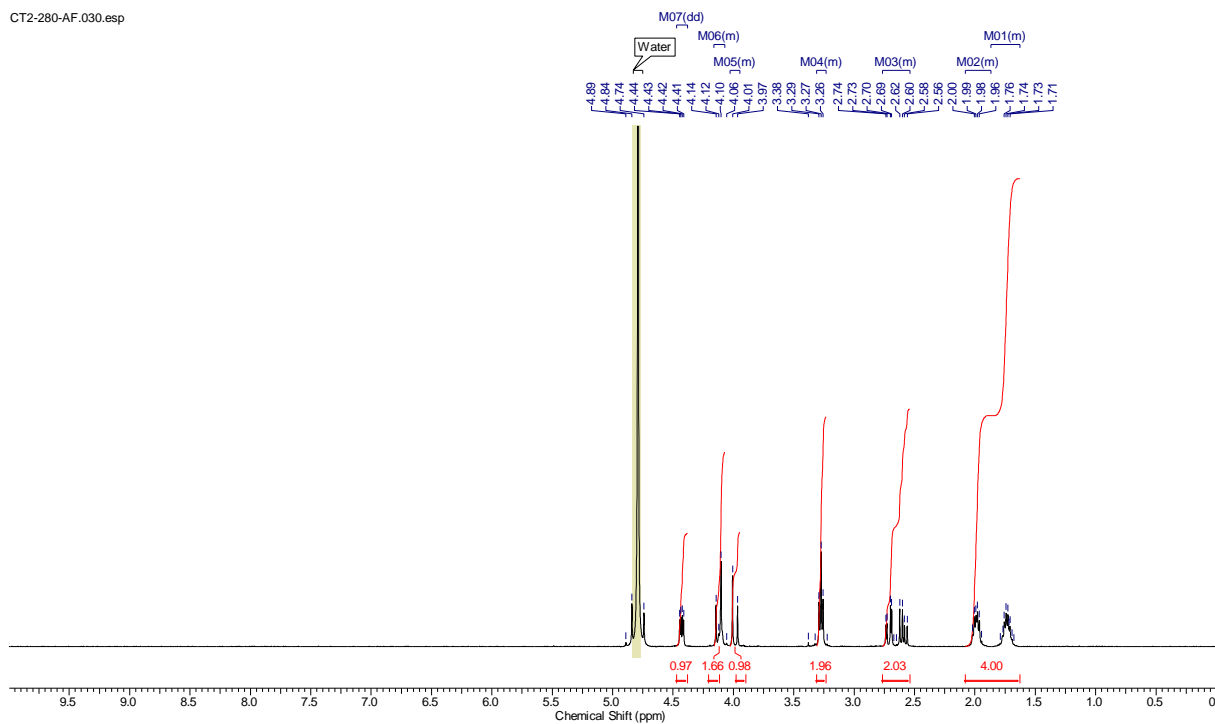
### Arg-Gly-Asp 71':



A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP (8 mg, 3%) and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.15 mmol, 52 mg) in D<sub>2</sub>O (4 mL) was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at 55 °C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> (2 bar) during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL). After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (16 mg; 31% yield).

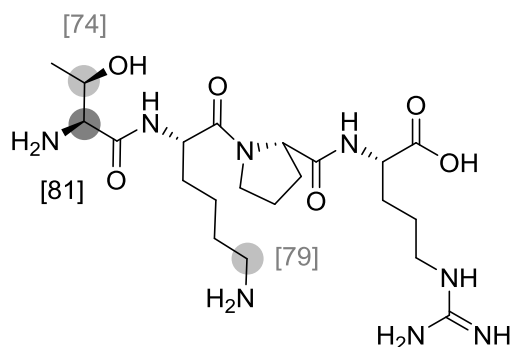
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4.43 (dd, *J* = 4.12, 8.87 Hz, 1H), 4.07 - 4.16 (m, 1.66H), 3.95 - 4.03 (m, 1H), 3.23 - 3.31 (m, 2H), 2.54 - 2.77 (m, 2H), 1.87 - 2.08 (m, 2H), 1.63 - 1.87 (m, 2H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 179.0, 178.3, 170.2, 156.9, 53.7, 53.0, 42.5, 40.7, 39.5, 29.8, 23.9



<sup>1</sup>H NMR spectrum of 71'

## Tuftsia 72:

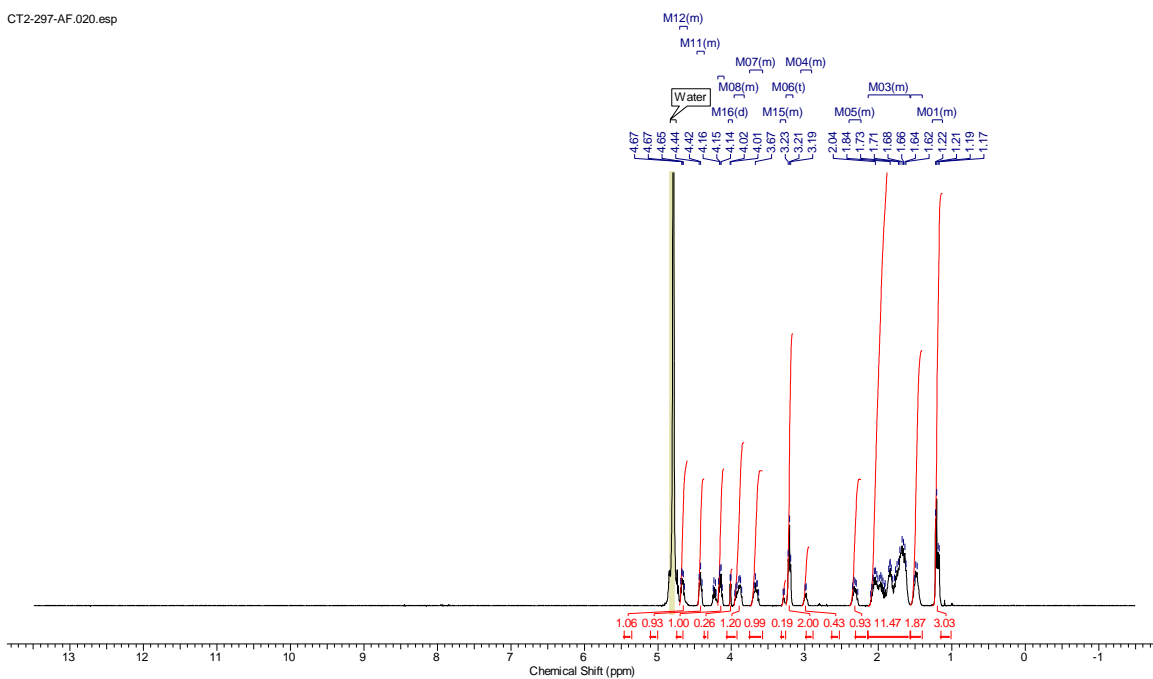


A 100 mL Fischer–Porter glassware was charged with RuNp@PVP (8 mg, 9%) and a magnetic stirrer in a glove box under argon. The Fischer–Porter glassware was then left under vacuum for 5 min and pressurized with D<sub>2</sub> gas (3 bars) during 2 hours. A solution of the substrate (0.05 mmol, 28 mg) in D<sub>2</sub>O (2 mL) was added under argon. The reaction mixture was magnetically stirred at 55°C (oil bath) under pressure of D<sub>2</sub> (2 bar) during 36 hours. Then the solution was cooled down at room temperature and collected with a syringe before being treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%, 20 mL). After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (9 mg; 32% yield).

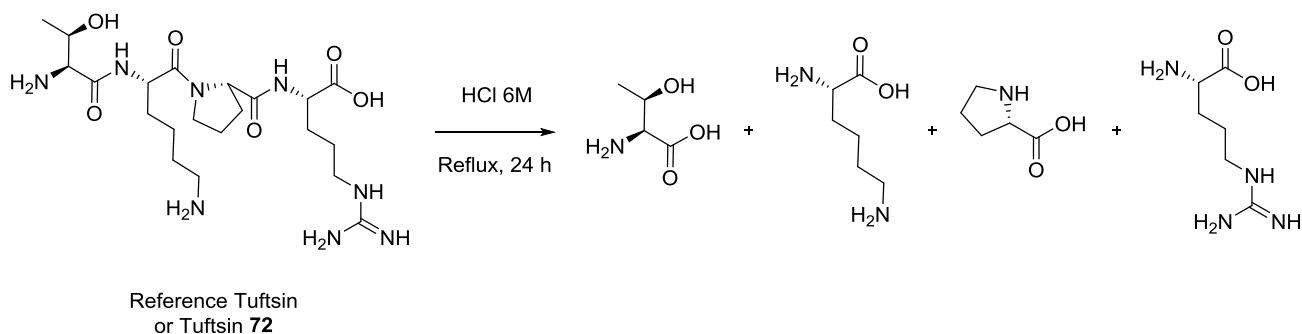
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 4.60 – 4.70 (m, 1H), 4.37 – 4.47 (m, 1H), 4.10 – 4.19 (m, 1H), 4.01 (d, *J* = 3.66 Hz, 0.26H), 3.83 – 3.96 (m, 1H), 3.57 – 3.75 (m, 1H), 3.26 – 3.33 (m, 0.19H), 3.21 (t, *J* = 6.68 Hz, 2H), 2.91 – 3.06 (m, 0.43H), 2.24 – 2.40 (m, 1H), 1.57 – 2.14 (m, 11H), 1.40 – 1.56 (m, 2H), 1.13 – 1.27 (m, 3H)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ 178.5, 174.4, 173.4, 172.1, 163.8, 160.8, 156.8, 60.8, 54.8, 51.4, 48.1, 40.7, 30.0, 29.4, 28.9, 26.3, 24.8, 24.6, 21.8, 21.7, 19.0, 18.7



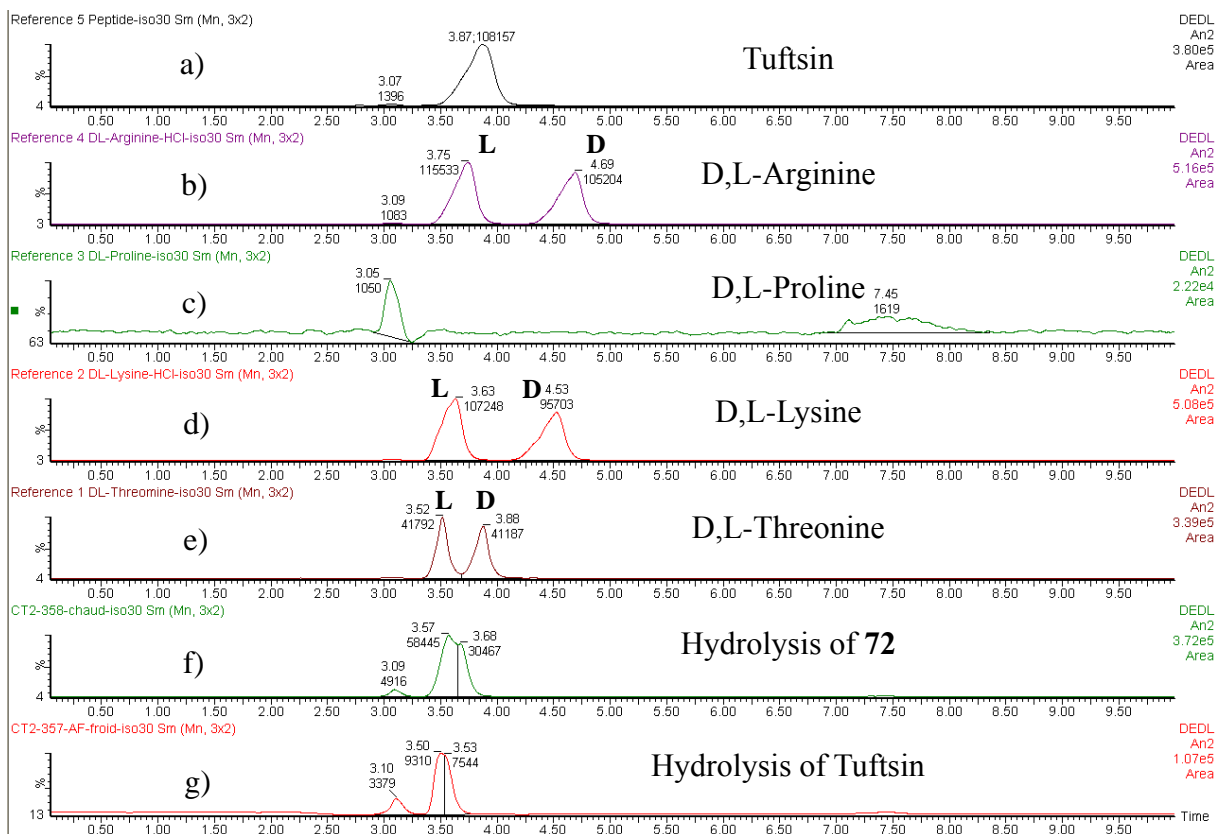
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **72**

### Chromatographic separation of aminoacids after hydrolysis of peptides:



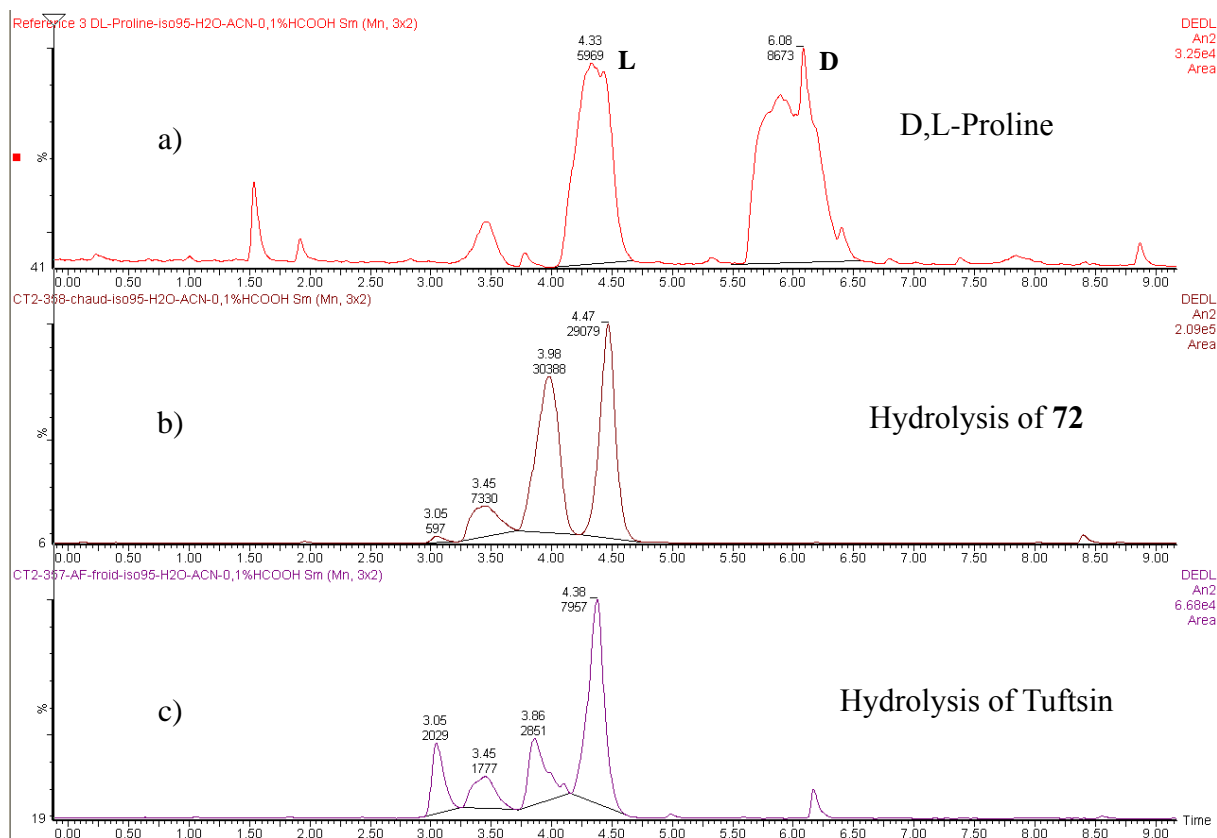
For the hydrolysis of reference Tuftsin peptide: 0.016 mmol of the peptide (8 mg) were heated with 2 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (4 mg).

For the hydrolysis of Tuftsin **72**: 0.016 mmol of the peptide (8 mg) were heated with 2 mL of 6M hydrochloric acid for 24 hours under reflux. The HCl solution was then evaporated to dryness and the white solid was dissolved in water before being treated with Dowex 50W-X8. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (6 mg).



HPLC chromatograms: a) reference Tuftsins peptide, b) reference D,L-Arginine, c) reference D,L-Proline, d) reference D,L-Lysine, e) D,L-Threonine, f) aminoacids of Tuftsins **72** after hydrolysis and g) aminoacids of Tuftsins after hydrolysis.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:MeOH:HCOOH 30:70:0.02, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>



HPLC chromatograms: a) reference D,L-Proline, b) aminoacids of Tuftsin **72** after hydrolysis c) aminoacids of Tuftsin after hydrolysis.

Mobile phase: H<sub>2</sub>O:ACN 95:5, flow rate: 1.5 mL.min<sup>-1</sup>

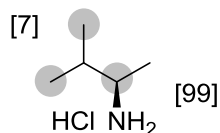
**Data of mass analysis for compounds 69 to 72**

<b>Compound</b>	$M_0$	$M_{+1}$	$M_{+2}$	$M_{+3}$	$M_{+4}$	$M_{+5}$
<b>69</b>	1.7	<b>65.0</b>	30.5	2.8		
<b>70</b>	15.9	<b>62.4</b>	16.9	4.8	2.2	
<b>71</b>	39.8	<b>54.7</b>	4.0	1.5		
<b>71'</b>	<b>72.5</b>	25.4	2.1			
<b>72</b>	0	5.1	19.9	<b>44.4</b>	27.3	3.4

**Table S6:** Relative amount in percent of the non-deuterated ( $M_0$ ) and deuterated ( $M_{(0+x)}$ ) isotopologues for compounds 69 to 72.

