



HAL
open science

Les iminosydnones, de nouveaux outils pour la chimie bioorthogonale

Margaux Riomet

► **To cite this version:**

Margaux Riomet. Les iminosydnones, de nouveaux outils pour la chimie bioorthogonale. Chimie organique. Université Paris-Saclay, 2018. Français. NNT : 2018SACLS463 . tel-01973276

HAL Id: tel-01973276

<https://theses.hal.science/tel-01973276>

Submitted on 8 Jan 2019

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.

Les iminosydnones, de nouveaux outils pour la chimie bioorthogonale

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'université Paris-Sud et au CEA-Saclay

École doctorale n°571 2MIB,
Sciences chimiques : molécules,
matériaux, instrumentation
et biosystèmes

Spécialité de doctorat: Chimie

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 15 novembre 2018, par

Margaux Riomet

Composition du Jury :

Emmanuelle Schulz Directeur de recherche, Université Paris-Saclay (ICMMO)	Président
Arnaud Gautier Maître de conférences, Université PSL (ENS)	Rapporteur
Vincent Aucagne Chargé de recherche, (CBM)	Rapporteur
Mélanie Ethève-Quelquejeu Professeur, Université Paris-Descartes (UMR 8601)	Examineur
Frédéric Taran Chef de service, CEA-Saclay (SCBM)	Directeur de thèse
Davide Audisio Chef de laboratoire, CEA-Saclay (SCBM)	Invité

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été réalisé dans le Service de Chimie Bioorganique et Marquage du CEA-Saclay. Il a été financé par l'IDEX Paris-Saclay en tant que travail de recherche interdisciplinaire. Je tiens tout d'abord l'Université Paris-Saclay qui m'a accordé ce financement, ainsi que le CEA pour son infrastructure et ses équipements.

J'adresse un remerciement sincère aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ces travaux, le Dr. Arnaud Gautier, le Dr. Vincent Aucagne, le Pr. Mélanie Ethève-Quelquejeu et le Dr. Emmanuelle Schulz qui a également accepté d'officier en tant que comité de suivi de thèse durant ces trois années. Les discussions que nous avons eues durant ces rencontres ont été pour moi très enrichissantes.

Mes remerciements vont ensuite au Dr. Bernard Rousseau qui m'a accueillie au sein du SCBM lors de mon stage et qui a accepté d'être mon directeur de thèse jusqu'à sa retraite. Mis à part ses fonctions administratives, il a marqué ma thèse par son dynamisme et son entrain. J'ai particulièrement apprécié ses poignées de main qui en témoignent et j'aspire à dégager la même aura que lui dans mon futur.

Je remercie du fond du cœur le successeur direct de Bernard à la fois en tant que chef de service et en tant que directeur de thèse, le Dr. Frédéric Taran. L'expérience qu'il m'a permis de vivre en intégrant son équipe a été très épanouissante. Je le remercie particulièrement pour la confiance qu'il a pu m'accorder, son partage de connaissances et sa capacité à me faire rêver au quotidien en des projets toujours plus délirants et ambitieux. Malgré sa prochaine entrée dans le club des quinquagénaires, son émerveillement permanent apporte beaucoup de fraîcheur à la vie d'équipe.

Je tiens également à remercier très chaleureusement le Dr. Davide Audisio, qui m'a également encadrée pendant cette thèse, pour sa gentillesse et sa force de caractère. Il a été d'un grand support et d'une grande aide durant toutes les étapes que j'ai traversées. Je le remercie d'avoir accepté d'être la cible principale de mes blagues et autres facéties, sa répartie à l'accent chantant me manquera beaucoup. Cet homme est pour moi une grande source d'inspiration de par son parcours et son implication. Un grand merci pour son soutien sans failles durant mes démarches pour trouver un post-doc. J'espère avoir la carrure pour pouvoir suivre ses traces. Mon seul regret est de ne pas avoir réalisé mon rêve de devenir la nounou de ses merveilleux enfants. Je lui souhaite beaucoup de courage pour l'HDR qu'il devrait passer dans les mois qui arrivent.

Je souhaiterais adresser mes remerciements au Dr. Thierry Naas et le Dr. Stéphanie Simon avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer pour le projet de conception d'ADC dirigés contre les infections bactériennes. Dans ce projet j'ai eu l'opportunité d'apprendre à réaliser des mesures de CMI en phase liquide avec Saoussen Oueslati au CHU de Bicêtre ; je la remercie pour avoir partagé son savoir-faire avec moi. J'aimerais également remercier le Dr. Anne Wijkhuisen pour avoir eu la gentillesse de nous fournir les cellules et pour son intérêt et sa grande implication dans le projet de sondes pro-fluorescentes. Merci également à l'équipe d'Imagif pour nous avoir guidé dans l'utilisation du microscope et pour leurs conseils.

J'adresse un immense merci au Dr. Sarah Bregant pour son accueil au SIMOPRO, son partage et sa pédagogie sur les expériences de biochimie que nous avons effectuées. Les journées passées avec elle au SIMOPRO ont été très agréables et j'ai pu là-bas découvrir une autre façon de travailler, bien éloignée de ma vie de paillasse en chimie organique. Nos discussions, le suspens des résultats et les longues réflexions qui s'en suivaient me manqueront beaucoup. Je tiens ici également à remercier le

Dr. Antoine Sallustrau qui a initié ce projet dans son ancienne vie de post-doc. Je suis à la fois reconnaissante des bases solides qu'il a construites et fière d'avoir réussi à donner un second souffle à ce projet. Avec mon départ et son retour, je lui laisse les rênes du projet et il a toute ma confiance pour le poursuivre.

Je tiens à montrer toute ma gratitude pour l'équipe d'analyse menée par David Buisson. Lui, Elodie et Céline ont toujours été d'une grande gentillesse et m'ont tous accordé le temps nécessaire lorsque j'avais besoin d'eux. J'aimerais plus particulièrement témoigner mon admiration pour Elodie et son courage pendant ces trois années. Sa présence les week-ends m'a donné la force de surpasser la fatigue des derniers mois de thèse. Je souhaite la bienvenue à Amélie et Sabrina, les nouvelles de l'analyse.

Je remercie vivement Chantal qui est d'une aide précieuse et toujours d'excellents conseils. Elle est un guide indispensable pour toute démarche administrative au CEA.

Un grand merci à Lucie et à Elodie qui ont été les premières thésardes que j'ai connues et qui sont vite devenues des exemples pour moi. J'espère avoir réussi à conserver leurs valeurs humaines au sein du laboratoire et à avoir fièrement représenté à mon tour "les filles du C14". Je tiens à remercier Sabrina qui m'a rejointe dès le début de la thèse. Ce fut un long chemin partagé, et je respecte profondément son travail acharné. J'espère que mes instants de folie ne l'auront pas trop traumatisée et je lui souhaite une excellente continuation. Merci à Karine, la Petite Porte, très souvent ma partenaire de crime. J'ai été très touchée par sa sensibilité et sa sincérité. Grazie a Jean-Luc e Antonio grâce à qui je suis capable de baragouiner italien. Il est très intéressant d'être capable de communiquer avec eux en utilisant 3 langues dans la même phrase. Et enfin, bienvenu à Jean-Jacques stagiaire. J'exige qu'il conserve ma paillasse en ordre après mon départ et je lui souhaite une belle thèse.

Je souhaiterais également remercier les post-docs qui ont croisé ma route dans l'équipe : Nathalie qui m'a convertie au sport intensif, Jijy avec qui j'ai partagé la paillasse, Arun pour son humour et sa générosité, Manas pour chauffer le bureau pendant la pause déjeuner, Hui pour sa sagesse, Minghao the best Chinese in the world (and there are so many Chinese), Kim-Kim qui est d'une gentillesse incroyable, Petit Arnaud qui n'a pas de cheveux (et qui est accessoirement super fortiche) et Expédite, une personne bruyante et attachante qui m'a énormément soutenue durant la période de rédaction.

J'aimerais remercier Sandra, maintenant partie qui m'a accueillie avec beaucoup de gentillesse au laboratoire ainsi que Sophie, Olivier et Dominique qui forment une équipe de choc.

Enfin je remercie tous les membres présents et anciens du SCBM avec des mentions spéciales pour JC et Eric pour les discussions diverses que nous avons pu avoir (malgré les histoires abracadabrantes qu'ils ont tenté de me faire croire), Gregounet qui est adorable et qui m'a écoutée parler dans le bus pendant 6 mois alors qu'il souhaitait dormir, Audrey et Hajer les "filles de la combi" toujours à l'écoute de mes petits tracas, Robinou qui me permet de roucouler son prénom, DJA pour les sorties (et auprès de qui je m'excuse à nouveau pour une sombre histoire de matelas), Seb la Débrouille qui m'a filé de quoi déménager 12 fois, Cristelle qui ne m'a pas trop grondée quand je me suis mise des produit dessus, et bien d'autres personnes que j'oublie avec qui j'ai passé de très bons moments.

J'aimerais dire un grand merci à mon Maxime qui m'a supportée et qui est toujours une oreille attentive à mes plaintes. Je me sens heureuse et épanouie à ses côtés et je suis extrêmement fière de lui pour sa thèse et son futur post-doc en Corée.

ABBREVIATIONS ET SYMBOLES

A	Absorbance
AAC	Antibody-Antibiotic Conjugate
Ac	Acétyle
ADC	Antibody-Drug Conjugate
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AIE	Aggregation-Induced Emission
Ala	Alanine
Alloc	Allyloxycarbonyls
Ar	Aryle
Asc	Ascorbate
BARAC	Biarylazacyclooctynone
BCN	Bicyclo[6.1.0]nonyne
Bn	Benzyle
Boc	Butyloxycarbonyl
BODIPY	Bore-dipyrométhene
BSA	Bovin Serum Albumin
Bu	Butyle
CalFluor	Click Activated Luminogenic Fluorophores
CDI	1,1'-carbonyldiimidazole
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMI	Concentration minimale inhibitrice
COSY	Correlation Spectroscopy
CuAAC	Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
CuSAC	Copper-Catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition
Cy	Cyanine
δ	Déplacement chimique
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DAR	Drug-Antibody Ratio
DBCO	Aza-dibenzocyclooctyne
dbpf	<i>ditert</i> -butylphosphino ferrocène
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DDAO	9H-(1,3-Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One-7-yl
DFT	Density Functional Theory
DIBAC	Aza-dibenzocyclooctyne
DIBO	4-Dibenzocyclooctynol
DIFO	Difluorinated cyclooctyne
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNS	Dansyl

DPPA	Azoture de diphénylphosphoryle
dppe	1,2-Bis(diphénylphosphino)éthane
DTT	Dithiothréitol
ε	Coefficient d'extinction molaire
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDCI	1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDG	Electron donating group
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
Eq.	Equivalent
ESI	Electrospray ionisation
Et	Ethyle
EWG	Electron withdrawing group
Φ_f	Rendement quantique
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-Transférase
h	heure
HATU	hexafluorophosphate de- <i>N,N</i> -diméthylméthaniminium
HMDS	Hexaméthylidisilazane
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
ICT	Internal Charge Transfer
IEDDA	Inverse electron demand Diels-Alder
Im	Imidazole
ImSyd	Iminosydone
IR	Infra-Red
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
j	jour
<i>k</i>	Constante de vitesse
K _d	Constante de dissociation
KAHA	Ketoacid-Hydroxylamine
λ	Longueur d'onde
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{ex}	Longueur d'onde d'excitation

LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LUMO	Lower Unoccupied Molecular Orbital
mAb	Anticorps monoclonal
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight mass spectrometry
Me	Méthyle
min	minute
Mp.	Melting point
MW	Molecular Weight
n.i.	non isolé
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimide
NMO	<i>N</i> -Méthylmorpholine- <i>N</i> -Oxide
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nu	Nucléophile
PBK	Phosphate buffer containing potassium chloride
PBS	Phosphate Buffer Saline
PEG	Polyéthylène Glycol
PeT	Photo-induced electron Transfer
Ph	Phényl
PNB	<i>p</i> -nitrobenzène
Poc	Propargyloxycarbonyl
Rdt	Rendement
Rflx.	Reflux
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive oxygen species
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAP	Sydnone Alkyne Photoclick chemistry
sat	saturated
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SI	Standard interne
SPAAC	Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition
SPADC	Strain-Promoted Alkyne-Diazoacetate Cycloaddition
SPANAC	Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition
SPANOC	Strain-Promoted Alkyne-Nitrone oxide Cycloaddition
SPSAC	Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition
t.a.	Température ambiante
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TBET	Through Bond Energy Transfer
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyle
TCDI	1,1'-thiocarbonylimidazole
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine

TCO	<i>trans</i> -cyclooctene
TEP	Tomographie à émission de positons
TFA	Trifluoroacetic acid
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine
TIBS	2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl
TLC	Thin Layer Chromatography
TMTH	3,3,6,6-tétraméthylthiacycloheptyne
Tol	Tolyl
TRITC	Tetramethylrhodamine
Ts	Tosyle
URSS	Union des républiques socialistes soviétiques
UV	Ultra-violet

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
I. La chimie bioorthogonale	1
A. Définition.....	1
B. Les ligations chimiques.....	4
1. La condensation entre les carbonyles et les amines nucléophiles.....	4
2. La ligation chimique native.....	5
3. La ligation de Staudinger.....	6
C. Les réactions métallo-catalysées.....	7
1. La cycloaddition azoture/alcyne catalysée au cuivre (I).....	7
2. La cycloaddition sydnone/alcyne catalysée au cuivre (I).....	10
3. Les réactions catalysées au palladium	13
D. Les cycloadditions sous contrainte stérique	14
1. La cycloaddition azoture/cycloalcynes	14
2. La cycloaddition sydnone/cycloalcynes	17
3. Les cycloadditions des alcynes cycliques avec d'autres dipôles.....	18
4. La réaction entre les tétrazines et les alcènes tendus	20
E. Les réactions photo-induites	22
F. Bilan sur les réactions bioorthogonales	23
II. Travaux antérieurs du laboratoire et objectifs des travaux de thèse.....	24
A. Les mésoioniques, la découverte d'une nouvelle réaction de cycloaddition bioorthogonale.....	24
1. Généralités à propos des mésoioniques	24
2. Découverte d'une réaction de « click & release » par criblage de combinaisons mésoionique/cycloalcyne	25
B. Généralités sur les iminosydnone.....	28
C. Objectifs des travaux de thèse	29
Partie I – Synthèse et réactivité des Iminosydnone.....	31
I. Synthèse	31
A. Formation du cycle Iminosydnone	31
1. La formation des iminosydnone dans la littérature.....	31
2. Synthèse des sels de 3-aryl-iminosydnone.....	33
B. Fonctionnalisation en position N ₆ -exocyclique	36
1. Utilisation d'électrophiles.....	36

2.	<i>Utilisation de nucléophiles.....</i>	<i>44</i>
C.	Fonctionnalisation de l'aryl en position N ₃	58
1.	<i>Les iminosydnone en tant que substrats dans les réactions pallado-catalysées</i>	<i>58</i>
2.	<i>Utilisation de couplage de Sonogashira</i>	<i>60</i>
3.	<i>Carbonylation des iminosydnone.....</i>	<i>61</i>
4.	<i>Autres réactions compatibles</i>	<i>62</i>
D.	Fonctionnalisation des iminosydnone en position C ₄	63
1.	<i>La fonctionnalisation des iminosydnone en position C₄ décrites dans la littérature ...</i>	<i>63</i>
2.	<i>Fonctionnalisation des iminosydnone en position C₄ des iminosydnone développées au laboratoire.....</i>	<i>69</i>
3.	<i>Utilisation de réactions pallado-catalysées pour la fonctionnalisation de la position C₄.....</i>	<i>71</i>
II. Réactivité des iminosydnone dans les réactions de cycloaddition avec les alcynes cycliques.....		73
A.	Influence du groupement substituant l'azote exocyclique.....	75
B.	Influence de la substitution sur l'aryl en position N ₃	76
C.	Influence de la substitution en position C ₄	77
D.	Autres facteurs influençant la cycloaddition.....	78
Partie II – Développement d'iminosydnone pro-fluorescentes pour des applications en imagerie cellulaire		81
I. Les sondes pro-fluorescentes dans la littérature		82
A.	Rappels sur la fluorescence.....	82
B.	Les effets d'extinction de fluorescence.....	85
1.	<i>Le transfert de charge intramoléculaire (ICT).....</i>	<i>86</i>
2.	<i>Le transfert d'électrons photoinduit (PeT).....</i>	<i>88</i>
3.	<i>Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET)</i>	<i>90</i>
4.	<i>Autres sondes pro-fluorescentes</i>	<i>93</i>
II. Synthèse d'iminosydnone pro-fluorescentes		96
A.	Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes exploitant le phénomène ICT	97
1.	<i>Résultats antécédents du laboratoire sur le phénomène ICT et les sydone.....</i>	<i>97</i>
2.	<i>Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes substituées sur l'aryle en position N₃.....</i>	<i>99</i>
B.	Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes exploitant le phénomène PeT..	104
1.	<i>Résultats antécédents du laboratoire sur le phénomène PeT et les sydone.....</i>	<i>104</i>
2.	<i>Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes substituées sur l'aryle en position N₆.....</i>	<i>107</i>
C.	Synthèse de double sondes iminosydnone, substituées en position N ₃ et N ₆	118

1.	<i>Introduction bibliographique sur les sondes à double exaltation de fluorescence.....</i>	118
2.	<i>Synthèse de sondes iminosydnone double, substituées en position N₃ et N₆.....</i>	120
III.	Etude des propriétés optiques des sondes synthétisées	123
A.	Les iminosydnone substituées en position N ₃	124
B.	Les iminosydnone substituées en position N ₆	126
C.	Les iminosydnone substituées en position N ₃ et N ₆	127
D.	Suivi de la réaction des iminosydnone libérant deux fluorophores "in vitro"	128
IV.	Utilisation des iminosydnone à double exaltation de fluorescence en microscopie confocale pour l'imagerie cellulaire.....	131
A.	Choix de la sonde et des conditions d'observation.....	131
B.	Utilisation de l'iminosydnone 69 pour le marquage cellulaire	133
Partie III – Développement d'espaceurs clivables bioorthogonaux pour des applications en biologie.....		
I.	Introduction sur les espaceurs clivables	139
A.	Clivage enzymatique.....	140
B.	Clivage photo-induit	141
C.	Clivage à pH acide.....	142
D.	Clivage par voie chimique.....	143
1.	<i>Clivage activé par des métaux de transition</i>	<i>143</i>
2.	<i>Clivage par échange de thiol</i>	<i>145</i>
E.	Espaceurs auto-immolables	147
F.	Création d'un building-block bifonctionnel clivable employant les iminosydnone.....	149
II.	Développement de sondes pour le target-fishing.....	153
A.	Contexte bibliographique	153
B.	Conception d'une sonde de target-fishing incorporant une iminosydnone en tant qu'espaceur clivable (Génération 1)	155
1.	<i>Concept et synthèse de la sonde</i>	<i>155</i>
2.	<i>Utilisation de l'iminosydnone Probe 1 pour le target-fishing.....</i>	<i>156</i>
C.	Nouvelles générations de sondes pour le target-fishing.....	158
1.	<i>Axes d'amélioration des iminosydnone pour le target-fishing</i>	<i>158</i>
2.	<i>Synthèse.....</i>	<i>159</i>
3.	<i>Résultats des nouvelles sondes dans des expériences de target-fishing</i>	<i>163</i>
III.	Développement de conjugués Anticorps/Antibiotiques	170
A.	Introduction bibliographique sur les conjugués Anticorps/Médicament (ADC)	170
1.	<i>Principes actifs utilisés.....</i>	<i>172</i>
2.	<i>Le ciblage.....</i>	<i>172</i>

3.	<i>L'espaceur</i>	172
4.	<i>La bioconjugaison</i>	172
B.	Preuve de concept pour la formation d'un ADC clivable par un cycloalcyne	173
C.	Utilisation des ADC pour le traitement d'infections bactériennes	174
D.	Le choix des antibiotiques	177
E.	Synthèse des analogues	180
1.	<i>Chloramphenicol</i>	180
2.	<i>Novobiocine</i>	181
3.	<i>La vancomycine</i>	183
4.	<i>La tobramycine</i>	185
F.	Activités inhibitrices des analogues d'antibiotiques synthétisés	188
G.	Perspectives.....	190
	Conclusion et Perspectives	191
	Partie expérimentale.....	197
I.	Materials and equipment	197
II.	Experimental Part: Part I	198
A.	Synthetic Procedure and Analytical Data	198
B.	Kinetic data for Iminosydnone/Cyclooctyne cycloaddition.....	246
III.	Experimental Part: Part II	253
A.	Synthetic Procedure and Analytical Data	253
B.	Optical properties.....	274
C.	Cell culture.....	286
IV.	Experimental Part: Part III	287
A.	Synthetic Procedure and Analytical Data	287
B.	Determination of kinetic constants	305
C.	Stability and reactivity in plasma.....	310
D.	Experiments with Myoglobin:	312
E.	Determination of CMI.....	326

INTRODUCTION GENERALE

I. La chimie bioorthogonale

A. Définition

Pour comprendre le rôle et les fonctions des biomolécules au sein d'un organisme, il est nécessaire de les étudier dans leur environnement natif. La visualisation de ces entités dans la complexité de leur milieu représente un défi majeur pour la communauté des biochimistes et des biophysiciens. Pour y répondre, différentes méthodes ont été développées pour greffer des étiquettes sur les biomolécules ciblées afin de les discerner et d'étudier leur comportement.

Les efforts développés dans ce but ont mené à des découvertes scientifiques majeures comme la protéine fluorescente verte (GFP) et ses différentes variantes.^{1, 2, 3} L'impact considérable de cette découverte a permis à Shimomura, Chalfie et Tsien d'obtenir le prix Nobel de chimie en 2008. Cette protéine et ses dérivés sont toujours largement utilisées aujourd'hui, notamment en les fusionnant par génie génétique avec les protéines d'intérêt. Le signal de fluorescence engendré facilite leur localisation et l'identification de leur mode d'action. A côté de son efficacité pour l'étude de protéines, cette technologie a aussi un certain nombre d'inconvénients. En particulier, elle n'est pas compatible avec le suivi d'autres biomolécules telles que les acides nucléiques, les lipides, les glycanes ainsi que les nombreuses protéines subissant des modifications post-traductionnelles capitales. Une autre limitation de la GFP est sa taille relativement grosse (27 kDa) qui peut entraîner des changements structuraux et modifier la localisation et la fonction de la protéine sur laquelle elle a été greffée.

Pour parfaire les moyens d'investigation, les chimistes ont développé ces dernières années de nouveaux outils basés sur des réactions chimiques appelées bioorthogonales, c'est-à-dire n'interagissant et n'interférant pas avec le système biologique (**Figure 1**).⁴ De manière idéale, les partenaires réactionnels doivent être inertes face à la myriade de fonctionnalités chimiques présentes en milieu biologique et réagir entre eux de manière hautement sélective.

¹ R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.

² J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **2002**, *3*, 906–918.

³ J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, *Science* **2003**, *300*, 87–91.

⁴ Pour des revues complètes, voir : (a) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998 ; (b) R. K. V. Lim, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1589–1600 ; (c) C. P. Ramil, Q. Lin, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11007–11022 ; (d) M. King, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 825–839 ; (e) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605 ; (f) L.-H. Qin, W. Hu, Y.-Q. Long, *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 2214–2228.

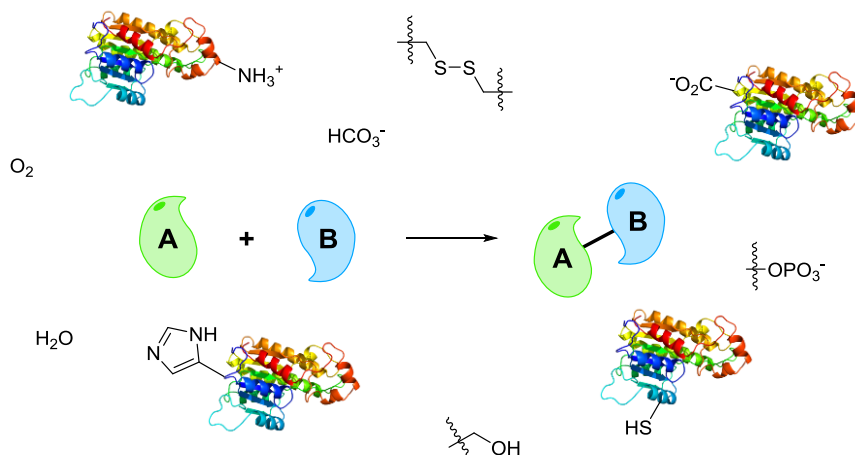


Figure 1 : Réaction bioorthogonale entre les composés A et B, en présence de diverses fonctionnalités présentes dans les milieux biologiques (non exhaustif).

Pour greffer une étiquette sur une biomolécule d'intérêt *via* une réaction bioorthogonale, il faut d'abord incorporer une fonction réactive bioorthogonale. La sonde peut être ajoutée dans un second temps pour marquer la biomolécule (**Figure 2**). Plusieurs méthodes ont été développées pour répondre à la problématique d'incorporation de la fonction d'accroche.^{4a, 5, 6, 7} Cette intégration peut se faire par une modification chimique directe, par incorporation de briques élémentaires (oses, acides aminés, etc.) non naturelles, ou par modification enzymatique.

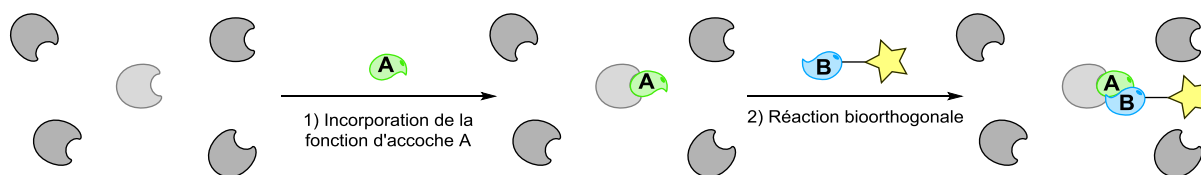


Figure 2 : Processus de marquage d'une biomolécule l'aide d'une réaction bioorthogonale.

Les réactions bioorthogonales permettant la liaison covalente entre la fonction d'accroche et la sonde sont un sujet de recherche brûlant. Peu de réactions répondent parfaitement aux nombreuses contraintes que présentent les milieux biologiques. Outre la bio-inertie évoquée précédemment, les partenaires doivent également être idéalement de petite taille et non toxiques, surtout pour des applications dans des cellules ou organismes vivants. Les conditions réactionnelles doivent être également compatibles avec les pH et températures physiologiques.

La cinétique des réactions bioorthogonales est également un paramètre de grande importance. Elle doit être suffisamment élevée pour deux raisons majeures. Tout d'abord, les concentrations en fonctions réactives disponibles sont faibles voire très faibles selon le système étudié ; une vitesse réactionnelle élevée permet de garantir que la réaction puisse se faire dans ces conditions. Une vitesse élevée permet également de favoriser la réaction par rapport aux autres phénomènes pouvant survenir tels que la métabolisation des réactifs ou les réactions parasites avec les fonctions chimiques présentes dans les milieux biologiques.

De manière générale, les réactions bioorthogonales possèdent une cinétique de réaction d'ordre 2 puisqu'elles font intervenir deux réactifs. Selon la constante de cinétique d'une réaction, nous pouvons anticiper l'échelle de temps nécessaire pour atteindre la conversion totale (**Figure 3**). Dans cet exemple

⁵ G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, 16, 506–513.

⁶ C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030–10074.

⁷ C. D. Spicer, B. G. Davis, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 4740.

la conversion est simulée pour l'introduction des deux réactifs en quantité équimolaire à une concentration de 100 μM .

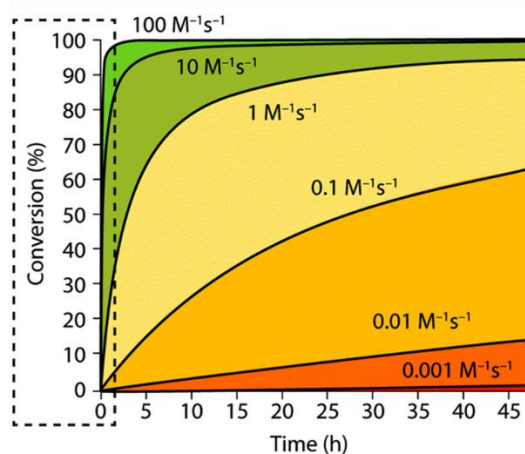
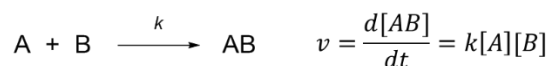


Figure 3 : Relation entre la constante de vitesse d'ordre 2 et la conversion de la réaction pour une concentration initiale de 100 μM pour les deux réactifs.⁸

Le choix d'une réaction bioorthogonale pour une application donnée se fera en fonction de la concentration de biomolécule accessible en corrélation avec la constante de cinétique. Plus la cible est diluée dans le milieu étudié, plus la réaction sélectionnée doit être efficace pour obtenir une ligation efficace dans une échelle de temps raisonnable. La vitesse peut être accélérée par différents artifices comme en utilisant un excès d'un des réactifs ou par des effets de concentration locale. Il est communément admis que la valeur de la constante k doit être de l'ordre de grandeur de $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour pouvoir commencer à envisager des applications en bioconjugaison. Elle doit être au-delà de 100 lorsqu'une application *in vivo* est envisagée.

Dans cette introduction, nous nous intéresserons aux réactions bioorthogonales principales qui ont fait l'objet d'applications dans des milieux cellulaires ou vivants. A partir de cet exposé non exhaustif, nous tirerons un bilan présentant les avantages et inconvénients associés à ces réactions bioorthogonales.

⁸ B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950.

B. Les ligations chimiques

1. La condensation entre les carbonyles et les amines nucléophiles

Les premières réactions décrites remplissant plusieurs critères de bioorthogonalité sont les réactions de condensation entre les carbonyles (aldéhydes et cétones) et les amines nucléophiles bénéficiant d'un hétéroatome donneur en α (hydrazines, hydrazides, alkoxyamines) (**Figure 4**). En plus d'accroître la nucléophilie de l'amine,⁹ cet effet α renforce la stabilité des dérivés oxime et hydrazone formés. La délocalisation électronique induite par les doublets libres de l'hétéroatome α rend le carbone sp_2 moins électrophile. L'effet inductif attracteur quant à lui réduit la basicité de l'atome d'azote. Ces deux effets combinés rendent les liaisons hydrazone et encore plus particulièrement oxime bien moins sensibles à l'hydrolyse que les imines correspondantes.¹⁰

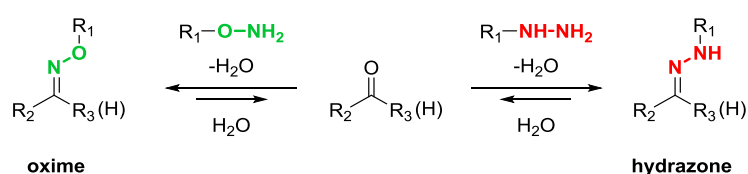


Figure 4 : Formation des liaisons oxime et hydrazone.
Le ratio entre les deux isomères Z/E dépend des substituants et des conditions réactionnelles.

La formation de liaison oxime et hydrazone est plus rapide à pH acide. Elle peut également être accélérée en ajoutant un nucléophile externe comme l'aniline comme l'a démontré Jencks.¹¹ Celle-ci forme d'abord un iminium avec le dérivé carbonyle. Cela accroît considérablement l'électrophilie du carbone sp_2 et l'attaque du semi-carbazide par le nucléophile α est alors accélérée. Cette catalyse a été utilisée plus récemment pour la ligation de deux chaînes peptidiques par Dawson¹² ou par Muir pour le radiomarquage de protéines par le fluor-18.¹³

Depuis la fin des années 1990, ces réactions ont été très exploitées pour diverses applications en bioconjugaison telles que la modification chimique sélective de protéines,¹⁴ de lipides, de glycanes,¹⁵ ainsi que pour l'ingénierie de surface cellulaire.¹⁶

Dans le but d'obtenir un produit réactionnel moins prompt à s'hydrolyser dans les conditions physiologiques, Bertozzi a développé la ligation de Pictet Spengler, basée sur la réaction éponyme.¹⁷ L'intermédiaire oxy-iminium formé après condensation de l'alkoxyamine avec l'aldéhyde est piégé par le carbone C_3 nucléophile de l'indole (**Figure 5**). La réaction a été utilisée avec succès pour le marquage de protéines portant une fonction aldéhyde.

⁹ E. G. Sander, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6154–6162.

¹⁰ J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.

¹¹ E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 826–831.

¹² A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602–15603.

¹³ R. R. Flavell, P. Kothari, M. Bar-Dagan, M. Synan, S. Vallabhajosula, J. M. Friedman, T. W. Muir, G. Ceccarini, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9106–9112.

¹⁴ I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321–322.

¹⁵ H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1242–1243.

¹⁶ L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, *276*, 1125–1128.

¹⁷ P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 46–51.

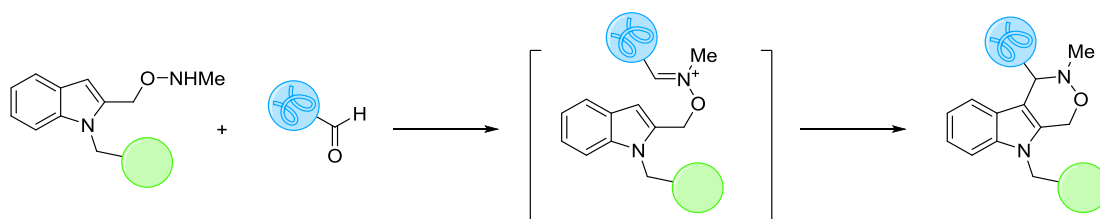


Figure 5 : Ligation de Pictet-Spengler pour la modification de protéines.

Suivant les travaux de Bertozzi, la variante de cette réaction utilisant un indole portant une hydrazine a été également développée par Rabuka.¹⁸ Cette réaction est optimale à pH 6 et permet de procéder à la ligation avec les aldéhydes dans des conditions moins acides.

2. La ligation chimique native

On appelle "ligation native" une réaction chimique formant une liaison peptidique entre les deux partenaires réactionnels sans ajout d'agent activateur d'acides. Ces réactions permettent notamment la liaison entre deux chaînes peptidiques en conservant la structure native du squelette peptidique. La première ligation native a été développée par Kent en 1994.¹⁹ Elle repose sur un réarrangement *S-N*-acyl découvert par Wieland en 1953 qui a lieu lorsqu'un thioester se trouve à proximité d'une amine primaire.²⁰ Cette ligation nécessite un résidu cystéine à l'extrémité *N*-terminale d'un peptide. Le thiol de la cystéine réagit avec un thioester à l'extrémité *C*-terminale d'un second peptide. Le thioester formé se réarrange menant à la formation d'une liaison amide (**Figure 6**).

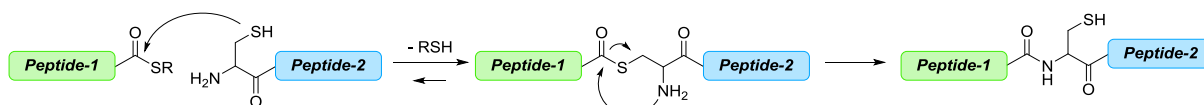


Figure 6 : Formation d'une liaison peptidique via la ligation native entre un thioester *C*-terminal et une cystéine *N*-terminale.

Cette avancée majeure a permis l'obtention de peptides synthétiques comprenant plus de 50 acides aminés. Par ailleurs, cette ligation est extrêmement spécifique et peut être effectuée sur des peptides entièrement déprotégés.