## Experimental details and characterization for compounds 73 to 77:

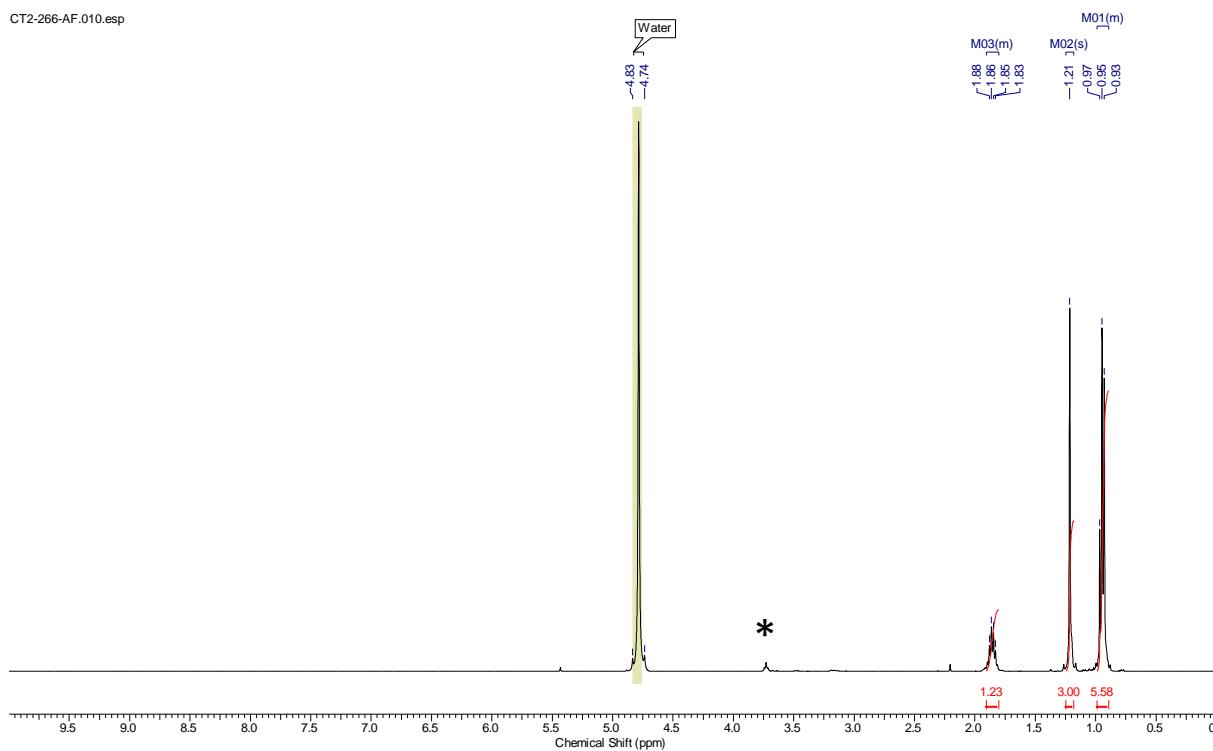
### (*R*)-3-methylbutan-2-amine hydrochloride **73** (procedure C):



After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (37%, 13  $\mu$ L) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 1 hour at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (9 mg; 50% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.80 – 1.91 (m, 1H), 1.21 (s, 3H), 0.89 – 0.99 (m, 5.6H)

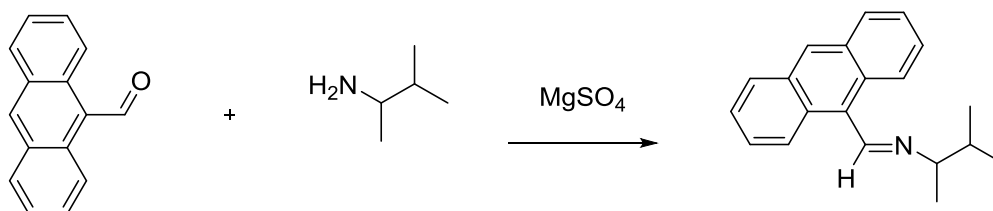
$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  52.7, 31.0, 17.5, 16.6, 14.4



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **73**

\*Presence of residual THF

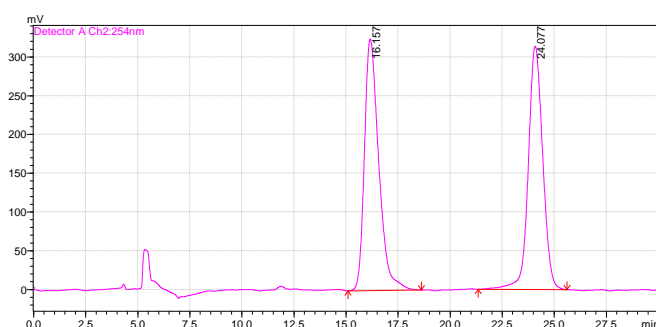
**Chromatographic separation of chiral amines as 9-anthraldimine Schiff base derivatives using a polysaccharide-derived chiral column<sup>169</sup>:**



For the preparation of 9-anthraldimine derivatives of racemic 3-methylbutan-2-amine and commercially available (*R*)-3-methylbutan-2-amine: 0.5 mmol of the amines (60  $\mu$ L), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (103 mg) and excess MgSO<sub>4</sub> (5 mmol, 602 mg, 10 eq) in 10 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

For the preparation of 9-anthraldimine derivative of (*R*)-3-methylbutan-2-amine hydrochloride **73**: 0.364 mmol of the free base (32 mg), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (75 mg) and excess MgSO<sub>4</sub> (3.64 mmol, 438 mg, 10 eq) in 7 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

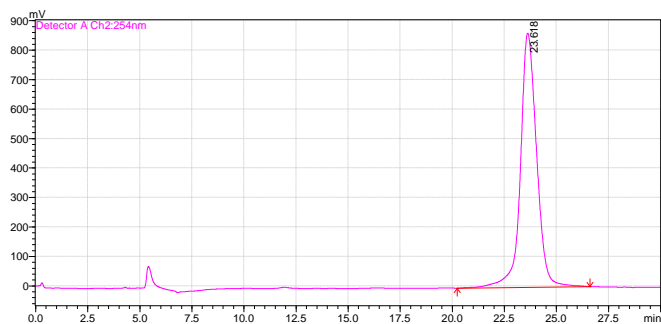
Chromatography was performed at room temperature using a Phenomenex Lux Cellulose-1 00G-4458-E0 chiral column (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  3  $\mu$ m). Mobile phase: hexane/2-propanol (99.5/0.5), flow rate: 1.0 ml.min<sup>-1</sup>, UV 254 nm.



Tr (min)	Area	%
16.157	15581048	50.5
24.077	15258847	49.5

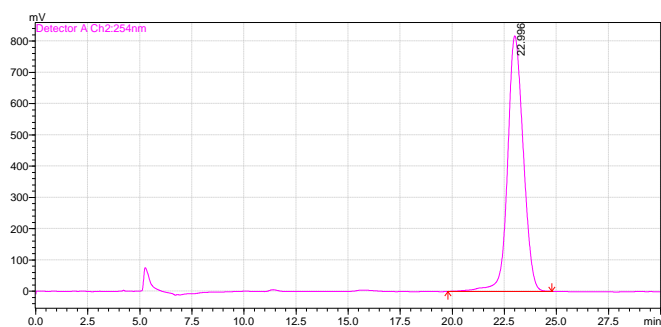
9-anthraldimine derivative of racemic 3-methylbutan-2-amine

<sup>169</sup> W. J. Xu, J. H. Hong, H.-K. Han, J. S. Kang, W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, 32, 2493-2496



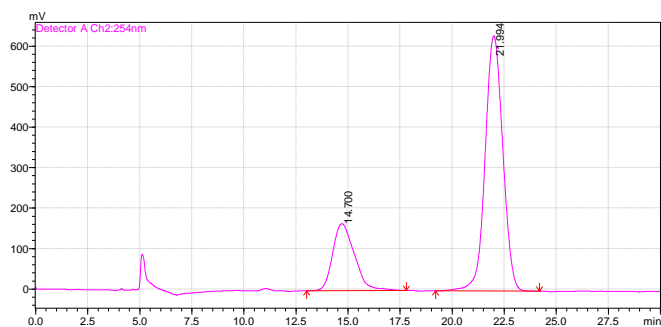
Tr (min)	Area	%
23.618	46898128	100.0

9-anthraldimine derivative of commercially available (*R*)-3-methylbutan-2-amine



Tr (min)	Area	%
22.996	42799543	100.0

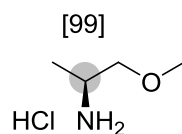
9-anthraldimine derivative of (*R*)-3-methylbutan-2-amine hydrochloride  
73



Tr (min)	Area	%
14.700	12050932	24.4
21.833	37256718	75.6

Coinjection

### (S)-1-methoxy-2-propylamine 74 (procedure C):

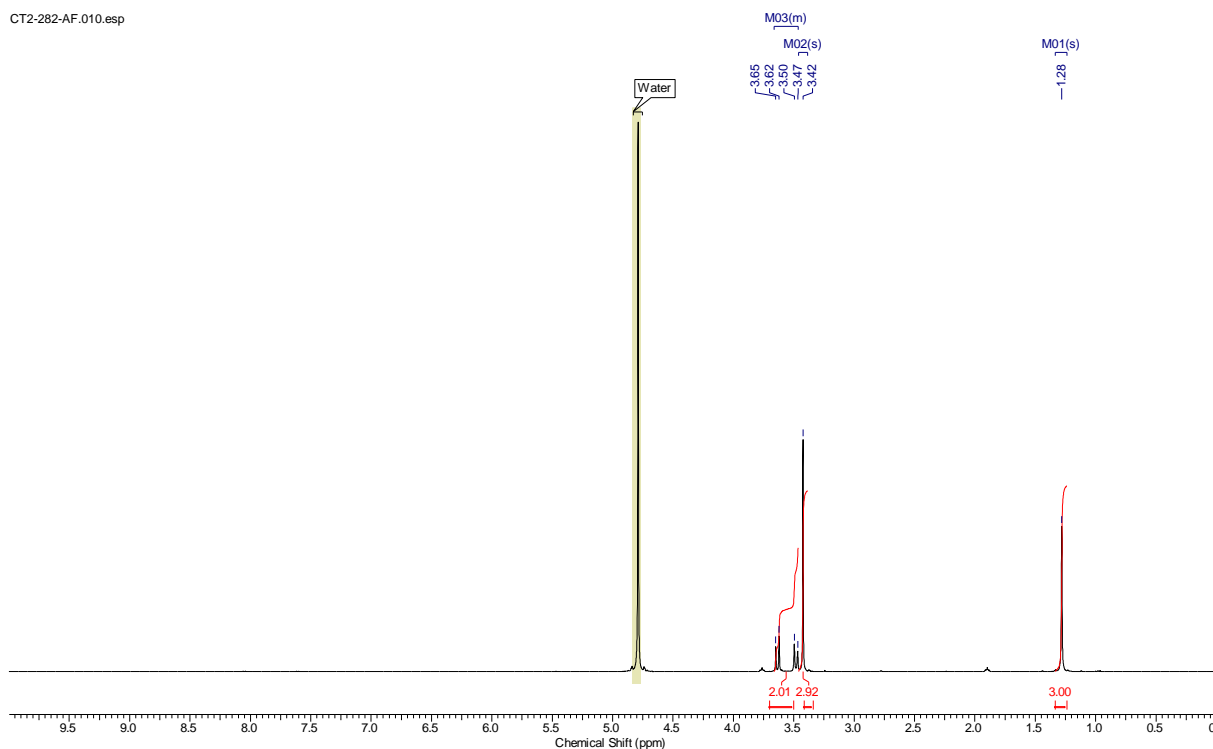


After filtration over a small activated neutral alumina pad, HCl (37%; 13  $\mu$ L) was added to the filtrate and the resulting solution was stirred for 1 hour at room temperature. Then the solution was evaporated to dryness to give a white solid (6 mg; 32% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.46 – 3.66 (m, 2H), 3.42 (s, 3H), 1.28 (s, 3H)

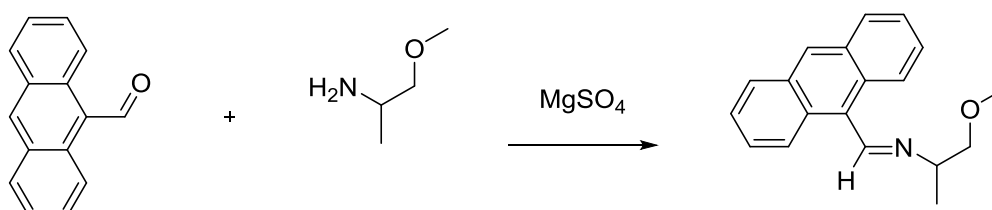
$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  115.0, 72.9, 58.6, 14.1

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.2$  ( $c = 1$ , water)



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **74**

**Chromatographic separation of chiral amines as 9-anthraldimine Schiff base derivatives using a polysaccharide-derived chiral column:**

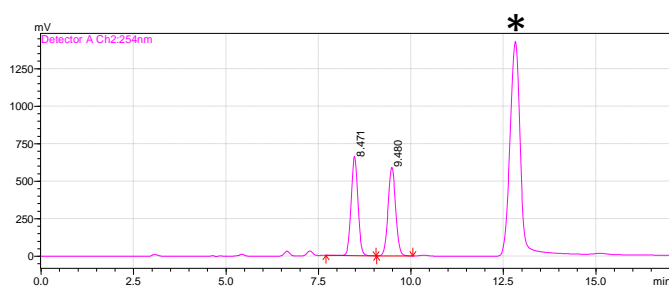




For the preparation of 9-anthraldimine derivatives of racemic 1-methoxy-2-propylamine and commercially available (*S*)-1-methoxy-2-propylamine: 0.5 mmol of the amines (53  $\mu$ L), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (103 mg) and excess  $\text{MgSO}_4$  (5 mmol, 602 mg, 10 eq) in 10 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

For the preparation of 9-anthraldimine derivative of (*S*)-1-methoxy-2-propylamine **hydrochloride 74**: 0.416 mmol of the free base (37 mg), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (86 mg) and excess  $\text{MgSO}_4$  (4.16 mmol, 500 mg, 10 eq) in 8 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

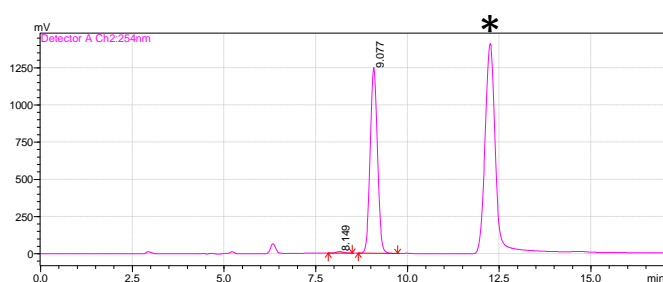
Chromatography was performed at room temperature using a Phenomenex Lux Cellulose-1 00G-4458-E0 chiral column (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  3  $\mu$ m). Mobile phase: hexane/2-propanol (90/10), flow rate: 1.0 ml.min<sup>-1</sup>, UV 254 nm.



Tr (min)	Area	%
8.471	85087799	50.3
9.480	8405327	49.7

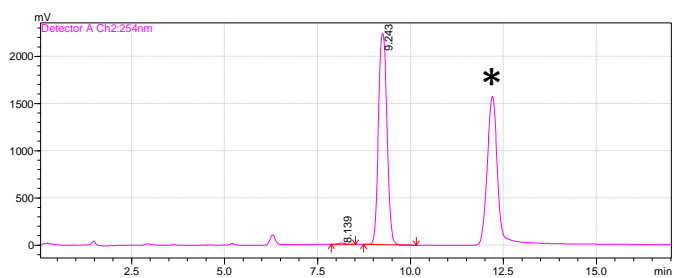
9-anthraldimine derivative of racemic 1-methoxy-2-propylamine

\*Presence of residual 9-anthracenecarboxaldehyde



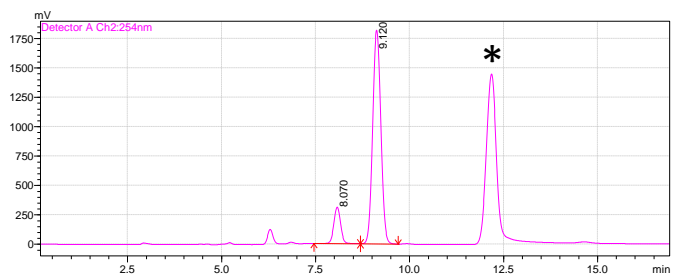
Tr (min)	Area	%
8.149	130556	0.7
9.077	17322728	99.3

9-anthraldimine derivative of commercially available (*S*)-1-methoxy-2-propylamine



Tr (min)	Area	%
8.139	178204	0.5
9.243	35614620	99.5

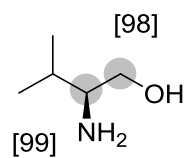
9-anthraldimine derivative of (S)-1-methoxy-2-propylamine hydrochloride **74**



Tr (min)	Area	%
8.070	3921385	12.4
9.120	27681851	87.6

Coinjection

### L-Valinol 75 (procedure D):



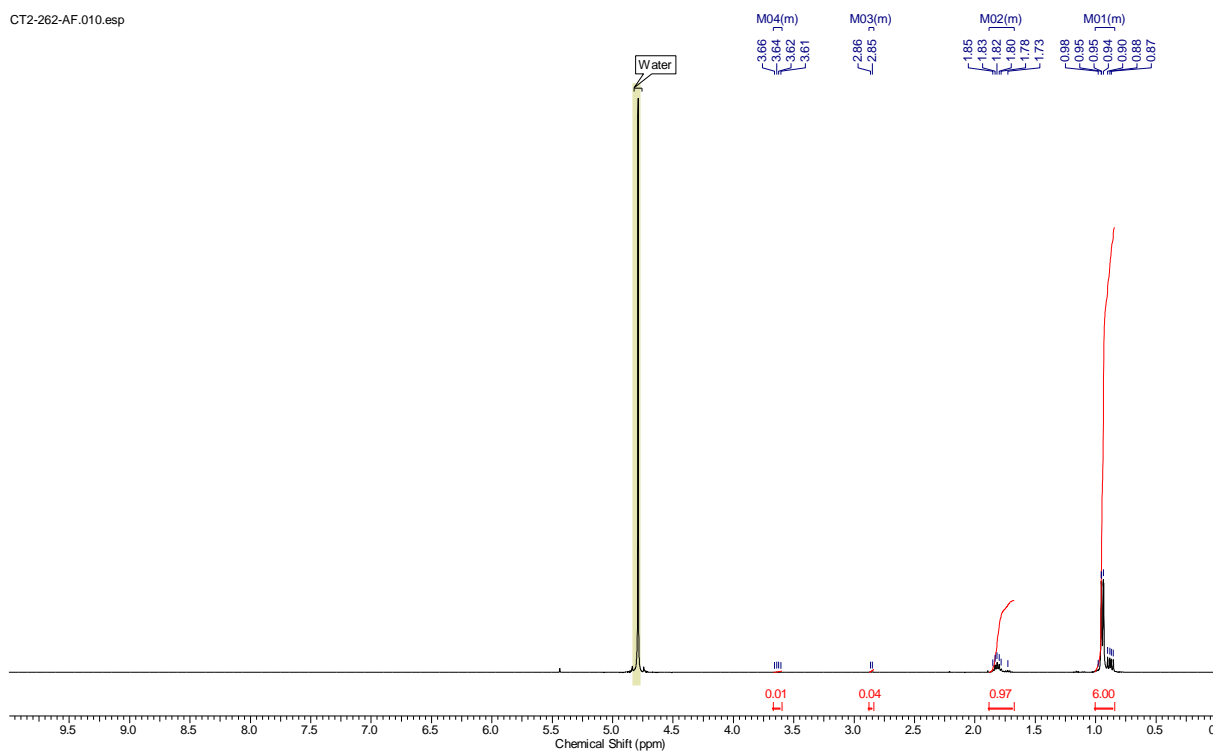
After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (7 mg; 47% yield).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 3.60 - 3.67 (m, 0.01H), 2.84 - 2.88 (m, 0.04H), 1.67 - 1.88 (m, 1H), 0.84 - 1.01 (m, 6H)

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 28.2, 18.2, 17.4

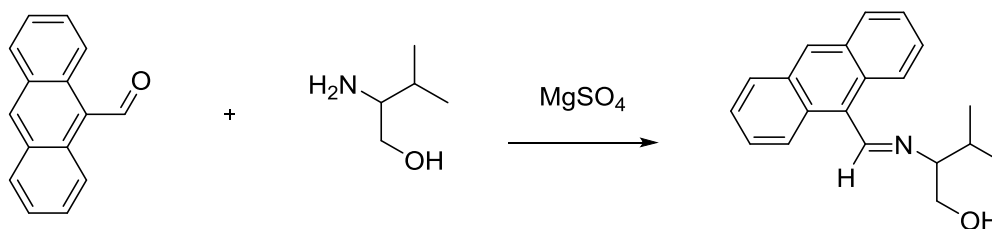
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +17.3 (c = 1, ethanol)

CT2-262-AF.010.esp



<sup>1</sup>H NMR spectrum of 75

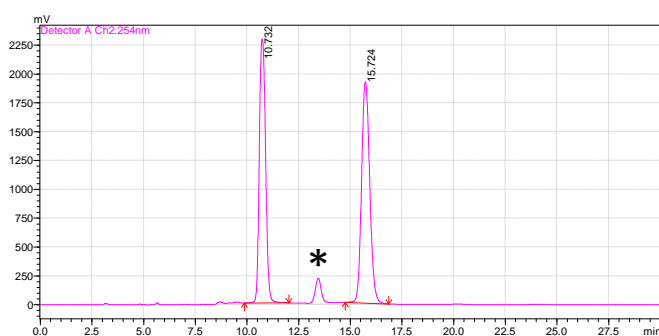
**Chromatographic separation of chiral amines as 9-anthraldimine Schiff base derivatives using a polysaccharide-derived chiral column:**



For the preparation of 9-anthraldimine derivatives of racemic Valinol and commercially available L-Valinol: 0.5 mmol of the amines (56  $\mu$ L or 52 mg), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (103 mg) and excess MgSO<sub>4</sub> (5 mmol, 602 mg, 10 eq) in 10 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

For the preparation of 9-anthraldimine derivative of L-Valinol **3**: 0.19 mmol of the amine (20 mg), an equimolar amount of 9-anthracenecarboxaldehyde (39 mg) and excess MgSO<sub>4</sub> (1.9 mmol, 229 mg, 10 eq) in 5 mL of 2-propanol were stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was filtered to remove the solid and the resulting solution was directly injected on the HPLC.

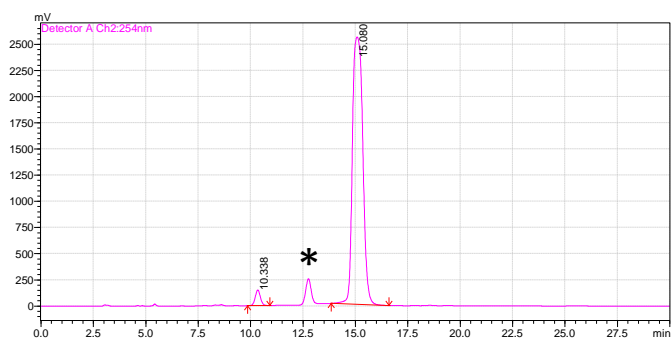
Chromatography was performed at room temperature using a Phenomenex Lux Cellulose-1 00G-4458-E0 chiral column (25 cm  $\times$  4.6 mm  $\times$  3  $\mu$ m). Mobile phase: hexane/2-propanol (90/10), flow rate: 1.0 ml.min<sup>-1</sup>, UV 254 nm.



Tr (min)	Area	%
10.732	48280234	47.7
15.724	52905015	52.3

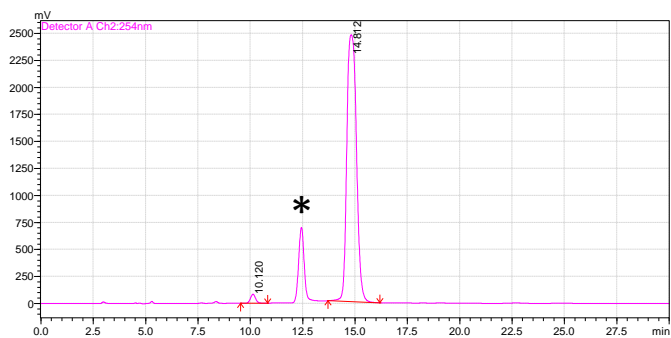
9-anthraldimine derivative of racemic Valinol

\*Presence of residual 9-anthracenecarboxaldehyde



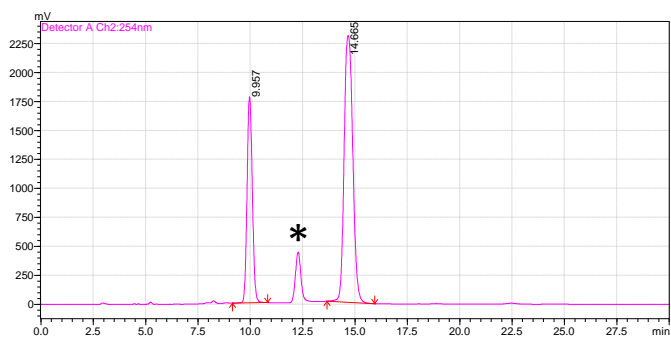
Tr (min)	Area	%
10.338	2548011	2.8
15.080	87726710	97.2

9-anthraldimine derivative of commercially available L-Valinol



Tr (min)	Area	%
10.120	1409517	1.8
14.812	78998780	98.3

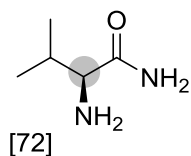
9-anthraldimine derivative of L-Valinol **75**



Tr (min)	Area	%
9.957	31264268	32.2
14.665	65899603	67.8

Coinjection

### L-Valinamide 76 (Procedure D):

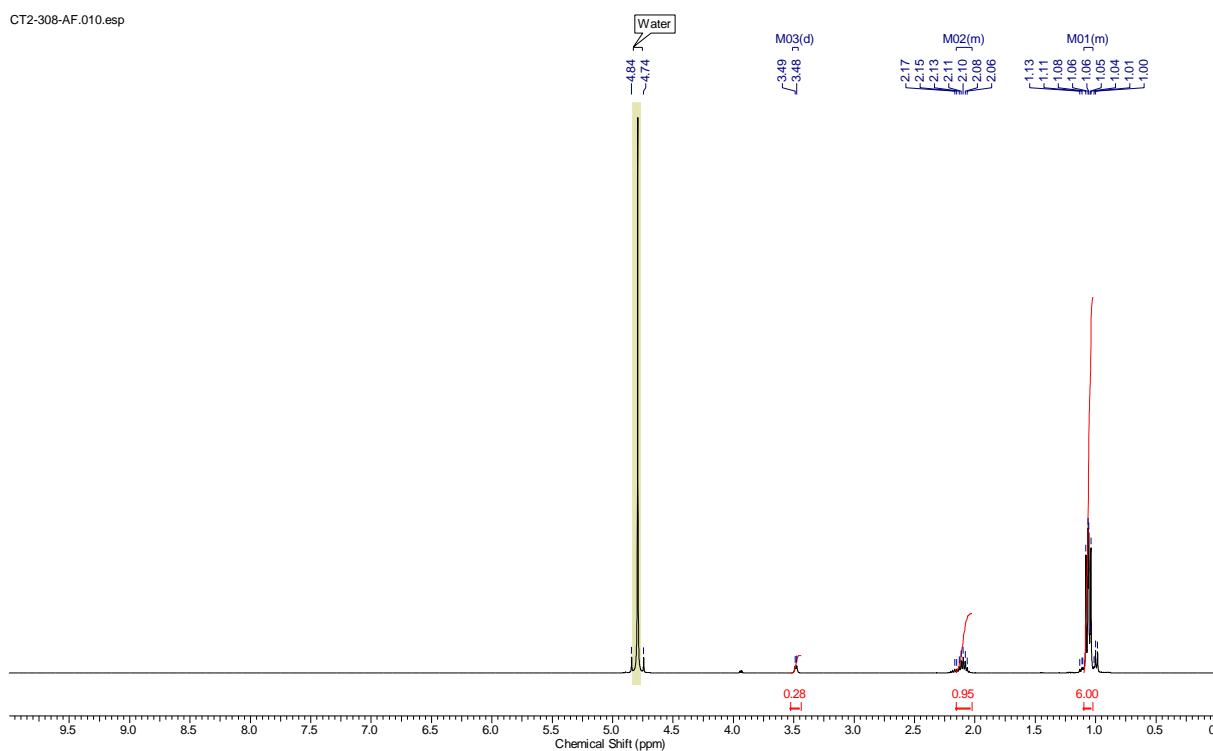


After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (12 mg; 71% yield).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  3.48 (d,  $J = 5.67$  Hz, 0.28H), 2.02 - 2.15 (m, 1H), 1.02 - 1.10 (m, 6H)

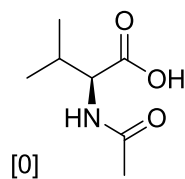
$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  178.7, 59.7, 31.3, 18.3, 16.8

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.9$  ( $c = 0.3$ , water)



$^1\text{H NMR}$  spectrum of **76**

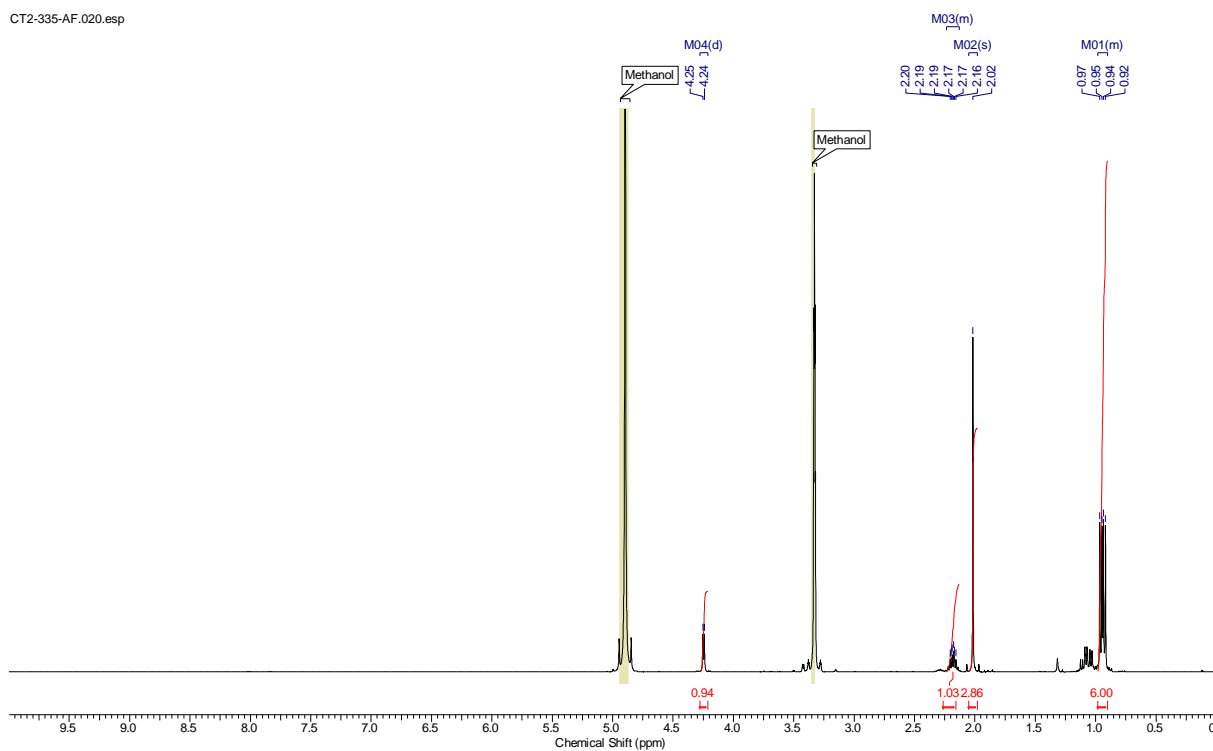
### ***N*-Acetyl-L-Valine 77 (Procedure D):**



After the filtration the solvent was evaporated *in vacuo* to give a white solid (5 mg; 21% yield).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  4.25 (d,  $J = 5.12$  Hz, 1H), 2.13 – 2.23 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 0.90 - 0.98 (m, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, MeOD)  $\delta$  173.5, 172.1, 57.7, 30.2, 20.9, 18.2, 16.9



$^1\text{H}$  NMR spectrum of 77

**Data of mass analysis for compounds 73 to 77**

<b>Compound</b>	$M_0$	$M_{+1}$	$M_{+2}$	$M_{+3}$	$M_{+4}$	$M_{+5}$
<b>73</b>	2.4	32.7	<b>36.2</b>	19.6	7.0	2.1
<b>74</b>	4.4	<b>90.2</b>	5.4			
<b>75</b>	0	0.1	5.8	<b>84.4</b>	8.4	1.3
<b>76</b>	34.5	<b>62.4</b>	3.1			
<b>77</b>	<b>98.2</b>	1.8				

**Table S7:** Relative amount in percent of the non-deuterated ( $M_0$ ) and deuterated ( $M_{(0+x)}$ ) isotopologues for compounds **73** to **77**.





**PARTIE EXPÉRIMENTALE**  
**PARTIE 2 : NOUVELLE**  
**STRATÉGIE D'ÉTUDE**  
**STRUCTURALE DE PETITES**  
**MOLÉCULES EN INTERACTION**  
**AVEC DES COMPLEXES**  
**SUPRAMOLÉCULAIRES**



## I. Synthesis of molecular probes for $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$ distance measurement

### Solvents and reagents

All experiments in anhydrous conditions were carried out with dry glassware under nitrogen dried on sodium carbonate and silica gel.

Anhydrous solvents are obtained by distillation under nitrogen atmosphere in presence of dehydrating agents: calcium hydride for dichloromethane and sodium with benzophenone for diethyl ether and tetrahydrofuran.

If not indicated, commercial products were used without further purification.

### Purification and analyses

**Purifications by column chromatography** on silica gel were achieved either by gravity, or under air or nitrogen pressure using Merck silica gel (granulometry 40-63  $\mu\text{m}$ ). The eluents are indicated in protocols for each purification.

**LCMS chromatograms** were recorded using Waters XBridge C18 column (3,5  $\mu\text{m}$ , 100 x 4,6 mm). The mobile phase consists of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) with 2% formic acid. Gradient: 0-8 min : A (95 to 0%) / B (5 to 100%), 4-5 min : A (0%) / B (100%). Flow rate: 1.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  at 25  $^{\circ}\text{C}$ . Electrospray mass spectra were recorded using an ESI/TOF Mariner Mass Spectrometer. In the description of mass spectra, "M" is the molar mass of the analysed molecule.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spectra and complementary experiments (COSY, HMBC, HSQC) were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer with an Avance calculator. Resonance frequencies of atoms are respectively at 400.13 MHz for proton and 100.61 MHz for carbon 13.

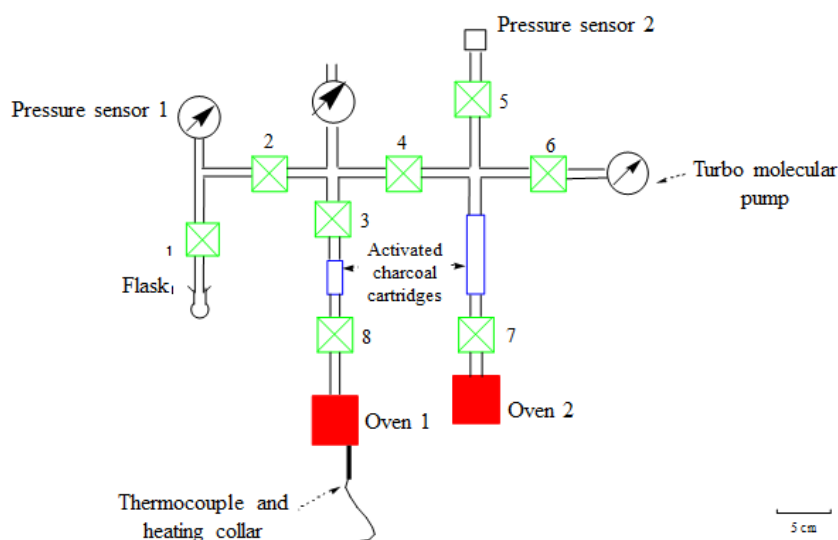
Chemical shifts are reported in parts per million (ppm,  $\delta$ ) downfield from residual solvent peaks and coupling constants are reported in Hertz (Hz). References are respectively chloroform protons ( $\delta = 7.26$  ppm) or tetramethylsilane protons ( $\delta = 0.00$  ppm) in  $^1\text{H}$  NMR, chloroform carbon ( $\delta = 77.00$  ppm) in  $^{13}\text{C}$  NMR.

Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (bs), doublet (d), triplet (t). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

**Infrared spectra (IR)** were recorded on a Perkin Elmer system 2000 FTIR spectrophotometer. The percent transmittance (T%) of samples dissolved in dichloromethane (DCM) was measured in film between sodium chloride (NaCl) discs. Solid or crystalline samples were pulverized with potassium bromide (KBr) and percent transmittance (T%) was measured. Absorption band frequencies are reported as wavelength numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ).

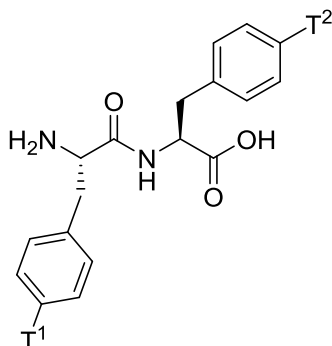
### Tritium bench

The tritium bench is used for  $\text{T}_2$  gas storage and use. Operation principle is based on  $\text{T}_2$  gas adsorption/desorption cycles on a Mn-Ni-La alloy (3.5 g) disposed in a temperature controlled oven. This alloy can store  $\text{T}_2$  gas at room temperature by hydride cracking.  $\text{T}_2$  is released by simple heating leading to  $\text{T}_2$  gas desorption. The first oven contains isotopically pure tritium which can be released in the reaction medium by heating. Unused but contaminated tritium is captured in the second oven. Ovens are activated by heating under dynamic vacuum at  $300^\circ\text{C}$  using a turbo molecular pump. Activated charcoal cartridges are disposed above the ovens and capture organic molecules to protect the alloy from oxygen in the air. The assembly is composed of very thin pipes to reduce the dead volumes which can contain high quantities of radioactivity.



## General tritiation procedure

Tritiation is described for the synthesis of **(S)-2-((S)-2-amino-3-(4-tritiophenyl)propanamido)-3-(4-tritiophenyl)propanoic acid 88**:



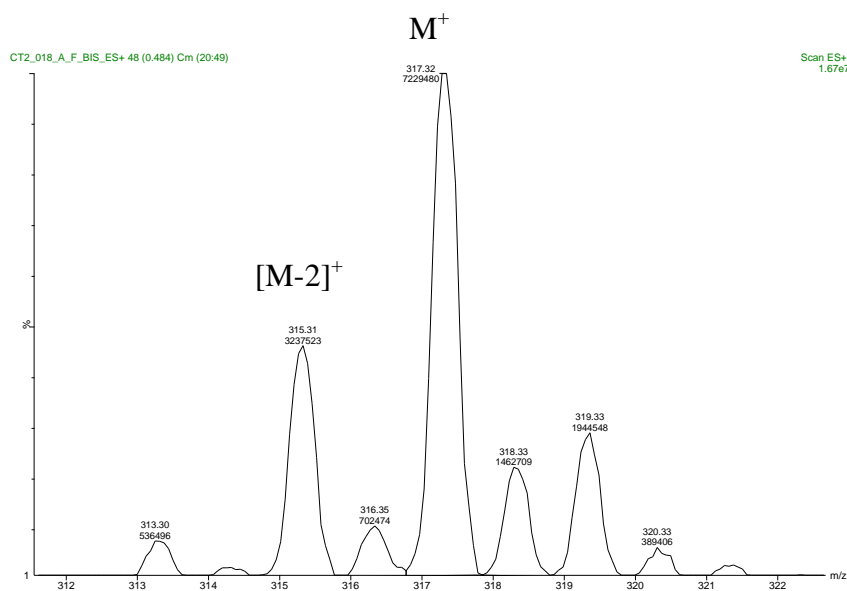
[4-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **88**

Exact Mass: 316,16

Molecular Weight: 316,39

A solution of benzyl **(S)-3-(4-bromophenyl)-2-((S)-3-(4-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate 91** (7 mg, 0.01 mmol) in DCM (2 mL) was added in a 10 mL round flask. 2 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was dissolved in 2 mL of a mixture water/methanol 1:1 and transferred in a single-neck flask. 5% Palladium on charcoal (7 mg, 3.30  $\mu$ mol Pd) was added to the reaction mixture. The flask was introduced into the glovebox and attached to the tritiation manifold with an attachment collar. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen and placed under high vacuum. Tritium gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours under a tritium pressure of 0.85 bars. The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the tritium atmosphere removed. The reaction mixture was filtered through a syringe filter, and washed with a mixture water/methanol 5:5, then evaporated to dryness. Labile tritium atoms were removed by three successive cycles of dissolution in methanol and concentration *in vacuo*. 270 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting) with a specific activity of 49 mCi/mmol (based on MS analysis), being 70% di-labeled, 30% mono-labeled.