Outre la synthèse peptidique, elle a également été utilisée en tant que ligation bioorthogonale. Elle a par exemple été exploitée par le groupe de Yao dans le développement d'une sonde fluorescente permettant de détecter les protéines GST surexprimées présentant une cystéine en position *N*-terminale.²¹

La nécessité d'avoir un résidu cystéine du côté *N*-terminal reste un inconvénient de cette ligation native, ce qui a suscité le développement de nouvelles ligations natives. C'est dans ce contexte que Bode a enrichi cette famille de réactions avec la réaction de condensation décarboxylante entre les *N*-alkylhydroxylamines et les α -cétoacides, appelée ligation KAHA (**Figure 7**).²²

¹⁸ P. Agarwal, R. Kudirka, A. E. Albers, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. M. Drake, L. C. Jones, D. Rabuka, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 846–851.

¹⁹ P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

²⁰ T. Wieland, E. Bokelmann, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129–149.

²¹ D. S. Y. Yeo, R. Srinivasan, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2003**, *0*, 2870–2871.

²² J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252.

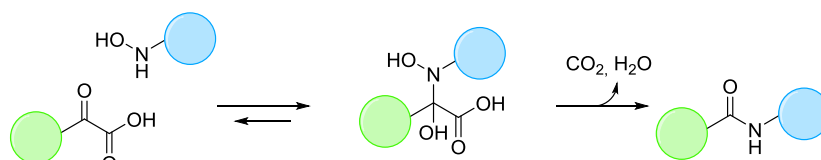


Figure 7 : Ligation KAHA entre une N-alkylhydroxylamine et un α -cétoacide.

Cette ligation a été particulièrement utilisée en synthèse peptidique linéaire²³ ou pour la cyclisation de protéines.²⁴ Sa chimio-sélectivité permet de réaliser ces réactions sur des peptides entièrement déprotégés.

3. La ligation de Staudinger

A l'inverse des réactions de ligation exposées précédemment, la ligation de Staudinger fait intervenir des partenaires réactionnels complètement artificiels que sont une phosphine et un azoture. Il s'agit de la première réaction bioorthogonale présentant cet attribut décrite dans la littérature. L'azoture employé dans cette réaction est un des groupements fonctionnels les plus adaptés à la chimie bioorthogonale. D'un côté il est très stable dans les conditions physiologiques et ne réagit pas avec les fonctions chimiques présentes dans les biomolécules. De l'autre, il possède une haute énergie intrinsèque et une double réactivité comme dipôle [1,3] et comme électrophile doux.

C'est en 2000 que le groupe de Bertozzi décèle l'utilité de la fonction azoture en chimie bioorthogonale en développant la ligation de Staudinger.²⁵ Cette réaction est une variante de la réduction des azotures en amines primaires par la triphénylphosphine décrite en 1919 par Staudinger et Meyer.²⁶ Dans la réaction de réduction classique, l'addition de la phosphine sur l'azoture conduit à un intermédiaire aza-ylure qui est ensuite hydrolysé en milieu aqueux, donnant l'oxyde de phosphine et une amine primaire. En installant un groupement ester en *ortho* du phosphore sur l'un des noyaux aromatiques de la phosphine, il est possible de piéger l'intermédiaire aza-ylure conduisant à la formation d'une liaison amide très stable (**Figure 8**).

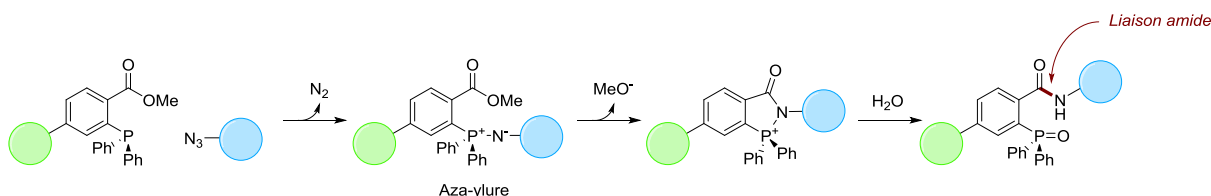


Figure 8 : Mécanisme de la ligation de Staudinger.

Dans la foulée, les groupes de Bertozzi et Raines ont développé une nouvelle version de la ligation de Staudinger appelée "Traceless Staudinger ligation".^{27,28} L'objectif de cette réaction est de se débarrasser du motif aryl phosphine oxydé sur le substrat final. Le lien entre les deux unités est à la fois compact et natif puisqu'il s'agit d'une liaison amide, extrêmement représentée dans les biomolécules. Ceci est possible en inversant l'orientation de l'ester²⁸ (ou du thioester²⁷) sur la phosphine. Il en résulte l'élimination de l'oxyde de phosphine plutôt que du groupement méthoxy (**Figure 9**).

²³ A. O. Ogunkoya, V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9693–9697.

²⁴ T. Fukuzumi, L. Ju, J. W. Bode, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5837–5844.

²⁵ E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.

²⁶ H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.

²⁷ B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939–1941.

²⁸ E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.

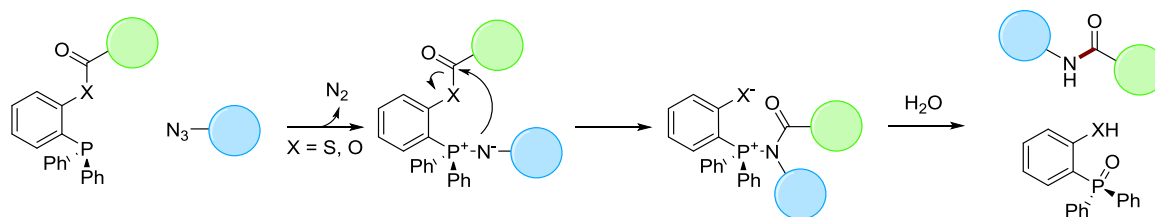


Figure 9 : Ligation de Staudinger Traceless.

La ligation de Staudinger possède tous les critères des réactions bioorthogonales : les substrats de départ ne sont pas présents dans les milieux biologiques, sont stables en milieu aqueux et la réaction est hautement chimio-sélective. Elle a ainsi pu être exploitée pour diverses applications en bioconjugaison.^{29,30} Le groupe de Bertozzi, pionnier dans le développement de la ligation de Staudinger a montré qu'il était possible d'étiqueter des glycanes portant une fonction azoture à la surface des cellules *in vitro*²⁵ ainsi qu'*in vivo*.³¹ Cette réaction a cependant quelques défauts comme une cinétique de réaction lente et la sensibilité de la phosphine à l'oxydation.

C. Les réactions métallo-catalysées

Les métaux de transition sont souvent associés à des espèces très toxiques et non compatibles avec les milieux biologiques. Pourtant ils permettent généralement de catalyser des transformations chimiques de manière efficace à faible concentration, un aspect séduisant pour la conception de réactions bioorthogonales. La réaction bioorthogonale utilisant un métal de transition la plus célèbre est la CuAAC (pour Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition). Derrière cette tête d'affiche, d'autres réactions métallo-catalysées ont également été développées ou adaptées pour respecter les contraintes de la bioorthogonalité.³²

Nous développerons dans ce paragraphe les cycloadditions catalysées au cuivre CuAAC et CuSAC, ainsi que certains couplages pallado-catalysés utilisés en bioconjugaison. Le ruthénium et l'or sont des métaux également employés. Leur utilisation bien que plus anecdotique que celle du cuivre et du palladium, a mené à des applications de bioconjugaison très élégantes.³³

1. La cycloaddition azoture/alcyne catalysée au cuivre (I)

La cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne a été étudiée dans sa version thermique par Huisgen dans les années 1960.³⁴ Cette cycloaddition mène à la formation de triazoles en mélange de deux régio-isomères 1,4 et 1,5 (**Figure 10-A**). Les conditions d'activation thermiques de cette réaction la rendent incompatible avec de nombreux substrats ainsi qu'avec les systèmes biologiques.

²⁹ C. I. Schilling, N. Jung, M. Biskup, U. Schepers, S. Bräse, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4840–4871.

³⁰ S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 8806–8827.

³¹ J. A. Prescher, D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nature* **2004**, 430, 873–877.

³² Pour des revues sur la chimie bioorthogonale catalysée par des métaux de transition, voir : (a) M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 6511–6526 ; (b) J. G. Rebelein, T. R. Ward, *Curr. Opin. Biotech.* **2018**, 53, 106–114.

³³ K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 3579–3584.

³⁴ R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 2494–2507.

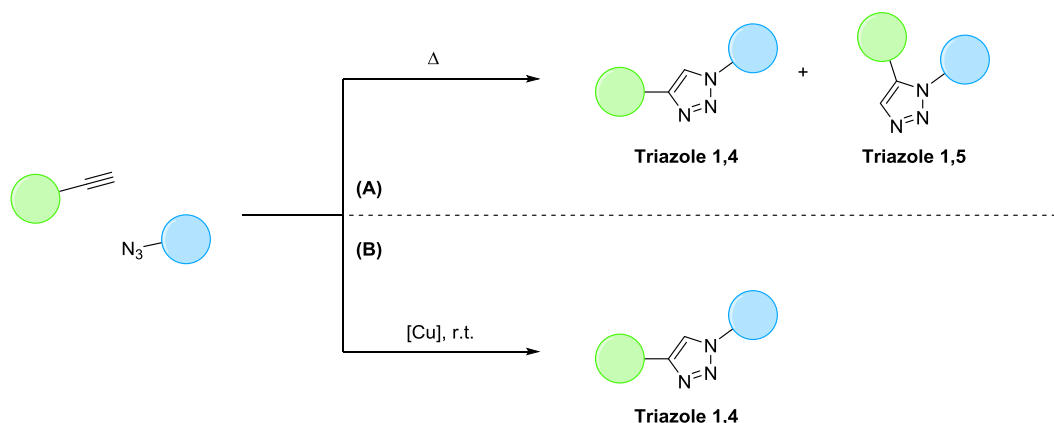


Figure 10 : Réactions de cycloaddition entre alcynes et azotures activée thermiquement (A) ou cupro-catalysée (B).

En 2002, la cycloaddition entre les azotures et les alcynes terminaux est remise au goût du jour par les groupes de Sharpless et de Meldal qui démontrent qu'en utilisant des sels de cuivre (I) il est possible d'obtenir uniquement le régio-isomère 1,4 à température ambiante (**Figure 10-B**).^{35, 36} De cette manière, la CuAAC s'inscrit dans les critères de la chimie click, définie par Sharpless un an plus tôt.³⁷

La réaction nécessite une activation par des sels de cuivre (I) générés *in situ* par réduction de cuivre (II) par l'ascorbate de sodium. En 2013, Fokin montre en utilisant un acétylénure de cuivre et une source externe de cuivre-63 que le mécanisme réactionnel de la CuAAC passe par une espèce dinucléaire de cuivre selon le mécanisme présenté dans la **Figure 11**.³⁸ Cet intermédiaire clé a par la suite été isolé par le groupe de G. Bertrand.³⁹

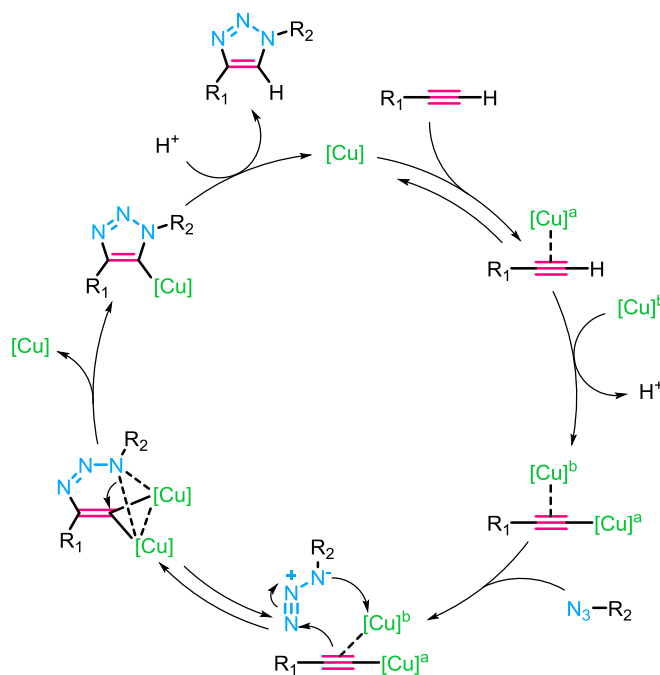


Figure 11 : Mécanisme proposé par Fokin pour la CuAAC.³⁸

³⁵ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

³⁶ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

³⁷ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.

³⁸ B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457–460.

³⁹ L. Jin, D. R. Tolentino, M. Melaimi, G. Bertrand, *Science Advances* **2015**, *1*, e1500304.

Dans l'optique d'accélérer encore la réaction de CuAAC en conservant des concentrations en cuivre peu élevées, les chercheurs se sont penchés sur le système chélatant du cuivre.^{40, 41} Pour cela, deux stratégies sont possibles.

La première méthode consiste à utiliser des ligands plus spécifiques du cuivre (I).⁴² Les ligands polytriazoles se sont révélés excellents dans ce but. Le TBTA a été le premier ligand développé de cette famille⁴³ et des analogues portant des groupements hydrosolubilisant ont été développés à sa suite (**Figure 12**).

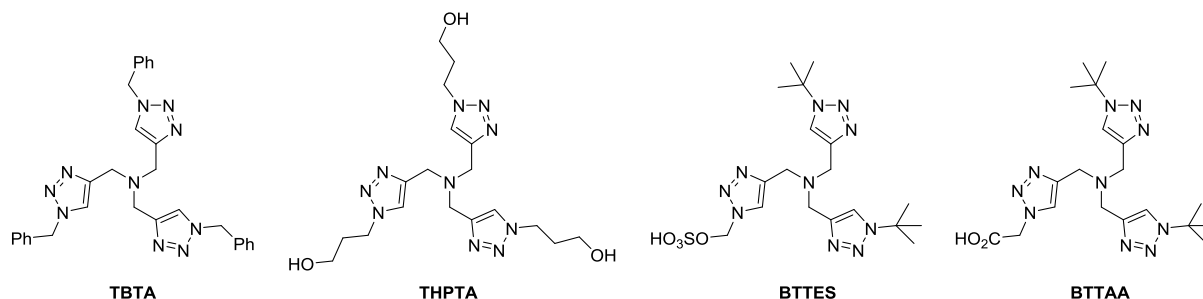


Figure 12 : Exemples de ligands tris-triazoles développés pour la CuAAC.

La seconde stratégie nécessite de plus grands efforts de synthèse, mais conduit également à une augmentation de la vitesse de réaction plus nette. Elle consiste à introduire les unités chélatantes du cuivre sur le partenaire azoture (**Figure 13**). Employée dans un premier temps par Ting avec un azoture-picolyl,⁴⁴ des azotures chélatant plus sophistiqués ont ensuite été élaborés dans notre laboratoire⁴⁵ et par le groupe de Zhang.⁴⁶ Ces composés possèdent deux triazoles permettant une meilleure chélation du cuivre et affichent une cinétique de réaction pouvant atteindre $1300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

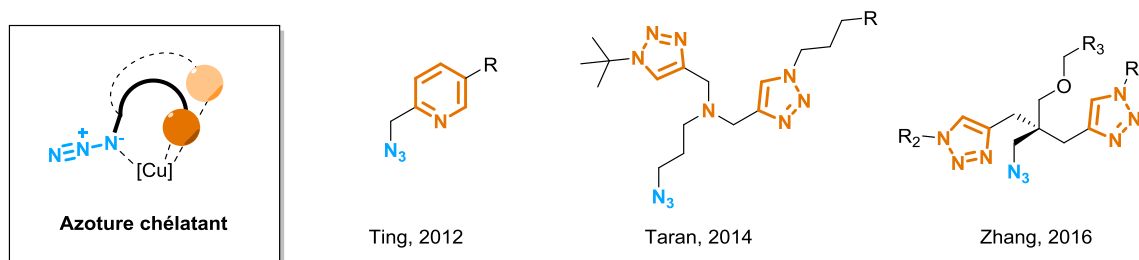


Figure 13 : Azotures chélatants développés pour accélérer la CuAAC.

La petite taille des fonctions azoture et alcyne terminal leur permettent d'être incorporées facilement dans une large variété de molécules et de biomolécules. Cette maniabilité fait que la CuAAC est aujourd'hui un outil de choix pour de nombreuses applications en bioconjugaison.

⁴⁰ H. Struthers, T. L. Mindt, R. Schibli, *Dalton T.* **2009**, 39, 675–696.

⁴¹ E. Haldón, M. C. Nicasio, P. J. Pérez, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 9528–9550.

⁴² V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12705–12712.

⁴³ T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853–2855.

⁴⁴ C. Uttamapinant, A. Tangpeerachaikul, S. Grecian, S. Clarke, U. Singh, P. Slade, K. R. Gee, A. Y. Ting, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5852–5856.

⁴⁵ V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 126, 5982–5986.

⁴⁶ Y. Su, L. Li, H. Wang, X. Wang, Z. Zhang, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2185–2188.

Parmi ces études, on trouve la modification de protéines *in vitro* et *in vivo* par incorporation d'acides aminés non naturels azotures ou alcynes suivi de CuAAC.^{47, 48} La CuAAC a également permis l'imagerie *in vivo* de différentes biomolécules comme des phospholipides dans des tissus de souris⁴⁹ ou les glycanes dans des embryons de poissons-zèbres.⁵⁰

La CuAAC possède tout de même des limitations en termes de toxicité malgré les différentes améliorations développées depuis sa découverte. Les cellules tolèrent difficilement des concentrations de cuivre (I) supérieures à 100 μM .^{4a} La réduction du cuivre (II) au cuivre (I) générée par l'ascorbate de sodium, qui est la méthode la plus utilisée est également connue pour générer des ROS, dégrader les biomolécules et générer une toxicité cellulaire.⁵¹

2. La cycloaddition sydnone/alcyne catalysée au cuivre (I)

Les sydnones sont des dipôles hétérocycliques à cinq chaînons. Elles appartiennent à la famille des mésoioniques (cf. Introduction générale-II.A.1. Généralités à propos des mésoioniques). A l'image des azotures, elles sont capables de subir des cycloadditions 1,3-dipolaires avec les alcynes.⁵² Cette réactivité a été observée pour la première fois par Huisgen en utilisant de très fortes températures.⁵³ La réaction se fait en deux étapes, une cycloaddition [3+2] suivie d'une réaction de rétro-Diels-Alder conduisant à la formation d'un pyrazole et l'extrusion d'une molécule de CO_2 (**Figure 14a**). Jusqu'à récemment, cette réactivité était peu exploitée de par sa mauvaise régiosélectivité et les conditions drastiques de température qu'elle nécessitait.

⁴⁷ A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782–11783.

⁴⁸ A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164–11165.

⁴⁹ C. Y. Jao, M. Roth, R. Welti, A. Salic, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15332–15337.

⁵⁰ D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.

⁵¹ V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912–1916.

⁵² E. Decuypère, L. Plougastel, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 11515–11527.

⁵³ R. Huisgen, R. Grashey, H. Gotthardt, R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, *1*, 48–49.

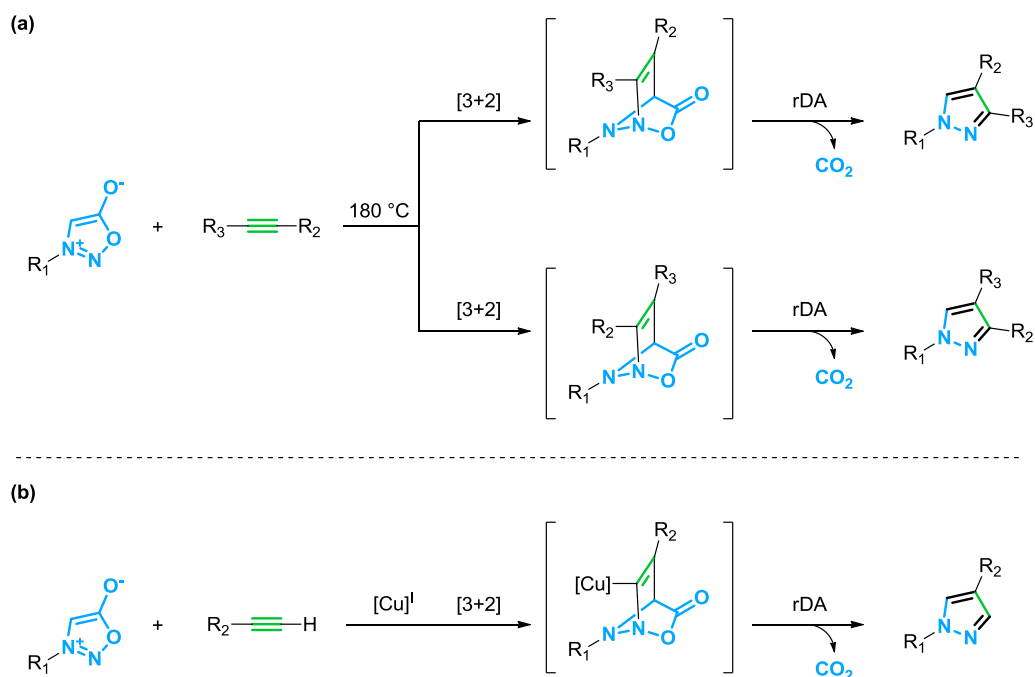


Figure 14 : Cycloaddition entre les sydnones et les alcynes ;
 a) version thermique ; b) version catalysée par des sels de cuivre I (CuSAC).

La biocompatibilité de la cycloaddition entre les sydnones et les alcynes a pu être atteinte récemment. Lors d'un criblage visant à découvrir de nouvelles réactions dipolaires métallo-catalysées réalisé dans notre laboratoire, la réactivité entre les sydnones et les alcynes terminaux en présence de cuivre (I) a pu être révélée.⁵⁴

Cette nouvelle réaction, la CuSAC ("Copper-Catalyzed Sydnone-Alkyne Cycloaddition"), possède tous les critères d'une réaction click au sens de Sharpless : les rendements sont très élevés, l'étendue de la réaction est très large, elle est compatible avec des conditions aqueuses et le seul sous-produit de la réaction est le dioxyde de carbone qui est inoffensif (**Figure 14b**).

L'intérêt de la CuSAC en bioconjugaison a été démontrée par le marquage sélectif de l'albumine de sérum bovin (BSA). La protéine a été fonctionnalisée par une sydnone alkyne, puis marquée par la réaction de CuSAC avec un alkyne dans des conditions physiologiques. Des analyses de MALDI-TOF et de SDS-PAGE ont montré une efficacité de 75% de la réaction (**Figure 15**).

⁵⁴ S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12056–12060.

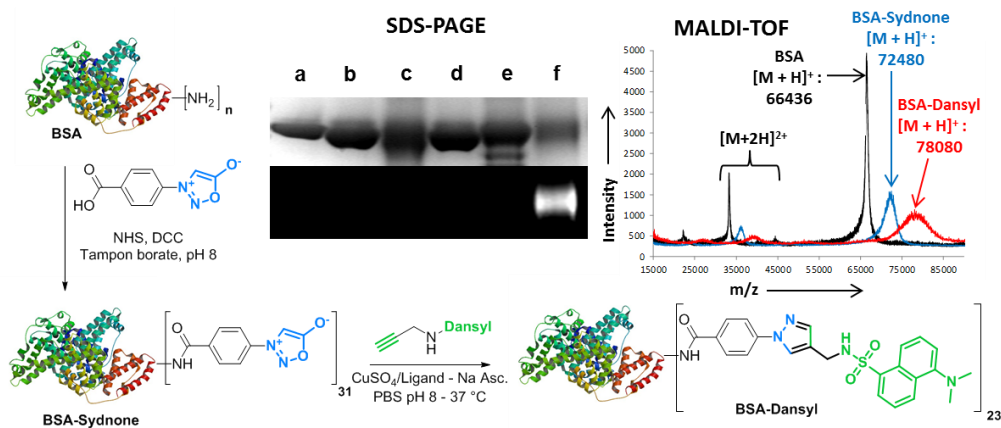


Figure 15 : Dansylation de la BSA en utilisant la réaction CuSAC. SDS-PAGE : l'image supérieure montre la coloration au bleu de Coomassie ; l'image inférieure montre le gel visualisé sous irradiation UV. Voie a : BSA, voie b : BSA-Sydnone ; voie c : sans l'alcyne ; voie d : sans cuivre ; voie e : sans sydnone ; voie f : BSA-Dansyl. Analyse MALDI-TOF de la BSA, BSA-Sydnone et BSA-Dansyl. Ligand : bathophenanthrolinedisulfonic acid.

Le comportement des sydnones avec les alcynes terminaux est très comparable à celui des azotures. Elles possèdent en plus l'avantage d'avoir une position de fonctionnalisation supplémentaire (*i.e.* la position C₄). Néanmoins les similitudes entre la CuAAC et la CuSAC soumettent cette cycloaddition aux mêmes limites concernant la toxicité du cuivre (I) et du système catalytique utilisé plus généralement.

3. Les réactions catalysées au palladium

Les complexes palladiques sont des outils formidables pour la formation de liaisons C-C. Les réactions de couplages pallado-catalysées ont été exploitées pour différentes applications en bioconjugaison, particulièrement celles supportant des conditions aqueuses. C'est le développement de nouveaux systèmes catalytiques solubles dans l'eau et biocompatibles qui a poussé la recherche dans la direction de la bioconjugaison pallado-catalysée (**Figure 16**).^{32a, 55}

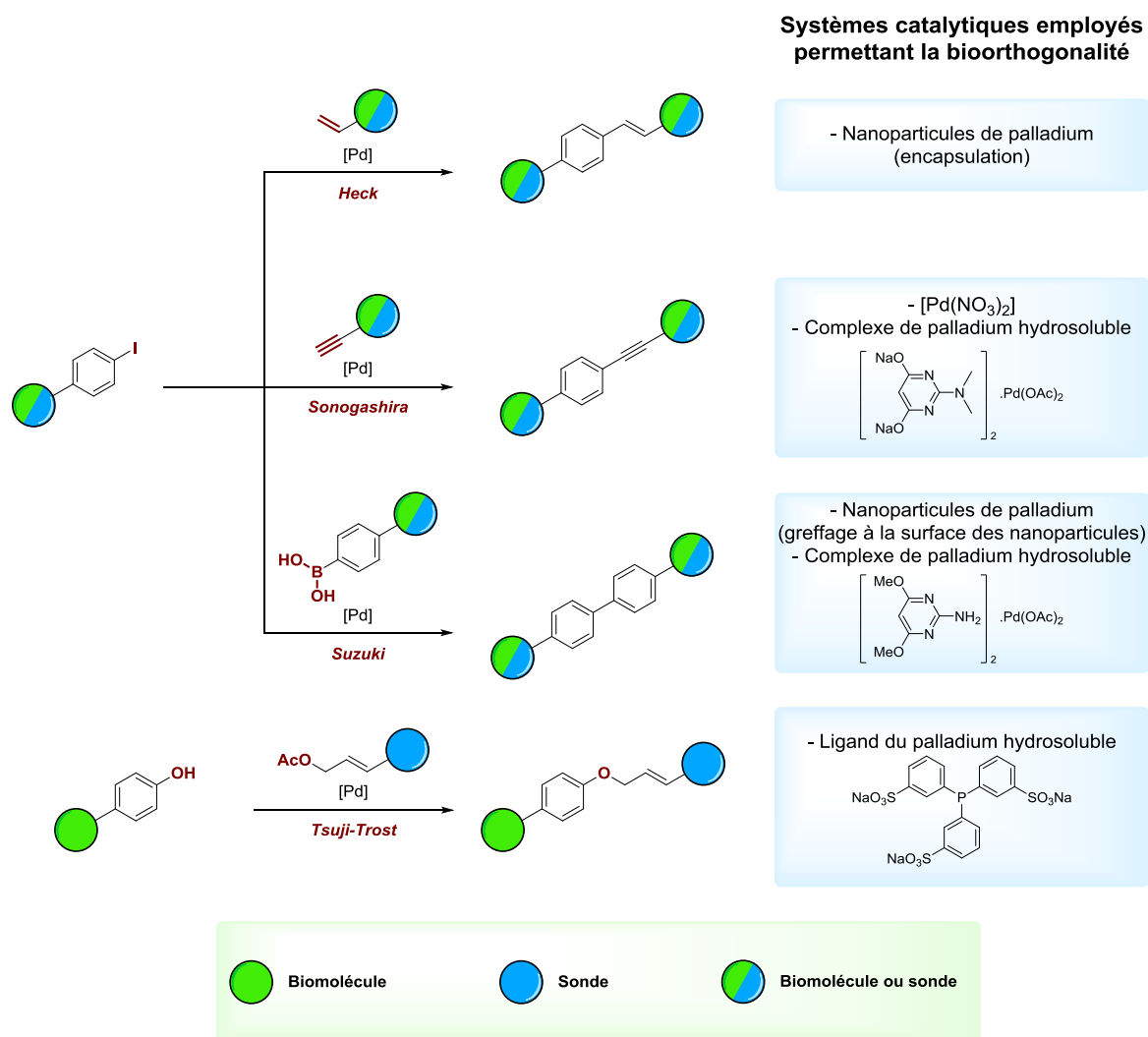


Figure 16 : Réactions pallado-catalysées utilisées pour la bioconjugaison.

Le couplage de Suzuki-Miyaura est sans conteste la réaction pallado-catalysée qui a été la plus utilisée pour des applications en bioconjugaison. C'est probablement son usage régulier en milieu aqueux qui a motivé les chercheurs à l'utiliser comme outil pour marquer les biomolécules. C'est en 2005 que le premier exemple de réaction de Suzuki sur une protéine est reporté par Hamachi.⁵⁶ Plusieurs acides boroniques dont des fluorophores sont ainsi greffés sur une protéine possédant une iodo-phénylalanine.

L'incorporation d'acides aminés non naturels comportant un aryl-iodé ou un acide boronique comme substitut de phénylalanine a très certainement été un moteur considérable dans l'amélioration

⁵⁵ S. V. Chankeshwara, E. Indrigo, M. Bradley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 128–135.

⁵⁶ A. Ojida, H. Tsutsumi, N. Kasagi, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3301–3305.

de la biocompatibilité du couplage de Suzuki, surtout en ce qui concerne le système catalytique. En 2009, le groupe de Davis reporte un nouveau système catalytique hydrosoluble et permettant d'augmenter singulièrement les rendements de couplage avec les protéines en conditions physiologiques (**Figure 17**).⁵⁷ Cet article est le premier exemple dans lequel la réaction de Suzuki avec un partenaire protéine est complète. Le catalyseur développé par Davis a ensuite été largement utilisé dans des applications de marquage de diverses biomolécules.^{58, 59}

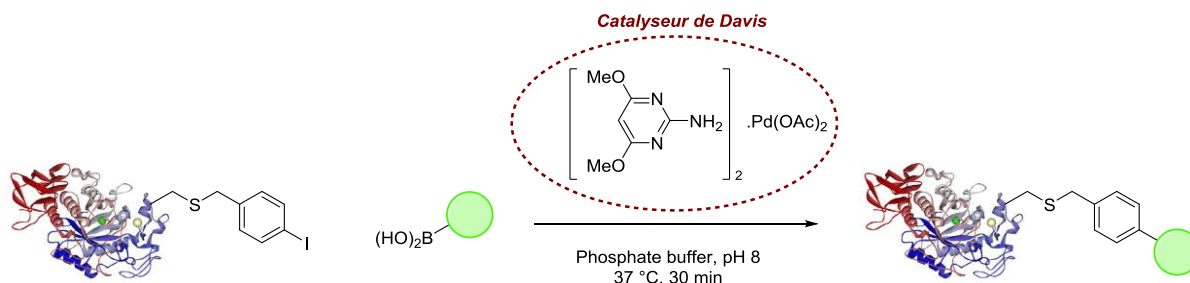


Figure 17 : Couplage de Suzuki pour fonctionnaliser des protéines.

Les autres couplages, bien moins employés, ont été l'objet d'études intéressantes. Par exemple la réaction de Tsuji-Trost permet de cibler sélectivement les résidus tyrosines parmi tous les acides aminés portant une fonction nucléophile.⁶⁰ Un couplage de Sonogashira se dispensant de cuivre a également été mis au point avec un catalyseur de structure proche de celui de Davis. Ce système a été efficace pour marquer des protéines portant des alcynes exprimées par des bactéries *E. coli*.⁶¹

En dehors de ces couplages, le palladium a également été utilisé pour cliver certains groupements chimiques dans des applications de relargage qui seront développées dans le Chapitre 3.

D. Les cycloadditions sous contrainte stérique

Devant les limites des réactions métallo-catalysées, les chimistes ont utilisé d'autres moyens permettant d'accélérer les réactions afin de les rendre biocompatibles. L'utilisation de composés dipolarophiles ayant une forte tension de cycle est une des solutions envisagées. Les différentes cycloadditions en résultant sont accélérées par le relâchement de la tension de cycle.

1. La cycloaddition azoture/cycloalcynes

Comme beaucoup de réactions bioorthogonales, la SPAAC ("Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition", (**Figure 18**) prend ses racines dans les années 1960. Wittig et Krebs ont qualifié la réaction entre l'azoture de phényl et le cyclooctyne comme "une explosion donnant un produit unique".⁶² Le cyclooctyne, plus petit alcyne cyclique stable, possède des angles de seulement 158° de part et d'autre de la fonction alcyne ce qui induit une réactivité intrinsèque accrue permettant la

⁵⁷ J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346–16347.

⁵⁸ Y.-S. Wang, W. K. Russell, Z. Wang, W. Wan, L. E. Dodd, P.-J. Pai, D. H. Russell, W. R. Liu, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 714–717.

⁵⁹ L. Lercher, J. F. McGouran, B. M. Kessler, C. J. Schofield, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10553–10558.

⁶⁰ S. D. Tilley, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1080–1081.

⁶¹ N. Li, R. K. V. Lim, S. Edwardraja, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15316–15319.

⁶² G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260–3275.

cycloaddition avec les azotures sans catalyseur et à température ambiante. En 2004, inspirée par ces observations, l'équipe de Bertozzi prouve que cette réactivité fulgurante pouvait être exploitée pour la bioconjugaison. Pour cela, ils synthétisent un cyclooctyne portant une biotine et marquent sélectivement la surface de cellules portant des sucres-azotures à leur surface.⁶³

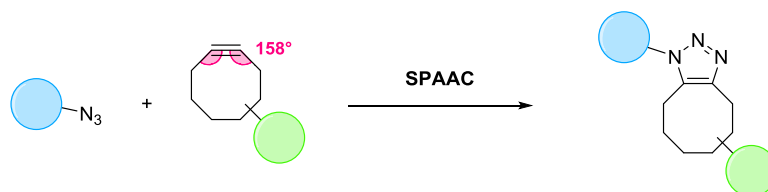


Figure 18 : Réaction de cycloaddition azoture/alcyne sous contrainte stérique.

Cette découverte primordiale possède alors un point faible qui est la vitesse de la réaction, considérablement plus faible que celles de la CuAAC et de la ligation de Staudinger. Le potentiel important présagé pour la SPAAC en tant qu'outil de bioconjugaison lance alors le début d'une recherche effrénée vers le meilleur cyclooctyne.

Ainsi de nombreux cycloalcyne ont été développés dans le but d'améliorer la vitesse réactionnelle principalement. Les chercheurs optent alors pour deux stratégies (**Figure 19**) :

- diminuer l'énergie de la LUMO en ajoutant des groupements électroattracteurs sur l'alcyne ;
- augmenter la tension de cycle.

La première méthode a mené à plusieurs nouveaux cycloalcyne, dont le DIFO synthétisé par le groupe de Bertozzi en 2007. Ce composé possède deux atomes de fluor en α de la triple liaison et présente une constante de vitesse 60 fois supérieure à celle de l'OCT, le cyclooctyne utilisé par la même équipe en 2004.⁶⁴ Cette stratégie consistant à introduire des groupements électroattracteurs sur l'alcyne a ensuite été abandonnée au profit de celle reposant sur l'augmentation de la tension de cycle.

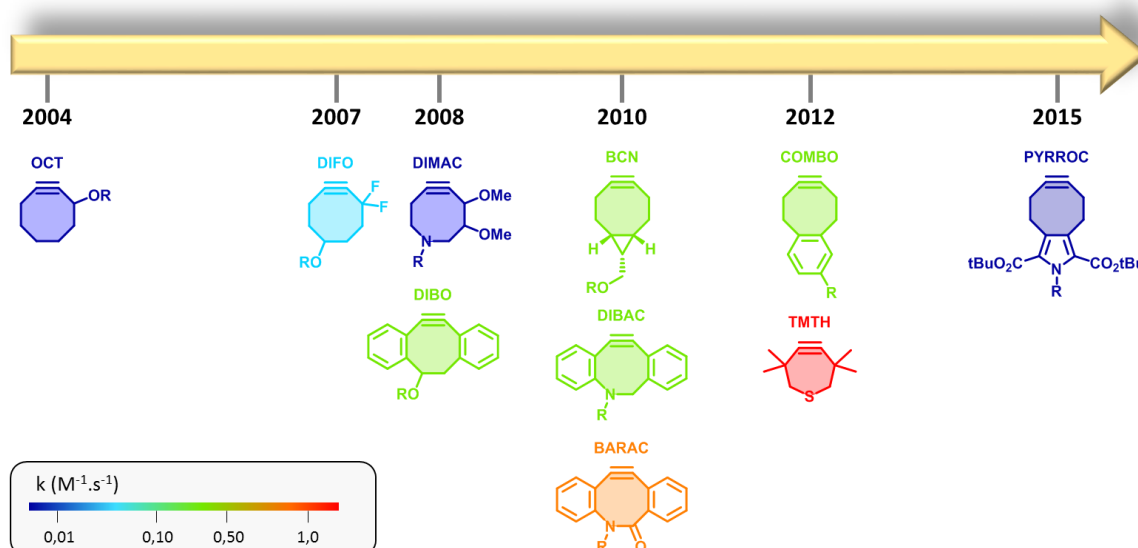


Figure 19 : Cycloalcyne développés pour améliorer la réaction de SPAAC.

⁶³ N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

⁶⁴ J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.

Cette stratégie a notamment été suivie par Boons qui a travaillé sur les dérivés du dibenzocyclooctyne. La présence des deux cycles aromatiques augmente considérablement la tension de cycle et donc la réactivité. Le premier à être synthétisé dans cette série est le DIBO en 2008 ($k=0.17 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$).⁶⁵ En 2010, le DIBAC (ou DBCO) et le BARAC sont synthétisés, présentant des constantes de vitesse respectives de 0,31 et 0,96 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.⁶⁶ Le DIBAC est à l'heure actuelle un des cyclooctynes les plus employés du fait de sa bonne réactivité et sa bonne stabilité contrairement au BARAC.

Une autre méthode pour augmenter la tension de cycle a été l'introduction d'un cyclopropane opposé à l'alcyne sur le cycle à 8 chaînons. Le cyclooctyne répondant à cette description, le BCN, a été synthétisé en 2010 par l'équipe de Van Delft.⁶⁷ Malgré une vitesse inférieure à celles du DIBAC et du BARAC, il est très utilisé en raison de sa synthèse courte et efficace (4 étapes, 46% de rendement). L'absence de groupements aromatiques hydrophobes lui procurent également une meilleure solubilité dans les milieux aqueux.

Enfin, la plus grande cinétique de cycloaddition entre les alcynes tendus et les azotures a été décrite par le groupe de Bertozzi en 2012. La réaction se fait avec un thio-cycloheptyne, le TMTH, avec une constante de 4 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.⁶⁸ Cependant, ce cycloalcyne affiche une pauvre stabilité et sa fonctionnalisation est difficile, ce qui en fait un outil quasiment jamais utilisé en bioconjugaison.⁶⁹

En termes d'applications en bioconjugaison, la SPAAC a été massivement utilisée dès sa découverte par Bertozzi.⁶³ Le développement massif de cycloalcynes plus compétitifs a largement favorisé la prédilection pour cette réaction pour bon nombre d'applications. L'efficacité de la SPAAC l'a vite désignée comme outil clé pour des applications *in vivo*.

La première application d'imagerie animale *in vivo* a été réalisée sur des embryons de poisson-zèbre.⁷⁰ La transparence des tissus de cet organisme permet une visualisation simple du marquage. Des applications sur mammifères, les souris, ont également été développées, mais celles-ci représentent un défi de plus grande envergure. La première étude, menée par le groupe de Bertozzi en 2010 montre la difficulté de transposer des systèmes mis au point *in vitro* à des applications *in vivo*.⁷¹ Dans ce travail, les différents défis relatifs à l'application de la SPAAC dans l'animal sont mis à jour lors d'expérience de marquage *in vivo*. Outre le manque de corrélation entre la réactivité du cyclooctyne et l'efficacité du marquage, la biodistribution inadaptée du cycloalcyne conduisant à sa rapide excrétion ainsi qu'un manque de sélectivité du marquage sont des obstacles majeurs. L'utilisation d'une formulation nano-particulaire pour le cyclooctyne s'est révélée par la suite efficace

⁶⁵ X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255.

⁶⁶ (a) M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97–99 ; (b) A. Kuzmin, A. Poloukhine, M. A. Wolfert, V. V. Popik, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2076–2085.

⁶⁷ J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422–9425.

⁶⁸ G. de Almeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443–2447.

⁶⁹ M. King, R. Baati, A. Wagner, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9308–9309.

⁷⁰ S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.

⁷¹ P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1821–1826.

pour augmenter son temps de circulation et obtenir des marquages plus efficaces. Cette méthode a été utilisée pour imager des tumeurs avec des fluorophores⁷² ou du fluor-18.⁷³

2. La cycloaddition sydnone/cycloalcynes

L'utilisation d'alcynes tendus dans la cycloaddition avec les sydnones a été établie seulement un an après la découverte de la CuSAC. Le groupe de Chin publie ainsi le premier exemple de SPSAC (Strain-Promoted Sydnone-Alkyne Cycloaddition) entre la *N*-phenyl-sydnone et le BCN.⁷⁴ La réaction a été prouvée comme biocompatible par le marquage de la GFP modifiée par un BCN avec une sydnone portant un motif BODIPY. La vitesse de cette réaction ($0,054 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) reste cependant inférieure à celle de la SPAAC avec le BCN ($0,14 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

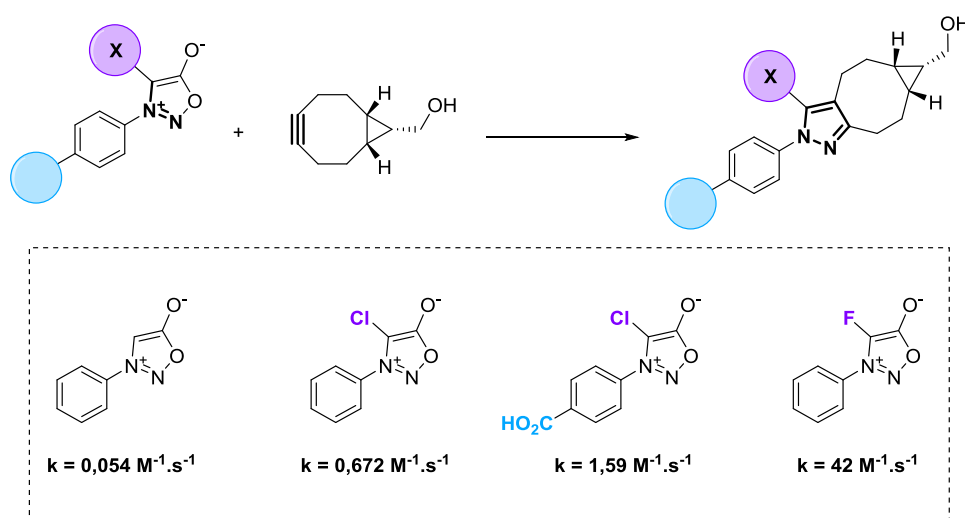


Figure 20 : Réaction de SPSAC, constantes de cinétiques de quelques sydnones avec le BCN.

Une étude cinétique proposée la même année par notre équipe a permis de déterminer les principaux facteurs structuraux des sydnones accélérant la SPSAC (**Figure 20**).⁷⁵ Plus particulièrement, la réaction peut être accélérée en substituant l'aryl de la position N₃ par un groupement électroattracteur. L'avantage des sydnones par rapport aux azotures réside dans la présence d'une seconde position dérivatisable, *i.e.* le carbone C₄. L'introduction d'un halogène sur cette position a un effet particulièrement bénéfique sur la cinétique de réaction, notamment le chlore⁷⁵ et le fluor⁷⁶ qui permettent d'obtenir une réaction avec le BCN plus rapide que les azotures.

Cet effet spectaculaire des halogènes sur la cycloaddition des sydnones avec les alcynes cycliques a été très récemment expliqué par Houk et Liang par des études de modélisation.⁷⁷ L'atome d'halogène en position C₄ de la sydnone réduit l'énergie demandée pour distordre la sydnone et atteindre l'état

⁷² H. Koo, S. Lee, J. H. Na, S. H. Kim, S. K. Hahn, K. Choi, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11836–11840.

⁷³ S. B. Lee, H. L. Kim, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, D. W. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10549–10552.

⁷⁴ S. Wallace, J. W. Chin, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1742–1744.

⁷⁵ L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9376–9378.

⁷⁶ H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuypere, D.-A. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12073–12077.

⁷⁷ H. Tao, F. Liu, R. Zeng, Z. Shao, L. Zou, Y. Cao, J. M. Murphy, K. N. Houk, Y. Liang, *Chem. Commun.* **2018**, 5082–5085.

de transition. La diminution d'énergie de la LUMO apportée par l'halogène est quant à elle peu impactante sur la réactivité.

Tout comme la SPAAC, le cycloalcyne utilisé a aussi une influence sur la vitesse réactionnelle de la SPSAC. En 2016, Houk et Murphy réalisent des études de DFT et montrent la grande réactivité des cycloalcyne DIBAC et BARAC avec les sydnones.⁷⁸ Ceux-ci affichent des constantes respectives de 0,902 et 1,46 M⁻¹.s⁻¹ avec la *N*-phenyl-sydnone.

Les applications de la SPSAC en bioconjugaison se sont aujourd'hui limitées au marquage de protéines. Bien que les sydnones soient plus encombrantes que les azotures, la possibilité d'accélération de la réaction, principalement par l'introduction d'halogènes en position C₄, laisse envisager des applications *in vivo* dans les années à venir.

3. Les cycloadditions des alcyne cycliques avec d'autres dipôles

D'autres dipôles sont susceptibles de réagir avec les cycloalcyne de manière bioorthogonale. On décompte ainsi les réactions avec les nitrones (SPANC),⁷⁹ les oxydes de nitriles (SPANOC)⁸⁰ et les diazoacétates (SPADC)⁸¹ (**Figure 21**).

Ces réactions offrent l'opportunité de créer des paires de réactions mutuellement bioorthogonales et d'élargir la palette d'outils dont nous disposons pour créer des liaisons chimiques dans le milieu biologique. Leurs développements n'étant pas encore à leurs apogées, elles possèdent toutefois des limitations à dépasser.

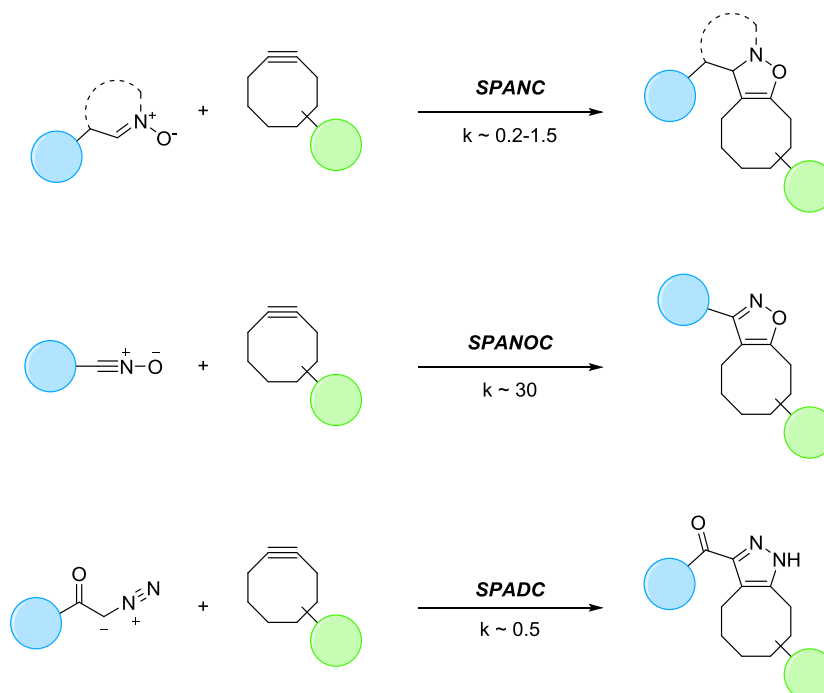


Figure 21 : Réactions entre les cycloalcyne et d'autres dipôles.

⁷⁸ M. K. Narayanam, Y. Liang, K. N. Houk, J. M. Murphy, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1257–1261.

⁷⁹ C. S. McKay, J. Moran, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 931–933.

⁸⁰ B. C. Sanders, F. Friscourt, P. A. Ledin, N. E. Mbuja, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 949–957.

⁸¹ L. Josa-Culleré, Y. A. Wainman, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 52241–52244.

Typiquement, les oxydes de nitriles affichent un impressionnant accroissement de la vitesse de cycloaddition. Mais ils nécessitent d'être générés *in situ* et leur grande électrophilie les rendent sujets à des couplages non spécifiques avec les nucléophiles.

Dans le cas de la SPANC, les nitrones sont plus stables, et l'utilisation de nitrones cycliques s'est montrée plus favorable pour des applications en bioconjugaison. Elles ont ainsi permis de marquer la surface de cellules cancéreuses *in vitro*.⁸² Une application élégante de cette réaction est le marquage de protéines et d'oligopeptides portant une sérine N-terminale. Celle-ci est oxydée puis condensée avec une hydroxylamine pour générer la nitronne *in situ* (Figure 22).⁸³

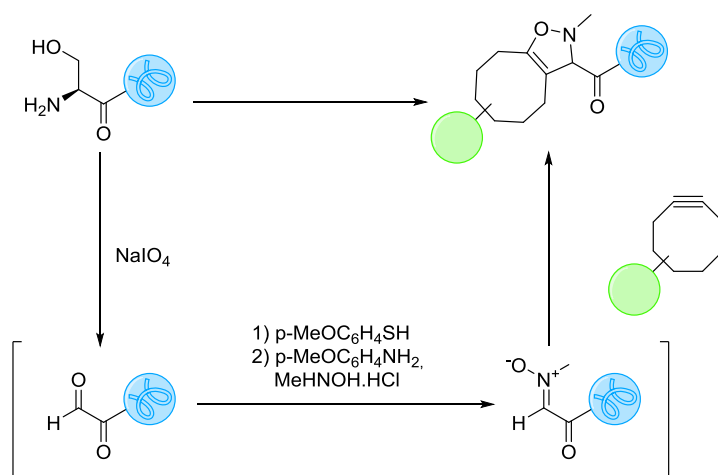


Figure 22 : Marquage d'une sérine N-terminale d'une protéine avec la SPANC.

⁸² C. S. McKay, J. A. Blake, J. Cheng, D. C. Danielson, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 10040–10042.

⁸³ X. Ning, R. P. Temming, J. Dommerholt, J. Guo, D. B. Ania, M. F. Debets, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3065–3068.

4. La réaction entre les tétrazines et les alcènes tendus

La réactivité des tétrazines avec différents composés insaturés a été observée pour la première fois par Lindsey en 1959.⁸⁴ Elle se fait selon une réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons (IEDDA). Contrairement à une réaction de Diels-Alder classique, c'est la HOMO du diénophile qui réagit avec la LUMO du diène (**Figure 23**). En effet, la réaction est accélérée pour des tétrazines portant des groupements électroattracteurs et des diénophiles enrichis électroniquement.

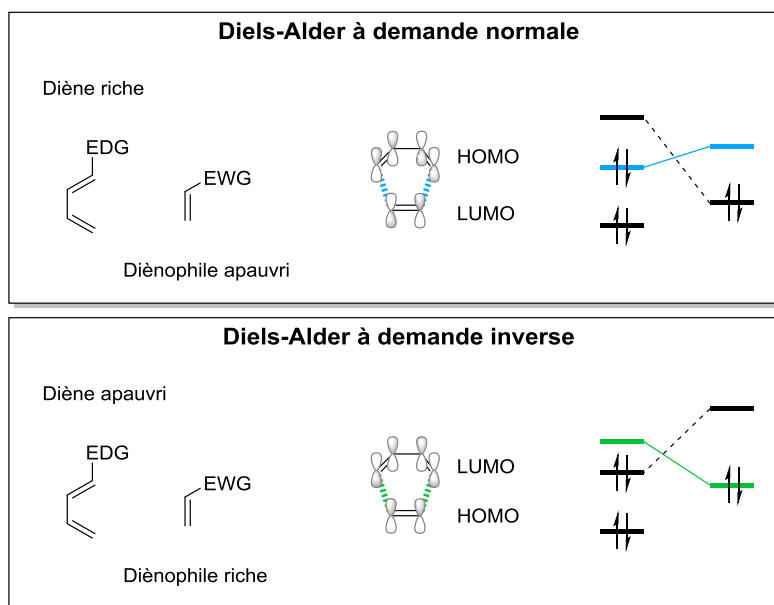
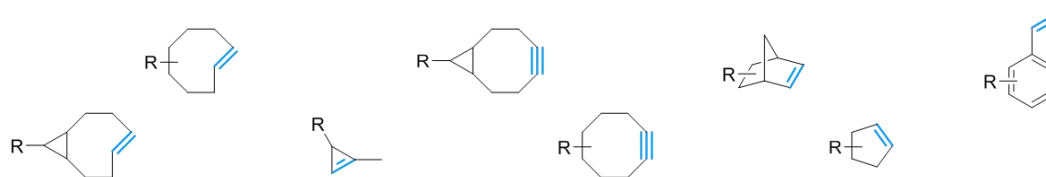


Figure 23 : Théorie des orbitales frontières pour les réactions de Diels-Alder à demande normale et inverse.

C'est en 2008 que cette réaction est introduite dans le panel de réactions bioorthogonales par l'équipe de Fox.⁸⁵ Ils utilisent pour cela un alcène tendu : le *trans*-cyclooctène (TCO). Différents effets gouvernent la vitesse de cette réaction dont les constantes sont généralement très élevées. Mis-à-part les effets électroniques des substituants des deux partenaires, la tension de cycle des diénophiles permet également de moduler la réactivité (**Figure 24**).



+

Réactivité

Figure 24: Ordre relatif de réactivité de différents diénophiles avec les tétrazines dans la réaction de Diels et Alder à demande inverse en électrons.

Le mécanisme réactionnel passe par un intermédiaire tricyclique. Ce dernier subit une étape de rétro Diels-Alder, favorisée par le relargage d'une molécule de diazote. La 4,5-dihydropyridazine issue

⁸⁴ R. A. Carboni, R. V. Lindsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342–4346.

⁸⁵ M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.

de cette étape subit un transfert de proton intramoléculaire pour mener à la 1,4-dihydropyridazine, qui peut être oxydée en pyridazine (**Figure 25**).

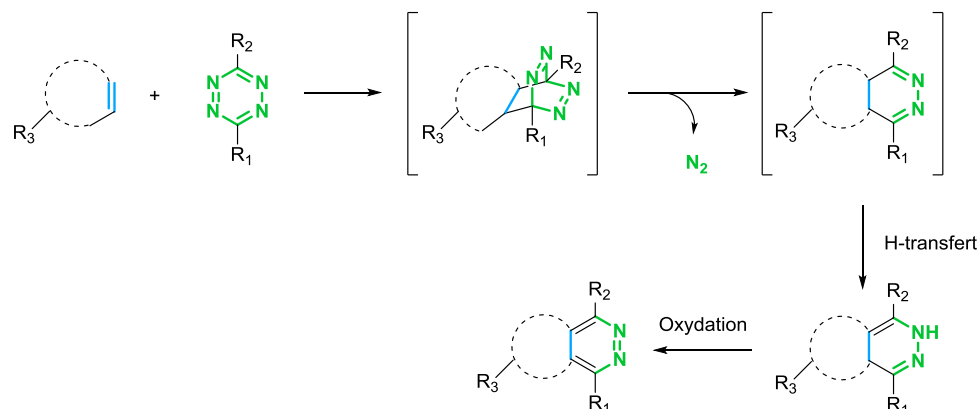


Figure 25 : Mécanisme de la réaction de Diels-Alder à demande inverse en électrons entre les tétrazines et les alcènes.

La vitesse de cette réaction est supérieure à celles des autres réactions bioorthogonales. Elle est encore plus élevée lorsque la réaction est réalisée dans l'eau, ce qui en fait un excellent candidat pour la bioconjugaison.

Cette réaction a été employée pour de nombreuses applications, notamment pour le suivi de processus biologiques rapides ou se produisant à très faibles concentrations.^{8, 86} Outre le développement de sondes fluorescentes (cf. Partie II), les réactions IEDDA ont été utilisées en chimie radiopharmaceutique ainsi qu'en radiomarquage *in vivo*.

Plus particulièrement, la grande vitesse réactionnelle est un atout majeur pour le marquage avec des isotopes à faible temps de demi-vie. Elle a ainsi permis la conception de sondes TEP (tomographie à émission de positons) incorporant un atome de fluor-18⁸⁷ et leur utilisation *in vivo*.⁸⁸ L'efficacité de cette ligation à faible concentration permet également d'utiliser une approche de pré-ciblage avec un anticorps, puis de faire la réaction de bioconjugaison au radiotracer *in vivo* comme l'a montré Robillard en 2010 avec une sonde à l'indium-111 (**Figure 26**).⁸⁹

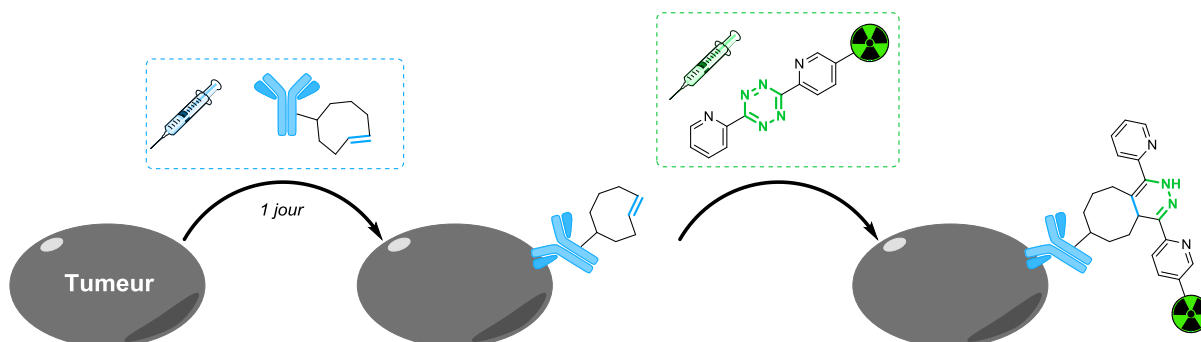


Figure 26 : Imagerie par tomographie par émission monophotonique en utilisant un pré-ciblage puis marquage avec un radiotracer grâce à la réaction IEDDA.

⁸⁶ H. Wu, N. K. Devaraj, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 1249–1259.

⁸⁷ Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti, J. M. Fox, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8043–8045.

⁸⁸ T. Reiner, E. J. Keliher, S. Earley, B. Marinelli, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1922–1925.

⁸⁹ R. Rossin, P. Renart Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vulders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375–3378.

Comme pour d'autres réactions de bioconjugaisons, les deux partenaires ont pu également être incorporés génétiquement dans des protéines pour diverses applications de bioconjugaison.^{90, 91}

E. Les réactions photo-induites

En 1967, Huisgen a reporté la cycloaddition entre le 2,5-diphényl tétrazole et le méthyl crotonate.⁹² Cette réaction a été revisitée plus de 40 ans après sa découverte par le groupe de Lin par une activation UV du tétrazole à 302 nm.⁹³ Cette photo-activation du tétrazole conduit à la perte d'une molécule de diazote et à la formation d'un dipôle nitrilimine. Ce dernier, très réactif peut ensuite interagir avec un alcène pour former une pyrazoline (**Figure 27**).

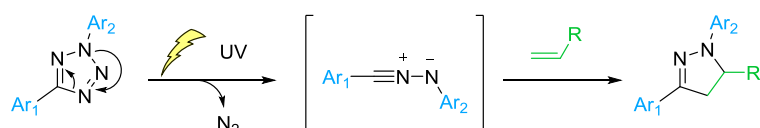


Figure 27 : Mécanisme réactionnel de la réaction de photo-click entre les tétrazoles et les alcènes.

Cette réaction a permis le marquage de protéines génétiquement encodées pour porter un alcène⁹⁴ ou un tétrazole⁹⁵ au sein de *E. coli*. La pyrazoline formée est souvent fluorescente lorsque les aryls Ar₁ et Ar₂ sont judicieusement choisis, tandis que le tétrazole ne l'est pas. Cette réaction permet ainsi la conception de sondes pro-fluorescentes.

La réaction de photo-click développée entre les tétrazoles et les alcènes a été essentiellement développée et utilisée par Lin dans diverses applications. Elle permet de contrôler à la fois temporellement et spatialement la bioconjugaison puisque les réactifs sont inertes lorsqu'ils ne sont pas irradiés.

En dépit de ces atouts, la réaction possède une compatibilité modérée avec les milieux biologiques puisque l'intermédiaire nitrilimine est très réactif face à la pléthore de nucléophiles que comportent ces milieux, ainsi qu'avec les acides carboxyliques, autre fonction très présente dans les milieux biologiques.⁹⁶ Par ailleurs, les longueurs d'ondes utilisées pour l'irradiation sont très énergétiques, provoquent des dommages cellulaires et excluent une utilisation *in vivo* de la réaction.

⁹⁰ K. Lang, L. Davis, S. Wallace, M. Mahesh, D. J. Cox, M. L. Blackman, J. M. Fox, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10317–10320.

⁹¹ J. L. Seitchik, J. C. Peeler, M. T. Taylor, M. L. Blackman, T. W. Rhoads, R. B. Cooley, C. Refakis, J. M. Fox, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898–2901.

⁹² J. S. Clovis, A. Eckell, R. Huisgen, R. Sustmann, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 60–70.

⁹³ W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835.

⁹⁴ W. Song, Y. Wang, J. Qu, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9654–9655.

⁹⁵ J. Wang, W. Zhang, W. Song, Y. Wang, Z. Yu, J. Li, M. Wu, L. Wang, J. Zang, Q. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14812–14818.

⁹⁶ S. Zhao, J. Dai, M. Hu, C. Liu, R. Meng, X. Liu, C. Wang, T. Luo, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702–4705.

F. Bilan sur les réactions bioorthogonales

Ces réactions représentent un panel d'outils considérable dans le but de lier de façon covalente les biomolécules à d'autres objets. Le degré d'application en bioconjugaison est variable et dépend de la biocompatibilité de la réaction, de sa vitesse, mais également de son ancienneté. Dans la **Figure 28**, nous synthétisons les systèmes ayant été utilisés pour des applications en bioconjugaison au moins sur cellules.

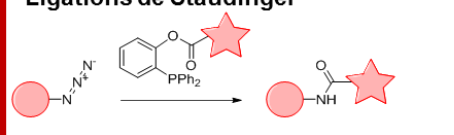
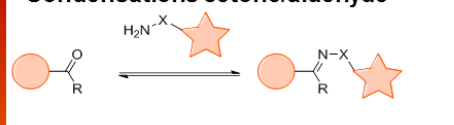
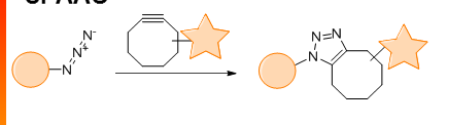

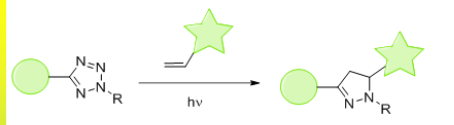
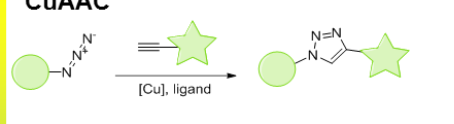
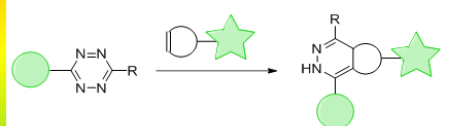
Réaction bioorthogonale	k (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Inconvénients de la réaction
Ligations de Staudinger 	~10 ⁻³	- Oxydation de la phosphine
Condensations cétone/aldéhyde 	~10 ⁻³ -10 ⁻¹	- pH acide - Sensible à l'hydrolyse
SPAAC 	~10 ⁻² -1	- Réactivité des cyclooctynes avec les thiols
SPSAC 	~10 ⁻² -10 ⁴	- Réactivité des cyclooctynes avec les thiols
Photoclick 	~10-100	- Irradiation UV
CuAAC 	~10-100	- Toxicité du cuivre I
IEDDA 	~1-10 ⁶	- Isomérisation transcyclooctène

Figure 28 : Bilan des principales réactions bioorthogonales, ordre de grandeur de vitesse réactionnelle, principales limitations.

A l'heure actuelle, aucune des réactions décrites n'est véritablement "parfaite". Les travaux de recherche pour améliorer les systèmes existants ou découvrir de nouvelles réactions sont encore en cours. Selon le cahier des charges nécessaire pour une application donnée, il est possible de choisir la réaction de bioconjugaison la plus adaptée en se basant sur ses principales caractéristiques.

II. Travaux antérieurs du laboratoire et objectifs des travaux de thèse

A. Les mésoioniques, la découverte d'une nouvelle réaction de cycloaddition bioorthogonale

1. Généralités à propos des mésoioniques

C'est en 1949 que Baker et Ollis introduisent le terme "mésoionique" dans le jargon scientifique, provenant de la contraction des mots "mésomérique" et "ionique".⁹⁷ Les mésoioniques sont une classe de composés hétérocycliques dipolaires à 5 voire 6 chaînons. Ces composés sont caractérisés par l'incapacité à les représenter de manière satisfaisante par une unique structure chargée. Les mésoioniques les plus courants dans la littérature sont les sydnones, les münchnones et les isomünchnones (**Figure 29**).

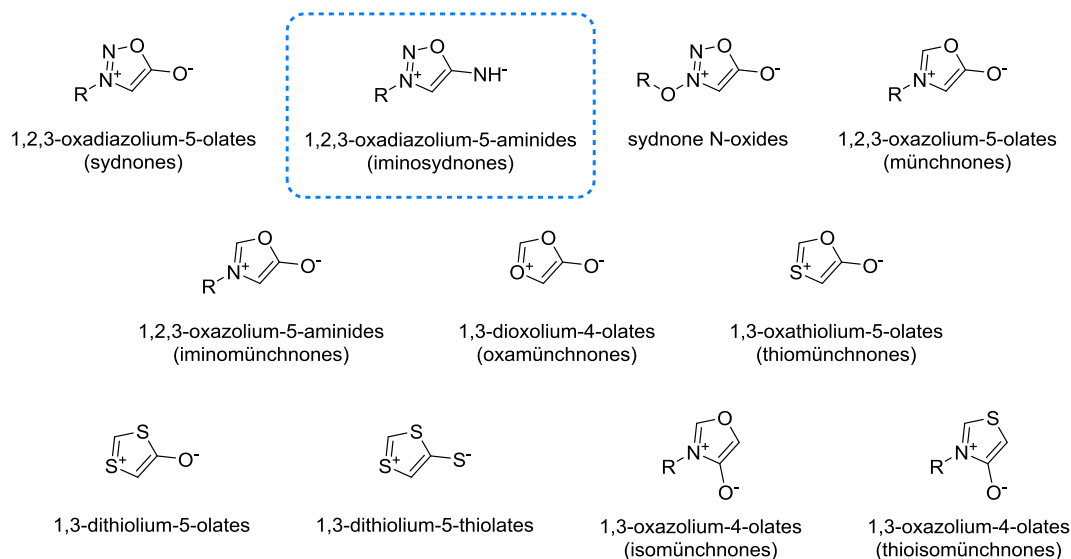


Figure 29 : Composés mésoioniques les plus courants.

⁹⁷ W. Baker, W. D. Ollis, V. D. Poole, *J. Chem. Soc.* **1949**, 0, 307–314.

2. Découverte d'une réaction de « click & release » par criblage de combinaisons mésoionique/cycloalcyne

Les capacités des chimistes à former une liaison au sein de milieux biologiques complexes sont relativement étendues (click, cf. Introduction-I). Les méthodes aboutissant à la fois à une ligation ainsi qu'au relargage d'une seconde entité ("click & release") sont plus anecdotiques (**Figure 30**).

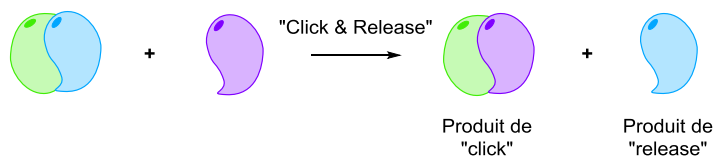


Figure 30 : Concept de "click & release".

Dans ce cadre, on peut citer le travail de Florent qui utilise une ligation de Staudinger pour créer une liaison urée entre les substituants d'un azoture et d'un carbamate. Ce processus induit la libération d'une autre entité sous la forme d'une amine (**Figure 31**).⁹⁸

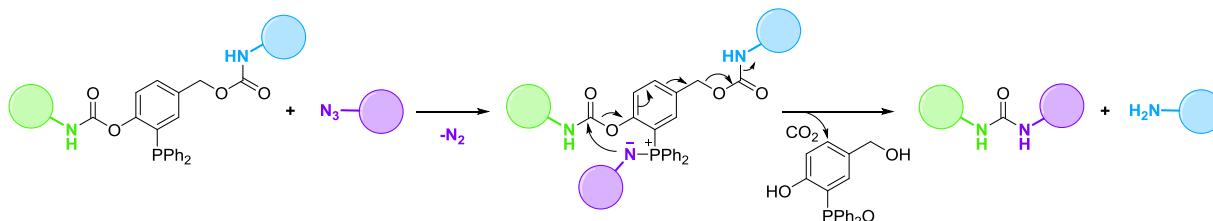


Figure 31 : Utilisation de la ligation de Staudinger pour faire une réaction de click & release par le groupe de Florent.

De manière plus impressionnante, l'équipe de Robillard a réussi à utiliser le système tétrazine/*trans*-cyclooctène pour libérer un produit conjointement à la réaction IEDDA (**Figure 32**).⁹⁹

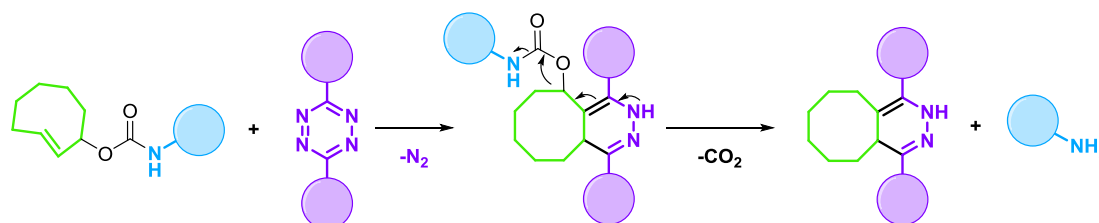


Figure 32 : Réaction click & release basée sur la réaction IEDDA tétrazine/*trans*-cyclooctène.

Pour obtenir le relargage, il faut substituer la position allylique du *trans*-cyclooctène par un groupement partant, tel un carbamate. L'efficacité de cette réaction lui a permis d'être utilisée *in vivo* chez la souris pour libérer une drogue greffée à un anticorps.¹⁰⁰

Dans le but d'élargir le panel de réactions engendrant à la fois une liaison et un clivage, nous avons constitué une librairie de 25 mésoioniques et avons criblé leur réactivité vis-à-vis de 4 cycloalcyne (**Figure 33**).¹⁰¹ Tout comme les sydnones, ces composés devraient réagir avec les cycloalcyne par

⁹⁸ M. Azoulay, G. Tuffin, W. Sallem, J.-C. Florent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3147–3149.