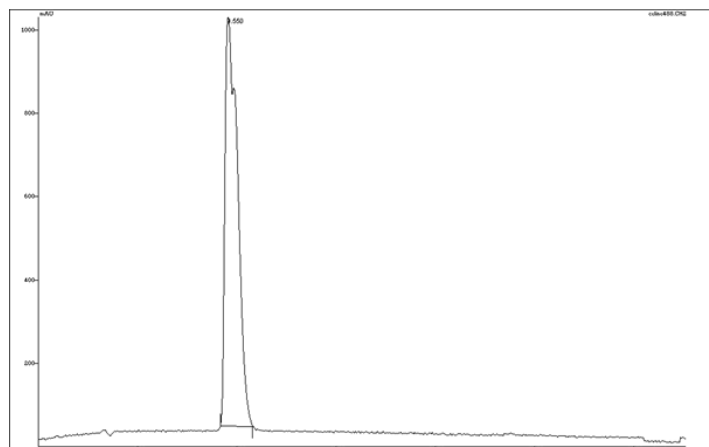
Averaging of the ion chromatogram over the peak of interest and comparison of the abundance of the  $M^+:[M-2]^+$  peaks indicated the level of di-labeled to mono-labeled (and non-labeled if  $[M-4]^+$  is present) material in the sample.



	Area	%
$M^+$	7229480	69.1
$[M-2]^+$	3237523	30.9
Total	10467003	100

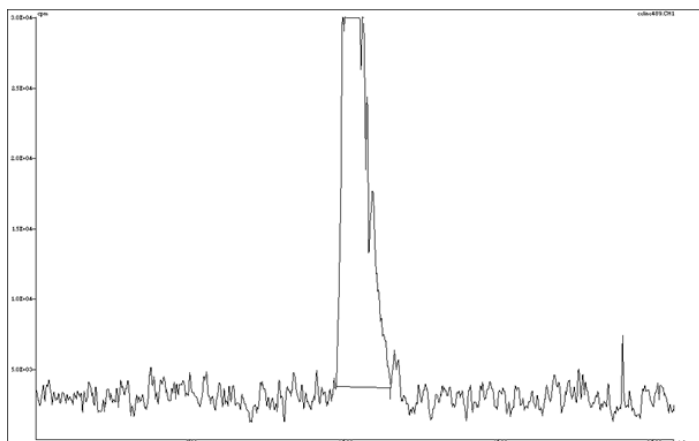
HPLC chromatograms of **88**. Purity checked on C18 Column.

Gradient: 80/20 H<sub>2</sub>O/AcCN + 0.1% HCOOH.



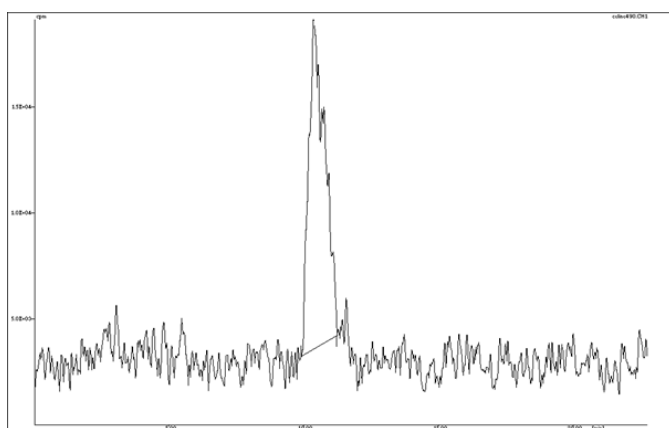
Compound	tr (min)	Area	%
Commercial Phe-Phe	9.55	41018	100

UV260 detection



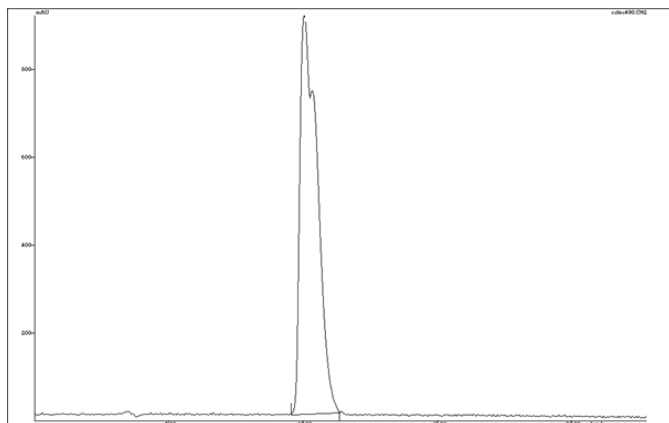
Compound	tr (min)	Area	%
<b>88</b>	<b>10.58</b>	<b>1588235</b>	<b>100</b>

Radiation detection



Compound	tr (min)	Area	%
<b>Commercial Phe-Phe + 88</b>	<b>10.34</b>	<b>610092</b>	<b>100</b>

Coinjection  
Radiation detection

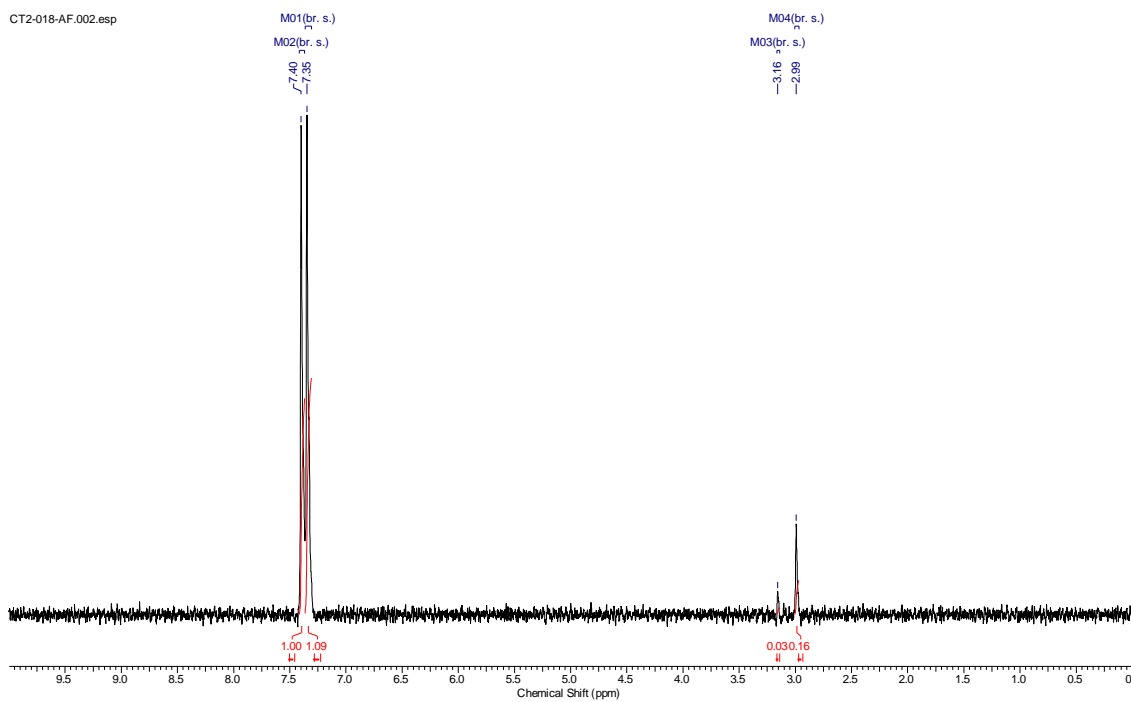


Compound	tr (min)	Area	%
<b>Commercial Phe-Phe + 88</b>	<b>10.03</b>	<b>39425</b>	<b>100</b>

Coinjection  
UV260 detection



**$^3\text{H}$  NMR (427 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )**  $\delta$  7.40 (br. s.,  $1\text{T}^1$ ), 7.35 (br. s.,  $1.09\text{T}^2$ ), 3.16 (br. s.,  $0.03\text{T}$ ), 2.99 (br. s.,  $0.16\text{T}$ )



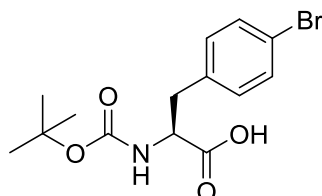
### **General sample preparation for rotor filling (described for compound 88)**

In a 400 mL beaker, to a solution of Phe-Phe (40 mg, 0.13 mmol) dissolved in water (16 mL) were added (*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-(4-tritiophenyl)propanamido)-3-(4-tritiophenyl)propanoic acid **88** (40 mCi) dissolved in water (1 mL). The resulting solution is concentrated to dryness (at up to 80°C) for 1 hour.

For safe filling of the rotor, the bench top used and the floor in front of it were covered with taped vinyl film. A large beaker half-filled with ethanol, weighing foil, and all necessary spatulas and glassware were prepared and properly arranged on the protected area. The two operators wore protective overalls; a first pair of gloves taped to the overalls' sleeve and a second pair of gloves that can be changed as needed; shoes covers; goggles; and a surgical mask over the mouth and nose. Special care was taken to avoid any air drafts. The insert was then held vertically with a holder, and a filling funnel was fitted to minimize possible spills. 14 mg of fill mix was weighed onto the weighing foil, then slowly poured into the insert. A rotor-cap was fitted onto the rotor and the insert was inserted. The remainder was recovered and any used tools or foil are rinsed with ethanol and immersed in the large beaker of ethanol. As a general rule, the gloves of the operator were changed as soon as there was a suspicion of contact with radioactive material. The first operator was the only one handling radioactive material and might not move from the protected area. The second operator overseed the work, providing clean items as needed. The insert was then introduced into the rotor and the second cap was fastened. The outside of the rotor was cleaned carefully, the exterior was tested for contamination, and the used gloves, shoe coverings and consumable items were wrapped in the aluminum and vinyl surface coverings and send for radioactive waste disposal. The immersed glassware was sequentially transferred into 2 beakers containing ethanol and finally properly washed. The surface which was protected by the vinyl and the scale was carefully cleaned with ethanol. No contamination was ever detected on the bench top or the floor in front of it.

## Synthesis

### (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93a**:



Exact Mass: 343,04  
Molecular Weight: 344,21

A solution of Boc<sub>2</sub>O (1.16 g, 5.25 mmol) in DCM (15 mL) was added in a 100 mL round flask with commercial (*S*)-2-amino-3-(4-bromophenyl)propanoic acid **92** (1.22 g, 5 mmol). 10 mL of DCM and trimethylamine (1.4 mL, 10 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. After 1 hour, the mixture became clear. Progress of the reaction was monitored by TLC, which indicates complete disappearance of precursor amine **6**. The solvent was then evaporated and a citric acid solution 10% (w/v) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times) yielding a white solid (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93a** (1.49 g, 4.33 mmol, 87%).

**LCMS:** [M+H]<sup>+</sup> = 344.0, 346.0

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 2CH<sub>arom</sub>), 7.06 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2CH<sub>arom</sub>), 4.95 (m, 1H, NH), 4.59 (m, 1H, CH), 3.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>)

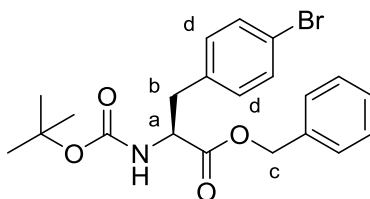
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 175.61, 155.23, 134.76, 131.62, 121.09, 80.46, 53.99, 37.18, 28.18

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3423 (ν<sub>O-H</sub>), 2979 (ν<sub>C-H</sub>), 2933 (ν<sub>C-H</sub>), 1695 (ν<sub>C=O</sub>), 1507 (δ<sub>(dp)N-H</sub>), 1490 (ν<sub>C=C</sub>), 1451 (δ<sub>C-H</sub>), 1395 (δ<sub>C-H</sub>), 1368 (δ<sub>C-H</sub>), 1252 (δ<sub>(dp)O-H</sub>), 1164 (ν<sub>C-O</sub>), 1070 (ν<sub>C-O</sub>), 781 (δ<sub>(hp)C-H</sub>)

**mp** 114-115°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +18.0 (*c* = 0.25, DCM)

**Benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate **94**:**



Exact Mass: 433,0889  
Molecular Weight: 434,3300

A solution of (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93a** (488 mg, 1.4 mmol) in water (10 mL) was added in a 100 mL round flask with cesium carbonate (652 mg, 2 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hour. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). Benzyl bromide (0.26 mL, 2.2 mmol) and DMF (10 mL) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was then evaporated and a citric acid solution 10% (w/v) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with NaHCO<sub>3</sub> and NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times) yielding a white solid benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate **94** (528 mg, 1.22 mmol, 61%).

**LCMS:** [M+H]<sup>+</sup> = 434.1, 435.8

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.32 (m, 7H, 7CH<sub>arom</sub>), 6.88 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, 2CH<sub>aromd</sub>), 5.13 (m, 2H, CH<sub>2c</sub>), 4.99 (m, 1H, NH), 4.60 (m, 1H, CH<sub>a</sub>), 3.05 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>), 1.42 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>)

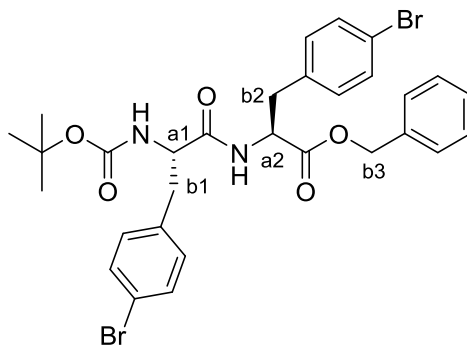
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 171.34, 154.90, 154.90, 134.94, 134.81, 131.49, 130.99, 128.57, 120.91, 80.02, 67.17, 54.17, 37.68, 28.21

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3365 (ν<sub>N-H</sub>), 3032 (ν<sub>arom=C-H</sub>), 2976 (ν<sub>C-H</sub>), 2928 (ν<sub>C-H</sub>), 1741 (ν<sub>C=O</sub>), 1713 (ν<sub>C=O</sub>), 1491 (ν<sub>C=C</sub>), 1453 (δ<sub>C-H</sub> ou ν<sub>C=C</sub>), 1366 (δ<sub>C-H</sub>), 1349 (δ<sub>C-H</sub>), 1251 (ν<sub>C-O</sub>), 1164 (ν<sub>C-O</sub> ou ν<sub>C-N</sub>), 809 (δ<sub>(hp)=C-H</sub>), 751 (δ<sub>(hp)=C-H</sub>), 698 (δ<sub>(hp)=C-H</sub>)

**mp** 96-97°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -15.0 (*c* = 0.25, DCM)

**Benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **91**:**



Boc-[4-Br]Phe-[4-Br]Phe-OBn **91**

Exact Mass: 658,07

Molecular Weight: 660,40

A solution of benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate **94** (217 mg, 0.5 mmol) in DCM (5 mL) was added in a 50 mL round flask. 5 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was dissolved in DCM (5 mL) and DIPEA was added until pH 7-8 (then 0.17 mL, 1 mmol). A solution of (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93a** (172 mg, 0.5 mmol) in DCM (5 mL), EDC.HCl (144 mg, 0.75 mmol) and HOBT (68 mg, 0.5 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). Purification by column chromatography on silica gel (heptane / AcOEt 70:30) afforded a white solid benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **91** (330 mg, 0.11 mmol, 22%).

**LCMS:**  $[M+H]^+ = 659.0, 661.0$

**$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.41 (m, 5H, 5 $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.29 (m, 4H, 4 $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 7.04 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2 $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 6.76 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H, 2 $\text{CH}_{\text{arom}}$ ), 6.30 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, NHa1), 5.10 (dd,  $J = 12.1$  Hz, 21.2 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{b3}$ ), 4.90 (m, 1H, NHa2), 4.77 (m, 1H, CHa1), 4.28 (m, 1H, CHa2), 2.99 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{b1}$ ,  $\text{CH}_2\text{b2}$ ), 1.39 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ )

**$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  170.45, 170.39, 155.17, 135.35, 134.72, 134.31, 131.67, 131.53, 130.97, 130.91, 128.66, 128.62, 128.62, 121.07, 120.93, 67.39, 53.01, 37.24, 28.16

The COSY, HSQC and HMBC NMR experiments were also in good agreement with the structure (see below).

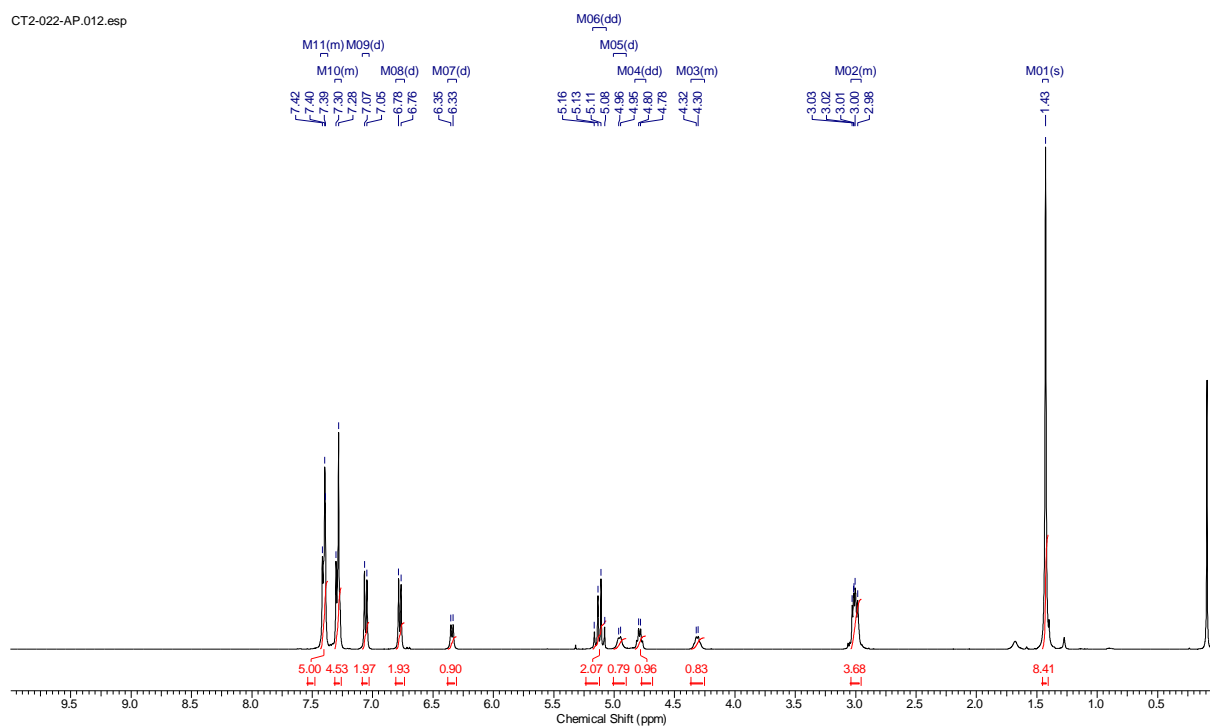
**IR (NaCl,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3328 ( $\nu_{\text{N-H}}$ ), 2968 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 2928 ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), 1743 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1659 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1522 ( $\delta_{(\text{dp})\text{N-H}}$ ), 1489 ( $\delta_{(\text{dp})\text{N-H}}$ ), 1452 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ,  $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1389 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ), 1368 ( $\delta_{\text{C-H}}$ ), 1249 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ), 1167 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ), 809 ( $\delta_{(\text{hp})\text{C-H}}$ ), 753 ( $\delta_{(\text{hp})\text{C-H}}$ ), 697 ( $\delta_{(\text{hp})\text{C-H}}$ ).

**mp** 188-189°C

**HRMS-ES<sup>+</sup>** (m/z) calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_5$ , 659.0756 found 659.0744 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

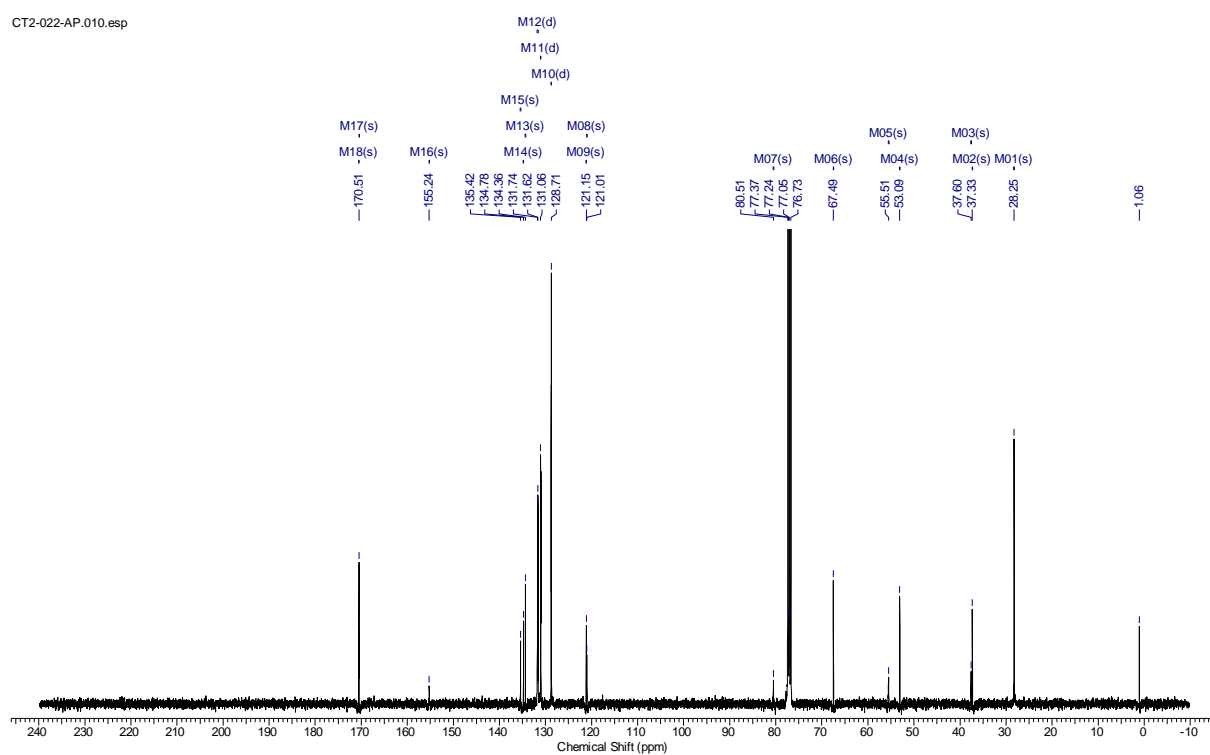
### <sup>1</sup>H NMR of compound **91**

CT2-022-AP.012.esp



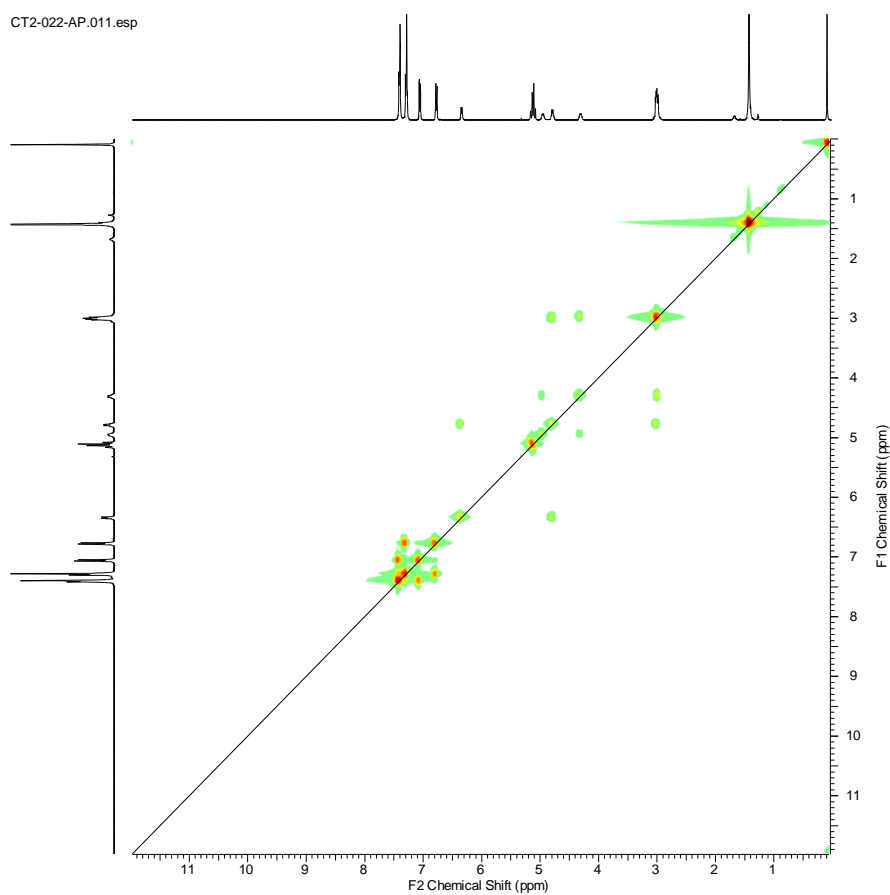
# <sup>13</sup>C NMR of compound **91**

CT2-022-AP.010.esp

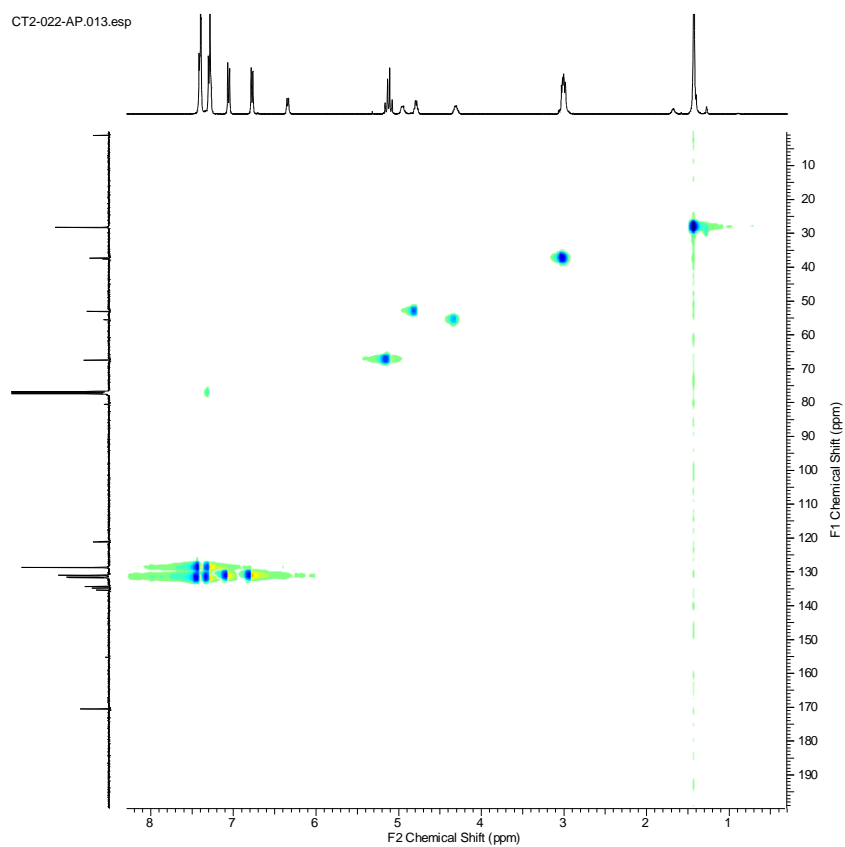


# COSY of compound **91**

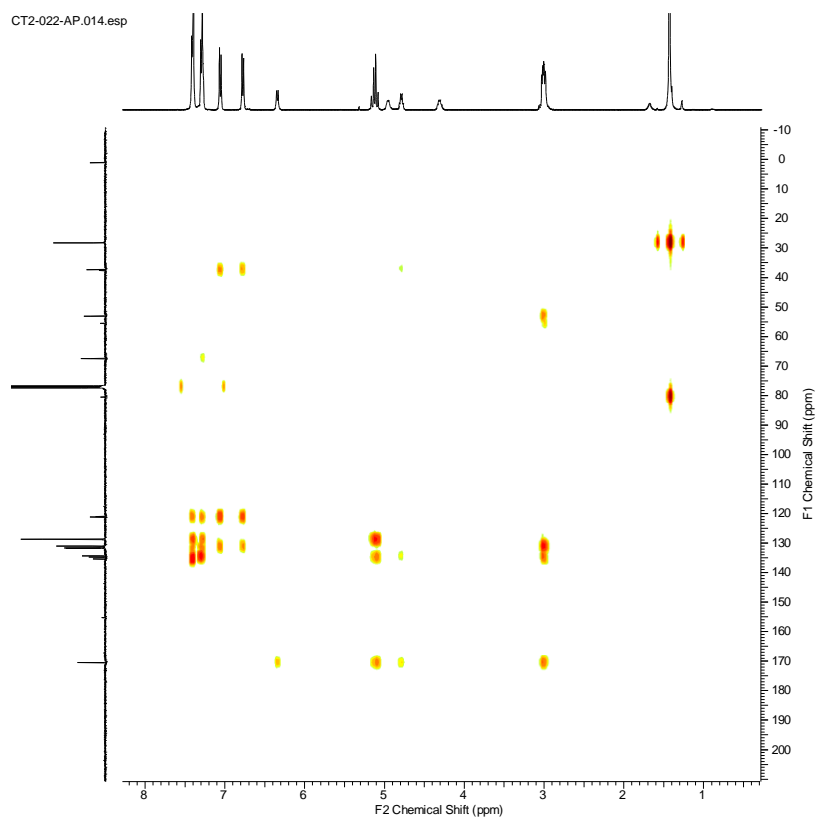
CT2-022-AP.011.esp



## HSQC of compound **91**

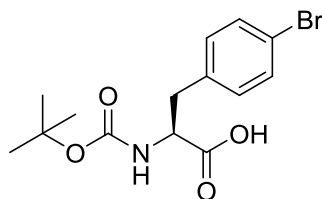


## HMBC of compound **91**





**(S)-3-(4-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid 93b:**

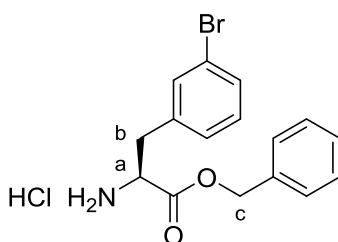


Exact Mass: 343,04  
Molecular Weight: 344,21

A solution of Boc<sub>2</sub>O (1.16 g, 5.25 mmol) in DCM (15 mL) was added in a 100 mL round flask with commercial (*S*)-2-amino-3-(4-bromophenyl)propanoic acid **92** (1.22 g, 5 mmol). 10 mL of DCM and trimethylamine (1.4 mL, 10 mmol) were added and the mixture was stirred overnight at room temperature. After 1 h, the mixture became clear. Progress of the reaction was monitored by TLC, which indicates complete disappearance of precursor amine **92**. The solvent was then evaporated and a citric acid solution 10% (w/v) was added. The mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with NaCl, dried over MgSO<sub>4</sub> and filtered. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times) yielding a white solid (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93b** (1.63 g, 4.74 mmol, 95%).

**(S)-benzyl 2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride 96a:**

Adapted from *Journal of the Chinese Chemical Society* **2009**, *56*, 1010–1017.



Exact Mass: 369,01  
Molecular Weight: 370,67

In a 50 mL round flask, commercial (*S*)-2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoic acid **95** (500 mg, 2.05 mmol) was suspended in 12 mL of benzyl alcohol and cooled to 0°C. 2 mL of thionyl chloride were added slowly to the suspension, and the reaction mixture was then heated at 95°C for 5 hours. 10 mL of dioxane were added at room temperature and benzyl alcohol was removed by gentle heating *in vacuo* at a bath temperature not exceeding 80°C. After co-evaporation with dioxane (three times) the solution turned from yellow to orange. After most of the benzyl alcohol was removed, 10 mL of diethyl ether were added when the reaction system had been cooled sufficiently to prevent the ether from boiling too vigorously and turbidity appeared. The mixture was then refrigerated (to about -15°C) overnight; meanwhile the benzyl ester hydrochloride crystallized. The product was collected after filtration and washed with diethyl ether yielding a white solid (*S*)-benzyl 2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride **96a** (147 mg, 0.40 mmol, 19%).

**LCMS:** [M+H]<sup>+</sup> = 333.9, 335.9

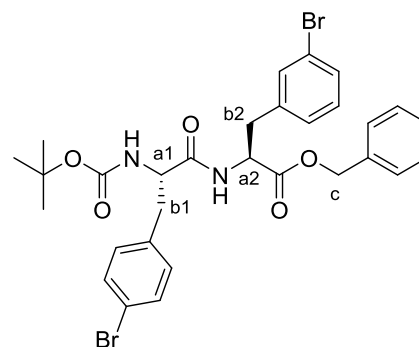
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 7.12 – 7.53 (m, 9H, 9CH<sub>arom</sub>), 5.23 (dd, *J*=15.00, 12.10 Hz, 2H, CH<sub>2c</sub>), 4.38 (t, *J*=6.95 Hz, 1H, CH<sub>a</sub>), 3.09 – 3.25 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ 168.29, 136.40, 134.60, 132.03, 130.61, 130.40, 128.43, 128.26, 127.92, 127.86, 122.41, 67.81, 53.40, 35.45

**IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 2949 (ν<sub>C-H</sub>), 1739 (ν<sub>C=O</sub>), 1569 (ν<sub>C=C</sub>), 1477 (δ<sub>C-H</sub>), 1226 (ν<sub>C-O</sub>), 1202 (ν<sub>C-O</sub>), 1065 (ν<sub>C-N</sub>), 946 (δ<sub>N-H</sub>), 845 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 780 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 734 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 694 (δ<sub>(hp)C-H</sub>)

**mp** 151-152°C

**Benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **97**:**



Boc-[4-Br]Phe-[3-Br]Phe-OBn **97**  
Exact Mass: 658,07  
Molecular Weight: 660,40

A solution of benzyl (*S*)-benzyl 2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride **96a** (130 mg, 0.35 mmol) in DCM (5 mL) was added in a 50 mL round flask. DIPEA was added until pH 7-8 (then 0.12 mL, 0.7 mmol).

A solution of (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **93b** (120 mg, 0.35 mmol) in DCM (5 mL), EDC.HCl (101 mg, 0.53 mmol) and HOBt (47 mg, 0.35 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). Purification by column chromatography on silica gel (heptane/AcOEt 70:30) afforded a white solid benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **97** (147 mg, 0.22 mmol, 64%).

**LCMS:**  $[M+H]^+ = 660.9, 662.8$

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.27 - 7.42 (m, 8H, 8 CH<sub>arom</sub>), 7.14 (s, 1H, CH<sub>arom</sub>), 7.00 - 7.09 (m, 3H, 3 CH<sub>arom</sub>), 6.83 (d,  $J = 7.50$  Hz, 1H, CH<sub>arom</sub>), 6.34 (d,  $J = 7.50$  Hz, 1H, NHa1), 5.12 (s, 2H, CH<sub>2c</sub>), 4.86 - 4.98 (m, 1H, NHa2), 4.78 (dd,  $J = 12.60, 5.80$  Hz, 1H, CHa1), 4.25 - 4.35 (m, 1H, CHa2), 2.89 - 3.09 (m, 4H, CH<sub>2b1</sub>, CH<sub>2b2</sub>), 1.40 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>)

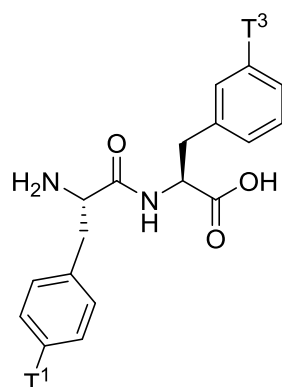
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.49, 170.38, 137.74, 135.35, 134.67 - 134.72 (m, 1C), 132.27, 131.71 (s, 2C), 130.96 (s, 2C), 130.24, 130.04, 128.67 (s, 5C), 128.61 (s, 3C), 127.82, 122.41, 120.98, 67.49, 53.04, 37.40, 28.15

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3303 ( $\nu_{N-H}$ ), 2977 ( $\nu_{C-H}$ ), 1740 ( $\nu_{C=O}$ ), 1657 ( $\nu_{C=O}$ ), 1523 ( $\delta_{(dp)N-H}$ ), 1490 ( $\nu_{C=C}$ ), 1444 ( $\delta_{C-H}$ ), 1390 ( $\delta_{C-H}$ ), 1366 ( $\delta_{C-H}$ ), 1250 ( $\nu_{C-O}$ ), 1167 ( $\nu_{C-N}$ ), 857 ( $\delta_{(hp)C-H}$ ), 782 ( $\delta_{(hp)C-H}$ ), 750 ( $\delta_{(hp)C-H}$ ), 696 ( $\delta_{(hp)C-H}$ )

**mp** 162-163°C

**HRMS-ES<sup>+</sup>** (m/z) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 659.0756 found 659.0751 ( $[M+H]^+$ )

**(S)-2-((S)-2-amino-3-(4-tritiophenyl)propanamido)-3-(3-tritiophenyl)propanoic acid 89:**



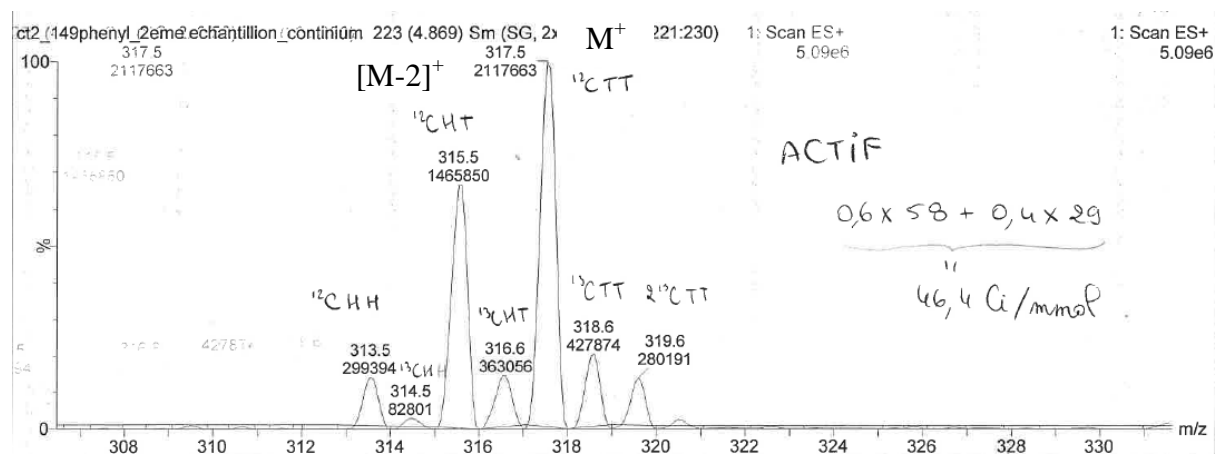
[4-<sup>3</sup>H]Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe **89**

Exact Mass: 316,16

Molecular Weight: 316,39

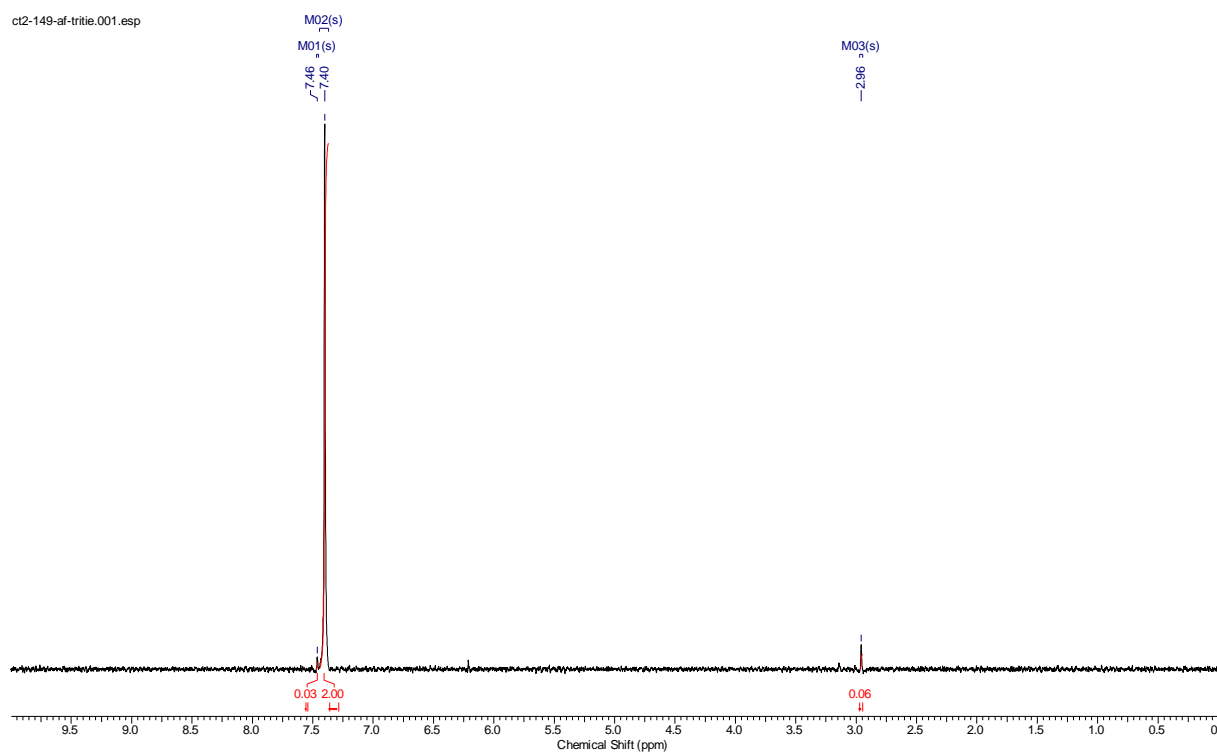
Prepared from benzyl (S)-3-(3-bromophenyl)-2-((S)-3-(4-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **97**, using the general tritiation procedure.