⁹⁹ R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 14112–14116.

¹⁰⁰ R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.* **2016**, 27, 1697–1706.

¹⁰¹ S. Bernard, D. Audisio, M. Riomet, S. Bregant, A. Sallustrau, L. Plougastel, E. Decuypere, S. Gabillet, R. A. Kumar, J. Elyian, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 15612–15616.

réaction de cycloaddition (3+2) suivie d'une réaction de retro-Diels-Alder générant ainsi un produit de ligation (pyrazole dans le cas des sydnones) et un produit de relargage (CO₂ dans le cas des sydnones).

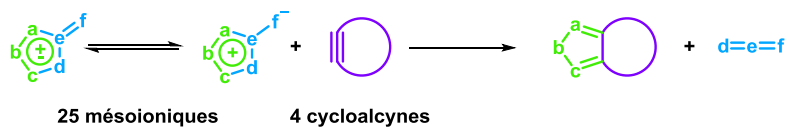
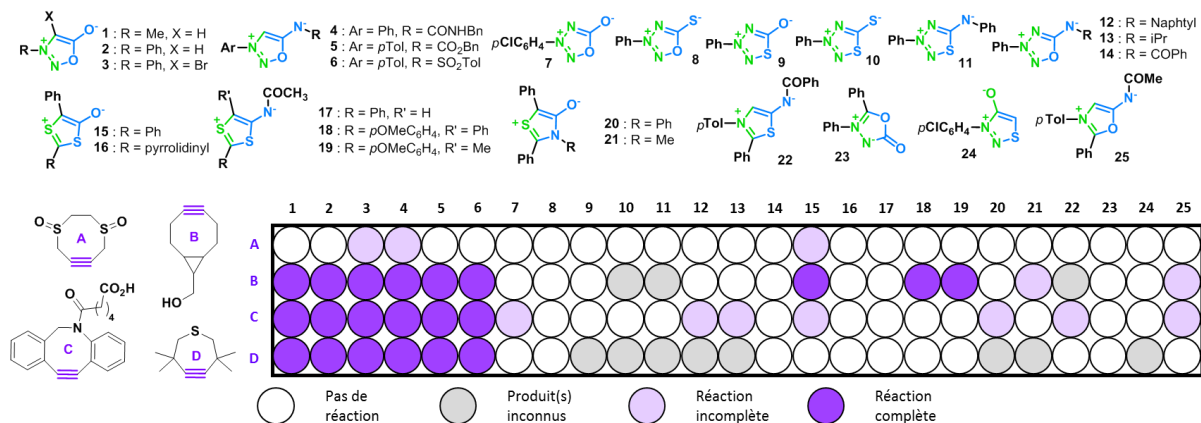


Figure 33 : Réactivité investiguée dans le criblage.

Ce sont ainsi 100 réactions qui ont été réalisées et analysées par LC/MS dans le but d'observer la formation de nouveaux produits (**Figure 34**).



Nous avons retrouvé la réactivité connue des sydnones (B-D/1-3) donnant un pyrazole de manière quantitative. Trois autres mésoioniques ont affiché une réactivité intéressante et des conversions totales. Il s'agit des dithiolium-olates et ditholiums-aminides **15**, **18** et **19** qui réagissent avec le cycloalcyne B (BCN) et produisent un thiophène, du COS ainsi qu'un amide pour **18** et **19**.

Le hit principal de ce criblage est obtenu avec le mésoionique iminosydnone. La réaction avec les cycloalcynes B-D est totale, quelle que soit la substitution de l'iminosydnone **4-6**.

Ces nouvelles réactions clés ont été reproduites sur plus large échelle et les produits obtenus ont été isolés, confirmant la réactivité espérée (**Figure 35**).

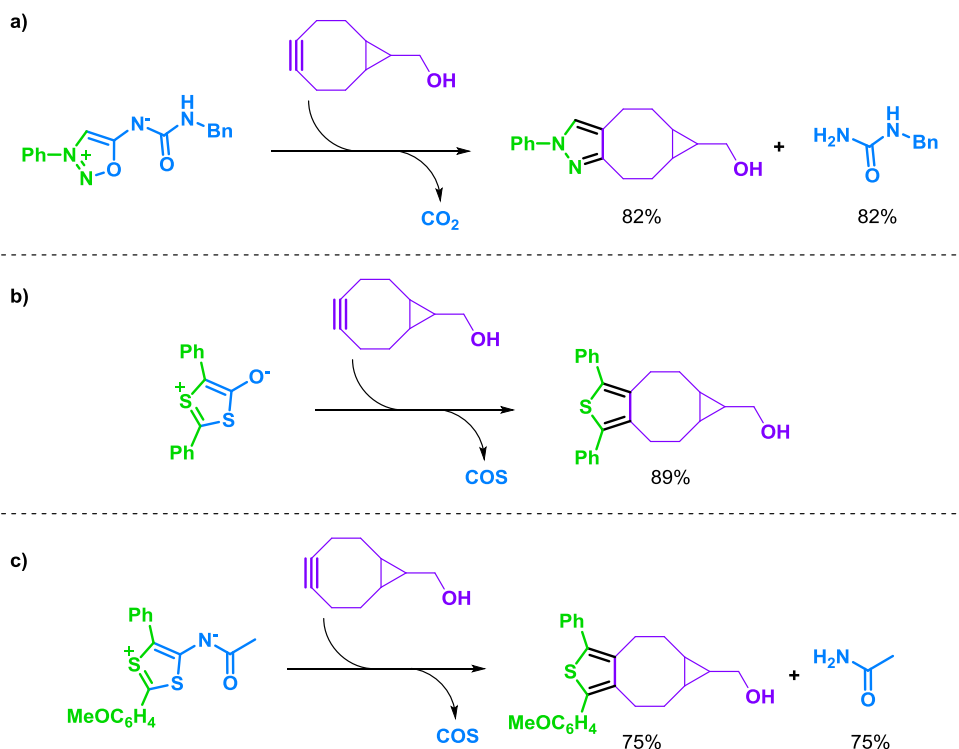


Figure 35 : Réactions de confirmation des hits. Les rendements sont déterminés par RMN.

Le ditholium **16** réagit avec le BCN pour libérer du COS avec un très bon rendement de 89% (**Figure 35-b**). Les iminosydnone et les composés ditholiums comportant un azote **18** montrent une réactivité plus intéressante puisqu'ils permettent de libérer une molécule plus complexe qu'un gaz (**Figure 35-a** et **c**). Cette libération passe probablement par la libération d'un acyl-isocyanate (ou acyl-isothiocyanate) qui est hydrolysé très rapidement dans le milieu, libérant du CO₂ (ou du COS). Ce mécanisme possible est illustré dans la **Figure 36** pour le cas des iminosydnone.

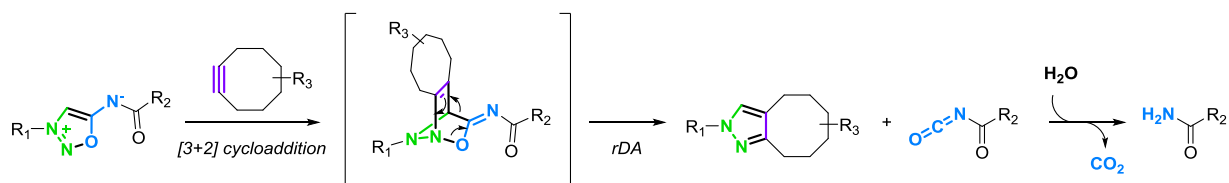


Figure 36 : Mécanisme postulé pour la réaction entre les iminosydnone et les cycloalcynes.

Ces travaux de thèse se concentrent sur le hit entre les iminosydnone et les cycloalcynes et différentes applications s'établissant autour de cette réactivité. Les autres réactions sont étudiées au laboratoire de façon indépendante à ce travail de thèse. Dans la suite de ce manuscrit, nous désignerons la réaction entre les iminosydnone et les cycloalcynes par les termes "click & release".

B. Généralités sur les iminosydrones

Les iminosydrones font partie de la famille des mésoioniques, au même titre que les sydnones dont elles ne diffèrent que par un atome (**Figure 29**). Elles ont été toutefois bien moins étudiées que ces dernières.

Comme tous les composés mésoioniques, elles ne peuvent pas être écrites sous la forme d'une espèce non chargée. Même écrites sous forme zwitterionique, il est admis qu'aucune de ces formes ne les représente de façon satisfaisante (**Figure 37**).

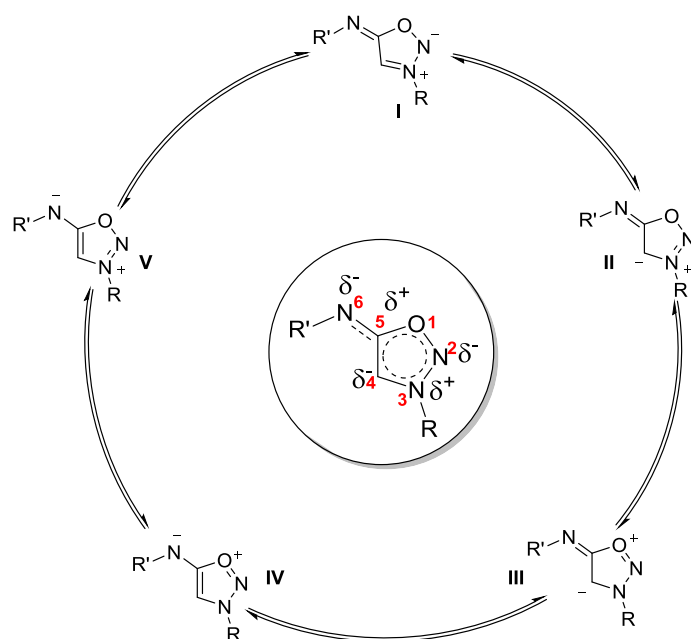


Figure 37 : Différentes formes mésomères des iminosydrones.

Dans ce manuscrit, nous utiliserons la forme V pour décrire les iminosydrones. Ces différentes représentations permettent d'anticiper les propriétés réactives des iminosydrones. Ainsi, l'azote N₆ ainsi que le carbone C₄ vont posséder des propriétés de nucléophiles. Le caractère imine de la liaison C₅-N₆ va tendre à limiter la nucléophilie de l'azote N₆ et conférer également un caractère électrophile au carbone C₅.

Dès leur découverte, les iminosydrones ont été étudiées pour leurs propriétés biologiques en tant que donneurs de monoxyde d'azote (NO).¹⁰² La libération de NO à partir de l'iminosydnone se ferait selon le mécanisme présenté en **Figure 38**.¹⁰³

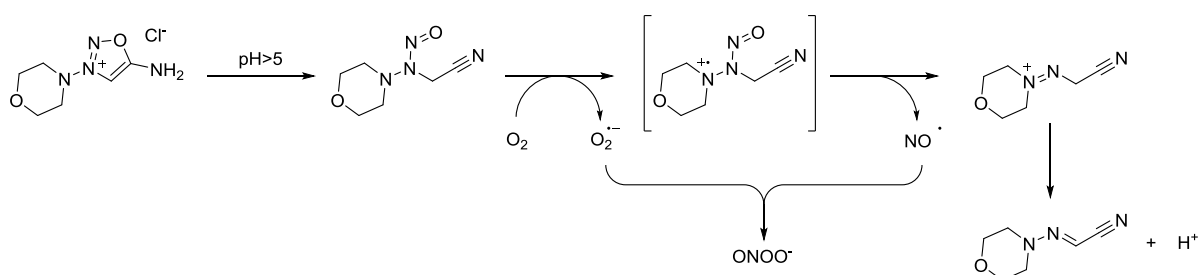


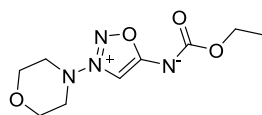
Figure 38 : Mécanisme de formation de radical NO et du radical anion superoxyde à partir d'iminosydrones.

¹⁰² L. J. Ignarro, C. Napoli, J. Loscalzo, *Circ. Res.* **2002**, *90*, 21–28.

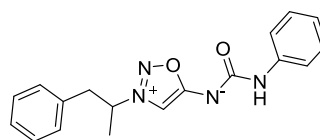
¹⁰³ L. Soullère, P. Hoffmann, F. Bringaud, *J. Heterocyclic Chem.* **2003**, *40*, 943–947.

Le principal représentant de cette famille de médicaments développée dans les années 1970s en URSS est le vasodilatateur molsidomine (**Figure 39**). Ce composé est un carbamate qui libère l'espèce active par activation enzymatique. Des dérivés carbamates portant des groupements plus spécifiques ont été synthétisés plus récemment dans le but de cibler des parasites particuliers.¹⁰³

A la même période, d'autres iminosydnonnes ont également été étudiées pour leurs propriétés biologiques. C'est le cas de Mesocarb, une drogue développée à l'origine contre la maladie de Parkinson qui a été utilisée par la suite pour diverses indications (**Figure 39**). Son utilisation et son étude sont restés cantonnés aux pays de l'ex URSS.



Molsidomine



Mesocarb

Figure 39 : Molsidomine et Mesocarb, les deux iminosydnonnes les plus connues pour leurs propriétés biologiques.

C. Objectifs des travaux de thèse

Ces résultats préliminaires obtenus au laboratoire établissent une nouvelle réactivité pour les iminosydnonnes. Il s'agit d'un point de départ prometteur pour l'établissement d'une nouvelle réaction bioorthogonale de click & release.

Ainsi, l'objectif de ces travaux de thèse a été dans un premier temps de développer des méthodes de synthèse robustes donnant accès aux iminosydnonnes et par la même occasion diversifier les substitutions possibles sur ce noyau mésoionique. Ces méthodes de synthèse permettront de générer une large gamme d'iminosydnonnes qui seront utilisées pour des études de cinétique de réaction iminosydnone-cycloalcyne afin de déterminer les substituants les plus à-même d'obtenir une réaction de click & release assez rapide pour être utilisée dans les milieux biologiques. Ces résultats constitueront le premier chapitre de ce manuscrit.

Dans un second temps, nous avons souhaité démontrer l'applicabilité de cette réaction en imagerie cellulaire. Notre ambition a été de synthétiser des iminosydnonnes capables de libérer deux entités aux propriétés de fluorescence distinctes pour effectuer des marquages fluorescents au sein des cellules. Le second chapitre de ce manuscrit concerne la synthèse et l'utilisation de ces sondes.

Enfin, nous avons souhaité mettre l'accent sur les propriétés d'espaceur clivable des iminosydnonnes à travers différentes applications en biologie. Le troisième chapitre de ce manuscrit y est consacré au travers de conjugués anticorps-médicament, d'outils de "target-fishing" ainsi que de prodrogues guanidilées. Ces dernières ont nécessité une nouvelle approche synthétique qui est également décrite dans ce chapitre.

PARTIE I – SYNTHÈSE ET REACTIVITE DES IMINOSYDNONES

I. Synthèse

La chimie des iminosydnones est globalement peu décrite. Elle a particulièrement été explorée par des groupes soviétiques et japonais entre leur découverte en 1957 et 1980. Ces recherches méthodologiques ont surtout été motivées par les propriétés biologiques des iminosydnones,^{102, 103} leur réactivité chimique, en revanche, n'a été que très peu étudiée. A notre connaissance, une seule référence décrit une réaction de cycloaddition impliquant des iminosydnones.¹⁰⁴

En se basant sur les données, plus nombreuses, décrites dans la littérature sur la chimie de sydnones, nous avons souhaité remettre au goût du jour la chimie de ces composés mésoioniques en utilisant des outils réactionnels modernes afin d'améliorer l'accès synthétique au squelette iminosydnone mais aussi sa fonctionnalisation.

Dans cette partie, nous débiterons chaque paragraphe par un rappel du contexte bibliographique dans lequel il s'inscrit avant de développer les résultats que nous avons obtenus au laboratoire.

A. Formation du cycle Iminosydnone

1. La formation des iminosydnones dans la littérature

En 1949, Baker, Ollis et Poole, pionniers dans la chimie des composés mésoioniques, et plus particulièrement des sydnones, proposent une représentation des sydnones sous plusieurs formes mésomères. Par la même occasion, ils introduisent le terme "mésoionique" en tant que classe de composés regroupant les sydnones et d'autres hétérocycles déjà décrits dans la littérature. Ils exposent également la grande variété d'hétérocycles à cinq chaînons pouvant être possiblement intégrés dans cette famille, notamment en conjecturant l'existence d'analogues azotés des sydnones, *i.e.* les iminosydnones.⁹⁷ Il fallut attendre 1957 pour voir la première iminosydnone synthétisée parallèlement par Brookes et Walker¹⁰⁵, ainsi que par le groupe de Masaki Ohta.¹⁰⁶ Leur première idée fut de traiter le *N*-nitroso-*N*-méthylaminoacétonitrile avec de l'anhydride acétique afin d'obtenir un composé cyclique, à l'image de la synthèse des sydnones.¹⁰⁷ N'obtenant pas de succès par cette stratégie, ils utilisèrent un acide de Brønsted, l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique, et observèrent cette fois-ci la formation du sel de chlorure ou de nitrate d'iminosydnone protonée (**Figure 40**).

¹⁰⁴ K. T. Potts, S. Husain, S. Husain, *J. Chem. Soc. D* **1970**, 0, 1360–1361.

¹⁰⁵ P. Brookes, J. Walker, *J. Chem. Soc.* **1957**, 0, 4409–4416.

¹⁰⁶ H. Kato, M. Hashimoto, M. Ohta, *Nippon kagaku zasshi* **1957**, 78, 707–713.

¹⁰⁷ J. C. Earl, A. W. Mackney, *J. Chem. Soc.* **1935**, 0, 899–900.

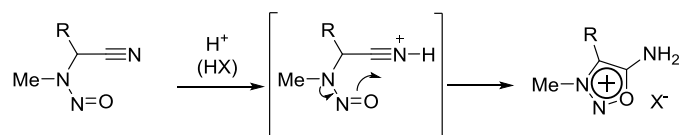


Figure 40: Synthèse des iminosydnone selon Brookes et Walker.

Cette méthode a vu quelques variantes comme l'utilisation de HCl sous différentes formes¹⁰⁸ (gazeux, méthanolique, anhydre en solvant organique, aqueux). A ce jour, elle représente toujours l'unique voie de synthèse permettant d'obtenir les sels d'iminosydnone.

Les nitroso-aminoacétonitriles sont donc les intermédiaires clés pour synthétiser les iminosydnone. Originellement formés par traitement des amines correspondantes avec de l'acide nitreux, ces produits sont difficiles à isoler et potentiellement cancérigènes. Pour s'affranchir de la manipulation d'acide nitreux et de la nitrosamine résultante, Turnbull et Beal mirent au point en 1992 une synthèse monotope utilisant l'isoamyl nitrite comme donneur organique de nitroso (**Figure 41**).¹⁰⁹ La cyclisation de la nitroso-amine est ensuite déclenchée par bullage de HCl dans le milieu réactionnel. L'utilisation de nitrites organiques est la plus commune à l'heure actuelle tandis que l'acide chlorhydrique gazeux est de plus en plus évité.

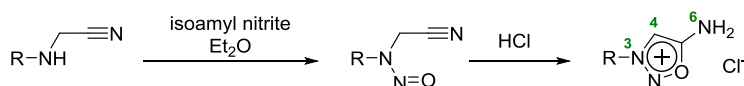


Figure 41 : Méthode monotope de synthèse des iminosydnone par Turnbull et Beal.

Bien que les premières iminosydnone synthétisées portaient un groupement carboné (alkyl ou aryl) sur l'azote N₃, de nombreux groupes portèrent leurs efforts de synthèse sur d'autres substitutions. En 1970, deux groupes parviennent à produire des iminosydnone portant une dialkylamine en position 3 (**Figure 42b**).¹¹⁰ Par ailleurs, Götz et Grozinger réussissent également à obtenir des groupements hydroxy et esters en position 3 (**Figure 42a**).¹¹¹ La synthèse de ces nouveaux composés repose sur les mêmes étapes que pour leurs analogues carbonés. Ils sont obtenus de manière efficace malgré la moins bonne stabilité des intermédiaires nitroso mis en jeu.

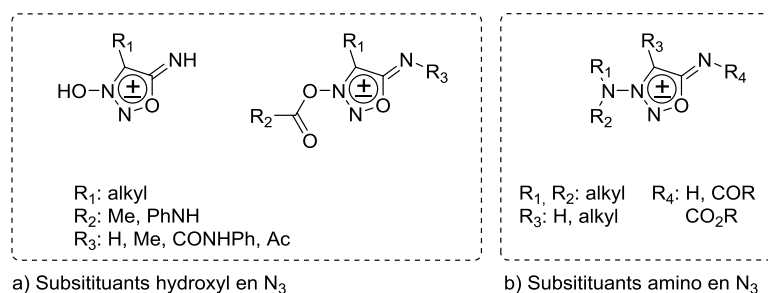


Figure 42 : Iminosydnone hétéro-substituées en N₃.

Dès leur apparition, les 3-dialkylamino-iminosydnone ont été repérées pour leur activité biologique, notamment au niveau cardiovasculaire.¹¹² On doit à ces premiers résultats un véritable engouement pour les 3-dialkylamino-iminosydnone puisqu'on peut trouver à l'heure actuelle environ

¹⁰⁸ H. U. Daeniker, J. Druey, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 2426–2441.

¹⁰⁹ E. N. Beal, K. Tumbull, *Synthetic Commun.* **1992**, *22*, 673–676.

¹¹⁰ a) K. Masuda, Y. Imashiro, T. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 128–132 ; b) M. Götz, K. Grozinger, *J. Heterocyclic Chem.* **1970**, *7*, 123–129.

¹¹¹ M. Götz, K. Grozinger, *Tetrahedron* **1971**, *27*, 4449–4456.

¹¹² K. Kikuchi, M. Hirata, A. Nagaoka, Y. Aramaki, *Jpn. J. Pharmacol.* **1970**, *20*, 23–43.

700 composés aminés dont les propriétés biologiques ont été étudiées contre moins de 200 pour leurs analogues carbonés.

En ce qui concerne les iminosydnonnes portant des substituants carbonés en position 3, la plupart d'entre elles possèdent des chaînes alkyles, probablement car ce sont les plus faciles à synthétiser. Il a pourtant été montré que la présence d'un aryle en position 3 stabilisait l'hétérocycle,¹¹³ malgré tout peu de 3-aryl-iminosydnonnes sont décrites dans la littérature. Nous avons vu précédemment que ce sont précisément les iminosydnonnes possédant un noyau aromatique en position 3, et non un groupement alkyl, qui présentaient des propriétés intéressantes de réactivité avec les cycloalcynes. Nous avons ainsi décidé d'étudier la cyclisation d'iminosydnonnes portant différents groupes aryles en position 3.

2. Synthèse des sels de 3-aryl-iminosydnonnes

La synthèse des iminosydnonnes en tant que telle se fait en deux étapes à partir des *N*-arylamino-acétonitriles correspondants. Ces derniers peuvent être obtenus par deux voies avec pour produit de départ les anilines correspondantes. Il s'agit soit de réaliser l'alkylation de l'aniline, soit de réaliser une réaction de type Strecker *via* l'utilisation de KCN et paraformaldéhyde (**Figure 43**).

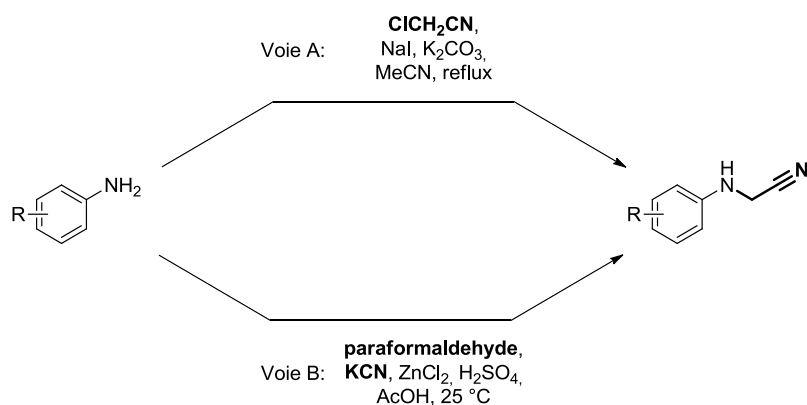


Figure 43 : Voies d'accès pour les *N*-arylamino-acétonitriles.

La stratégie d'alkylation des anilines pour laquelle nous avons opté repose sur l'activation du chloro-acétonitrile par de l'iodure de sodium dans l'acétonitrile selon les conditions de Finkelstein.¹¹⁴ La réaction est propre et aucun produit de dialkylation n'est observé malgré l'excès de chloro-acétonitrile utilisé. Cette méthode nous a permis d'obtenir quatre *N*-arylamino-acétonitriles (**2a–d**) avec d'excellents rendements (**Figure 44**). Deux d'entre eux possèdent un groupement fonctionnalisable (**2c**, **2d**) et sont donc de bons synthons pour la formation d'iminosydnonnes substituées sur le cycle aromatique.

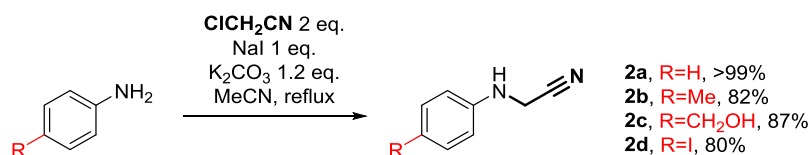


Figure 44 : Synthèse des *N*-arylamino-acétonitriles par alkylation de Finkelstein.

¹¹³ a) L. E. Kholodov, E. V. Borisov, V. G. Yashunskii, *Chem Heterocycl Compd* **1971**, *4*, 514–516 ; b) L. E. Kholodov, V. G. Yashunskii, *Chem Heterocycl Compd* **1966**, *1*, 215–218.

¹¹⁴ H. Finkelstein, *Ber. Dtsch Chem. Ges.* **1910**, *43*, 1528–1532.

En ce qui concerne la voie utilisant la méthode de Strecker, elle repose sur la formation d'un iminium qui est ensuite attaqué par le cyanure de potassium. Cette réaction nous a permis d'obtenir deux amino-acétonitriles supplémentaires (**2e-f**) avec des rendements moyens, malgré l'absence de produits issus de double addition de Strecker. Ces deux substrats portent un groupement dérivatisable intéressant, soit un acide carboxylique soit un nitrile (**Figure 45**).

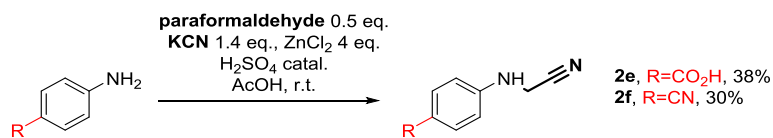


Figure 45 : Synthèse des N-arylamino-acétonitriles par réaction de Strecker.

Les composés obtenus ont pu ensuite être engagés dans les deux étapes clé de formation du noyau iminosydnone, *i.e.* la nitrosylation suivie de la cyclisation en milieu acide. A l'instar de Turnbull et Beal, nous avons privilégié l'utilisation de donneurs de NO organiques tels que l'isoamyl nitrite et le *tert*-butyl nitrite. Ces réactifs sont utilisés en excès et permettent la nitrosylation de l'amine secondaire en quelques heures. Le produit nitrosylé peut être isolé de manière propre par simple évaporation du milieu réactionnel. L'ajout de HCl en solution dans le dioxane permet ensuite la cyclisation de l'iminosydnone en solvant organique dans lequel elle n'est pas soluble, son isolation se fait ainsi par simple filtration.

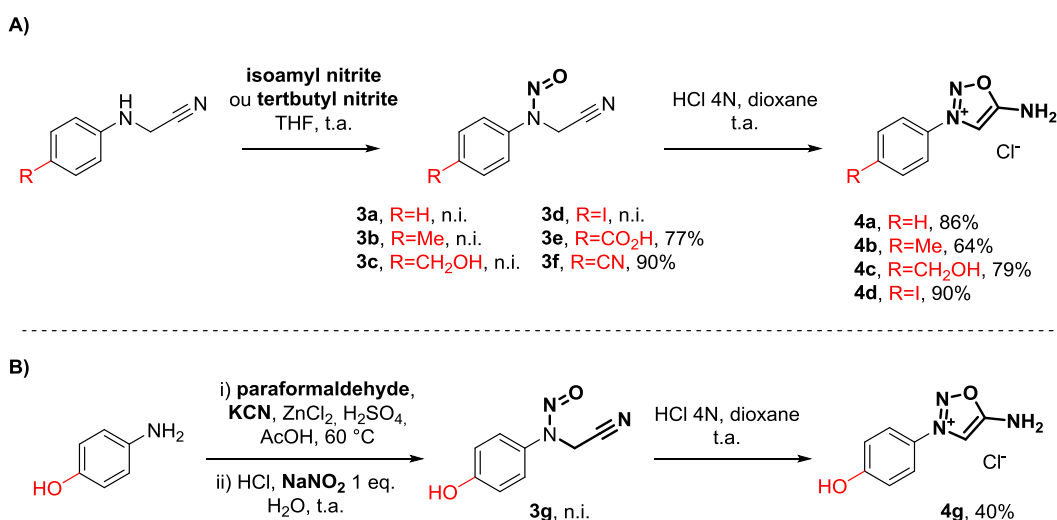


Figure 46 : Formation de l'iminosydnone. A) en deux étapes monotape ; B) de façon monotape à partir de l'aniline **1g**. n.i. = non isolé.

Quatre sels d'iminosydnone ont pu être obtenus avec succès (**4a-d**). Ces produits ont été obtenus avec des rendements allant de bons à excellents (**Figure 46-A**). Par ailleurs, les méthodes de synthèse et de purification utilisées permettent une montée en échelle aisée de formation des iminosydnones. Nous avons pu ainsi obtenir les composés phényle (**4a**) et *p*-iodophényle (**4d**) sur une échelle de 30 grammes sans perte de rendement.

En revanche, les dérivés acide (**3e**) et nitrile (**3f**) ne donnent pas l'iminosydnone attendue, mais se décomposent après l'addition de HCl. La présence de groupements électroattracteurs empêche la cyclisation de l'amine nitrosylée d'avoir lieu. Cette réactivité plus faible des substrats possédant des groupements électroattracteurs en position N₃ pouvait être prédite au vu des résultats obtenus par Yashunskii lors de son étude sur la cinétique de cyclisation des iminosydnones en milieu acide dans

laquelle il montre que des substituants électrodonneurs facilitent la cyclisation.¹¹⁵ Malgré tout nous ne nous attendions pas à ce que ces nitrosamines ne soient pas réactives face à l'addition d'acide puisque la cyclisation des sydnones portant un groupement électroattracteur se produit sans peine.¹¹⁶

Enfin, il nous a également été possible de synthétiser une iminosydone portant un substituant phénol en position N₃ à partir du 4-aminophénol. Les réactions de Strecker et de nitrosylation se font de façon monotope. L'intermédiaire nitrosylé **3g** est ensuite directement engagé dans la cyclisation pour obtenir le sel d'iminosydone **4g** avec un rendement global de 40% (**Figure 46**).

Les sels d'iminosydone isolés sont des substances stables sous forme de solide. En revanche, les bases conjuguées de ces produits s'ouvrent spontanément pour donner l'intermédiaire nitrosylé ; elles n'ont jamais pu être observées (**Figure 47**).^{105 113} Par ailleurs, le pKa du sel d'iminosydone **4a** est de 6.2^{113b} et on peut raisonnablement supposer que les pKas des dérivés synthétisés restent de cet ordre. Ce paramètre est à prendre en compte pour les fonctionnalisations de l'azote exocyclique, celles-ci ne devront pas nécessiter l'emploi de base forte.

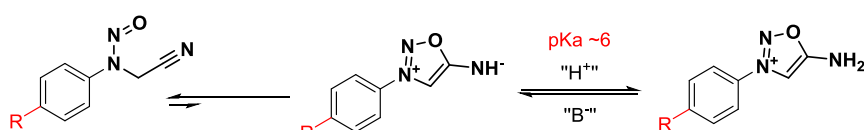


Figure 47 : Equilibre entre l'iminosydone et son précurseur nitrosylé.

En définitive, nous avons obtenu avec succès quatre sels d'iminosydone avec différentes substitutions sur l'aryl (**4a-d, 4g**) (**Figure 48**). Ces derniers seront engagés par la suite dans diverses réactions, notamment la substitution de l'azote exocyclique.

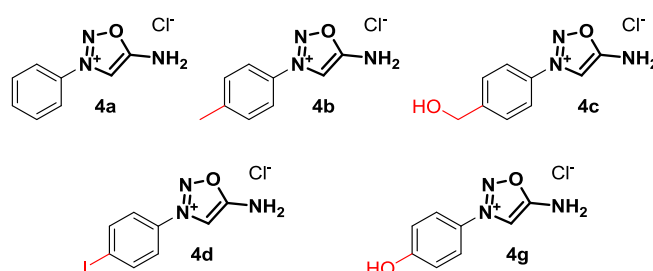


Figure 48 : Résumé des sels d'iminosydone obtenus.

¹¹⁵ V. V. Ogorodnikova, L. E. Kholodov, V. G. Yashunskii, *Chem Heterocycl Compd* **1977**, *13*, 33–39.

¹¹⁶ D. L. Browne, J. P. A. Harrity, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 553–568.

B. Fonctionnalisation en position N₆-exocyclique

1. Utilisation d'électrophiles

Historiquement, la fonctionnalisation de l'azote N₆ des iminosydones se fait à l'aide d'électrophiles (**Figure 49**).^{106, 117, 118, 119} La nucléophilie de ce centre est plutôt faible, notamment en raison de la forte délocalisation de la charge négative dans le réseau aromatique hétérocyclique ainsi que du caractère "imine" de cet azote. Il est donc nécessaire d'utiliser des espèces très électrophiles pour fonctionnaliser cette position.

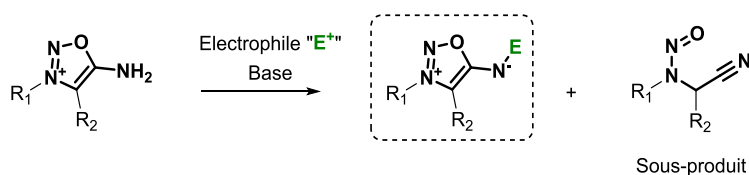


Figure 49 : Réactivité générale des iminosydones avec les électrophiles.

Par ailleurs, seule l'iminosydone déprotonée est capable de s'ajouter efficacement sur un électrophile. Or cette espèce est instable, puisqu'elle s'ouvre spontanément sous la forme de nitrosamine (**Figure 47**). La réactivité de l'électrophile utilisé est donc d'autant plus importante afin de piéger rapidement l'iminosydone déprotonée et limiter la formation du produit d'ouverture.

Nous avons étudié la réactivité des sels d'iminosydones avec différents électrophiles pour accéder à une grande variété de fonctionnalités sur la position N₆ et ensuite évaluer leur comportement dans les réactions de cycloaddition.¹²⁰

¹¹⁷ V. G. Yashunskii, L. E. Kholodov, *Russ. Chem. Rev.* **1980**, *49*, 28–45.

¹¹⁸ H. U. Daeniker, J. Druey, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 2441–2462.

¹¹⁹ K. Masuda, T. Kamiya, Y. Imashiro, T. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 72–79.