368 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting) with a specific activity of 46 mCi/mmol (based on MS analysis), being 60% di-labeled, 40% mono-labeled.

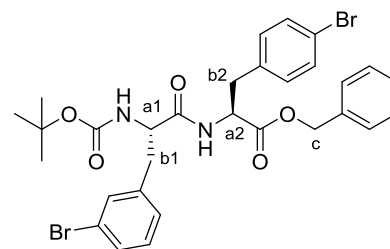


	Area	%
<b>M<sup>+</sup></b>	<b>2117663</b>	<b>59.1</b>
<b>[M-2]<sup>+</sup></b>	<b>1465850</b>	<b>40.9</b>
<b>Total</b>	<b>3583513</b>	<b>100</b>

$^3\text{H}$  NMR (427 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.46 (s, 0.03T), 7.40 (s,  $2\text{T}^{1,3}$ ), 2.96 (s, 0.06H)



**Benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **99**:**



Boc-[3-Br]Phe-[4-Br]Phe-OBn **99**  
Exact Mass: 658,07  
Molecular Weight: 660,40

A solution of benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate **94** (64 mg, 0.15 mmol) in DCM (5 mL) was added in a 50 mL round flask. 5 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was dissolved in DCM (5 mL) and DIPEA was added until pH 7-8 (then 0.05 mL, 0.30 mmol). A solution of commercial (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoic acid **98** (52 mg, 0.15 mmol) in DCM (5 mL), EDC.HCl (43 mg, 0.225 mmol) and HOBT (20 mg, 0.15 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). Purification by column chromatography on silica gel (heptane / AcOEt 70:30) afforded a white solid benzyl (*S*)-3-(4-bromophenyl)-2-((*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **99** (67 mg, 0.10 mmol, 67%).

**LCMS:** [M+H]<sup>+</sup> = 661.0, 662.9; [M-H]<sup>-</sup> = 659.0, 660.8

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 7.19 (m, 11H, 11CH<sub>arom</sub>), 6.88 (d, 2H, 2CH<sub>arom</sub>), 6.22 (d, 1H, NH<sub>a1</sub>), 5.04 (m, 2H, CH<sub>2c</sub>), 4.85 (m, 1H, NH<sub>a2</sub>), 4.72 (m, 1H, CH<sub>a1</sub>), 4.22 (m, 1H, CH<sub>a2</sub>), 2.93 (m, 4H, CH<sub>2b1</sub>, CH<sub>2b2</sub>), 1.35 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>)

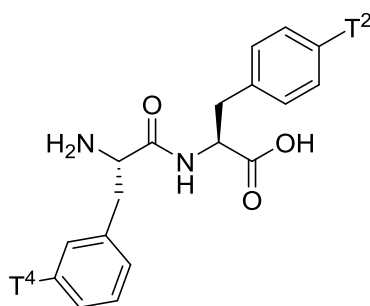
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ 170.37, 170.33, 138.72, 134.73, 134.29, 132.31, 131.54, 130.90, 130.13, 128.68, 128.64, 128.61, 127.87, 122.60, 121.07, 67.38, 53.00, 37.71, 37.23, 28.16

**IR (NaCl, cm<sup>-1</sup>):** 3328 (ν<sub>N-H</sub>), 3281 (ν<sub>N-H</sub>), 3091 (ν<sub>arom=C-H</sub>), 2979 (ν<sub>C-H</sub>), 2928 (ν<sub>C-H</sub>), 1741 (ν<sub>C=O</sub>), 1681 (ν<sub>C=O</sub>), 1657 (ν<sub>C=O</sub>), 1565 (δ<sub>(dp)N-H</sub>), 1523 (δ<sub>(dp)N-H</sub>), 1489 (δ<sub>C-H</sub>), 1444 (δ<sub>C-H</sub>, ν<sub>C=C</sub>), 1392 (δ<sub>C-H</sub>), 1367 (δ<sub>C-H</sub>), 1252 (ν<sub>C-O</sub>), 1252 (ν<sub>C-O</sub>), 1165 (ν<sub>C-O</sub>), 853 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 816 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 778 (δ<sub>(hp)C-H</sub>), 695 (δ<sub>(hp)=C-H</sub>)

**mp** 149-150°C

**HRMS-ES<sup>+</sup>** (m/z) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 659.0756 found 659.0781 ([M+H]<sup>+</sup>)

**(S)-2-((S)-2-amino-3-(3-triitophenyl)propanamido)-3-(4-triitophenyl)propanoic acid 90:**



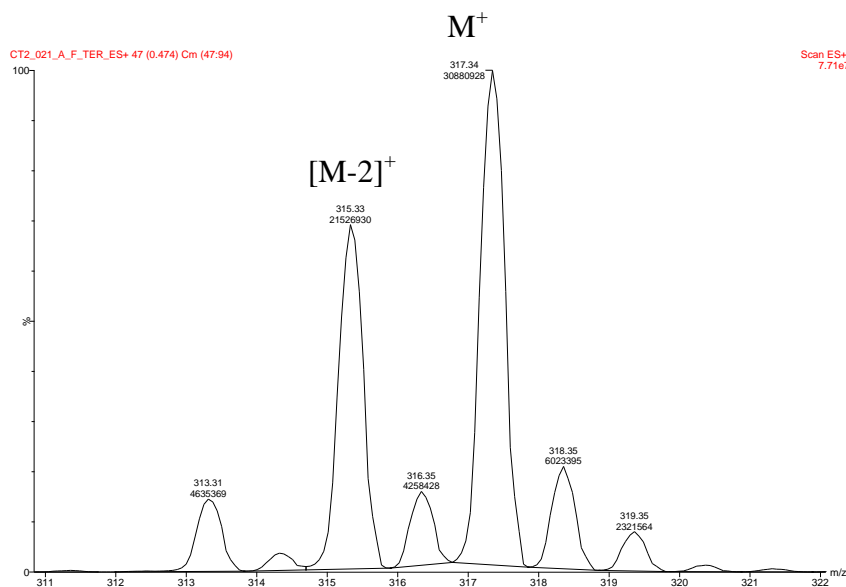
[3-<sup>3</sup>H]Phe-[4-<sup>3</sup>H]Phe **90**

Exact Mass: 316,16

Molecular Weight: 316,39

Prepared from benzyl (S)-3-(4-bromophenyl)-2-((S)-3-(3-bromophenyl)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanamido)propanoate **99**, using the general tritiation procedure.

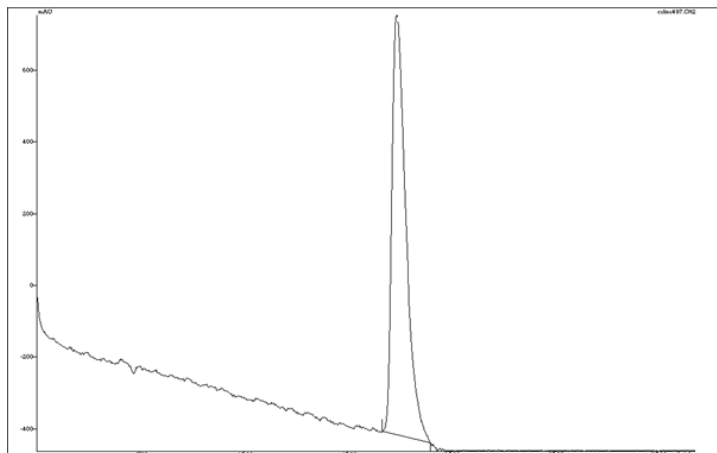
251 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting) with a specific activity of 46 mCi/mmol (based on LCMS analysis), being 60% di-labeled, 40% mono-labeled.



	Area	%
<b>M<sup>+</sup></b>	<b>30880928</b>	<b>58.9</b>
<b>[M-2]<sup>+</sup></b>	<b>21526930</b>	<b>41.1</b>
<b>Total</b>	<b>52407858</b>	<b>100</b>

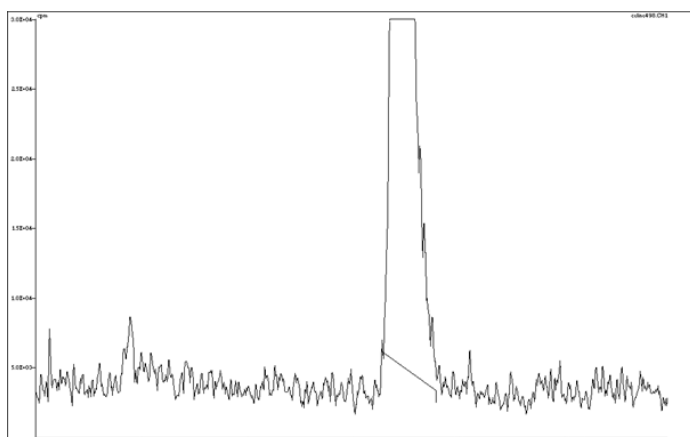
HPLC chromatograms of **90**. Purity checked on C18 Column.

Gradient: 80/20 H<sub>2</sub>O/AcCN + 0.1% HCOOH.



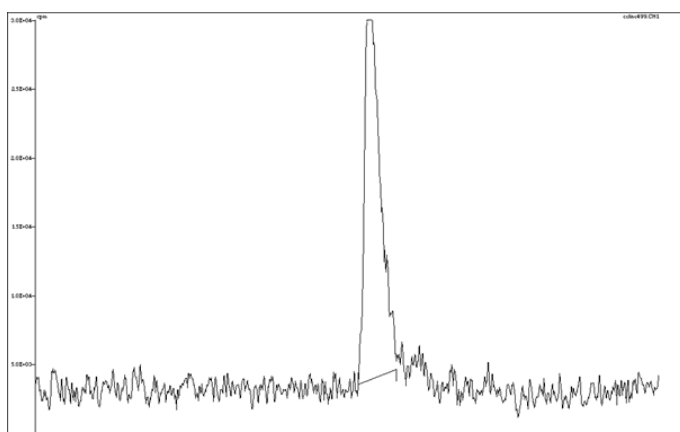
Compound	tr (min)	Area	%
Commercial Phe-Phe	17.37	53470	100

UV260 detection



Compound	tr (min)	Area	%
90	16.73	2441280	100

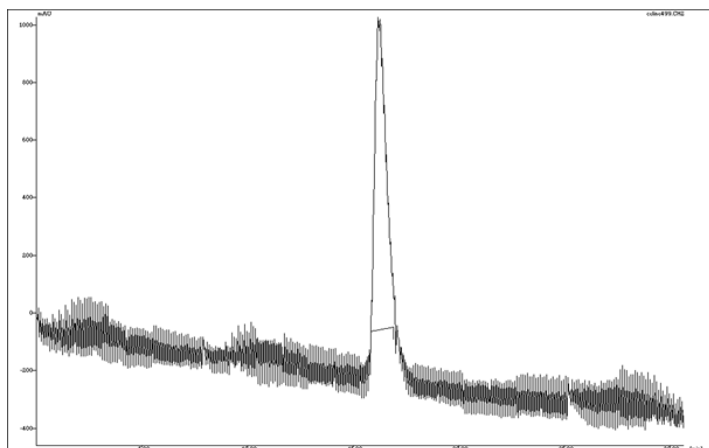
Radiation detection



Compound	tr (min)	Area	%
Commercial Phe-Phe + 90	16.30	1400599	100

Coinjection  
Radiation detection

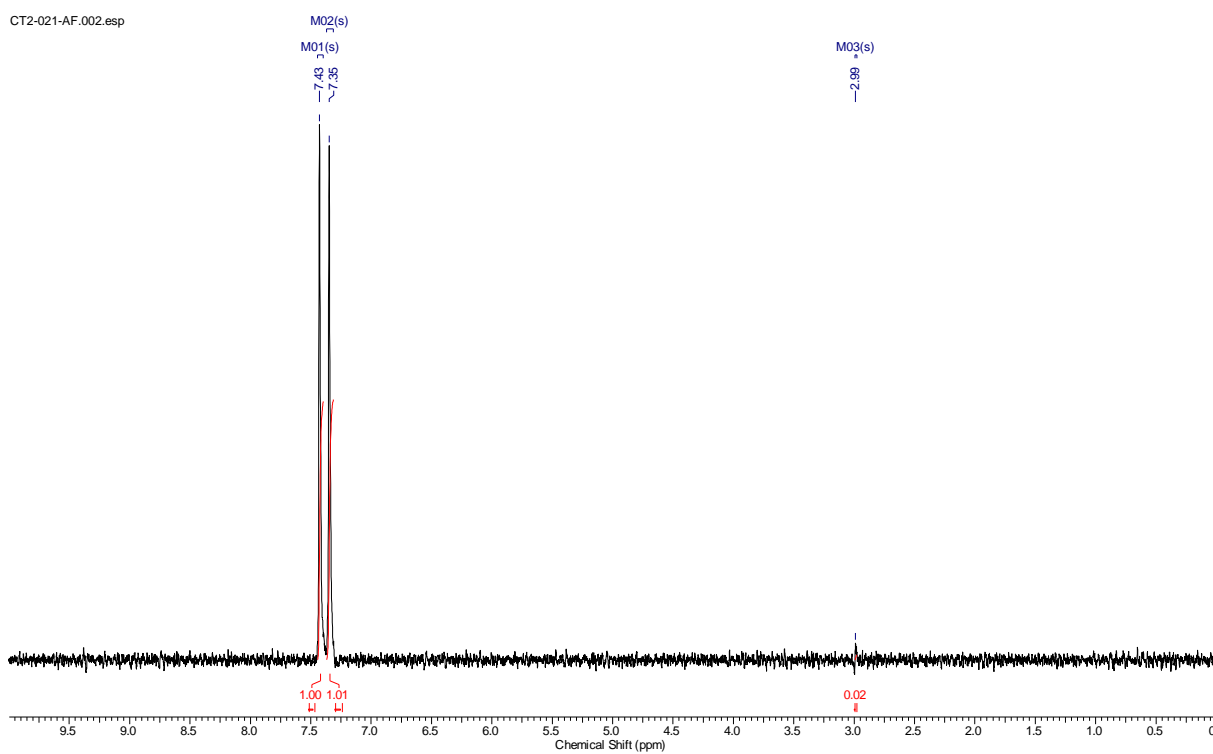




Compound	tr (min)	Area	%
Commercial Phe-Phe + 88	10.03	39425	100

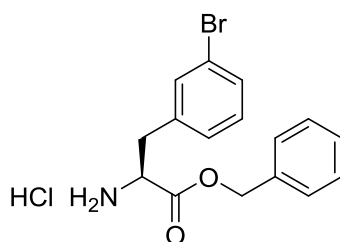
Coinjection  
UV260 detection

$^3\text{H}$  NMR (427 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  7.43 (s, 1T<sup>4</sup>), 7.35 (s, 1.01T<sup>2</sup>), 2.99 (s, 0.02H)



**Benzyl (*S*)-2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride **96b**:**

Adapted from *Journal of the Chinese Chemical Society* **2009**, *56*, 1010–1017.

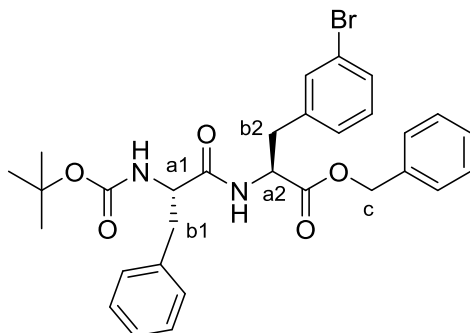


Exact Mass: 369,01  
Molecular Weight: 370,67

In a 25 mL round flask, commercial (*S*)-2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoic acid **95** (250 mg, 1.02 mmol) was suspended in 6 mL of benzyl alcohol and cooled to 0 °C. 1 mL of thionyl chloride was added slowly to the suspension, and the reaction mixture was then heated at 95 °C for 5 hours. Benzyl alcohol was removed by gentle heating *in vacuo* at a bath temperature not exceeding 80 °C. The solution turned from yellow to orange. After most of the benzyl alcohol was removed, 5 mL of diethyl ether were added when the reaction system had been cooled sufficiently to prevent the ether from boiling too vigorously and turbidity appeared. The mixture was then refrigerated (to about -15 °C) overnight; meanwhile the benzyl ester hydrochloride crystallized. The product was collected after filtration and washed with diethyl ether yielding a white solid (*S*)-benzyl 2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride **96b** (320 mg, 0.86 mmol, 85%).

LCMS:  $[M+H]^+ = 334, 336$

**Benzyl (S)-3-(3-bromophenyl)-2-((S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate 102:**



Boc-Phe-[3-Br]Phe-OBn **102**

Exact Mass: 580,16

Molecular Weight: 581,51

A solution of benzyl (*S*)-2-amino-3-(3-bromophenyl)propanoate hydrochloride **96b** (130 mg, 0.35 mmol) in DCM (5 mL) was added in a 50 mL round flask. DIPEA was added until pH 7-8 (then 0.12 mL, 0.7 mmol). A solution of commercial (*tert*-butoxycarbonyl)-L-phenylalanine **103** (93 mg, 0.35 mmol) in DCM (5 mL), EDC.HCl (101 mg, 0.53 mmol) and HOBT (47 mg, 0.35 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature overnight. Purification by column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 99:1) afforded a white solid benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate **102** (95 mg, 0.16 mmol, 74%).

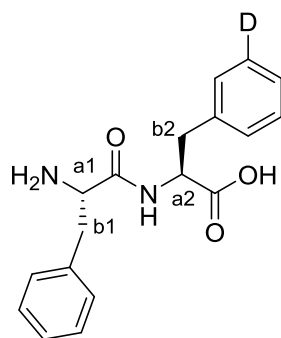
**LCMS:**  $[M+H]^+ = 580.93, 583.09$

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  7.15 - 7.44 (m, 11H, 11CH<sub>arom</sub>), 7.13 (s, 1H, CH<sub>arom</sub>), 7.04 (t,  $J = 7.78$  Hz, 1H, CH<sub>arom</sub>), 6.84 (d,  $J = 7.50$  Hz, 1H, CH<sub>arom</sub>), 6.38 (d,  $J = 7.32$  Hz, 1H, NHa1), 5.11 (s, 2H, CH<sub>2c</sub>), 4.85 - 4.98 (m, 1H, NHa2), 4.74 - 4.85 (m, 1H, CHa1), 4.26 - 4.41 (m, 1H, CHa2), 2.85 - 3.15 (m, 4H, CH<sub>2b1</sub>, CH<sub>2b2</sub>), 1.40 (s, 9H, 9CH<sub>arom</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$  170.9, 170.5, 138.0, 136.4, 134.8, 132.3, 130.2, 130.0, 129.3, 128.7, 128.7, 128.7, 128.6, 128.6, 127.9, 127.0, 122.4, 77.2, 67.4, 53.2, 37.6, 28.2

**HRMS-ES<sup>+</sup>** (m/z) calcd for C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 581.1651 found 581.1649 ( $[M+H]^+$ )

**(S)-2-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)-3-(3-deuterophenyl)propanoic acid 104a:**



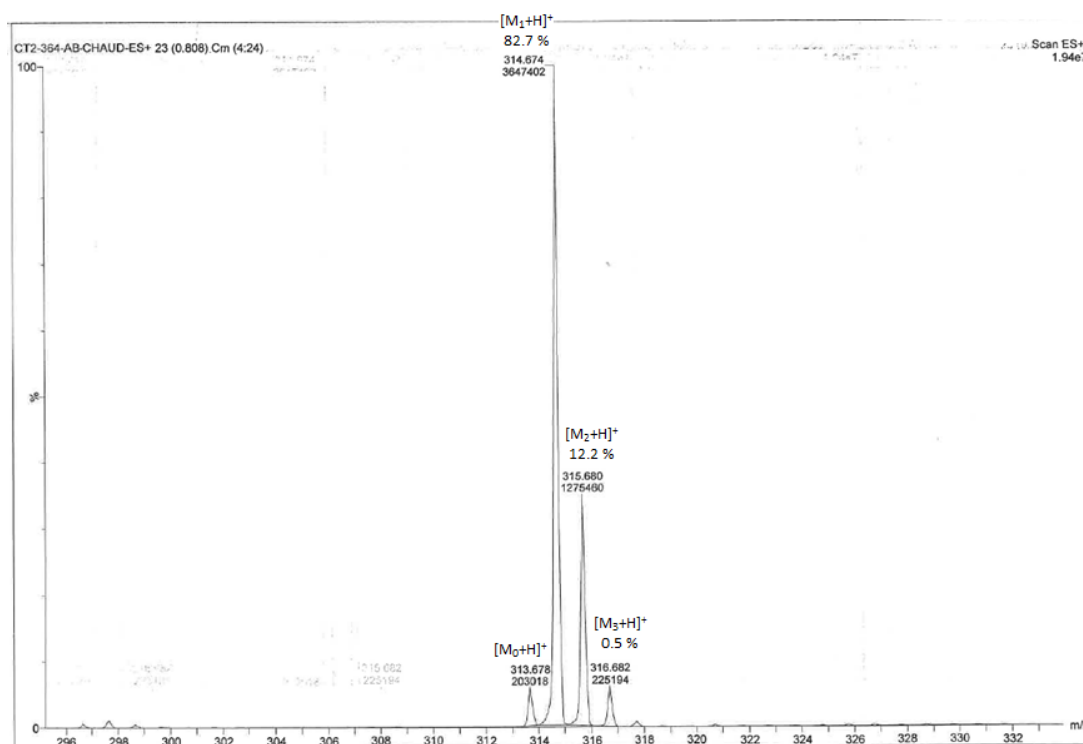
Phe-[3-<sup>2</sup>H]Phe **104a**

Exact Mass: 313,15

Molecular Weight: 313,38

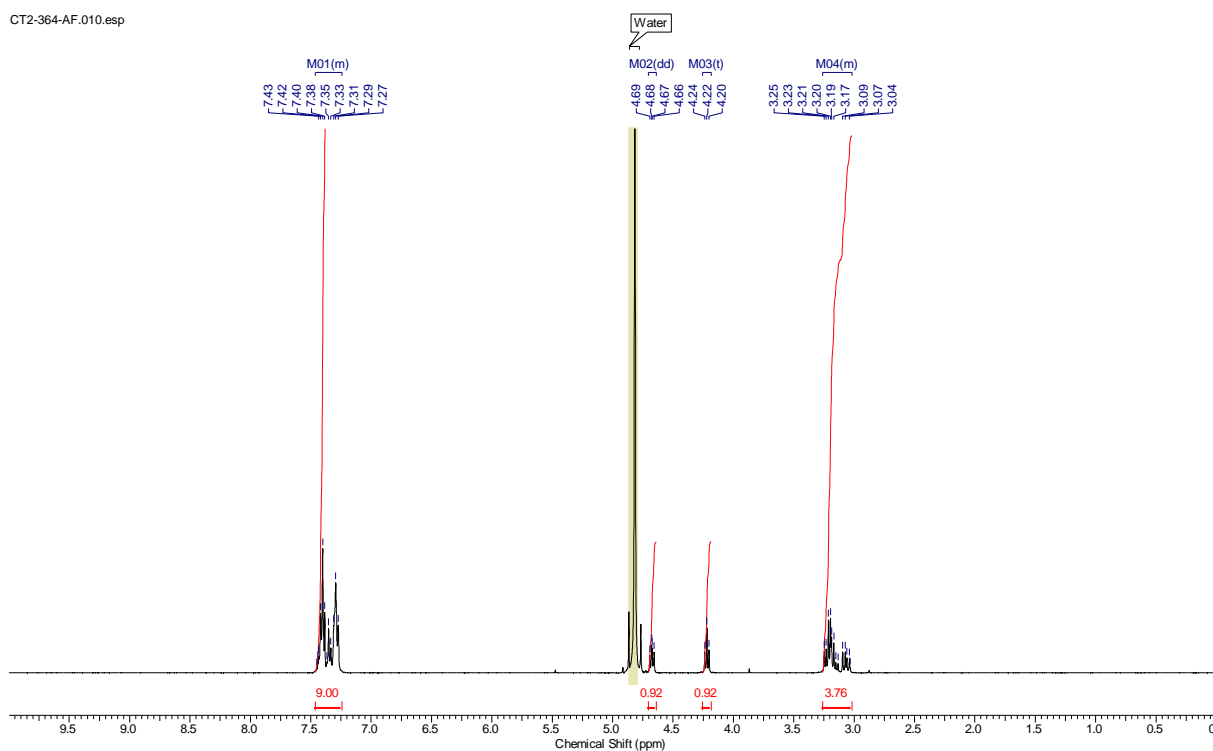
A solution of benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate **102** (7 mg, 0.01 mmol) in DCM (2 mL) was added in a 10 mL round flask. 2 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was dissolved in 2 mL of a mixture water/methanol 1:1. 5% Palladium on charcoal (7 mg, 3.30  $\mu$ mol Pd) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen and placed under high vacuum. D<sub>2</sub> gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours under ordinary deuterium pressure (balloon). The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the deuterium atmosphere removed. The reaction mixture was filtered through a syringe filter, washed with a mixture water/methanol 5:5, then evaporated to dryness yielding a white solid (*S*)-2-((*S*)-2-amino-3-phenylpropanamido)-3-(3-deuterophenyl)propanoic acid **104a** (4 mg, 0.01 mmol, 99%).

## Direct liquid introduction electrospray mass spectra: total isotopic enrichment [95%].

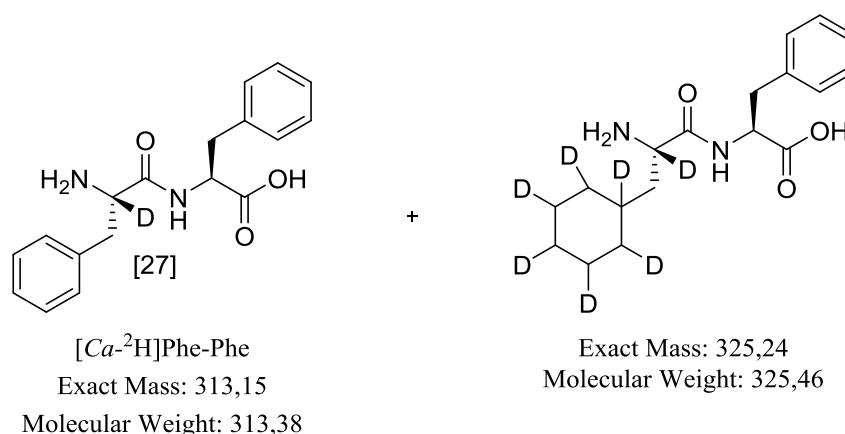


<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.24 – 7.46 (m, 9H, 9CH<sub>arom</sub>), 4.67 (dd, *J* = 6.22, 8.23 Hz, 1H, CHa2), 4.22 (t, *J* = 7.14 Hz, 1H, CHa1), 3.02 – 3.26 (m, 4H, CH<sub>2</sub>b1, CH<sub>2</sub>b2)

CT2-364-AF.010.esp

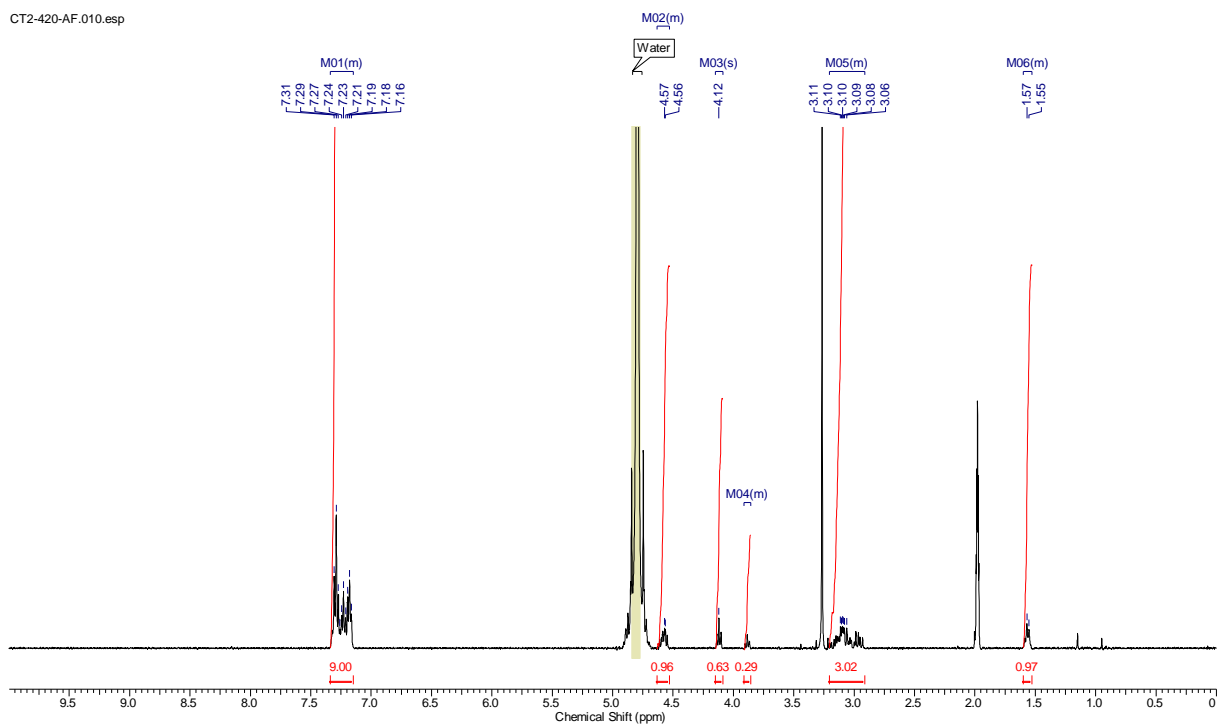


**[C $\alpha$ -<sup>2</sup>H]Phe-Phe 105 (80%) + derivative 106 (20%):**

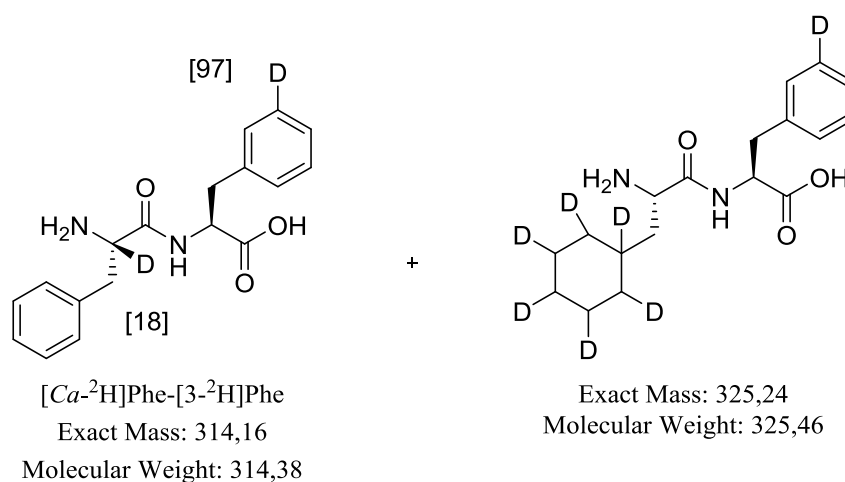


Commercial Phe-Phe **87** (3 mg, 0.01 mmol) was dissolved in water and treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL). The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times). RuNP@PVP 16% (3 mg) were charged in a 5 mL round flask in a glove-box under argon. The solid was dissolved in thoroughly degassed NaOH 0.01M (2 mL) and transferred in the 5 mL round flask. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum then allowed to warm to room temperature (two times). The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum, D<sub>2</sub> gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours, at 55°C, under ordinary deuterium pressure. The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the deuterium atmosphere removed. The reaction mixture was treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL) then evaporated to dryness yielding a white solid (2 mg).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>COOD 1M) δ 7.15 - 7.34 (m, 9H), 4.53 - 4.63 (m, 0.96H), 4.12 (s, 0.63H), 3.86 - 3.91 (m, 0.29H), 2.91 - 3.20 (m, 3.02H), 1.53 - 1.60 (m, 0.97H)**



**[C $\alpha$ -<sup>2</sup>H]Phe-[3-<sup>2</sup>H]Phe 107 (90%) + derivative 108 (10%):**

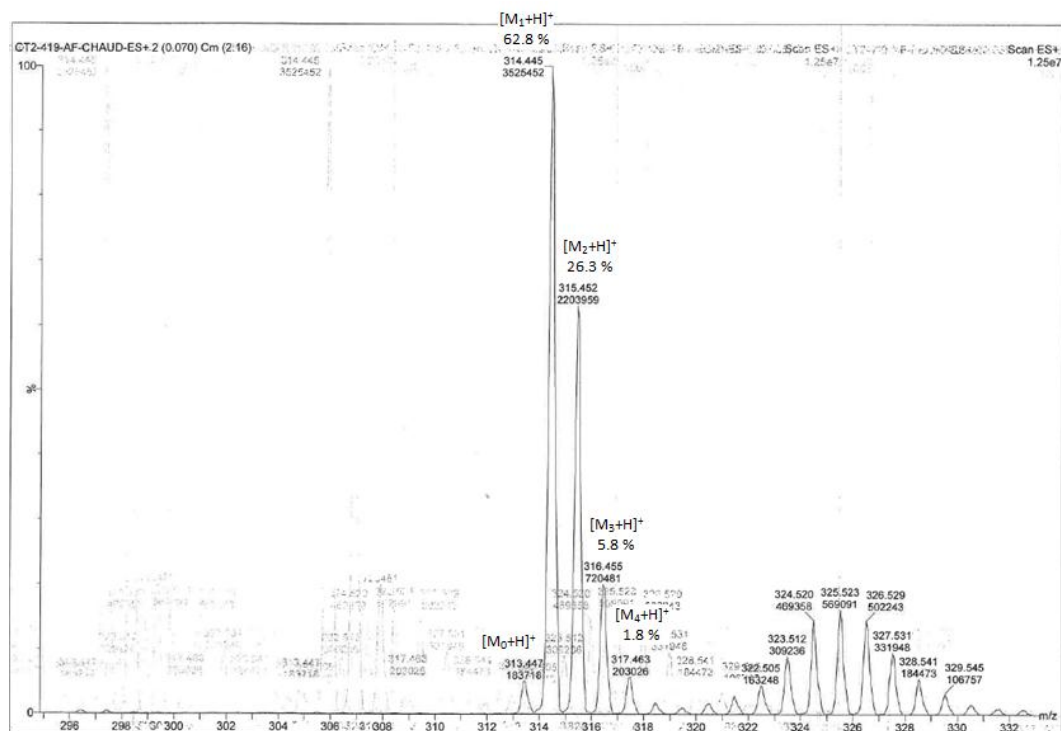


A solution of benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate **102** (7 mg, 0.01 mmol) in DCM (2 mL) was added in a 10 mL round flask. 2 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was solubilized in the minimum of methanol with 2 mL of DCM and filtrated over Amberlyst A-21 ion-exchange resin. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times). The solid was dissolved in a mixture water/methanol 1:1 (2 mL). 5% Palladium on charcoal (5 mg, 2.35  $\mu$ mol Pd) was added to the reaction mixture. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen and placed under high vacuum. D<sub>2</sub> gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours under ordinary deuterium pressure (balloon). The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the deuterium atmosphere removed. The reaction mixture was filtered through a syringe filter, washed with a mixture water/methanol 5:5, then treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL). The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times). RuNP@PVP 16% (3 mg) were charged in a 5 mL round flask in a glove-box under argon. The solid was dissolved in thoroughly degassed NaOH 0.01M (2 mL) and transferred in the 5 mL round flask. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum then allowed to warm to room temperature (two times). The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum, D<sub>2</sub> gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours, at 55°C, under ordinary deuterium pressure (balloon). The reaction

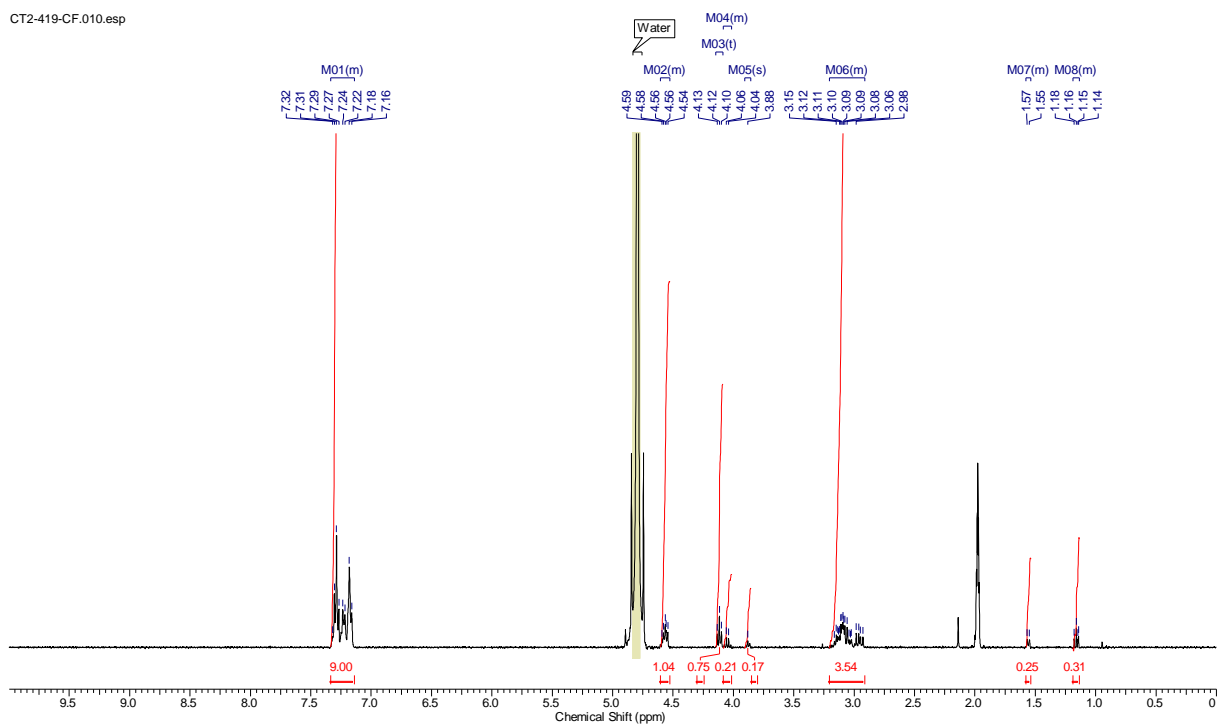


flask was then frozen in liquid nitrogen and the deuterium atmosphere removed. The reaction mixture was treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL) then evaporated to dryness yielding a white solid (1 mg).