¹²⁰ M. Riomet, E. Decuypere, K. Porte, S. Bernard, L. Plougastel, S. Kolodych, D. Audisio, F. Taran, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 8535–8541.

a. Formation des iminosydrones-amides

Les amides sont parmi les fonctionnalisations *N*-exocycliques les plus étudiées et les plus employées pour les iminosydrones. Leur formation a particulièrement été examinée par Kaneko qui décrit quatre voies d'accès pour ces composés (**Figure 50**),¹¹⁹ s'inspirant notamment du travail de Druey.¹¹⁸

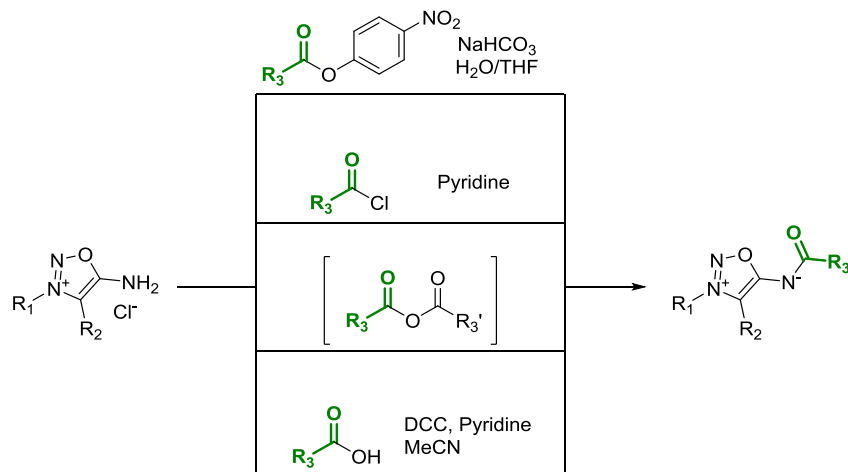


Figure 50 : Synthèse d'iminosydrones-amides dans la littérature.

Néanmoins, la majorité des iminosydrones-amides synthétisées sont souvent simplement acétylées, soit par le chlorure d'acétyle, soit en utilisant l'anhydride acétique. Au vu du succès de la stratégie décrite par Kaneko à obtenir une iminosydron-amide en utilisant un acide carboxylique et un carbodiimide, nous avons opté pour cette stratégie pour dériver les 3-aryl-iminosydrones sous forme d'amides (**Figure 51**).

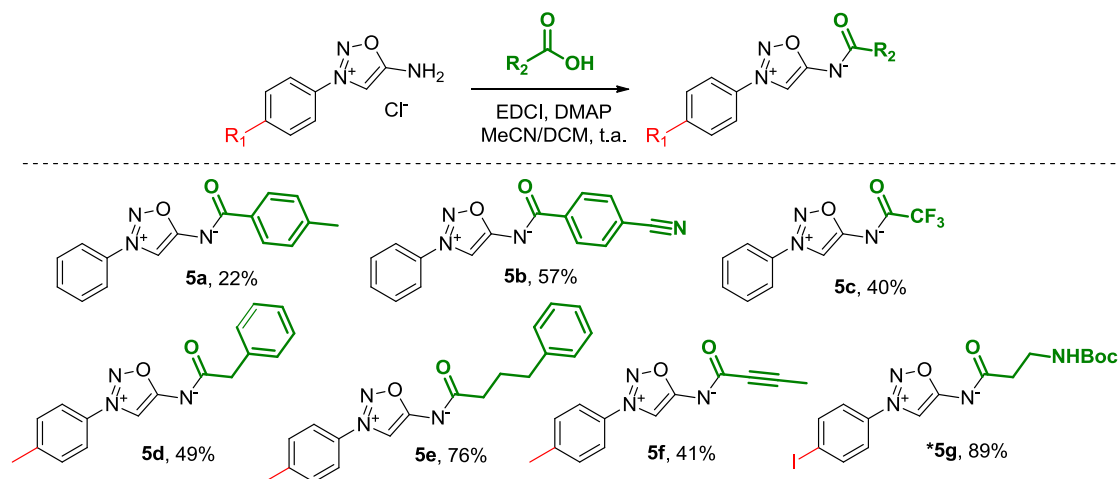


Figure 51 : Synthèse d'amides utilisant un couplage peptidique ; *obtenu avec HATU, DIPEA, DMF.

Nous avons sélectionné comme système de couplage peptidique le carbodiimide EDCI avec la diméthylaminopyridine (DMAP) pour sa robustesse et des facilités de purification.

Nous avons ainsi pu obtenir sept nouvelles iminosydrones-amides (**5a–5g**) avec des rendements globalement moyens. Dans tous les cas les sous-produits résultant de l'ouverture de l'iminosydron de départ ont été observés. Cette stratégie permet néanmoins d'avoir accès à une grande variété de substrats dans des conditions douces en évitant l'utilisation de dérivés fortement réactifs tels que les anhydrides ou les chlorures d'acyle, dont la compatibilité chimique reste plus restreinte.

b. Formation des iminosydnone-sulfonamides

Les iminosydnone-sulfonamides ont été moins étudiées que les dérivés carbonylés. On ne trouve que peu de rapports dans la littérature à leur sujet. Leur synthèse a d'abord été décrite dans la pyridine en utilisant les chlorures de sulfonyl associés.¹²¹ Plus récemment, on peut trouver une voie de synthèse utilisant comme base la triéthylamine.¹²² Dans ces deux cas, les iminosydnone utilisées portent en position 3 des groupements donneurs alkyl ou dialkylamino qui tendent à renforcer la nucléophilie de l'azote N₆.

Nous avons éprouvé les deux méthodes de synthèse décrites sur un substrat témoin qui est la 3-phenyl-iminosydnone **4a** avec le chlorure de tosyl, un chlorure de sulfonyl commercial (**Figure 52**).

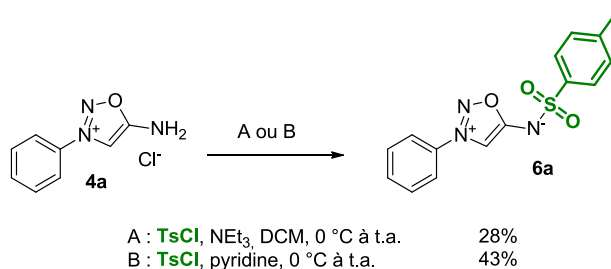


Figure 52 : Synthèse de 3-phenyl-6-tosyl-iminosydnone selon les méthodes décrites dans la littérature.

Nous obtenons un rendement bas de 28% en utilisant la triéthylamine comme base, tandis qu'en employant la pyridine le rendement atteint 43%. Par ailleurs, la proportion de produit d'ouverture généré est inférieure pour la voie B (21%, contre 66% pour la voie A), ce qui donne une préférence pour l'emploi de la pyridine pour d'autres substrats. Nous constatons que ces réactions sont moins efficaces sur les substrats arylés que pour ceux ayant des groupements alkyls ou N-dialkyls, donneurs en position N₃, décrits dans la littérature.

La formation d'iminosydnone-sulfonamides a également été réalisée avec le chlorure de dansyl, un réactif fluorescent communément utilisé en biochimie pour faire du séquençage de protéines.¹²³ Dans ce cas-ci, la méthode la plus efficace a été d'utiliser la diisopropyléthylamine (DIPEA) comme base dans le DMF (**Figure 53**). La base est ajoutée au goutte à goutte à basse température (-20 °C) afin de favoriser l'addition de l'iminosydnone sur le chlorure de dansyle plutôt que l'ouverture qui donnerait la nitrosamine.

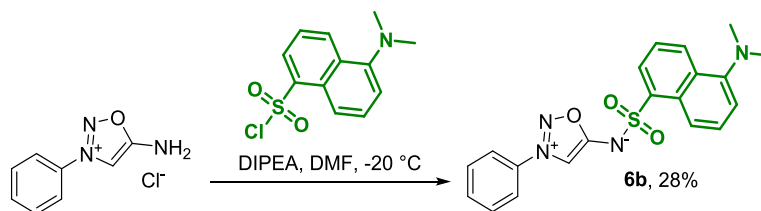


Figure 53 : Synthèse d'iminosydnone-sulfonamide portant un dansyl.

On obtient le produit désiré **6b** avec un rendement plutôt bas de 28%. Les autres méthodes précédemment décrites (NEt₃ ou pyridine) n'ont permis d'obtenir le produit qu'avec des rendements inférieurs à 10%. Malgré l'efficacité modeste de la fonctionnalisation des iminosydnone sous forme de sulfonamides, nous avons toutefois pu obtenir deux substrats qui nous permettrons d'étudier leurs

¹²¹ H. U. Daeniker, J. Druey, *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 2462–2465.

¹²² I. A. Cherepanov, L. H. Kusaeva, I. A. Godovikov, V. N. Kalinin, *Russ Chem Bull* **2009**, *58*, 2474–2477.

¹²³ J. M. Walker, in *Basic Protein and Peptide Protocols*, Humana Press, **1994**, pp. 321–328.

réactivités dans un second temps. Le second produit synthétisé porte un groupement dansyl dont les propriétés de fluorescence seront également étudiées par la suite (cf. Partie II).

c. Formation des iminosydones-carbamates

La synthèse d'iminosydones-carbamates par addition du sel d'iminosydnone sur des électrophiles est relativement peu décrite. Une première stratégie employée repose sur l'emploi de carbonates activés par un groupement *p*-nitrobenzène (PNB). Elle a permis la synthèse d'iminosydones portant des sucres¹²⁴ ou un carbamate acéloxy-alkyl utilisé comme prodrogue (**Figure 54**).¹²⁵

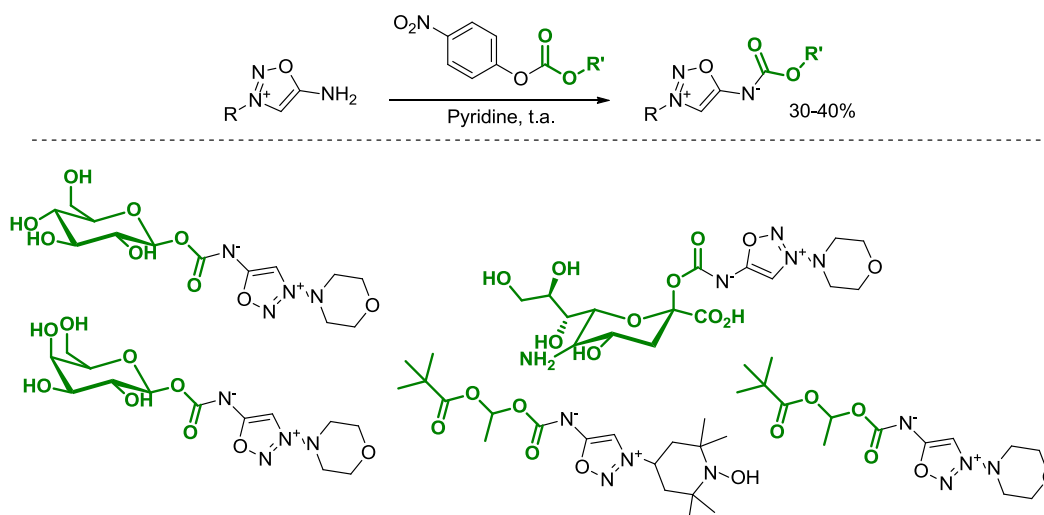


Figure 54 : Iminosydones-carbamates décrites dans la littérature, synthétisées à l'aide de carbonates activés.

La voie de synthèse utilisant les chloroformates a été essentiellement utilisée pour synthétiser des carbamates activés que nous détaillerons par la suite (**Figure 55**).¹²⁶

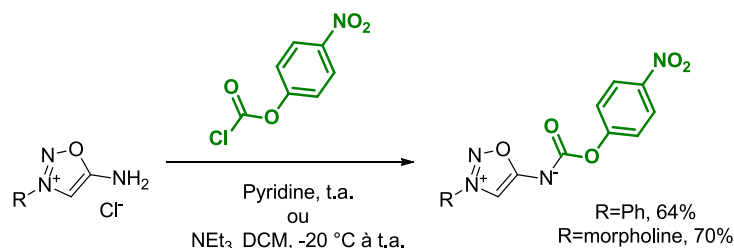


Figure 55 : Synthèse d'iminosydnone-*paranitrophényl*carbamate selon Bringaud et O'Hagan

Nous avons dans un premier temps décidé d'utiliser les conditions décrites par O'Hagan pour synthétiser une iminosydnone dont l'azote en position 6 est protégé sous forme de carbamate de benzyle (**Figure 56a**).

¹²⁴ T. B. Cai, D. Lu, X. Tang, Y. Zhang, M. Landerholm, P. G. Wang, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3518–3524.

¹²⁵ S. Acharya, P. Rogers, R. R. Krishnamoorthy, D. L. Stankowska, H. V. R. Dias, T. Yorio, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1490–1494.

¹²⁶ A. Nortcliffe, N. P. Botting, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4657–4671.

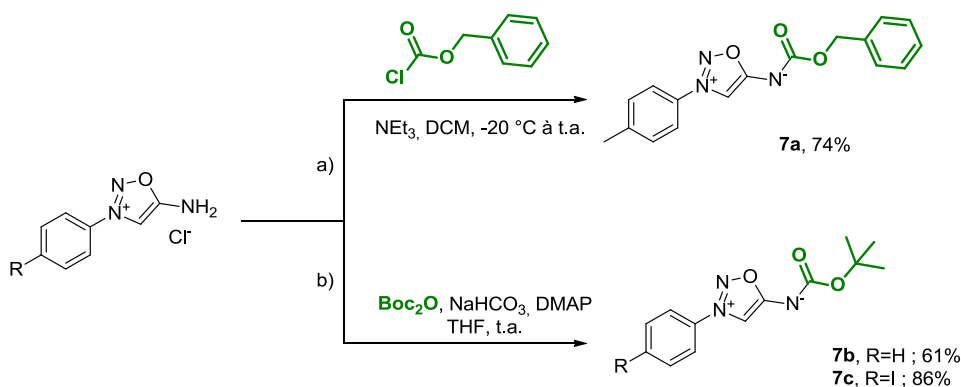


Figure 56 : Synthèse des iminosydnone-carbamates.

Le produit **7a** est obtenu avec un rendement de 74%. A nouveau, le succès de la réaction repose sur un ajout lent et à très basse température de la base. En contrôlant précisément ces paramètres, il est possible d'obtenir les iminosydnone-carbamates *via* les chloroformates avec de bons rendements.

Pour finir, les iminosydnone-carbamates les plus intéressantes d'un point de vue synthétique sont les dérivés *tert*-butylcarbamates (Boc). Ce groupement protecteur classique des amines est également greffable sur les iminosydnone. Il permet de protéger l'azote exocyclique lors de fonctionnalisations sur d'autres positions du mésoionique. Cherepanov *et al.* ont récemment montré que les 6-*N*-Boc-iminosydnone étaient compatibles avec une réaction de lithiation de la position C₄ puis réaction avec un électrophile.¹²⁷ Il est alors possible d'obtenir l'iminosydnone à nouveau sous forme de chlorhydrate par clivage du groupement Boc avec du HCl méthanolique (**Figure 57**).

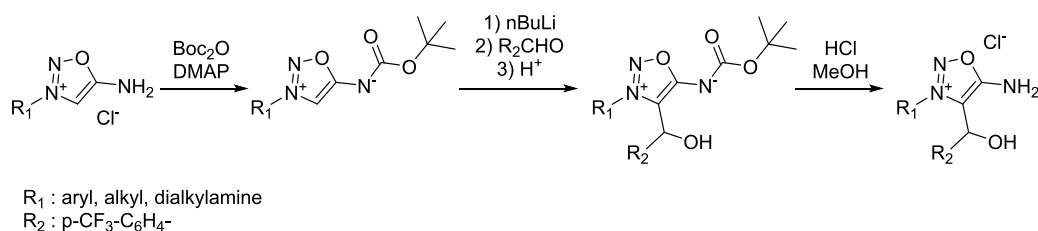


Figure 57 : Protection sous forme de *tert*-butylcarbamate, fonctionnalisation puis déprotection des iminosydnone.

Nous avons également choisi cette stratégie afin d'avoir accès à des iminosydnone protégées fonctionnalisables dans un second temps (**Figure 56b**). Nous avons ainsi pu obtenir la 3-phenyl-6-*N*-Boc-iminosydnone **7b** avec un rendement de 61%. Ce substrat fera office de modèle pour étudier les réactions de fonctionnalisation en C₄ (cf. Partie I-I-D-Fonctionnalisation des iminosydnone en position C₄). La 3-(*p*-iodophényl)-6-*N*-Boc-iminosydnone **7c**, obtenue avec 86% de rendement servira quant à elle à étudier la compatibilité de réactions de couplages avec le noyau mésoionique (cf. Partie I-I-C-Fonctionnalisation de l'aryl en position N₃).

¹²⁷ I. A. Cherepanov, A. S. Samarskaya, I. A. Godovikov, K. A. Lyssenko, A. A. Pankratova, V. N. Kalinin, *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59*, 727–729.

d. Formation des iminosydrones-urées

La formation d'iminosydrones portant une fonction urée sur l'azote exocyclique se fait par l'utilisation d'isocyanates. Historiquement, la réaction est faite avec la pyridine en tant que base et solvant,¹²⁸ ou bien dans l'eau en utilisant comme base du bicarbonate de sodium.¹¹⁸ Le groupe de Yashunskii a également développé une méthode-tandem, fonctionnalisant l'iminosydnone conjointement à sa cyclisation (**Figure 58**).¹²⁹

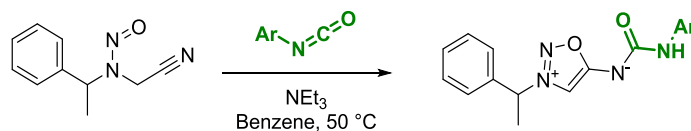


Figure 58 : Synthèse d'iminosydnone à partir des nitrosamino-acétonitriles selon Yashunskii.

Enfin, on peut noter que la réaction avec le cyanate de potassium dans l'eau permet d'obtenir l'iminosydnone-urée non substituée.¹³⁰

Nous avons pu synthétiser des iminosydrones-urées selon plusieurs protocoles, avec des isocyanates commerciaux ou de synthèse mais également générés *in situ*.

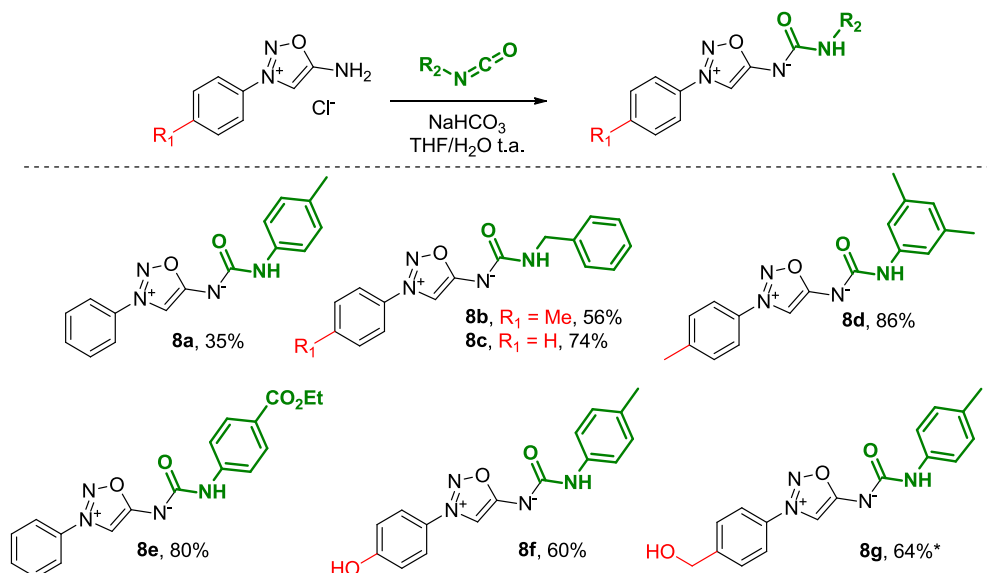


Figure 59 : Synthèse d'iminosydrones-urées ; *obtenu en utilisant NEt₃, DMF, -20 °C.

La réaction a été réalisée dans un mélange THF/eau avec pour base le bicarbonate de sodium, une base utilisée couramment pour déprotoner les iminosydrones (**Figure 59**).

Les produits ont été obtenus avec des rendements allant de modestes à très bons. Des aryl-isocyanates ont été utilisés, ainsi que l'isocyanate de benzyle. Il est intéressant de noter la spécificité de l'attaque de l'isocyanate par l'azote de l'iminosydnone et non par les alcools libres pour les produits **8f** et **8g** obtenus avec des rendements de 64 et 60% respectivement. Nous avons également utilisé le bicarbonate de sodium comme base avec le 1-chloro-2-isocyanatoethane, pour obtenir l'urée attendue **8h** avec un rendement de 45% (**Figure 60**). Nous pouvons constater ici la

¹²⁸ a) Z. A. Olovyanskikh, T. M. Ivanova, V. E. Sviridova, V. G. Yashunskii, *Chem Heterocycl Compd* **1978**, *14*, 130–135 ; b) M. Vahermo, T. Suominen, A. Leinonen, J. Yli-Kauhala, *Arch. Pharm.* **2009**, *342*, 201–209.

¹²⁹ Z. A. Olovyanskikh, V. A. Parshin, V. V. Ogorodnikova, M. D. Mashkovskii, V. G. Yashunskii, *Pharm Chem J* **1987**, *21*, 756–759.

¹³⁰ M. Ohta, K. Yoshida, S. Sato, *B. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, *39*, 1269–1273.

spécificité de la réaction de l'iminosydnone vis-à-vis du réactif qui est un bis-électrophile puisqu'aucun produit d'alkylation n'a été détecté dans ce cas.

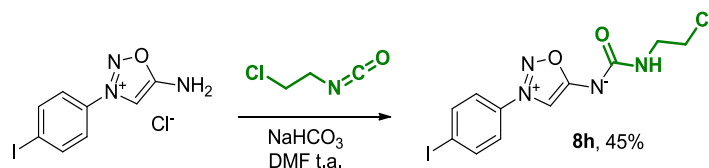


Figure 60 : Réaction d'une iminosydnone avec le 1-chloro-2-isocyanatoethane.

Nous avons également développé un protocole utilisant la triéthylamine comme base dans le DMF. La réaction se produit bien plus rapidement qu'avec le bicarbonate de sodium. Nous avons également observé que l'ouverture de l'iminosydnone est instantanée à température ambiante en présence de base aminée. L'ajout de base au goutte à goutte pendant 45 minutes à basse température ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) est déterminant pour obtenir un rendement acceptable en produit désiré.

Les isocyanates sont de bons électrophiles, toutefois même si nombre d'entre eux sont disponibles commercialement, ils n'offrent que peu de diversité moléculaire. Au cours de nos travaux de recherche nous avons été amenés à développer des iminosydnones susceptibles d'être greffées sur des fonctions thiols, notamment ceux présents sur des protéines. Pour cela il était nécessaire de synthétiser des iminosydnones comportant un noyau maléimide ou aryl propionitrile connus pour réagir rapidement sur les thiols.¹³¹ Les isocyanates comportant ces motifs structuraux n'étant pas disponible dans le commerce, il a donc été nécessaire de trouver une voie alternative.

Les isocyanates peuvent être générés *in situ* à partir des amines correspondantes à l'aide de triphosgène. Pour cela, nous utilisons un milieu biphasique dichlorométhane/eau. Le triphosgène subit une activation douce à l'aide de bicarbonate de sodium pour former ensuite l'isocyanate. Ces conditions d'activation sont par ailleurs compatibles avec l'ajout des sels d'iminosydnones puisqu'elles passent outre l'utilisation d'une base aminée. Cette méthode nous a permis de fonctionnaliser l'iminosydnone avec le motif aryl propionitrile **8i** ainsi qu'avec un bras espaceur comportant une amine protégée **8k**. Une autre méthode d'accès pour les isocyanates consiste à partir de l'acide carboxylique correspondant. Ce dernier peut être converti en une étape en azoture d'acyle à l'aide d'azoture de diphénylphosphoryle.¹³² L'isocyanate se forme ensuite de manière propre en chauffant par un réarrangement de Curtius et peut être utilisé dans un second temps sans purification. En utilisant cette voie de synthèse pour l'isocyanate et la formation d'urée en milieu biphasique, nous avons pu obtenir une iminosydnone-urée fonctionnalisée par un maléimide **8j** avec un rendement de 91% (**Figure 61**).

¹³¹ S. Kolodych, O. Koniev, Z. Baatarkhuu, J.-Y. Bonnefoy, F. Debaene, S. Cianféroni, A. Van Dorsselaer, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 197–200.

¹³² T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 6203–6205.

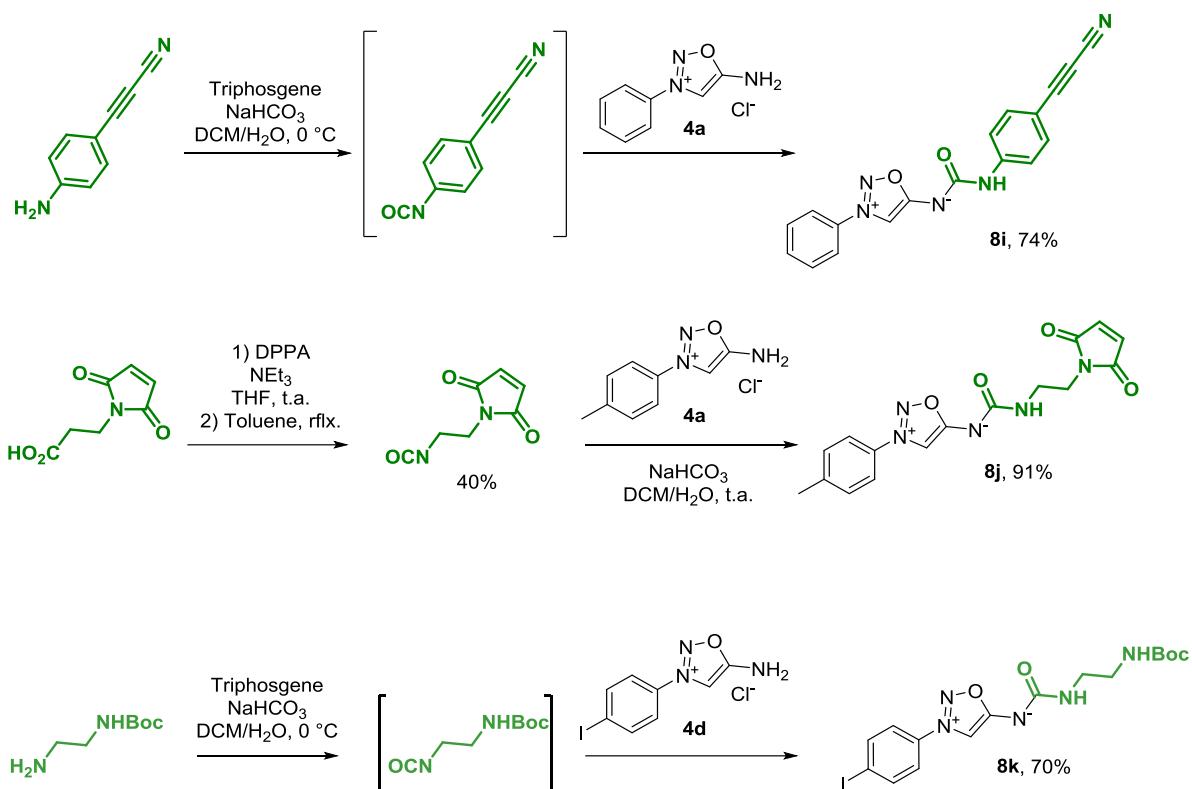


Figure 61 : Synthèse d'iminosydnone-urées en milieu biphasique.

e. Formation des iminosydnone-thiourées

En 1962, Druet décrit la formation d'iminosydnone-thiourées par l'action d'isothiocyanates sur les chlorures d'iminosydnone en présence de bicarbonate de sodium.¹¹⁸ En revanche, le groupe d'Ohta qui avait réussi à synthétiser une iminosydnone portant une urée terminale,¹³⁰ indique que la même réaction utilisant le thiocyanate de potassium n'aboutit qu'à un échange d'anions (Cl^- contre SCN^-). Dans nos mains, l'addition de 3-aryliminosydnone sur l'isothiocyanate de phényle est restée sans succès.

En revanche, l'utilisation d'isothiocyanates plus électrophiles activés par la présence d'un carbonyle, s'est révélée efficace. Nous avons pu obtenir ainsi trois iminosydnone thiourées avec de très bons rendements (**Figure 62**).

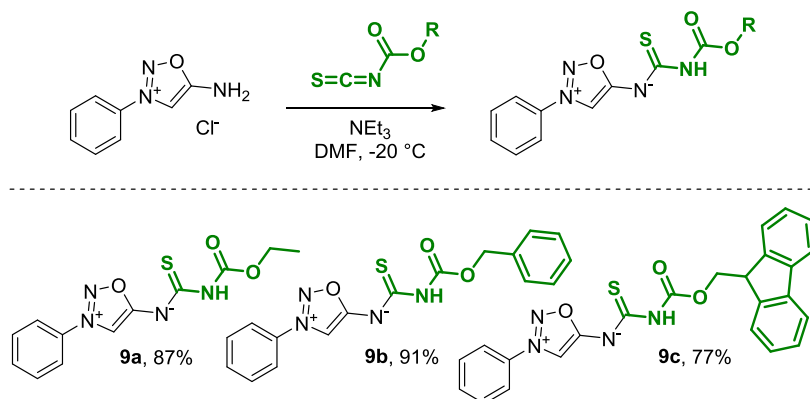


Figure 62 : Synthèse d'iminosydnone-thiourées.

La voie de synthèse que nous avons sélectionnée pour ces produits est la même que celle utilisée pour l'obtention de l'urée **8a**. Les produits **9a–b** ont pu être isolés par chromatographie sur gel de silice.

2. Utilisation de nucléophiles

La fonctionnalisation des iminosydnones en position N₆ peut se réaliser avec des nucléophiles mais pour cela il est nécessaire de préalablement activer cette position par des groupements électrophiles. Cette voie présente plusieurs avantages et notamment celui de ne plus entraîner l'ouverture du cycle lors de la déprotonation du sel d'iminosydnone. De plus, il existe une plus grande disponibilité de nucléophiles (amines, alcools, thiols...) que d'électrophiles.

a. Rappel de la littérature : activation de l'iminosydnone sous forme de *p*-nitrophényl carbamate

La fonctionnalisation exocyclique d'iminosydnones en utilisant des électrophiles est la voie de synthèse historique de ces composés. Elle est la plus directe puisqu'elle est réalisée en une seule étape à partir du sel d'iminosydnone associé. Cette méthode souffre néanmoins de plusieurs inconvénients. Tout d'abord, elle nécessite l'emploi d'électrophiles forts, réduisant ainsi la compatibilité chimique d'un grand nombre de groupement fonctionnels. Par ailleurs, peu d'électrophiles sont commerciaux ; ils nécessitent donc d'être générés *in situ* en utilisant des agents réactifs et dangereux, *e.g.* le triphosgène dans le cas de la formation d'urées.

En 2003, le groupe de Pascal Hoffmann synthétise pour la première fois une iminosydnone carbamate activée par le groupement *para*-nitrobenzène (PNB) (**Figure 55**). Ce synthon permet par la suite d'accéder à des iminosydnones carbamates complexes lorsqu'il est mis en présence d'un alcool au reflux de l'acétonitrile (**Figure 63**). On peut noter la synthèse d'iminosydnones dérivées de l'adénosine ou du Trolox, un analogue de la vitamine E (**Figure 63a**).¹³³

Plus récemment, O'Hagan et ses collaborateurs ont utilisé cette stratégie pour obtenir des dérivés d'acides aminés portant une iminosydnone.¹²⁶ Ces amino-acides sont déprotégés et évalués tels quels en tant que donneurs de radicaux NO[•] ou sont alors engagés dans la synthèse de peptides RGD modifiés (**Figure 63b**).¹³⁴ Ils utilisent non seulement des alcools comme Hoffmann, mais également des amines menant à la formation d'iminosydnones-urées.

¹³³ V. Vinatier, L. Soulère, P. Hoffmann, *Nitric Oxide* **2006**, *15*, 363–369.

¹³⁴ A. Nortcliffe, I. N. Fleming, N. P. Botting, D. O'Hagan, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8343–8347.

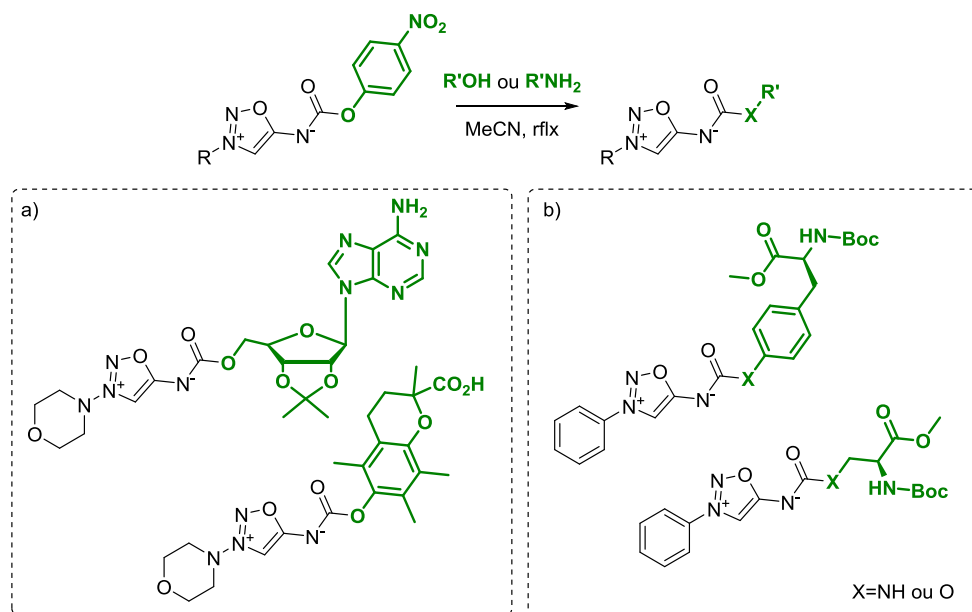


Figure 63 : Addition d'amines et d'alcools sur les iminosydnones-carbamates PNB (paranitrobenzene) ;
 a) exemples d'iminosydnones dérivées d'alcools complexes par Hoffmann ;
 b) iminosydnones dérivées d'acides aminés par O'Hagan.

Cependant, malgré nos efforts, cette stratégie décrite dans la littérature s'est montrée inefficace sur nos substrats comme par exemple sur la 3-(*p*-iodophényl)-iminosydnone (**Figure 64**).

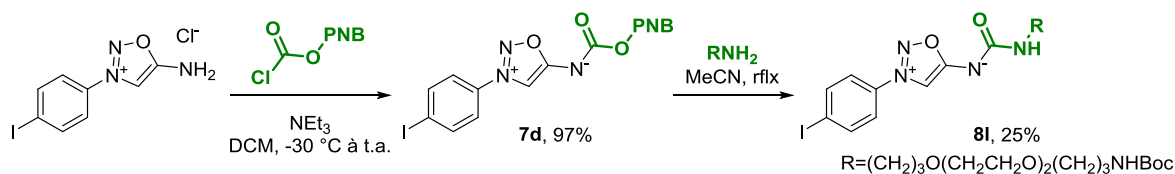


Figure 64 : Synthèse d'iminosydnone-urée via la stratégie carbamate PNB.

La formation du carbamate para-nitrobenzene **7d** (PNB) s'est montrée efficace dans le dichlorométhane en utilisant la triéthylamine comme base (97%) tandis que la procédure employant la pyridine s'est révélée peu reproductible, donnant au maximum 37% de produit. En revanche l'étape suivante qui consiste en l'addition de l'amine sur le carbamate activé n'a pas été concluante. On obtient au mieux 25% de l'urée désirée **8k** (**Figure 64**) ; la dégradation du produit de départ en *p*-nitrophénol et nitrosamine étant dans ce cas favorisée.

De ce fait, cette méthode ne nous est pas apparue suffisamment robuste et générale. Nous avons donc cherché une nouvelle voie d'activation électrophile des iminosydnones.

b. Expérience préliminaire

Nous avons tout d'abord essayé de générer une iminosydnone-isocyanate qui pourra réagir en tant qu'électrophile. Pour cela, nous avons traité le sel d'iminosydnone avec du triphosgène à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ajoutant de la triéthylamine au goutte à goutte. Un nucléophile est ensuite ajouté après 15 min ; dans ce cas nous avons utilisé l'alcool benzylique (**Figure 65**).