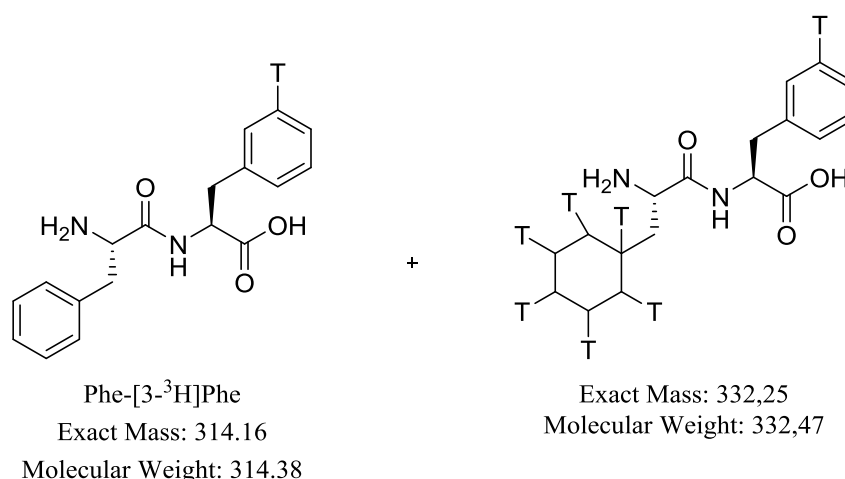
**Direct liquid introduction electrospray mass spectra:** total isotopic enrichment [97%].



**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DEUTERIUM OXIDE)**  $\delta$  7.14 - 7.34 (m, 9H), 4.53 - 4.60 (m, 1.04H), 4.12 (t,  $J = 7.04$  Hz, 0.75H), 4.01 - 4.08 (m, 0.21H), 3.88 (s, 0.17H), 2.91 - 3.21 (m, 3.54H), 1.54 - 1.58 (m, 0.25H), 1.13 - 1.19 (m, 0.31H)



**Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe 109b (53%) + derivative 110 (47%):**

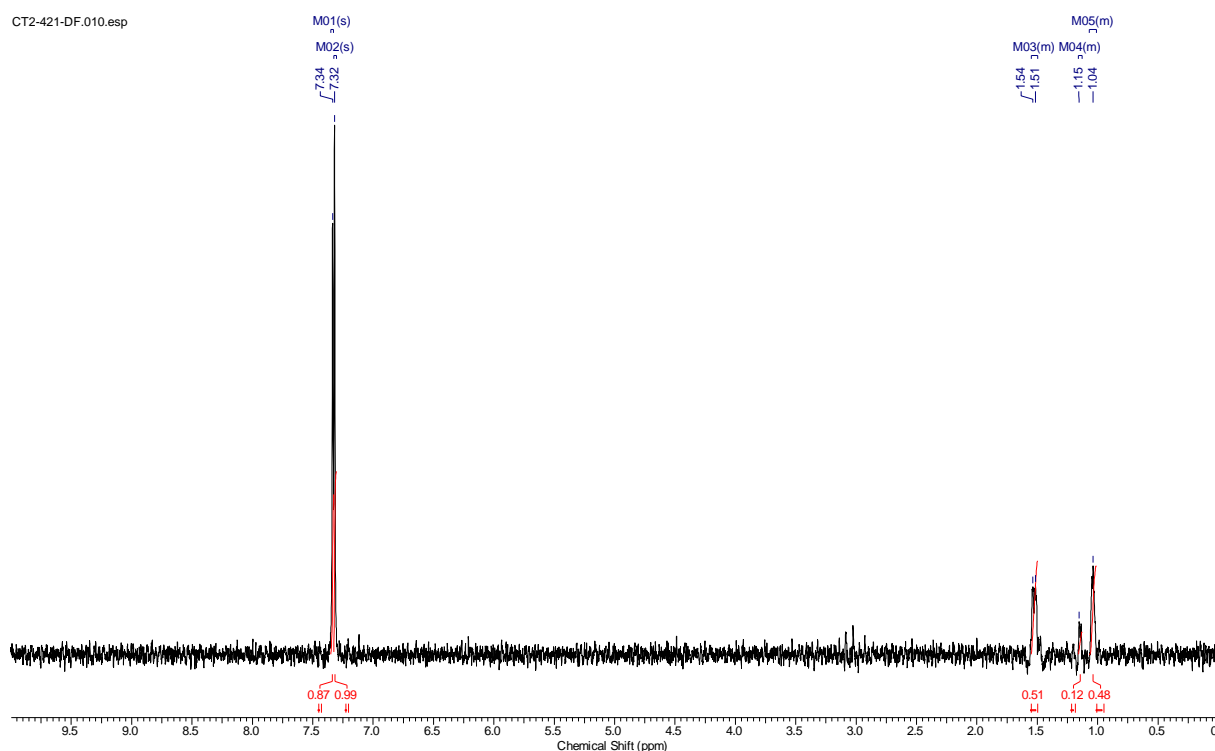


A solution of benzyl (*S*)-3-(3-bromophenyl)-2-((*S*)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate **102** (9 mg, 0.015 mmol) in DCM (2 mL) was added in a 10 mL round flask. 2 mL of TFA were added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with toluene (three times). The solid was solubilized in the minimum of methanol with 2 mL of DCM and filtrated over Amberlyst A-21 ion-exchange resin. The solvent was removed under vacuum and the solid was then co-evaporated with DCM (three times). The solid was dissolved in a mixture water/methanol 1:1 (2 mL) and transferred in a 5 mL single-neck flask. 5% Palladium on charcoal (7 mg, 3.29  $\mu$ mol Pd) was added to the reaction mixture. The flask was introduced into the glovebox and attached to the tritiation manifold with an attachment collar. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum then allowed to warm to room temperature (two times). Tritium gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours under a tritium pressure of 0.78 bars. The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the tritium atmosphere removed. The reaction mixture was filtered through a syringe filter, washed with a mixture water/methanol 5:5, then treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL) and evaporated to dryness. Labile tritium atoms were removed by three successive cycles of dissolution in methanol and concentration *in vacuo*. 97 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting). Specific activity not determined.

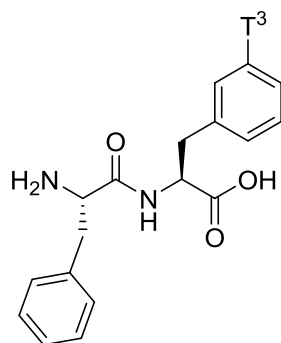
RuNP@PVP 16% (5 mg) were charged in a 5 mL round flask in a glove-box under argon. The solid was dissolved in thoroughly degassed NaOH 0.01M (2 mL) and transferred in the 5

mL single-neck flask. The flask was introduced into the glovebox and attached to the tritiation manifold with an attachment collar. The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum then allowed to warm to room temperature (two times). The reaction mixture was frozen in liquid nitrogen, placed under high vacuum, Tritium gas was then introduced and the reaction was allowed to warm to room temperature. Stirring was maintained for 2 hours, at 55°C, under a tritium pressure of 1.43 bar. The reaction flask was then frozen in liquid nitrogen and the tritium atmosphere removed. The reaction mixture was treated with Dowex 50W-X8 (Pasteur pipette, solvent of elution: H<sub>2</sub>O:DMF 50:50, 10 mL then ammonium hydroxide solution 20%:DMF 50:50, 20 mL) then evaporated to dryness. Labile tritium atoms were removed by three successive cycles of dissolution in methanol and concentration *in vacuo*. 210 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting). Specific activity not determined.

<sup>3</sup>H NMR (427 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.34 (s, 0.87T), 7.32 (s, 1T), 1.50 - 1.55 (m, 0.51T), 1.13 - 1.16 (m, 0.12T), 1.01 - 1.07 (m, 1T)



**(S)-2-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)-3-(3-tritiophenyl)propanoic acid 109c:**



Phe-[3-<sup>3</sup>H]Phe

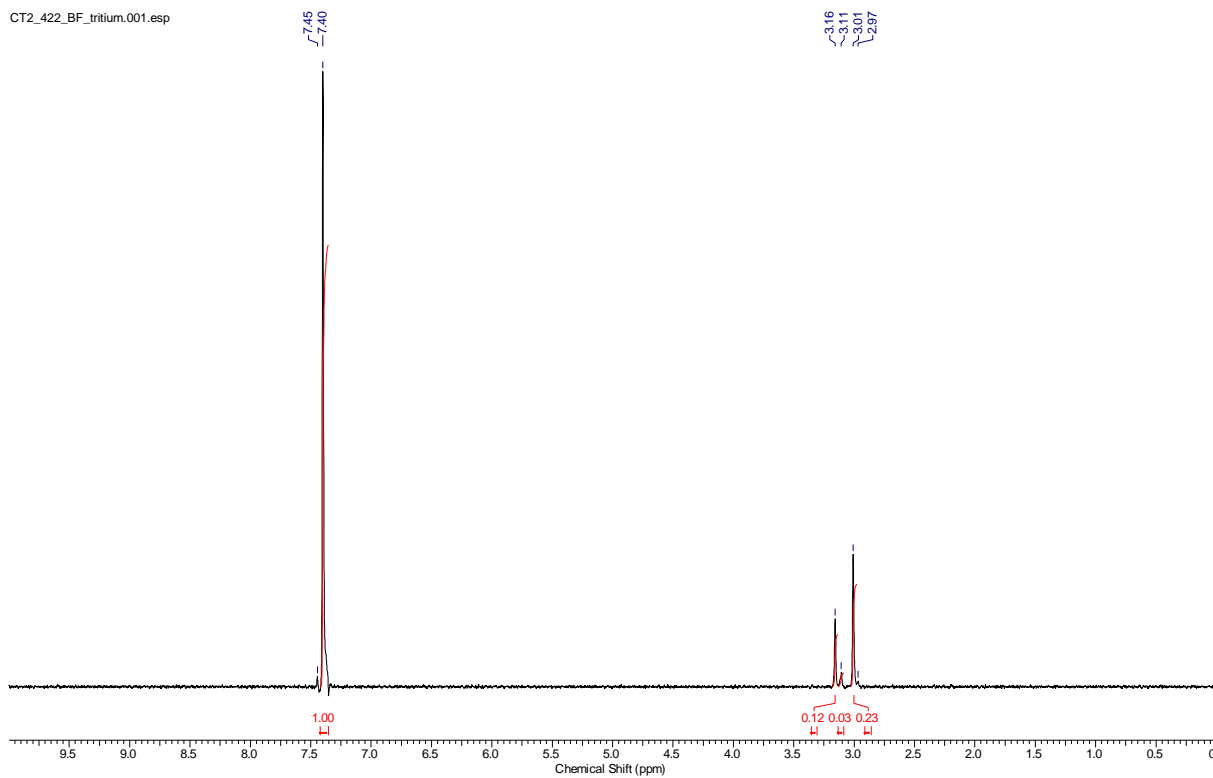
Exact Mass: 314,16

Molecular Weight: 314,38

Prepared from benzyl (S)-3-(3-bromophenyl)-2-((S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-3-phenylpropanamido)propanoate **102**, using the general tritiation procedure, under a tritium pressure of 1.17 bar.

67 mCi of fixed radioactivity were obtained in the tritiated product (liquid scintillation counting).

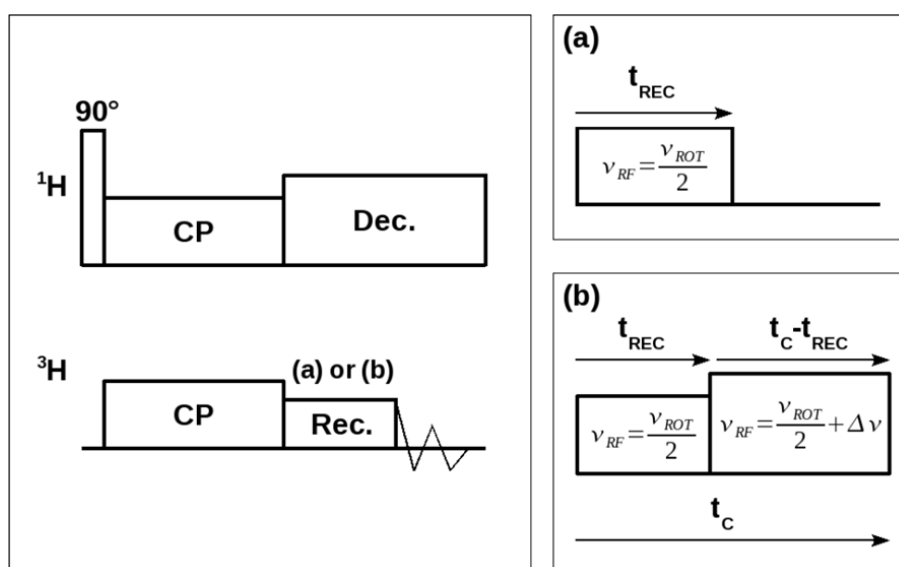
<sup>3</sup>H NMR (427 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.40 (s, 1T), 3.16 (s, 0.12T), 3.11 (br. s., 0.03T), 3.01 (s, 0.23T)



## II. NMR Experiments

The NMR data were collected on a Bruker 500WB spectrometer operating at Larmor frequencies of 499.13 MHz and 532.39 MHz for  $^1\text{H}$  and  $^3\text{H}$ , respectively. A commercial DOTY XC4 3H-1H-X triple resonance 4 mm (o.d.) CPMAS probe was used, at a spinning frequency of 8 kHz. This probe was modified (MAS chamber sealed) so that the spinning gas could be monitored by a radiation detector. In order to reduce the risk of a rotor crash, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> thick wall rotors were used. In addition, the sample volume was reduced by employing inserts so as to ensure high homogeneity of the applied radiofrequency (rf) field.

The two pulse sequences used to measure interatomic distances are depicted in Figure S1.  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  dipolar recoupling was performed by employing a low rf field matched to half the spinning frequency, the so-called HORROR condition<sup>170</sup>.



**Figure S1:** Pulse sequence diagrams used for the distance measurements. (Left panel)  $^3\text{H}$  magnetization was created using 1H-3H cross-polarization (CP) with a contact time of 120  $\mu\text{s}$  and rf fields of 22 kHz and 38 kHz for  $^3\text{H}$  and  $^1\text{H}$ , respectively. Subsequently, the  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  dipolar recoupling was performed during the Rec. period using rf irradiation under HORROR conditions (i.e. rf field strength matched to half the rotor spinning frequency), and a  $^1\text{H}$  cw decoupling (Dec. period) of about 85 kHz. (Right panel) Two approaches were employed to measure the  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  dipolar oscillation. (a) The recoupling time ( $t_{\text{REC}}$ ) was incremented and followed by the signal detection (Incremental Time version). (b) The recoupling time ( $t_{\text{REC}}$ ) was incremented and followed by a rf irradiation period off the HORROR condition which duration was decremented so as to keep the overall irradiation time ( $t_{\text{C}}$ ) constant (Constant Time version). Between 128 to 1024 scans were co-added for each  $t_{\text{REC}}$  value with a recycle delay ranging from 1 s to 4 s.

<sup>170</sup> N.C. Nielsen, H. Bildsøe, H. J. Jakobsen, M. H. Levitt, *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 1805–1812.

## II. NMR Simulations

The dipolar oscillations were simulated using damped signals combining the response of the  $^3\text{H}$ - $^3\text{H}$  spin pairs (yielding the dipolar oscillation) and of isolated  $^3\text{H}$  spins as follows:

$$S_{sim}(t_{rec}) = \left\{ A \int S_D(t_{rec}; d, \Delta) g(\Delta) d\Delta + B \right\} \times \exp\left(-\frac{t_{rec}}{T_{1\rho}}\right)$$

where  $S_D(t_{rec}; d, \Delta)$  is the signal of a  $^3\text{H}$  spin pair with an interatomic distance  $d$ , subjected to an rf irradiation strength set at the HORROR condition and at a frequency offset  $\Delta$  from the center of the  $^3\text{H}$  line. The latter parameter is introduced to take into account the broad chemical shift distribution, here denoted  $g(\Delta)$ , owing to the amorphous character of the samples.  $T_{1\rho}$  accounts for the relaxation in the rotating frame. With respect to the strength of  $g(\Delta)$ , the effect of the chemical shift difference between the two tritium sites can be neglected. For each sample,  $g(\Delta)$  was obtained from a fit of the MAS NMR spectrum to a Gaussian distribution. A full width at half maximum (FWHM) of about 800–1000 Hz was observed for all samples. The fact that at a  $^1\text{H}$  rf decoupling field higher than 50 kHz no line narrowing was observed confirmed that chemical shift distribution was the main mechanism of line broadening. This distribution  $g(\Delta)$  causes the response of spin pairs to decrease faster than the single spin response. Additionally, in order to account for other imperfections, mainly the rf field inhomogeneity, a Gaussian broadening over the rf field (FWHM of 100 Hz) was also incorporated in the equation.

The simulations were performed using a custom simulation package, implementing advanced features of the Floquet theory<sup>171</sup>.

Determination of the parameters  $d$  and  $T_{1\rho}$  was performed by minimizing the normalized error function

$$\chi^2 = 100 \times \frac{\int (S_{exp}(t_{rec}) - S_{sim}(t_{rec}))^2 dt_{rec}}{\int S_{exp}^2(t_{rec}) dt_{rec}}$$

where  $S_{exp}(t_{rec})$  and  $S_{sim}(t_{rec})$  are the experimental and simulated signals, respectively. It is worth noticing in the first equation that during the minimization procedure, for each  $d$  and  $T_{1\rho}$  values, the parameters A and B are self-consistently determined as  $S_{sim}(t_{rec})$  is linearly

---

<sup>171</sup> T. Charpentier, C. Fermon, J. Virlet, *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 181–190.

dependent upon A and B.  $d$  and  $T_{1\rho}$  are therefore the only two parameters of the fit, so that minimum of  $\chi^2$  can be easily obtained from an exhaustive calculation for a range of  $d$  and  $T_{1\rho}$  values.