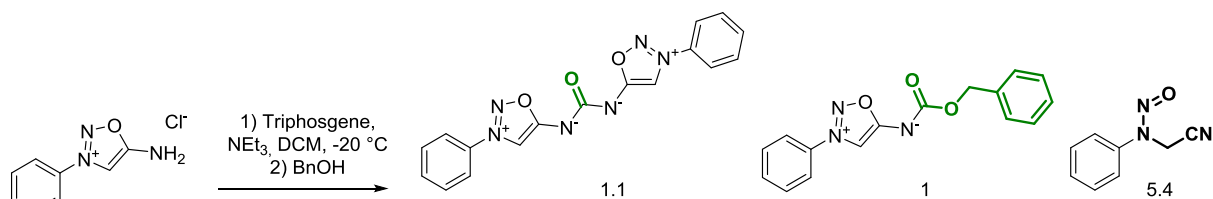


Figure 65 : Réaction entre le sel d'iminosydnone **4a** et le triphosgène puis addition d'un nucléophile ; ratios déterminés par RMN ¹H sur le brut réactionnel.

On observe la formation massive de produit d'ouverture. Le carbamate désiré est isolé avec seulement 6% de rendement et on peut également isoler de la bis-iminosydnone urée avec le même rendement. Il est donc nécessaire d'activer les iminosydnones vis-à-vis de l'addition de nucléophiles *via* des intermédiaires plus stables et moins prompts à des réactions secondaires (dimérisation, ouverture...). Notre choix s'est alors tourné vers des carbonyles en positions N₆ des iminosydnones activés par un imidazolium.

c. Introduction sur l'activation d'un carbonyle à l'aide d'un imidazolium

Les urées et les carbamates sont des motifs très utilisés en chimie, notamment en chimie médicinale de par leur stabilité et leur capacité à créer des liaisons hydrogène. De nombreuses méthodes ont été développées pour leur synthèse. Historiquement, ces produits sont obtenus par addition d'amines ou d'alcools sur des isocyanates, introduits tels quels ou générés au cours de la réaction. Compte tenu de l'importance de ces composés, les chimistes ont développé de nombreuses nouvelles méthodes employant des réactifs moins néfastes, plus sélectifs et des conditions réactionnelles plus douces.^{135, 136}

Nous nous sommes inspirés de ces stratégies dans le cadre de la synthèse d'iminosydnones fonctionnalisées par une urée ou un carbamate. Une stratégie commune pour l'obtention de ces deux motifs est l'utilisation de carbonyles activés par un imidazolium développée par le groupe de Batey.^{137, 138, 139}

Cette stratégie repose avant tout sur le fait que l'addition d'amines sur le 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) produit un composé bien moins réactif que le produit de départ, qui est donc isolable et ne sur-réagit pas.¹⁴⁰ Ainsi, l'emploi de CDI sans activation a été adopté uniquement pour la formation d'urées symétriques disubstituées intramoléculaires, en chauffant fortement.¹⁴¹ En 1971, Jencks pose les jalons des futurs travaux de Batey en démontrant que les acyl-imidazoliums étaient plus réactifs que les acyl-imidazoles.¹⁴² Ainsi, dans une série d'articles, Batey décrit l'accès à des urées tétrasubstituées, des carbamates ainsi que des S-thiocarbamates *via* un intermédiaire commun carbamoyl-imidazolium.^{137, 138, 139} Ce synthon est obtenu en deux étapes par réaction de dialkylamines avec le CDI suivie d'une méthylation de l'imidazole par de l'iodure de méthyle (**Figure 66**). Cette méthode s'est

¹³⁵ F. Bigi, R. Maggi, G. Sartori, *Green Chem.* **2000**, *2*, 140–148.

¹³⁶ A. K. Ghosh, M. Brindisi, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2895–2940.

¹³⁷ R. A. Batey, C. Yoshina-Ishii, S. D. Taylor, V. Santhakumar, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2669–2672.

¹³⁸ J. A. Grzyb, R. A. Batey, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7485–7488.

¹³⁹ J. A. Grzyb, M. Shen, C. Yoshina-Ishii, W. Chi, R. S. Brown, R. A. Batey, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7153–7175.

¹⁴⁰ H. A. Staab, W. Rohr, *Chem. Ber.* **1962**, *95*, 1298–1306.

¹⁴¹ H. A. Staab, *Liebigs Ann. Chem.* **1957**, 609, 75–83.

¹⁴² W. P. Jencks, D. G. Oakenfull, K. Salvesen, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 188–194.

révélée également efficace pour la synthèse de composés thiocarbamoyls en utilisant le 1,1'-thiocarbonylimidazole (TCDI).¹³⁹

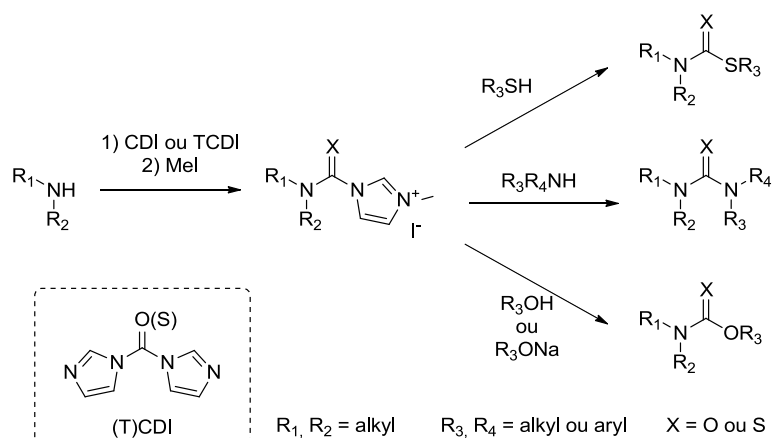


Figure 66 : Dérivatisation de dialkylamines en différents carbamoyls via un carbonyl-imidazolium.

Par ailleurs, des stratégies s'affranchissant de l'alkylation de l'imidazole ont également été développées plus récemment. Le groupe de Sarpong utilise une catalyse par un acide de Brønsted de type pyridinium ; cette méthode lui donne ainsi accès à diverses oxazolidinones (**Figure 67a**).¹⁴³ Il a été également montré que la réactivité du CDI, ainsi que de l'espèce carbamoyl-imidazole, était exacerbée dans l'eau. L'équipe de Padiya a pu obtenir de cette manière de nombreux dérivés urées, carbamates et thiocarbamates (**Figure 67b**).¹⁴⁴

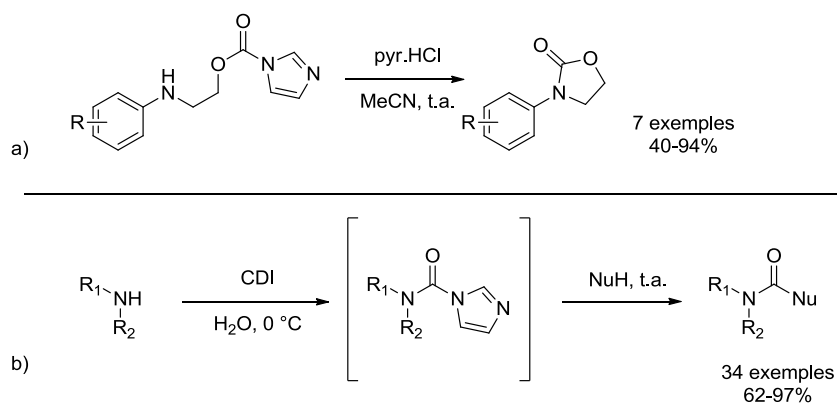


Figure 67 : Formation de dérivés carbamoyls via un carbamoyl-imidazole ; a) par activation à l'aide d'un acide de Brønsted ; b) par une méthode one-pot dans l'eau.

Ces stratégies robustes ayant été employées avec succès dans la création de liens urées¹⁴⁵ et carbamates¹⁴⁶ au sein de molécules biologiquement actives aux structures complexes, nous avons décidé de les utiliser dans le cadre de la fonctionnalisation des iminosydnones. Nous avons donc choisi

¹⁴³ S. T. Heller, T. Fu, R. Sarpong, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1970–1973.

¹⁴⁴ K. J. Padiya, S. Gavade, B. Kardile, M. Tiwari, S. Bajare, M. Mane, V. Gaware, S. Varghese, D. Harel, S. Kurhade, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2814–2817.

¹⁴⁵ a) C. Parsy, F.-R. Alexandre, G. Brandt, C. Caillet, S. Cappelle, D. Chaves, T. Convard, M. Derock, D. Gloux, Y. Griffon, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4444–4449 ; b) C. C. Parsy, F.-R. Alexandre, V. Bidau, F. Bonnaterre, G. Brandt, C. Caillet, S. Cappelle, D. Chaves, T. Convard, M. Derock, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 5427–5436.

¹⁴⁶ D. G. Brown, P. R. Bernstein, A. Griffin, S. Wesolowski, D. Labrecque, M. C. Tremblay, M. Sylvester, R. Mauger, P. D. Edwards, S. R. Throner, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 733–758.

de synthétiser différentes iminosydnones carbonyl-imidazoles et carbonyl-imidazoliums, pour étudier leur réactivité face à plusieurs nucléophiles.

d. Les iminosydnones-carbonyl-imidazolium

Pour la synthèse des dérivés carbonyl-imidazoles **10a-c**, nous nous sommes inspirés de la méthode décrite par le groupe de Batey pour la conception de dérivés de méthyl-isocyanates.¹⁴⁷ Ce groupe utilise le sel de méthyl-ammonium correspondant en présence de CDI sans addition de base. Les groupements imidazoles du CDI suffisent à déprotoner l'ammonium pour le rendre réactif. Ces conditions douces et l'absence de base permettent une réaction contrôlée, empêchant la formation d'urée 1,1'-diméthyl.

Compte tenu de l'instabilité de la base conjuguée des sels d'iminosydnones et de la faible différence de pKa entre les iminosydnones et l'imidazole (pKas environ de 6 et 7 respectivement), ces conditions se montrent prometteuses pour l'obtention d'iminosydnones-carbonyl-imidazoles.

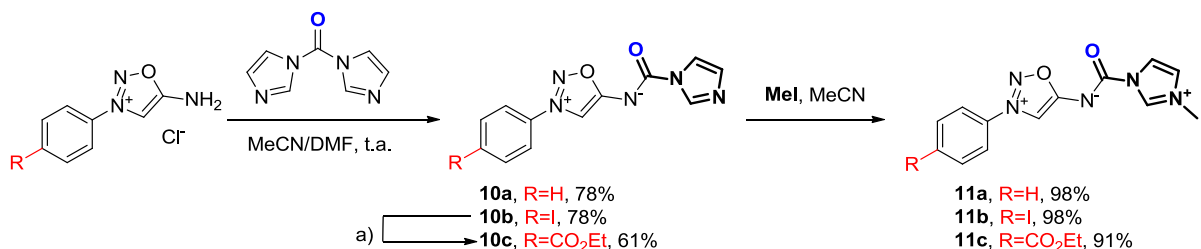


Figure 68 : Synthèse d'iminosydnones-carbonyl-imidazolium ; a) CO, Pd(PPh₃)₂Cl₂, EtOH/NEt₃ 1/1, 80 °C.

Ces conditions ont donc été appliquées aux sels d'iminosydnones phényl et *p*-iodophényl (Figure 68). La conversion se fait quasi-intégralement en produit désiré ; le produit d'ouverture n'est présent qu'à l'état de traces dans le brut réactionnel (<4% en RMN). On peut ainsi isoler les produits **10a** et **10b** avec un rendement de 78% après purification sur colonne de chromatographie. Le produit iodé **10b** peut ensuite être converti avec succès en ester éthylique **10c** en utilisant une réaction pallado-catalysée de carbonylation avec du monoxyde de carbone, très efficace sur les iminosydnones (cf Partie I-I-C-Carbonylation des iminosydnones).

Ces iminosydnones-carbonyl-imidazoles peuvent ensuite être méthylées à l'aide d'iodure de méthyle dans l'acétonitrile avec d'excellents rendements. La réaction se fait à température ambiante pour le produit substitué par un phényle **11a**, en revanche elle nécessite un léger chauffage à 40 °C pour les deux autres dérivés **11b-c** (Figure 68).

De même, la synthèse des analogues sulfurés de ces produits a été réalisée avec succès à l'aide du TCDI (Figure 69).

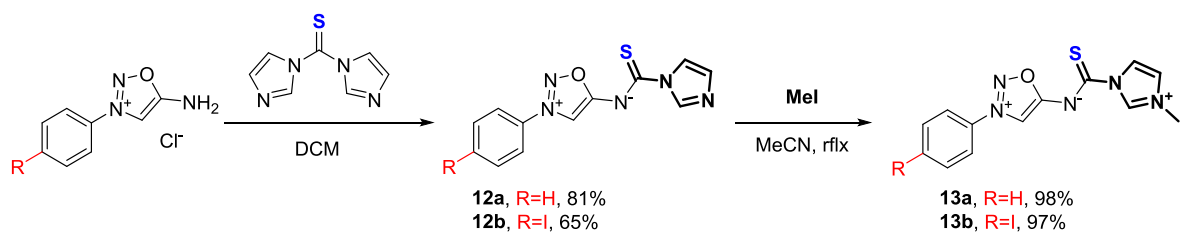


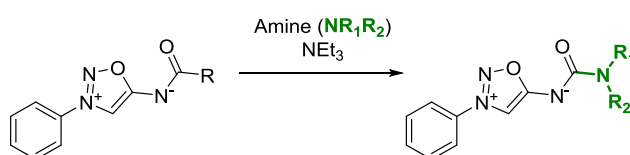
Figure 69 : Synthèse d'iminosydnones-thiocarbonyl-imidazolium.

¹⁴⁷ P. A. Duspara, M. S. Islam, A. J. Lough, R. A. Batey, *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 10362–10368.

On peut ainsi obtenir les dérivés thiocarbonyl-imidazoliums (**12a–b** et **13a–b**) avec des rendements comparables à ceux de leurs homologues oxygénés. Aucune alkylation du soufre n’a été observée. Il est à noter que ces produits sont d’éventuels précurseurs d’iminosydnonnes-thiourées très peu décrites dans la littérature, et d’iminosydnonnes-O-thiocarbamates et dithiocarbamates qui n’ont à notre connaissance jamais été décrites.

e. Réactivité des iminosydnonnes-carbonyl-imidazoliums, optimisation de la réaction de substitution avec des amines

Une fois ces molécules en main, nous avons testé leur réactivité avec deux amines modèles ; la *n*-butylamine en tant qu’amine primaire et la morpholine comme amine secondaire. Les réactions ont été réalisées sur l’iminosydnone portant uniquement un groupement phényl, que ce soit sous sa forme imidazole ou imidazolium (**Tableau 1**).



Entrée	Composé	R	Amine (n _{eq})	Solvent	Temperature	Temps	Rendement
1	10a		 (6 eq.)	DCM	r.t.	7 j	–
2	10a		 (6 eq.)	DCM	r.t.	7 j	–
3	10a		 (1 eq.)	CHCl ₃ /DMF (30/1)	70 °C	20 h	–
4	10a		 (1 eq.)	CHCl ₃ /DMF (30/1)	70 °C	20 h	–
5 ^a	10a		 (100 eq.)	–	r.t.	2 h	18%
6 ^a	10a		 (100 eq.)	–	r.t.	2 h	3%
7	11a		 (1 eq.)	DCM	r.t.	2 h	85%
8	11a		 (1 eq.)	DCM	r.t.	30 min	95%

Tableau 1 : Optimisation des conditions de la réaction d’addition d’amines sur les iminosydnonnes activées.
^a Réaction sans NEt₃.

Nous pouvons tout d’abord constater le manque de réactivité des iminosydnonnes-carbonyl-imidazoles vis-à-vis de l’addition de nucléophiles (Entrées 1–4). Même en augmentant le nombre d’équivalents d’amines (Entrées 1–2) ou en chauffant la réaction (Entrées 3–4),

l'iminosydnone **10a** ne réagit pas. Il est uniquement possible d'obtenir les urées désirées en utilisant les amines en tant que solvant (100 équivalents). Dans ce cas le produit est isolé avec de faibles rendements (18% et 3%), dus à une forte dégradation (Entrées 5-6).

En revanche, l'iminosydnone-carbonyl-imidazolium **11a** se montre très réactive face à la *n*-butylamine ainsi que la morpholine puisqu'avec uniquement un équivalent d'amine, il est possible d'obtenir les urées correspondantes en peu de temps avec des rendements élevés (Entrées 7-8). Cette excellente réactivité implique que le produit ne doit pas être mis en solution dans un solvant nucléophile. En effet, les analyses LC/MS et RMN montrent une conversion instantanée et totale en méthyl-carbamate correspondant lors d'utilisation du méthanol comme solvant.

Dans les mêmes conditions, l'iminosydnone portant un PNB n'a pas montré de conversion après une nuit.

Nous choisirons donc les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums pour étudier leur réactivité face à différents nucléophiles, en commençant par les amines.

f. Etendue de la réaction entre les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums et les amines

Nous avons pu faire réagir les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums **11a-c** avec différentes amines (**Figure 70**). Les deux amines modèles utilisées réagissent également bien avec les iminosydnone portant un groupement aryl fonctionnalisé (**14a-f**), donnant les urées correspondantes avec des rendements allant de 75% à 95%. Nous avons pu introduire la N,O-diméthylhydroxylamine, et ainsi obtenir l'hydroxyurée correspondante **14g** avec un rendement de 78%. La réaction est également compatible avec des amines plus encombrées (**14h-i**). Il faut tout de même noter qu'avec l'adamantylamine, la réaction est plus lente, 16 heures, contre une réaction de l'ordre de l'heure pour les amines précédentes. Nous avons ensuite évalué la réactivité des anilines dans cette réaction. Il s'est avéré que la plus faible nucléophilie de ces dernières ralentit la réaction (24 h). Batey quant à lui avait observé qu'il était nécessaire de générer les amidures à l'aide d'une base forte pour obtenir les aryl-urées correspondantes.¹³⁹ Dans notre cas, nous conservons une réactivité correcte, d'autant plus qu'en chauffant la réaction dans du chloroforme, il est possible d'obtenir le produit désiré **14j** en seulement 10 minutes avec un rendement comparable. Ceci montre l'excellente réactivité des iminosydnone-carbonyl-imidazoliums face aux nucléophiles par rapport aux carbonyl-imidazoliums décrits précédemment.

Les produits **14a-c**, **14g-h**, issus de l'addition d'amines secondaires sont une vraie nouveauté dans la chimie des iminosydnone, puisqu'auparavant aucune iminosydnone-urée trisubstituée n'avait été synthétisée. Cela vient notamment du fait que les iminosydnone-urées sont issues de la réaction entre le sel d'iminosydnone et l'isocyanate correspondant, forcément monosubstitué.

Nous avons pu ensuite vérifier la compatibilité de la réaction avec des amines possédant des groupements plus sensibles comme un carbohydrate **14l** ou un ester boronique **14m**. Les urées correspondantes ont pu être isolées respectivement avec des rendements de 60% et 63%.

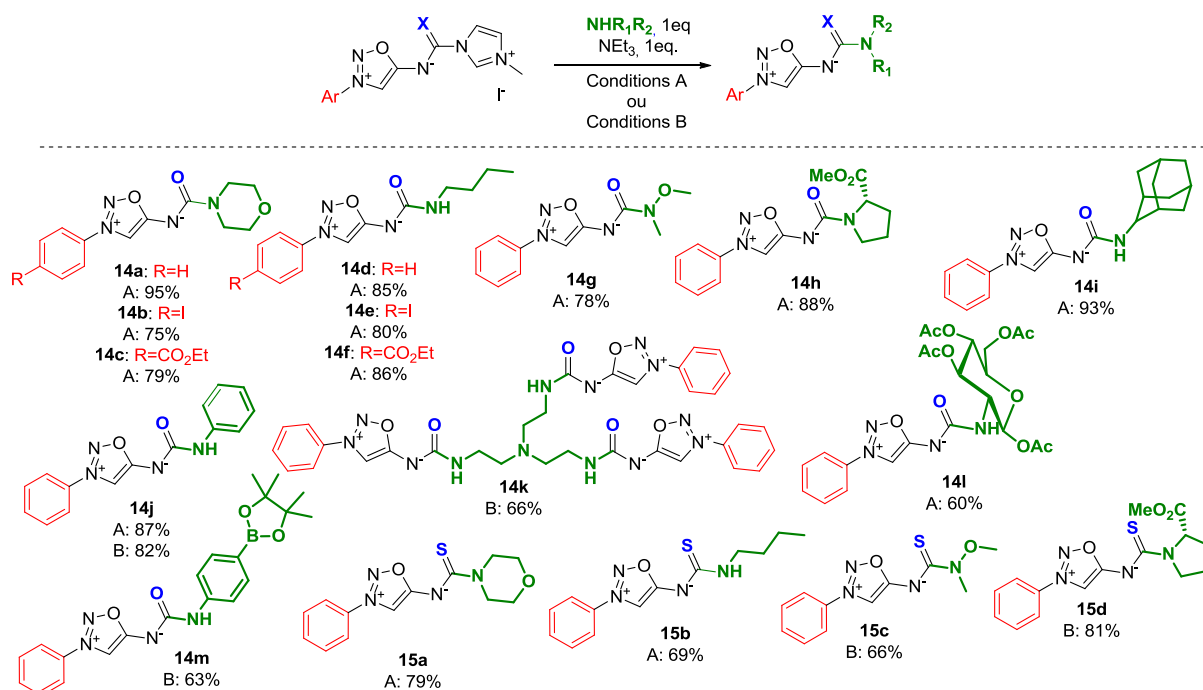


Figure 70 : Etendue de la réaction entre les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums et les amines ;
A : DCM, t.a. ; B : CHCl₃, reflux.

Nous avons également pu faire réagir la tris(2-aminoéthyl)amine afin d'obtenir la tris-iminosydnone **14k**. Lorsque la réaction est menée à température ambiante, on observe majoritairement le produit mono substitué mélangé aux produits di et trisubstitués. En revanche, en chauffant au reflux du chloroforme, le seul produit formé est la tris-iminosydnone qui peut ensuite être isolée avec un rendement de 66%. Ce produit est un exemple attrayant pour la conception de plateformes possédant plusieurs fonctions iminosydnones.

Enfin, nous avons évalué la réactivité d'amines avec l'iminosydnone-thiocarbonyl-imidazolium **13a**. Nous avons pu obtenir ainsi 4 thiourées (**15a-d**) avec d'assez bons rendements. Nous pouvons noter que cette iminosydnone est moins activée que **11a**. En effet, il a fallu plus de 10 heures de réaction pour consommer entièrement le produit de départ à température ambiante pour obtenir **15a** et **15b** contre entre 30 minutes et 2 heures pour leurs analogues oxygénés. Toutefois, nous avons par cette méthode à nouveau accès à des produits dont aucune voie de synthèse n'avait été décrite jusque-là.

La grande réactivité des iminosydnones activées par un carbonyl-imidazolium face à des amines, parfois désactivées, nous a fortement incités à utiliser d'autres espèces nucléophiles connues pour réagir avec des carbonyles activés par un imidazolium.

g. *Etendue de la réaction entre les iminosydnones-carbonyl-imidazoliums et les alcools et thiols*

Les autres nucléophiles modèles que nous avons étudiés dans cette réaction sont les alcools et les thiols, moins nucléophiles que les amines. Lors d'une courte optimisation, nous observons que la réaction entre l'iminosydnone **11a** le *n*-butane-thiol à température ambiante n'atteint que 45% de conversion après 3 jours. L'emploi de températures plus élevées dans le chloroforme s'est révélé bénéfique à la réaction dont l'étendue est présentée dans le **Figure 71**.

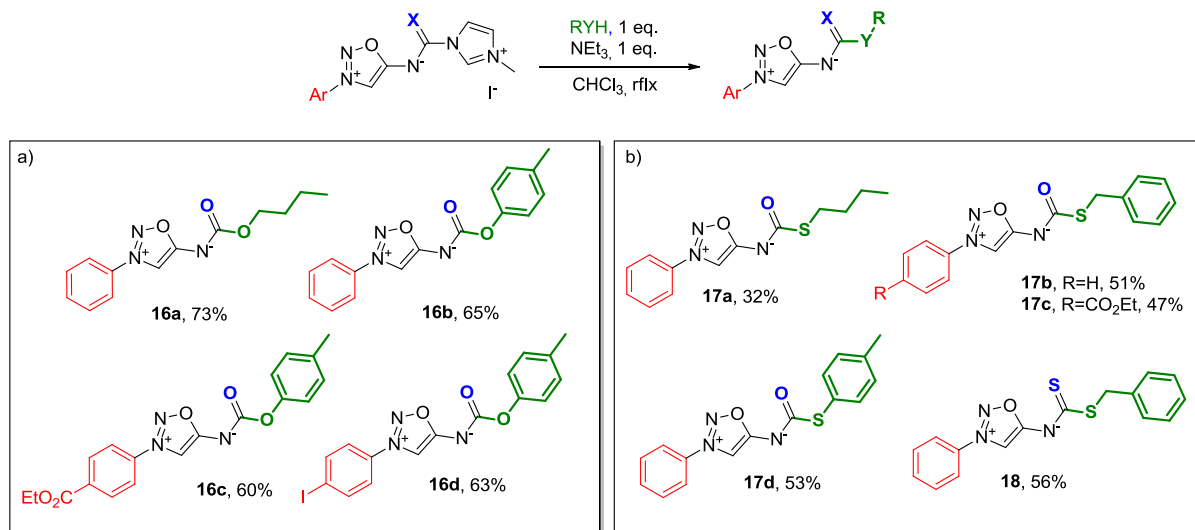


Figure 71 : Etendue de la réaction entre les iminosydnones-carbonyl-imidazoliums et a) les alcools et b) les thiols.

Concernant l'utilisation des alcools, nous avons évalué en premier lieu un alcool primaire alkylique donnant le carbamate correspondant avec un rendement de 73% (**16a**). Le crésol s'est trouvé être un substrat intéressant réagissant avec nos trois iminosydnones-carbonyl-imidazoliums (**16b-d**) plus rapidement que le butanol, c'est-à-dire en 30 minutes contre 4h pour **16a**. Les produits sont obtenus avec des rendements compris entre 60 et 65%.

Pour ce qui est des thiols, la réaction perd en efficacité. On n'obtient tout de même de meilleurs rendements qu'avec le butane-thiol utilisé pour explorer les conditions réactionnelles. L'emploi du benzyl mercaptan permet d'obtenir deux S-thiocarbamates **17b-c**, ainsi qu'un dithiocarbamate **18**. Le thiocrésol donne accès au tolyl S-thiocarbamate **17d** avec un rendement de 53%. Ce produit s'est en revanche montré instable après purification, les deux formes S-thiocarbamate et O-thiocarbamate étant en équilibre (**Figure 72**).

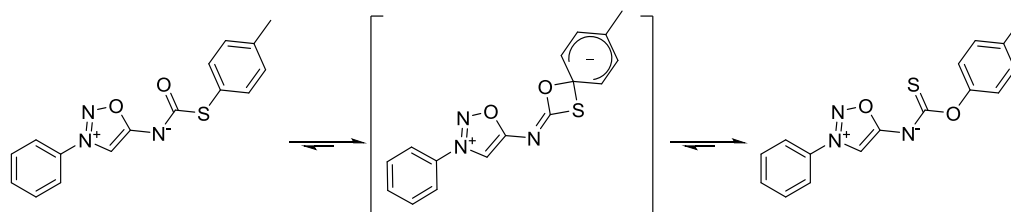


Figure 72 : Equilibre entre S-aryl-thiocarbamates et O-aryl-thiocarbamates.

Enfin, nous avons pu obtenir le dithiocarbamate, portant deux atomes de soufre par action du benzyl mercaptan sur l'iminosydnone **13a**. Le produit **18** est ainsi obtenu avec un rendement de 56%. La formation d'iminosydnones-thiocarbamates ou dithiocarbamates n'a jamais été décrite auparavant. Notre méthode permet ainsi non seulement un accès aux urées et carbamates plus direct que par

l'addition de l'iminosydnone sur des électrophiles, mais elle donne également accès à des iminosydnones portant de nouvelles fonctionnalités sur l'azote exocyclique.

h. Compétition dans l'addition de différents nucléophiles sur l'iminosydnone-carbonyl-imidazolium

Lors de l'étude de l'étendue de la réaction d'addition des nucléophiles sur les iminosydnones-carbonyl-imidazoliums, nous avons été témoins de différences cinétique pour la réactivité des différentes fonctions.

Nous pouvons de cette manière établir un ordre de réactivité (**Figure 73**).

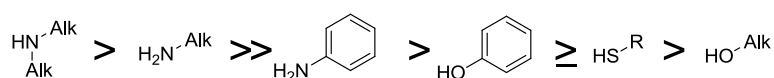


Figure 73 : Ordre de réactivité des différents nucléophiles employés.

Nous observons ainsi que les amines sont les nucléophiles les plus réactifs, avec tout d'abord les dialkylamines, puis amines monosubstituées par un alkyl et enfin les anilines beaucoup moins réactives. La famille des phénols est ensuite la classe la plus réactive, probablement à cause de leur plus grande acidité par rapport aux alcools. Ils restent tout de même d'un ordre de réactivité équivalent à celui des dérivés soufrés, généralement bons nucléophiles. Ces observations ne concordent pas avec l'ordre de réactivité énoncé par Batey en 2003 (**Figure 74**),¹³⁸ montrant la particularité des iminosydnones-carbonyl-imidazoliums en comparaison des autres carbonyl imidazoliums précédemment décrits.

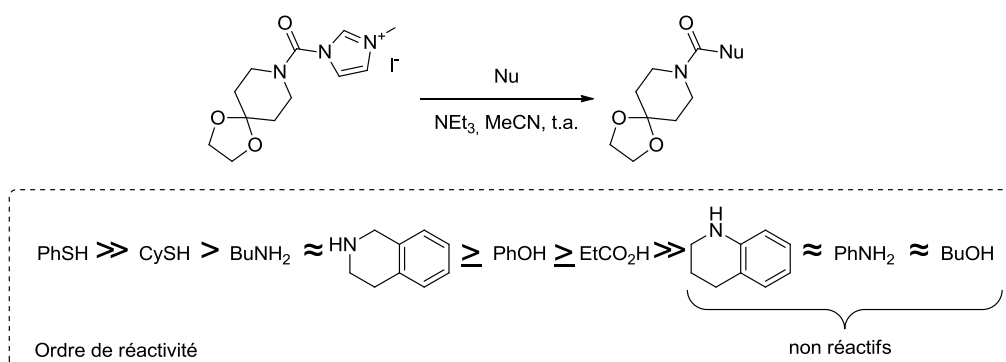


Figure 74 : Ordre de réactivité de différents nucléophiles avec les carbonyl imidazoliums selon Batey.

Afin d'exploiter ces différences de réactivité, nous avons mis en présence de l'iminosydnone **4a** un équivalent de divers composés possédant plusieurs fonctions nucléophiles (**Figure 75**).

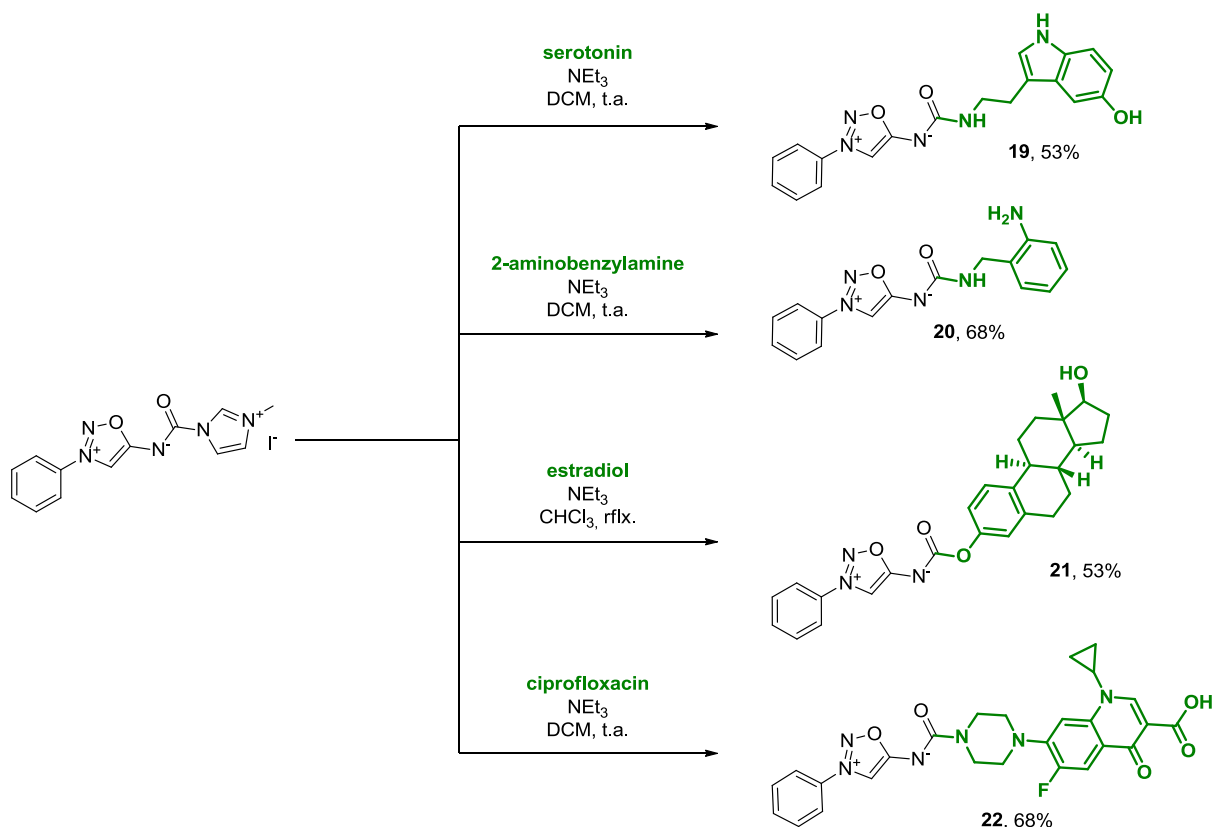


Figure 75 : Utilisation de composés portant plusieurs fonctions nucléophiles.

Nous avons tout d'abord utilisé la sérotonine, un neurotransmetteur possédant à la fois une amine, un indole et un phénol. Nous avons utilisé le même protocole que pour la formation des autres urées dans ce cas. A l'issue de la réaction nous avons pu isoler le produit majoritaire urée **19** avec un rendement de 53%. Une petite quantité de sérotonine-urée-carbamate portant deux iminosydnones a également pu être détectée sans être isolée.

Il est également possible de discriminer une alkylamine d'une aniline. Cela a été montré par l'utilisation de 2-aminobenzylamine. L'alkyl-urée **20** a ainsi pu être isolée avec un rendement de 68%. Une analyse RMN 2D (COSY, HSQC) ont permis d'établir la régiosélectivité de la réaction.

La sélectivité de réaction entre alcools et phénols a pu se faire sur l'estradiol. Le carbamate issu de l'addition du phénol **21** a été obtenu avec 53% de rendement. Par ailleurs ce produit est également intéressant en tant que dérivé d'un produit biologiquement actif, accessible en 1 étape sans protection préalable des alcools. Nous avons pu vérifier la sélectivité de la réaction en synthétisant le produit **21** (**Figure 76**) à partir de l'estradiol acétate suivie d'une saponification.

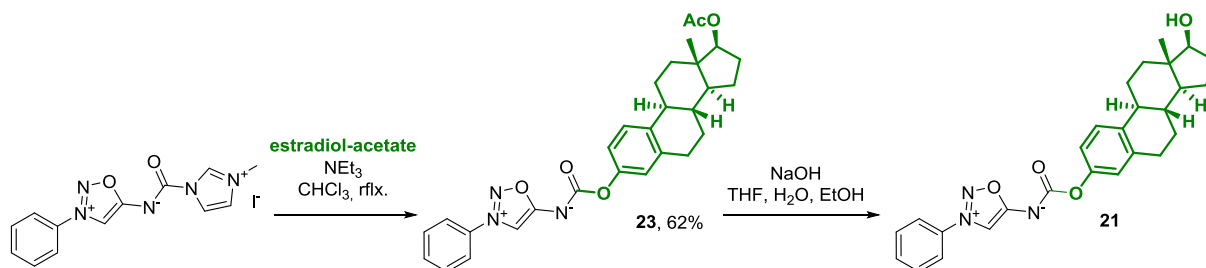


Figure 76 : Synthèse du composé **21** via l'estradiol acétylé.

Enfin, nous avons employé la ciprofloxacine, un antibiotique portant une pipéridine ainsi qu'une fonction acide carboxylique. Il a été montré que les dérivés carbonyl-imidazolium pouvaient réagir

avec les acides carboxyliques pour donner les amides correspondants (**Figure 77**).¹³⁸ Dans le cas de la réaction des iminosydnones avec la ciprofloxacine, nous n'avons observé aucune réaction avec l'acide carboxylique et avons obtenu exclusivement l'urée **22** avec un rendement de 68%.

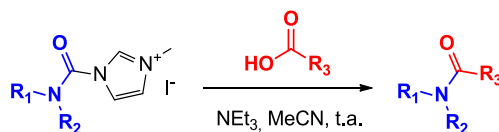


Figure 77 : Formation des amides tertiaires en utilisant des carbonyl imidazoliums.

Nous avons pu explorer la réactivité des iminosydnones-carbonyl-imidazoliums avec la plupart des nucléophiles généralement employés et connus pour réagir avec les carbamoyls imidazoliums. Nous avons ensuite souhaité étudier la réactivité d'autres fonctions moins communément utilisées dans ce cadre.

i. Réactivité d'autres nucléophiles avec les iminosydnones-carbonyl-imidazoliums

A notre connaissance, il n'existe qu'un seul report par Tomkinson¹⁴⁸ utilisant d'autres nucléophiles que ceux précédemment cités avec les carbamoylimidazoliums. Dans ce cas les auteurs utilisent une hydroxylamine protégée (**Figure 78**).

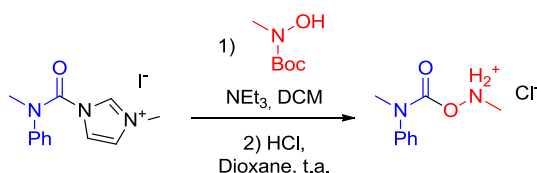


Figure 78 : Réaction d'un carbamoyl imidazolium avec une hydroxylamine.

Nous avons tout d'abord envisagé l'utilisation d'hydrazines, substituées ou bien par un phényl ou alors par un benzyl (**Figure 79**).

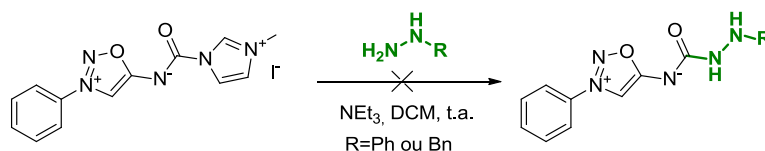


Figure 79 : Réaction entre l'iminosydnone **11a** et les hydrazines.

Dans aucun des cas nous n'avons observé le produit attendu. Dans le cas de la phénylhydrazine, la disparition du produit de départ est lente et on peut observer l'apparition de nombreux nouveaux produits. En revanche, la benzylhydrazine donne un produit unique de même masse molaire que le produit désiré mais ne présentant pas de signaux analytiques caractéristiques du noyau iminosydnone. Notre hypothèse est que le second azote de l'hydrazine pourrait réagir avec la fonction "imine" de l'iminosydnone menant à l'ouverture du cycle et à la formation d'un nouvel hétérocycle (**Figure 80**). Les données analytiques RMN (¹H, ¹³C et 2D) et de masse (masse moléculaire et fragmentation) pourraient correspondre au produit décrit en **Figure 80**. Plusieurs essais de cristallisation du composé ont été infructueuses.

¹⁴⁸ A. Hall, E. P. Huguet, K. L. Jones, T. C. Jones, N. M. Killeen, S. C. Yau, N. C. O. Tomkinson, *Synlett* **2007**, 2, 293–297.

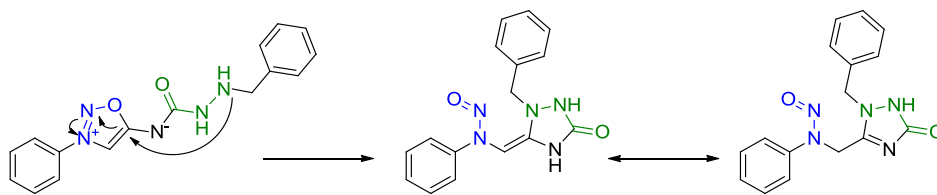


Figure 80 : Mécanisme postulé pour le réarrangement suivant l'addition d'hydrazines sur les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums.

Pour valider cette hypothèse, nous avons fait réagir une hydrazine, dont le second azote est moins nucléophile, avec l'iminosydnone **11a** (Figure 81).

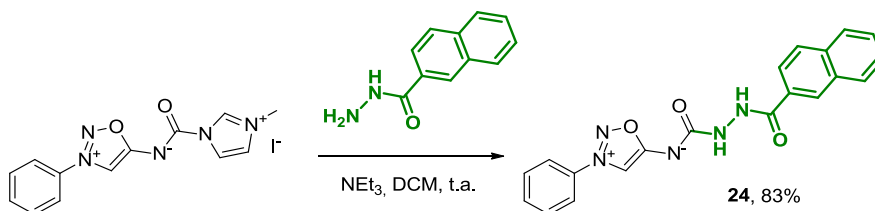


Figure 81 : Réaction entre l'iminosydnone 4a et la naphthyl hydrazine.

Le produit désiré **24** est isolé avec un rendement de 83%. Aucun autre produit n'est observé lors de cette réaction, ce qui consolide notre hypothèse concernant le produit de réaction obtenu avec l'hydrazine.

A l'image des hydrazines, nous avons également engagé une hydroxylamine dans la réaction avec l'iminosydnone **11a** (Figure 82).

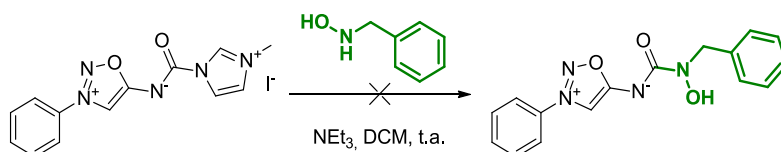


Figure 82 : Réaction entre l'iminosydnone **11a** et la N-benzylhydroxylamine.

Tout comme pour la benzylhydrazine, on n'observe un nouveau produit qui ne possède pas le cœur iminosydnone. D'après les données analytiques, nous pouvons conjecturer un produit semblable à celui obtenu avec les hydrazines (Figure 83).

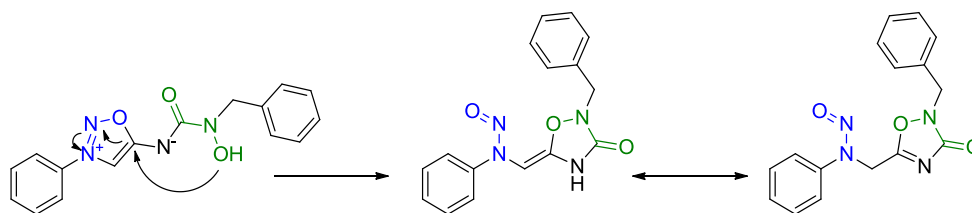


Figure 83 : Mécanisme postulé pour le réarrangement suivant l'addition d'hydroxylamines sur les iminosydnone-carbonyl-imidazoliums.

Pour compléter l'exploration de nucléophiles possédant un enchainement d'hétéroatomes, nous avons mis en présence de l'iminosydnone-carbonyl-imidazolium **11a** la benzaldoxime. Nous pouvons isoler le produit désiré **25** avec un rendement de 66% (Figure 84).

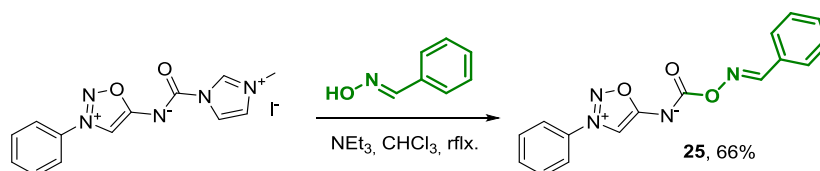


Figure 84 : Réaction entre l'iminosydnone 4a et la benzaldoxime.

Dans ce cas, nous avons également réussi à confirmer la structure du produit par diffraction des rayons X (**Figure 85**).

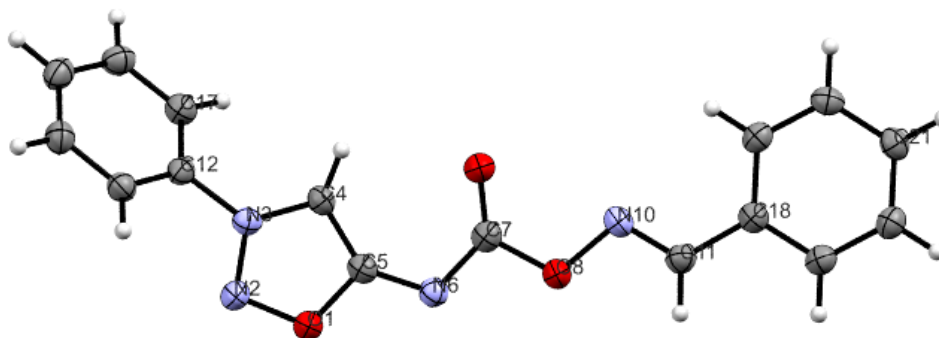


Figure 85 : Structure cristallographique de l'iminosydnone 25.

Cette structure nous indique notamment que la configuration E autour de la liaison C=N a été conservée. On remarque que la structure est plane de N₃ à C₂₀ tandis que le cycle benzénique C₁₂₋₁₇ est hors du plan avec un angle de 50,2 °.

Nous avons développé une méthode divergente pour la fonctionnalisation *N*-exocyclique des iminosydnone se basant sur les dérivés iminosydnone-(thio)carbonyl-imidazoliums. Ces produits ont la capacité de réagir avec une grande variété de nucléophiles, ce qui nous a permis d'élargir la diversité des fonctionnalités greffables en position N₆. En outre, cette méthodologie s'est révélée non seulement efficace, mais également douce et compatible avec des fonctions sensibles. Ainsi nous avons pu synthétiser des composés dont l'accès n'est pas envisageable *via* la stratégie originelle utilisant des électrophiles.

Après avoir largement exploré la dérivatisation des iminosydnone en position exocyclique, nous nous sommes tournés vers la fonctionnalisation de l'aryle en position N₃.

C. Fonctionnalisation de l'aryl en position N₃

L'iminosydnone portant un iode en position *para* de l'aromatique est le substrat possédant la plus grande versatilité pour introduire de nouveaux substituants. Nous avons choisi le dérivé **7c** dont l'azote N₆ est protégé par un groupement Boc pour explorer la faisabilité des diverses réactions étudiées.

Une méthode de choix pour introduire de nouveaux substituants sur un aryl-iodé est l'utilisation de couplages pallado-catalysés, largement utilisés pour la création de liaisons C–C.¹⁴⁹

1. Les iminosydnones en tant que substrats dans les réactions pallado-catalysées

Au commencement de cette étude, nous avons quelques incertitudes concernant les iminosydnones et leur possible capacité à chélater et empoisonner le catalyseur.

En effet, en 2014 le groupe de Schmidt a démontré que les sydnones, dont la structure est fortement apparentée à celle des iminosydnones, pouvaient être considérées comme des carbènes N-hétérocycliques anormaux.¹⁵⁰ Dans cette étude, ils utilisent les sydnones comme ligands du palladium pour réaliser des couplages de Suzuki.

En 2017, le même groupe mène une étude similaire sur les iminosydnones.¹⁵¹ Ils préparent l'anion de l'iminosydnone puis l'utilisent comme ligand du palladium. Ils utilisent ensuite le complexe formé pour catalyser des couplages de Suzuki.

Enfin, le groupe de Kalinin est parvenu à synthétiser des iminosydnones portant un phosphore en position C₄.¹⁵² De tels composés sont capables de former des complexes avec le palladium sous forme de métallacycles à cinq chaînons. Les structures cristallines des complexes indiquent une grande participation de l'azote N₆ dans la coordination du métal, ce qui n'était pas le cas de l'oxygène exocyclique des sydnones.¹⁵³

Nous avons été agréablement surpris en constatant que malgré ces différents exemples prédisant un éventuel empoisonnement du catalyseur par nos substrats, il nous était possible d'impliquer les iminosydnones dans de multiples réactions pallado-catalysées.

¹⁴⁹ C. C. C. Johansson Seechurn, M. O. Kitching, T. J. Colacot, V. Snieckus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5062–5085.

¹⁵⁰ S. Wiechmann, T. Freese, M. H. H. Drafs, E. G. Hübner, J. C. Namyslo, M. Nieger, A. Schmidt, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11822–11824.

¹⁵¹ T. Freese, A.-L. Lücke, C. A. S. Schmidt, M. Polamo, M. Nieger, J. C. Namyslo, A. Schmidt, *Tetrahedron* **2017**, *73*, 5350–5357.

¹⁵² V. N. Kalinin, S. N. Lebedev, I. A. Cherepanov, I. A. Godovikov, K. A. Lyssenko, E. Hey-Hawkins, *Polyhedron* **2009**, *28*, 2411–2417.

¹⁵³ a) S.-T. Lin, H.-S. Cheo, L.-S. Liu, J.-C. Wang, *Organometallics* **1997**, *16*, 1803–1805 ; b) S.-T. Lin, H.-S. Choe, L.-S. Liu, J.-C. Wang, *J. Organomet. Chem.* **2000**, *610*, 1–7.

a. Les couplages de Suzuki-Miyaura et Stille

Le couplage entre un dérivé d'acide boronique et un dérivé halogéné catalysé au palladium *i.e.* le couplage de Suzuki-Miyaura, est une méthode de choix pour la création de liaisons C–C. Nous avons pu tester cette réaction sur la 4-(*p*-iodophényl)-6-Boc-iminosydnone **7c** avec différentes espèces (Figure 86).

Nous avons de cette manière pu obtenir le composé bi-arylé **26a** avec un rendement de 51%. Dans ce cas nous avons utilisé un acide boronique et une espèce de Pd⁰ dans le DMF. Il a également été possible d'obtenir l'aldéhyde α - β -insaturé **26b** avec un excellent rendement de 96%. Pour cela, nous partons du pinacol borane-acétal. L'iminosydnone-acétal formée est ensuite hydrolysée lors d'un court traitement de la réaction en milieu acide avant d'être isolée par colonne de chromatographie. L'isolation de l'acétal donne un rendement moindre, par ailleurs ce produit montre une stabilité relativement faible pendant la purification et ne peut pas être conservé durant une grande période sans se dégrader.

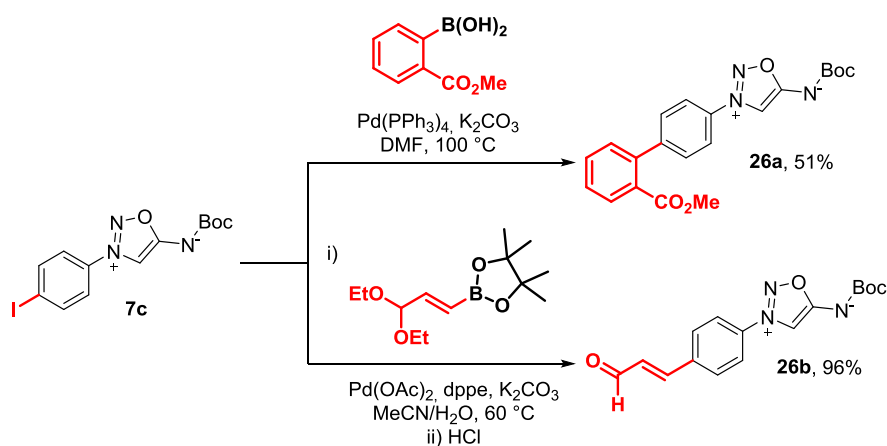


Figure 86 : Utilisation des iminosydnone dans les couplages de Suzuki-Miyaura.

Dans ce second cas, il faut noter que le couplage de Suzuki reste la meilleure alternative pour l'obtention de ce substrat. En effet, nous avons originellement opté pour un couplage de Heck, l'acroléine étant un substrat peu coûteux. L'acroléine n'est pas utilisée en tant que telle dans les couplages de type Heck puisque les carbonyles α - β -insaturés polymérisent dans ces conditions.¹⁵⁴ Nous avons donc utilisé l'acroléine diéthyl acétal pour la fonctionnalisation de l'iminosydnone, malheureusement les conditions classiques utilisées pour le couplage de Heck mènent au produit ester éthylique **26c** issu de la β -H élimination de l'hydrogène au pied de l'acétal (Figure 87). Ce type de comportement avait déjà été décrit. Nous avons utilisé les conditions décrites par Cacchi, menant majoritairement à la formation de l'acétal.¹⁵⁵ Dans notre cas, nous n'avons pu isoler que 7% du produit désiré **26d**, rendant l'utilisation de couplage dont le mécanisme ne repose pas sur une β -H élimination inévitable (Figure 87).

¹⁵⁴ T. C. Zebovitz, R. F. Heck, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3907–3909.

¹⁵⁵ G. Battistuzzi, S. Cacchi, G. Fabrizi, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 777–780.

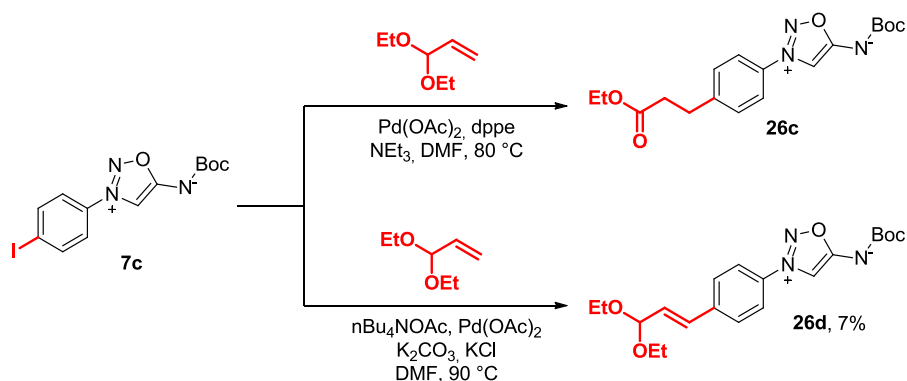


Figure 87 : Couplage de Heck entre **7c** et l'acroléine diéthyl acétal.

Le couplage de Stille, entre un dérivé stannylé et un halogéno aryl est également une méthode de choix pour la formation de liaisons C–C. Malgré la toxicité des dérivés d'étain, cette réaction reste populaire étant donné la formidable variété d'organostannanes utilisables.

Ici nous avons pu greffer un vinyl à l'iminosydnone **26e** avec rendement de 82% (**Figure 88**). Ce groupement peut être ensuite utilisé pour des post-fonctionnalisations.

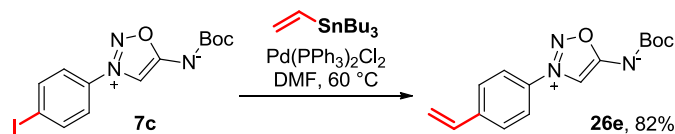


Figure 88 : Couplage de Stille avec l'iminosydnone **7c**.

2. Utilisation de couplage de Sonogashira

Nous avons de même pu greffer des substituants de types acétyléniques en utilisant un couplage de Sonogashira (**Figure 89**). Nous avons ainsi engagé le phénylacétylène et le 4-éthynylanisole dans cette réaction pour obtenir les iminosydrones désirées **26f** et **26g** avec des rendements respectifs de 67 et 96%.

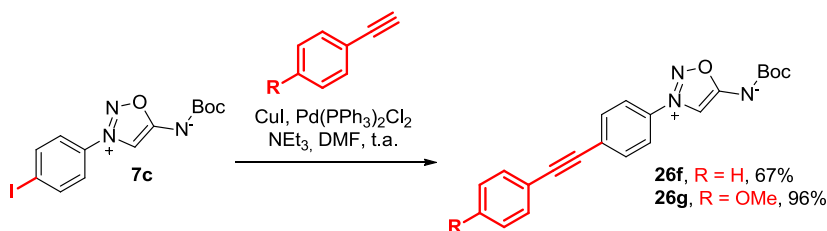


Figure 89 : Couplages de Sonogashira avec l'iminosydnone **7c**.

Nous avons ainsi eu accès à de nouveaux substrats qui nous serviront pour l'étude de la réactivité des iminosydrones.

3. Carbonylation des iminosydnones

La cyclisation des iminosydnones s'est montrée incompatible avec la présence de groupements électroattracteurs sur l'aryl en position N₃ (cf. Partie I-I-A-Synthèse des sels de 3-aryl-iminosydnones). Un groupement acyle, tel un ester ne peut être obtenu qu'après la cyclisation du mésoionique. Le composé iodé est à nouveau un substrat de choix pour réaliser cette transformation à l'aide d'une carboalkoxylation catalysée au palladium.¹⁵⁶

Nous avons appliqué les conditions de carboalkoxylation utilisées les groupes de Romieu et Ziesel pour la fonctionnalisation de leurs sondes fluorescentes BODIPY.¹⁵⁷ Ainsi nous avons mis en présence de l'iminosydnone **7c** un catalyseur au palladium dans un mélange équimolaire d'éthanol et de triéthylamine sous bullage de monoxyde de carbone (**Figure 90**). L'éthanol joue ici le rôle de nucléophile qui va attaquer le complexe palladique après insertion du carbonyle pour libérer le produit désiré. On obtient de cette manière l'iminosydnone-ester **26h** avec un rendement de 71%.

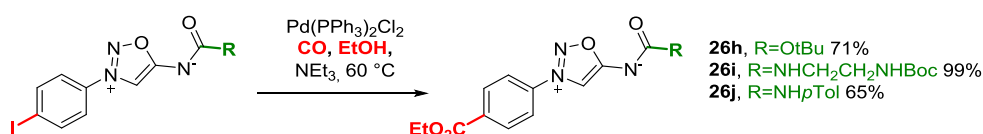


Figure 90 : Carbonylation des 4-(p-iodophenyl)-iminosydnones.

Après le succès de la réaction sur ce substrat, nous l'avons étendue à deux autres iminosydnones possédant d'autres substituants en position 6, comme des urées, des substrats qui représentent un défi supplémentaire étant donné leurs meilleures qualités de ligands du Pd. De cette façon nous avons obtenu sans difficulté les iminosydnones-urées **26i** et **26j** avec des rendements respectifs de 99 et 65%.

La carbonylation des iminosydnones devient ainsi une méthode de choix pour introduire un groupement électroattracteur sur le noyau aromatique de la position N₃ des iminosydnones ; de tels groupements ne pouvant être introduits que post-cyclisation.

Le produit **26h** peut ensuite être fonctionnalisé autrement en position 6 après déprotection du groupement Boc par de l'acide trifluoroacétique qui donne le sel d'iminosydnone, puis réaction avec un électrophile, tel qu'un isocyanate (**Figure 91**). Nous obtenons ainsi le composé **26j** avec un bon rendement, malgré tout, la synthèse de ce produit est plus efficace en fonctionnalisant d'abord la position 6 (**Figure 90**)

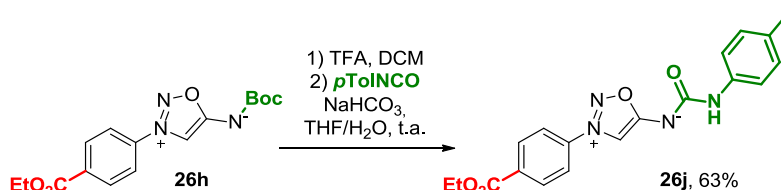


Figure 91 : Déprotection du groupement Boc et post-fonctionnalisation de l'azote N₆.

Nous pouvons ainsi constater que la non-formation des sels d'iminosydnones possédant un groupement électroattracteur sur l'aryl provient de la faible réactivité des nitrosamines correspondantes et non d'un problème de stabilité de ces sels puisque l'on parvient à les obtenir par une voie différente.

¹⁵⁶ A. Schoenberg, I. Bartoletti, R. F. Heck, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 3318–3326.

¹⁵⁷ S. Niu, C. Massif, G. Ulrich, P.-Y. Renard, A. Romieu, R. Ziesel, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7229–7242.

4. Autres réactions compatibles

Après une première fonctionnalisation des iminosydnones iodées à l'aide d'un couplage pallado-catalysé, les produits formés peuvent nécessiter d'autres étapes pour obtenir des substrats exploitables.

Par exemple, les dérivés esters **26h-j** sont des produits intéressants pour l'accroche de divers substituants aminés par couplage peptidique. Mais cela implique une première étape de saponification afin d'obtenir le dérivé acide correspondant.

Les iminosydnones se sont montrées très sensibles aux différentes conditions basiques de saponification utilisées. Même avec un substituant sur l'azote N₆ bloquant l'ouverture du cycle, les produits testés ont manifesté une tendance poussée à la dégradation.

Néanmoins après une importante optimisation, nous avons montré que l'utilisation d'hydroxyde de sodium en quantité modérée (5 équivalents) dans un mélange ternaire de solvants (eau, THF et éthanol) permettait d'obtenir les acides carboxyliques correspondant (**Figure 92**). Le temps de réaction est d'environ 2 heures et il est important d'arrêter la réaction dès sa complétion sous peine de dégrader le produit.

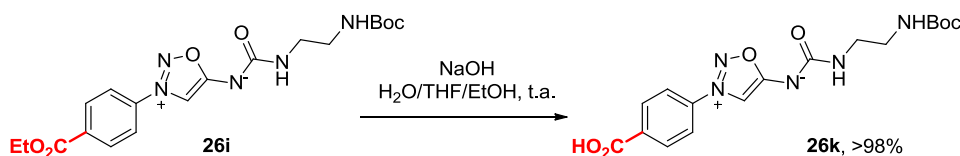


Figure 92 : Saponification des esters-iminosydnones.

Nous obtenons ainsi l'iminosydnone portant un acide carboxylique **26k** de manière quantitative. Il faut noter que la montée en échelle de cette réaction montre une érosion du rendement, probablement due à l'étape d'extraction que la mauvaise solubilité du produit rend délicate.

Nous avons également utilisé l'iminosydnone portant un groupement vinyl afin d'introduire une nouvelle fonction chimique. Nous avons par cette occasion réalisé une séquence de dihydroxylation avec le tétraoxyde d'osmium et la *N*-méthylmorpholine-*N*-oxide suivie d'une coupure oxydante réalisée avec le périodate de sodium pour obtenir l'aldéhyde **26l** avec un rendement de 23% (**Figure 93**).

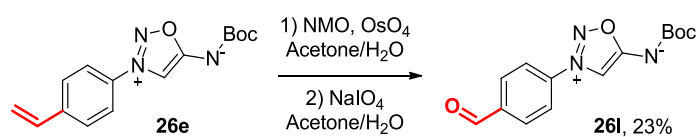


Figure 93 : Formation d'une iminosydnone portant un aldéhyde.

Nous avons souhaité connaître la compatibilité du squelette iminosydnone avec les conditions d'hydrogénation catalytique, largement utilisées en synthèse pour la réduction de composés ou pour le clivage de groupements protecteurs. Nous avons pour cela mis en présence une iminosydnone modèle **26k**, du palladium sur charbon et de l'hydrogène (**Figure 94**). Nous avons observé une forte dégradation du produit de départ. Nous reconfirmons ici l'incompatibilité de l'hydrogénation avec les iminosydnones déjà avancée par Daeniker et Druey.¹¹⁸

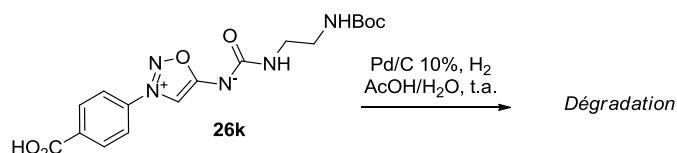


Figure 94 : Test d'hydrogénation sur une iminosydnone modèle.

Nous avons pu montrer que les couplages catalysés au palladium sont totalement compatibles avec le squelette iminosydnone et permettent une grande variété de fonctionnalisations de l'aryle en position 3. Les substrats obtenus par ces couplages pallado-catalysés ont pu ensuite être modifiés. Nous avons démontré qu'en optimisant les conditions réactionnelles, il était possible de réaliser des réactions de saponification sur ces produits. Les réactions de coupures oxydantes sont également compatibles mais peu efficaces. En revanche, les réactions d'hydrogénation sont à éviter.

Après avoir exploré la fonctionnalisation de l'iminosydnone sur sa position exocyclique ainsi que les conditions réactionnelles compatibles avec le squelette pour modifier la substitution de l'aryl en N₃, nous nous sommes intéressés à la dernière position substituable de ce mésoionique, soit le carbone C₄.

D. Fonctionnalisation des iminosydnones en position C₄

1. La fonctionnalisation des iminosydnones en position C₄ décrites dans la littérature

a. Halogénéation de la position C₄

La position 4 de l'iminosydnone porte une charge partielle négative. Ce caractère semi-cabanionique lui confère une nucléophilie qui lui permettant entre autres d'être aisément halogénée.

L'halogénéation des iminosydnones a été décrite dès la première publication décrivant ces mésoioniques par Ohta.¹⁰⁶ Les auteurs utilisent dans ce cas du dibrome sur la 3-phényl-6-acétyl-iminosydnone. Cette méthode a été reprise avec succès par Daeniker et Druey sur des iminosydnones-urées (**Figure 95**).¹¹⁸ Ils constatent en revanche que la bromation des sels d'iminosydnones ne fonctionne pas.

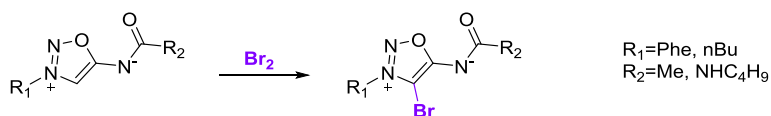


Figure 95 : Bromation des iminosydnones avec Br₂.

En 1973, Götz étudie plus en détail l'halogénéation des 3-amino-iminosydnones.¹⁵⁸ En ce qui concerne la bromation, il utilise le dibrome comme ses prédécesseurs, mais introduit également pour la première fois l'utilisation du *N*-bromosuccinimide (NBS) avec les iminosydnones (**Figure 96**) grâce auquel il obtient des rendements en iminosydnone bromée allant de 17 à 65%.

¹⁵⁸ M. Götz, K. Grozinger, J. T. Oliver, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 671–673.

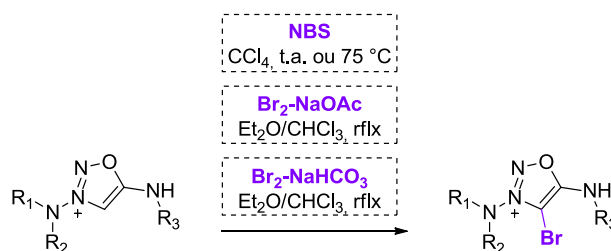


Figure 96 : Méthodes de bromation pour les 3-amino-iminosydnone utilisées par Götz.

En ce qui concerne l'introduction des autres halogènes Cl et I, il apparaît que contrairement au cas du brome, l'utilisation de Cl₂ et I₂ ne mène pas aux 4-halogénosydnone. En revanche, l'emploi des *N*-halogénosuccinimides correspondants permet l'obtention des 4-chloro et 4-iodo iminosydnone (**Figure 97**).

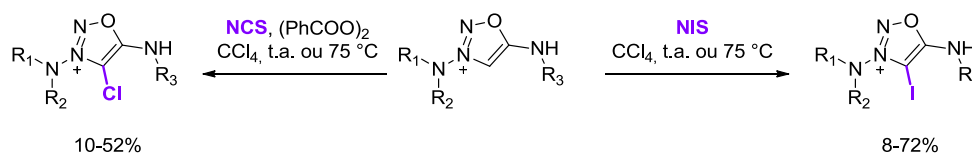


Figure 97 : Chloration et iodation des 3-amino-iminosydnone.

Il faut tout de même noter la nécessité d'ajouter du peroxyde de benzoyle dans le cas de la chloration.

Le groupe de Yashunskii a également souhaité explorer les limites de la bromation des iminosydnone d'après un résultat secondaire obtenu par Daeniker et Druey sur une iminosydnone-amide aromatique. Eu égard à ce résultat, en 1975 Yashunskii et ses collaborateurs ont engagé différentes iminosydnone-urées en réaction avec le dibrome (**Figure 98**).¹⁵⁹ Lorsque l'urée porte un groupement phényle, ils observent que la bromation de l'aromatique est préférée à celle de la position 4. Il est nécessaire d'utiliser 2 équivalents de Br₂ pour que la position 4 réagisse, montrant la baisse de la nucléophilie de l'aryl après la première bromation.

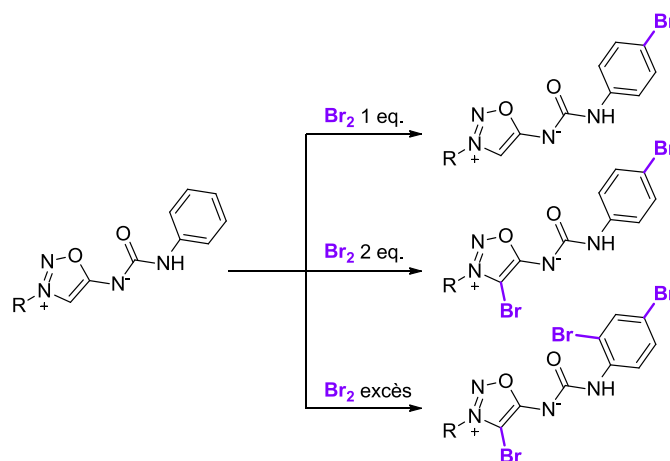


Figure 98 : Bromation des iminosydnone-urées aromatiques.

Plus récemment, Turnbull et Beal ont développé une méthodologie permettant à la fois la bromation, mais aussi la débromation des iminosydnone (**Figure 99**).¹⁶⁰

¹⁵⁹ Z. A. Olovyannishnikova, B. I. Bryantsev, I. S. Slyusarenko, V. G. Yashunskii, *Chem Heterocycl Compd* **1975**, *11*, 1041–1046.

¹⁶⁰ E. N. Beal, K. Turnbull, *Synthetic Commun.* **1992**, *22*, 1515–1522.

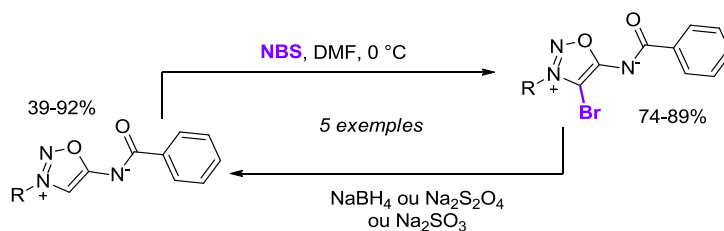


Figure 99 : Bromation et débromation des iminosydnone.

La bromation se réalise dans le DMF à 0 °C en présence de NBS ; ces conditions permettent d'obtenir le produit bromé avec de bons rendements, meilleurs que ceux décrits auparavant. En ce qui concerne la débromation, 3 conditions réactionnelles sont possibles. En présence de Na₂S₂O₄, les résultats ne sont pas reproductibles avec des rendements allant de 39 à 85%. En revanche les méthodes utilisant NaBH₄ ou Na₂SO₃ donnent des résultats de meilleure qualité avec des rendements systématiquement supérieurs à 80%.

Nous avons vu que le carbone C₄ des iminosydnone est suffisamment nucléophile pour être halogéné. La bromation est la réaction d'halogénéation la plus récurrente dans la littérature et qui semble être la plus accessible. Le brome peut même être considéré comme un groupement protecteur de cette position puisqu'il peut être clivé *a posteriori*. Cependant, les halogènes sont les seuls groupements que l'on peut introduire à cette position sur les iminosydnone telles quelles. La réaction avec d'autres électrophiles nécessite obligatoirement la déprotonation de cette position.

b. Déprotonation en C₄ et réaction avec des électrophiles

Cette stratégie reposant sur la déprotonation de la position C₄ suivie de la mise en présence d'un électrophile (**Figure 100**) est bien plus récente en comparaison de l'halogénéation des iminosydnone.

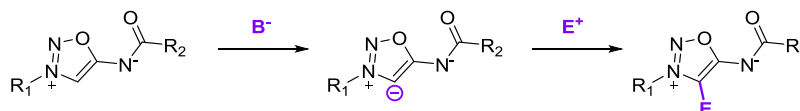


Figure 100 : Stratégie générale pour substituer la position C₄ par déprotonation et addition d'un électrophile.

Elle a vu le jour en 2000 dans un article de Cherepanov et Kalinin¹⁶¹ dans lequel ils utilisent le *n*-butyl-lithium pour déprotoner l'iminosydnone. Ils décrivent les carbonyles non énolisables comme étant les seuls électrophiles sur lesquels peuvent s'additionner les iminosydnone lithiées, dû à leur faible stabilité. Ils obtiennent entre autres les iminosydnone portant un alcool secondaire en position C₄ après réaction avec des dérivés du benzaldéhyde (**Figure 101**).

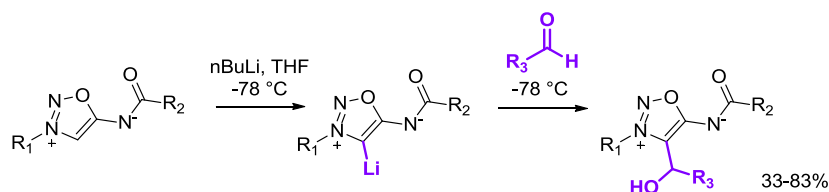


Figure 101 : Réaction des iminosydnone lithiées avec des aldéhydes.

¹⁶¹ I. A. Cherepanov, V. N. Kalinin, *Mendeleev Commun.* **2000**, *10*, 181–182.

Pour pallier l'instabilité des iminosydnones lithiées, les auteurs utilisent une réaction de *trans*-métallation avec le cuivre. Les cupro-iminosydnones résultantes sont stables dans le solvant même en chauffant à reflux. Elles sont également capables de réagir dans des couplages pallado-catalysés avec des dérivés halogénés (**Figure 102**). Néanmoins, les produits sont obtenus avec des rendements modestes.

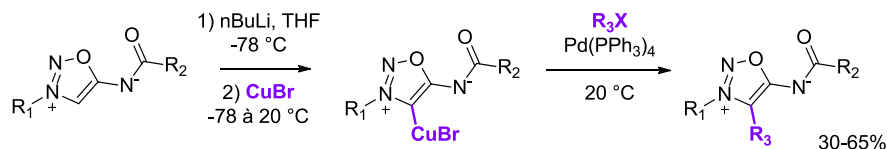


Figure 102 : Formation de cupro-iminosydnones, utilisation dans des couplages au palladium.

En 2009, Kalinin étend la fonctionnalisation des iminosydnones lithiées à d'autres électrophiles dans une série d'articles (**Figure 103**).

Le soufre moléculaire (S_8) est d'abord utilisé pour obtenir les 4-thio-iminosydnones.¹⁶² Il est possible d'obtenir un thiol ou un thioéther en traitant le thiolate de lithium intermédiaire soit par hydrolyse, soit avec un dérivé halogéné.

L'iminosydnone lithiée peut également être traitée avec la chlorodiphénylphosphine pour donner l'iminosydnone phosphorylée correspondante.¹⁵²

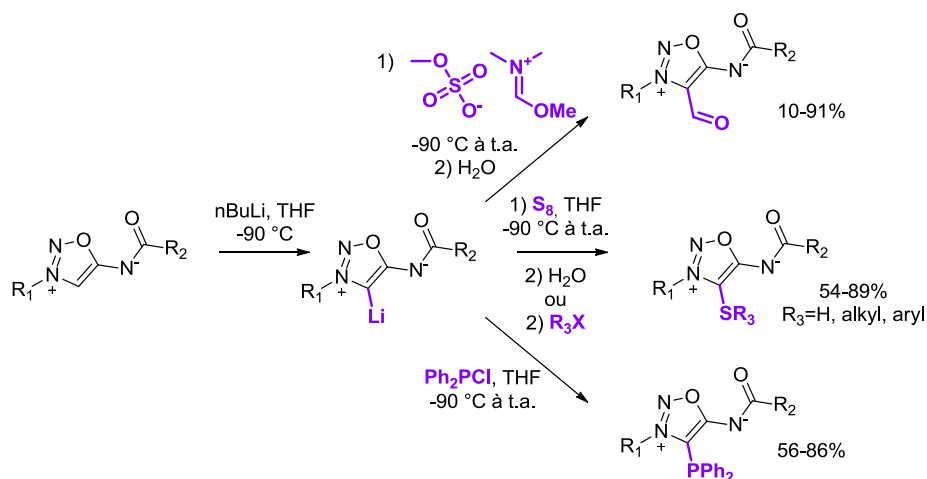


Figure 103 : Extension de la réactivité des iminosydnones lithiées à d'autres électrophiles.

Enfin, il est possible d'obtenir des 4-formyl-iminosydnones.¹²² L'obtention de ces produits est délicate : les auteurs rapportent l'échec de la réaction de Vilsmeier sur les iminosydnones ainsi que l'impossibilité d'utiliser le diméthylformamide comme agent de formylation avec les iminosydnones lithiées. Seule l'utilisation de (méthoxyméthylidène)diméthylammonium méthyl sulfate comme électrophile s'est montrée efficace. La réaction passe par la formation d'un hémiaminal qui est ensuite hydrolysé pour donner l'aldéhyde.

L'aldéhyde des 4-formyliminosydnones peut être ensuite utilisé pour la formation de nouveaux hétérocycles. Kalinin *et al.* synthétisent ainsi des thiopyranes portant une iminosydnone.¹⁶³

¹⁶² I. A. Cherepanov, S. N. Lebedev, A. S. Samarskaya, I. A. Godovikov, Y. V. Nelyubina, V. N. Kalinin, *Mendeleev Commun.* **2009**, *19*, 322–323.

¹⁶³ I. A. Cherepanov, E. D. Savin, N. G. Frolova, M. O. Shishkova, I. A. Godovikov, K. Y. Suponitsky, K. A. Lyssenko, V. N. Kalinin, *Mendeleev Commun.* **2009**, *19*, 320–321.

Le paramètre clé des réactions entre les iminosydnones et ces nouveaux électrophiles est la température. Dans ces nouveaux exemples, les auteurs réalisent la déprotonation des iminosydnones à $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ contre $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ auparavant. Ils justifient cette différence par la meilleure stabilité de l'iminosydnone lithiée dans ces conditions.

Très récemment, Schmidt et ses collaborateurs ont amélioré la formation des iminosydnones lithiées. Ils montrent qu'en utilisant le lithium bis(triméthylsilyl)amide (LiHMDS) dans le THF, il était possible de déprotoner les iminosydnones à température ambiante et que les iminosydnones lithiées correspondantes étaient stables en solution sous atmosphère inerte pendant plusieurs semaines.¹⁵¹

Les iminosydnones lithiées ainsi formées peuvent ensuite être piégées par différents électrophiles menant à de nouvelles espèces d'iminosydnones portant un sélénium, un atome d'or ou de palladium (**Figure 104**).

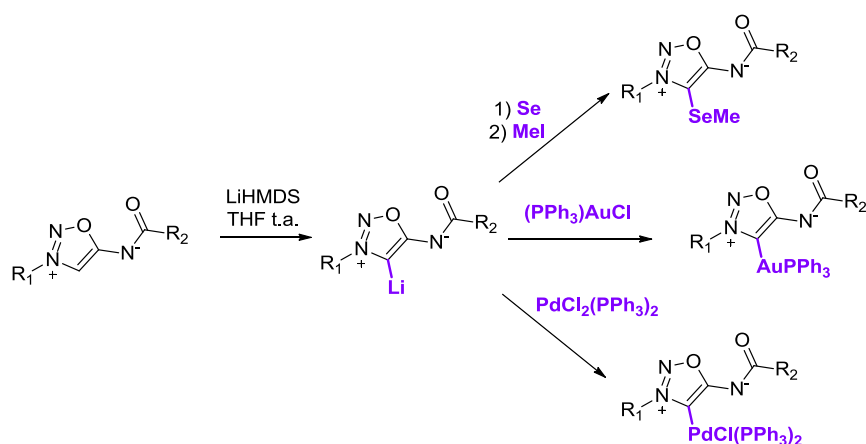


Figure 104 : Formation et dérivatisation des iminosydnones lithiées selon Schmidt.

Dans de nouveaux travaux les auteurs engagent les iminosydnones lithiées avec de nouveaux électrophiles de type isocyanates et isothiocyanates (**Figure 105**).¹⁶⁴

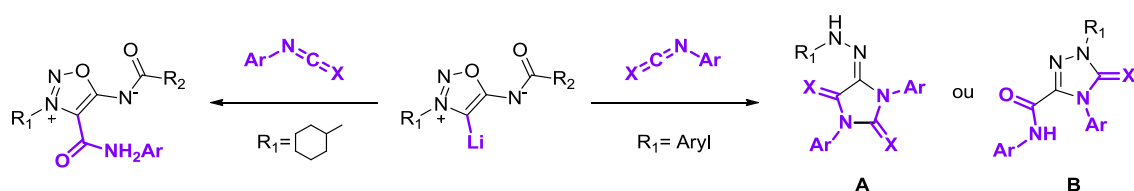


Figure 105 : Réaction entre les iminosydnones lithiées et les iso(thio)cyanates.

La réaction avec la 3-cyclohexyl-iminosydnone donne ainsi 3 différentes iminosydnones portant un amide ou un thioamide en position 4. En revanche la réaction à partir des 3-aryl-iminosydnones mène à une seconde addition sur l'isocyanate puis à un réarrangement qui donnent les produits A ou B porteurs d'un nouvel hétérocycle (**Figure 106**).

¹⁶⁴ T. Freese, A.-L. Lücke, J. C. Namyslo, M. Nieger, A. Schmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 1646–1654.

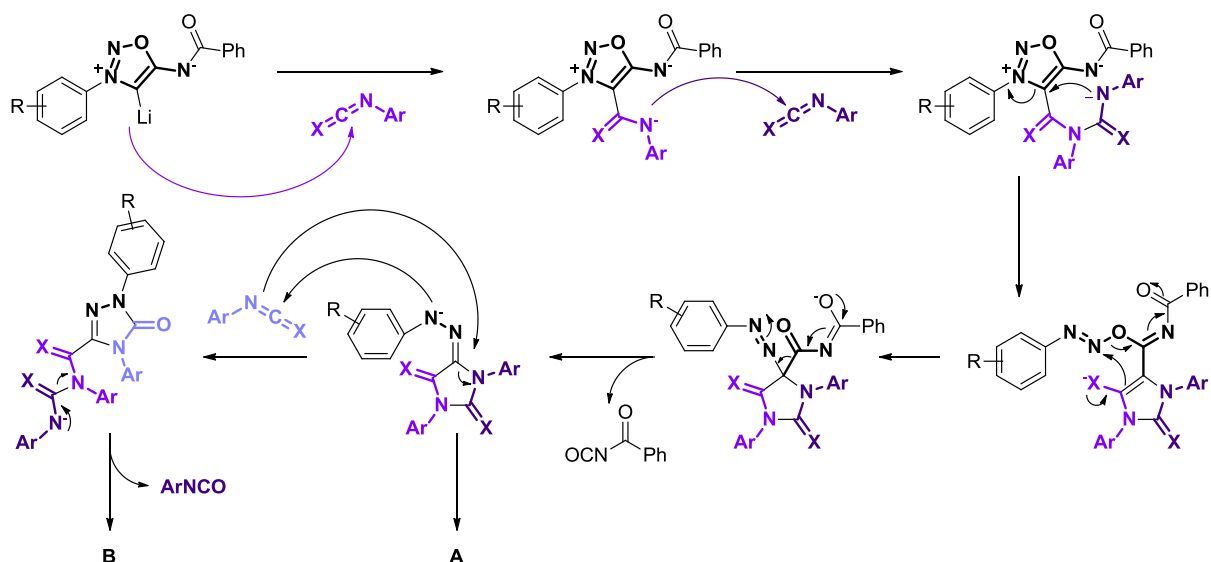


Figure 106 : Mécanisme proposé pour la formation de A et B.

Nous avons pu voir que la littérature propose deux méthodes générales de fonctionnalisation de la position 4 des iminosydnones. D'une part elles peuvent être halogénées ; l'introduction d'un brome en position 4 est de loin la réaction la plus décrite, la chloration et l'iodation ne sont qu'anecdotiques. Par ailleurs, les substrats obtenus ne sont jamais exploités. La deuxième classe de dérivatisation de cette position passe par la formation de l'iminosydnone anionique puis l'addition d'un électrophile. Cette méthode a été développée plus récemment que l'halogénéation, mais elle ne tolère pas une grande diversité fonctionnelle sur l'azote exocyclique.

2. Fonctionnalisation des iminosydnones en position C₄ des iminosydnones développées au laboratoire

a. Halogénéation des iminosydnones

La réaction d'halogénéation posant le moins de difficultés est la bromation. Nous avons utilisé pour cela le *N*-bromosuccinimide dans le dichlorométhane (**Figure 107**). Ces conditions sont à la fois douces, mais permettent un traitement moins fastidieux de la réaction contrairement aux conditions de Beal et Turnbull qui utilisent le DMF.¹⁶⁰

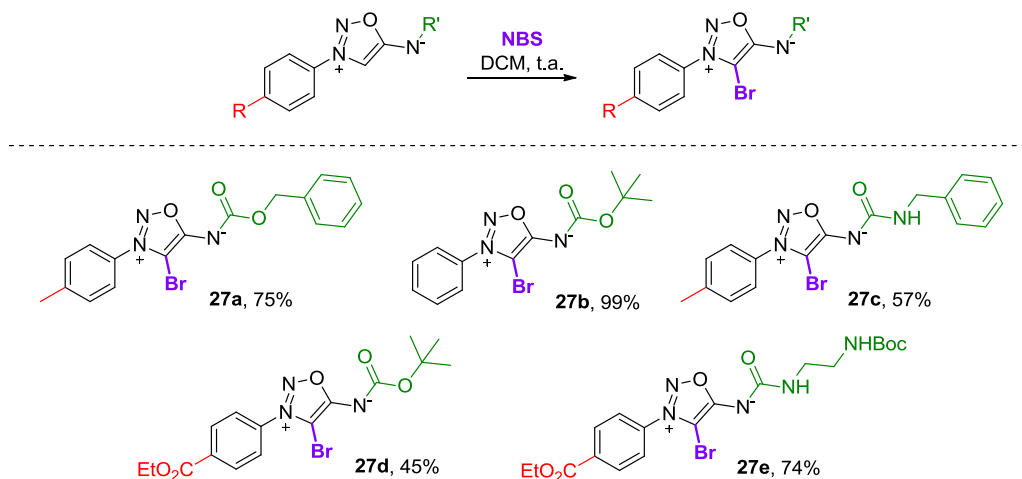


Figure 107 : Réaction entre les iminosydnones et le NBS.

Nous avons pu obtenir de cette manière 5 iminosydnones bromées **27a-e**. La réaction est compatible avec les iminosydnones portant des groupements esters (**27d-e**). L'azote exocyclique en revanche ne peut porter que des substituants aliphatiques. Nous avons remarqué que comme l'a décrit Yashunskij,¹⁵⁹ la présence d'un groupement aromatique sur l'urée exocyclique mène à la bromation de ce dernier (**Figure 108**).

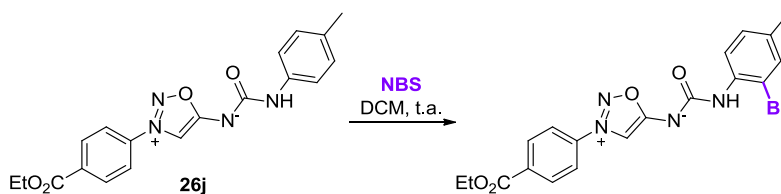


Figure 108 : Bromation des iminosydnones portant une urée aromatique.

Nous supposons donc que l'urée aromatique est plus nucléophile que le carbone C₄ du squelette iminosydnone.

Si l'on souhaite accéder à cette iminosydnone-urée aromatique bromée en position C₄, il est nécessaire de déprotéger l'iminosydnone **27d** puis de la faire réagir avec l'isocyanate correspondant. On obtient ainsi le produit **27f** avec un rendement de 32% sur deux étapes (**Figure 109**).



Figure 109 : Synthèse de l'iminosydnone **27f**.

Concernant l'iodation des iminosydrones, bien qu'elle soit décrite dans CCl_4 sur les 3-amino-iminosydrones, nous avons plutôt choisi d'utiliser le protocole développé par Turnbull pour l'iodation des 3-aryl-sydrones.¹⁶⁵ La réaction utilise le *N*-iodosuccinimide comme donneur d'iode et l'acide acétique comme solvant (**Figure 110**).

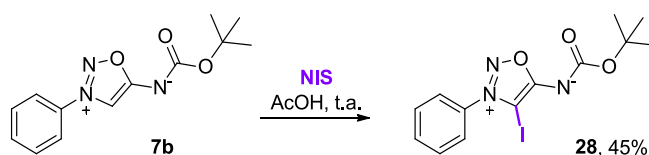


Figure 110 : Iodation de la-3-Phe-6-Boc-iminosydnone **7b**.

Nous avons réalisé la réaction sur l'iminosydnone protégée par un groupement Boc et avons obtenu le produit iodé **28** avec un rendement de 45%. Contrairement aux sydrones, ce produit ne précipite pas dans le milieu réactionnel. Nous observons également que l'iode introduit est relativement labile, notamment pendant les étapes d'évaporation, ce qui diminue le rendement de la réaction.

La chloration des iminosydrones apparaît comme plus délicate sur nos substrats. Nous avons tout d'abord essayé d'utiliser les conditions décrites.¹⁵⁸ La réaction utilise le *N*-chlorosuccinimide comme donneur de chlore, activé par le peroxyde de benzoyle dans CCl_4 (**Figure 111-a**). Après 30 minutes, on observe une dégradation totale du produit de départ. Dans les mêmes conditions que pour l'iodation, soit avec NCS dans l'acide acétique (**Figure 111-b**), le produit de départ ne montre qu'une faible conversion, et le produit chloré n'est pas isolable. Ces conditions s'étaient pourtant montrées efficaces pour la chloration des sydrones,⁷⁵ dont la réactivité se rapproche de celle des iminosydrones.

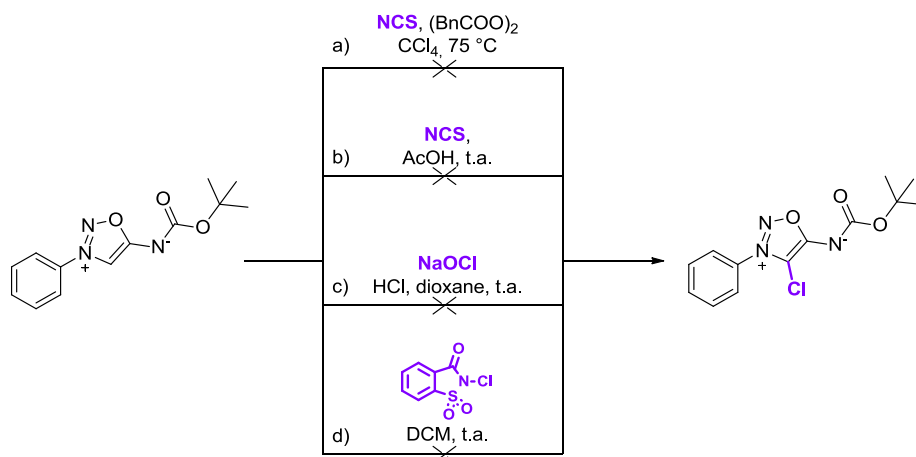


Figure 111 : Tentatives de chloration des iminosydrones.

Notre groupe avait également décrit la chloration de sydrones en utilisant l'hypochlorite de sodium en milieu acide.⁷⁵ Malheureusement, dans le cas des iminosydrones la réaction se révèle

¹⁶⁵ D. C. Brown, K. Turnbull, *Synthetic Commun.* **2013**, *43*, 3233–3237.

inefficace à température ambiante (**Figure 111-c**) et mène à la déprotection du groupement Boc à des températures élevées.

Enfin, nous avons utilisé la *N*-chlorosaccharine (**Figure 111-d**), un agent de chloration utilisé pour introduire un chlore sur des noyaux aromatiques riches.¹⁶⁶ Dans notre cas, nous n'observons plus de produit de départ après 20h. Les données de masse et de RMN du brut concordent avec la présence du produit attendu, mais ce dernier n'est pas stable lors de sa purification.

La combinaison de ces résultats nous entraîne à supposer que les dérivés chlorés d'iminosydones sont probablement peu stables.

3. Utilisation de réactions pallado-catalysées pour la fonctionnalisation de la position C₄

Avant d'utiliser les iminosydones halogénées comme substrats de réactions pallado-catalysées, nous avons tout d'abord évalué la réactivité de l'iminosydnone non substituée en C₄. En effet, il a été montré que la liaison C-H des sydnones pouvait être activée pour réaliser des réactions de Heck déshydrogénantes.¹⁶⁷ La réaction, qui est efficace à température ambiante sur les sydnones, ne conduit pas à la formation de produit dans notre cas, même en chauffant à 60 °C en tube scellé (**Figure 112**). On n'observe uniquement le produit de départ.

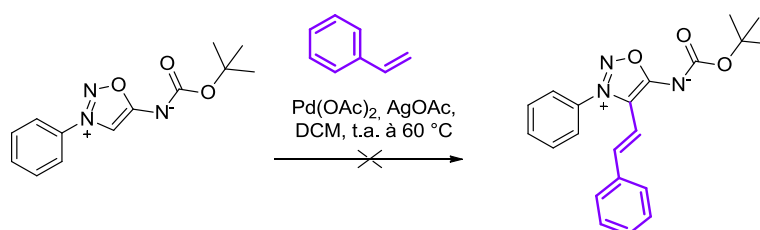


Figure 112 : Tentative de réaction de Heck déshydrogénante avec les iminosydones.

Nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation des iminosydones halogénées synthétisées auparavant. Nous avons ainsi engagé l'iminosydnone bromée dans des couplages de Suzuki avec un acide boronique. Nous avons utilisé un système catalytique classique obtenu en mélangeant du Pd(OAc)₂ avec la 1,2-bis(diphénylphosphino)éthane (complexe A), et également un complexe palladique très encombré (complexe B) obtenu avec un ligand *di**tert*-butylphosphino ferrocène (dbpf), supposé être plus réactif pour les couplages de Suzuki (**Figure 113**).¹⁶⁸

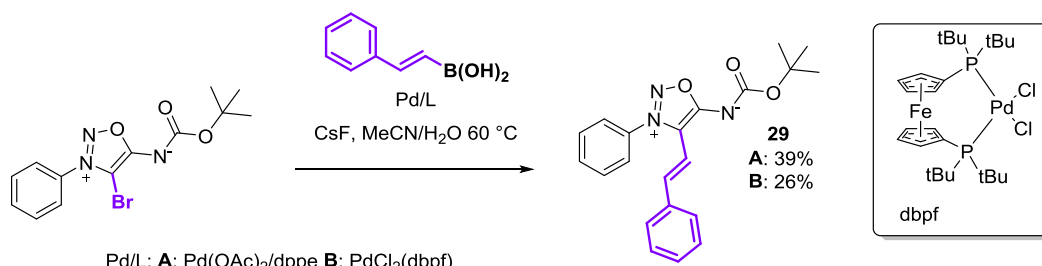


Figure 113 : Réaction de Suzuki avec l'iminosydnone bromée

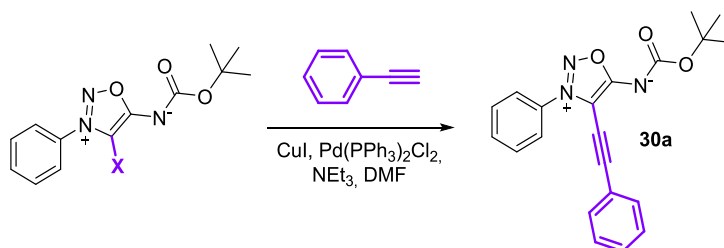
¹⁶⁶ S. P. L. de Souza, J. F. M. da Silva, M. C. S. de Mattos, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2003**, *14*, 832–835.

¹⁶⁷ Y. Yang, C. Kuang, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 7810–7813.

¹⁶⁸ J. D. Moseley, P. M. Murray, E. R. Turp, S. N. G. Tyler, R. T. Burn, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6010–6017.

On obtient un rendement de 39% en **29** lors de l'utilisation du système catalytique A. La débromation de l'iminosydnone de départ menant au produit **7b** restreint le rendement de cette réaction qui reste modeste. De manière surprenante, bien que la réaction utilisant PdCl₂(dbpf) permet de limiter les quantités de produit débromé, le rendement final reste inférieur à celui obtenu avec le système A. Une purification plus compliquée est à l'origine de cette différence de rendements.

Nous avons ensuite évalué la réactivité des iminosydnones halogénées en position 4 dans la réaction de Sonogashira. Nous avons utilisé le phénylacétylène comme partenaire alcyne dans la réaction (**Tableau 2**).



Entrée	X	Température (°C)	Rendement (%)
1	I	80	16
2	I	20	45
3	Br	20 à 40	- ^a

Tableau 2 : Optimisation de la réaction de Sonogashira avec les iminosydnones halogénées en position 4 ;
^aConversion faible.

On observe que l'iminosydnone iodée est le meilleur partenaire pour la réaction de Sonogashira, l'iminosydnone bromée se montrant moins réactive. Lorsque la réaction est effectuée à 80 °C, on observe une majorité de produit issu de la déiodation du produit de départ, tandis qu'il est minoritaire à température ambiante, menant ainsi à un rendement meilleur, de 45%, en produit **30**.

Nous avons alors utilisé ces conditions pour étendre la réaction à un autre substrat alcyne (**Figure 114**).

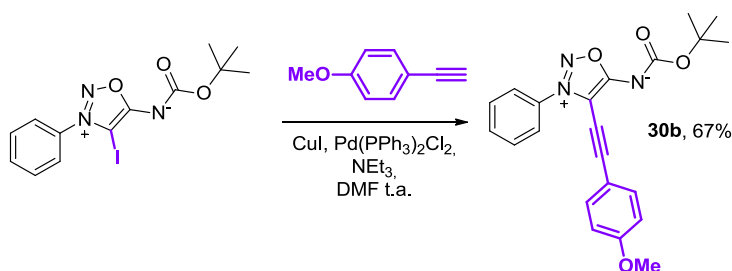


Figure 114 : Réaction de Sonogashira avec le p-MeO-phénylacétylène

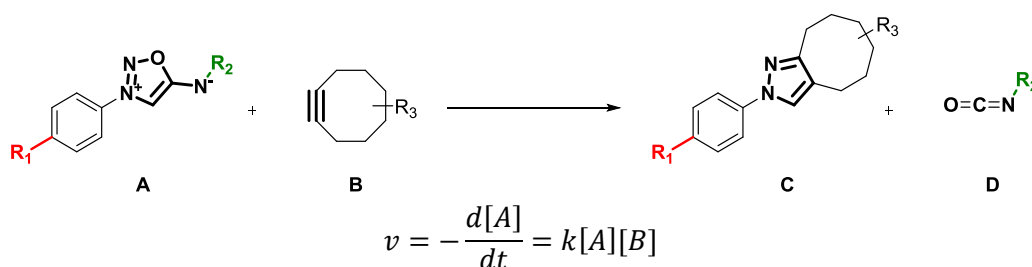
La réaction est efficace dans ces conditions et mène à l'iminosydnone **30b** avec un rendement de 67%.

Nous avons ainsi pu synthétiser de nouvelles iminosydnones substituées en position 4 par une voie qui n'était pas exploitée jusque-là, à savoir l'emploi des iminosydnones halogénées dans des couplages pallado-catalysés.

Nous achevons ainsi notre étude sur la synthèse et la fonctionnalisation du squelette iminosydnone. Nous avons pu obtenir une grande variété de substrats possédant des substituants différents. Nous devons à présent étudier la réactivité de ces nouveaux composés avec les alcynes.

II. Réactivité des iminosydnones dans les réactions de cycloaddition avec les alcynes cycliques

Après la mise en évidence de la réactivité des iminosydnones avec les cycloalcynes lors d'un criblage (cf. Introduction générale-II-A-Découverte d'une réaction de « click & release » par criblage de combinaisons mésoionique/cycloalcyne), nous avons étudié cette réaction en faisant varier les substituants présents sur le squelette iminosydnone ainsi que les cyclooctynes. Pour cela, nous avons cherché à déterminer la constante cinétique de la réaction en la supposant d'ordre 2 puisqu'elle fait intervenir deux partenaires moléculaires (**Équation 1**).



Équation 1 : Loi de cinétique pour une réaction d'ordre 2.

Après intégration entre l'instant initial de la réaction et un temps t , on obtient une observable $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ linéaire en fonction du temps (**Équation 2**).

$$\frac{\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + cste \quad k \text{ en } M^{-1} \cdot s^{-1}$$

Équation 2 : Equation permettant d'obtenir la valeur de la constante de cinétique de la réaction par régression linéaire ; $[A]_0$ et $[B]_0$ sont les concentrations en A et B à l'état initial de la réaction.

La cycloaddition a été effectuée dans un milieu organo-aqueux constitué de PBS pH 7.4 à 10 mM et de DMSO. Les constantes de cinétique ont été déterminées par suivi HPLC. La conversion de la réaction peut en effet être calculée en mesurant l'aire du pic d'absorbance de l'iminosydnone normalisée par rapport au pic d'un standard interne (SI) idéalement choisi, ici le 3-fluoro-4-nitrophenol. On a ainsi accès à la concentration en iminosydnone (A) et en déduire celle en cycloalcyne (B) pour chaque injection. Le tracé des $\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ en fonction du temps, analysé par régression linéaire permet alors de déterminer la constante de réaction qui correspond à la pente de la régression (**Figure 115**).

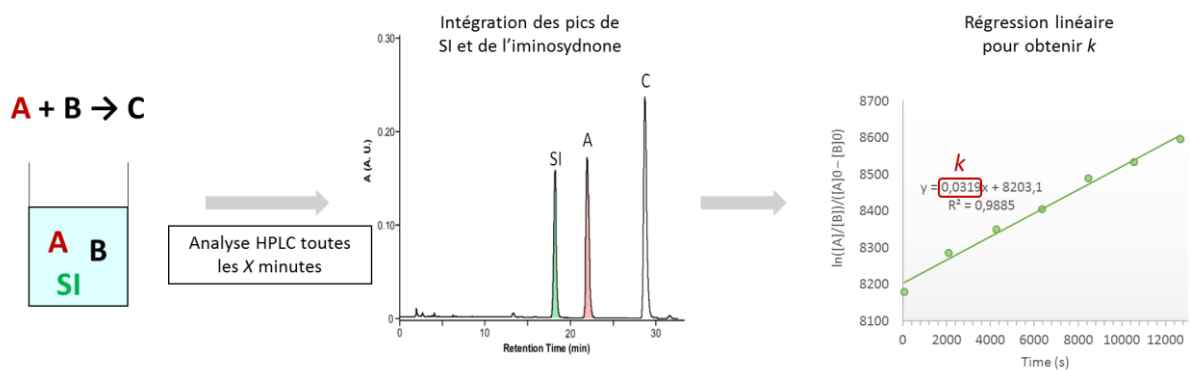
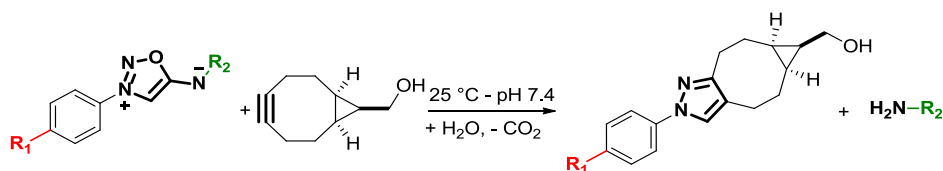


Figure 115 : Mise en œuvre de l'étude cinétique par HPLC ;
 A = iminosydnone, B = cyclooctyne, C = pyrazole, SI = standard interne.

Pour réaliser cette étude cinétique, nous avons sélectionné quelques iminosydnone représentatives de la diversité fonctionnelle introduite précédemment. Afin de les comparer entre elles, nous avons réalisé la réaction avec le même cyclooctyne, le BCN, avec un ratio PBS/DMSO de 2/8. Pour plus de clarté, les résultats seront présentés par classe de substitution en commençant par l'influence des substituants en position exocyclique N₆.

A. Influence du groupement substituant l'azote exocyclique

Nous avons tout d'abord regardé la réactivité du sel d'iminosydnone **4a** ne possédant pas de substituant en position N₆, il apparaît que ce dernier ne réagit pas avec les cyclooctynes. Comme le montre le **Tableau 3** les substitutions sur cette position du squelette iminosydnone ont un impact très significatif sur la cinétique de réaction.



Amides				
Entrée	ImSyd	R ₁	R ₂	k [M ⁻¹ .s ⁻¹]
1		H	CH ₃ CO	0.010
2	5c	H	CF ₃ CO	0.006
3	5a	H		0.006
4	5b	H		0.004

Sulfonamides				
Entrée	ImSyd	R ₁	R ₂	k [M ⁻¹ .s ⁻¹]
5	6a	H		0.032
6	6b	H		0.042

Carbamates				
Entrée	ImSyd	R ₁	R ₂	k [M ⁻¹ .s ⁻¹]
7	7a	Me	BnOCO-	0.008
8	7b	H	tBuOCO-	0.018

Urées/Thiourée				
Entrée	ImSyd	R ₁	R ₂	k [M ⁻¹ .s ⁻¹]
9	8c	H	Bn-NHCO-	0.061
10	8a	H		0.047
11	8e	H		0.028
12	8i	H		0.034
13	9a	H		< 0.001

Tableau 3 : Constantes de vitesse pour la réaction entre les iminosydnones et le BCN ; Etude de l'influence du groupement exocyclique.

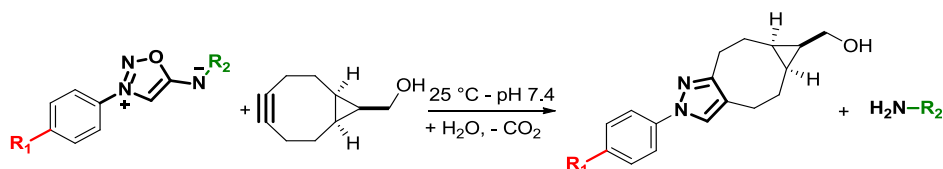
Les iminosydnones amides réagissent avec le BCN avec des constantes faibles allant de 0.004 à 0.01 M⁻¹.s⁻¹. Nous pouvons constater que la présence d'un groupement électroattracteur sur le substituant exocyclique a tendance à diminuer la réactivité (**Tableau 3**, comparer Entrées 1 avec 2 et 3 avec 4). Ce penchant reste toutefois peu marqué du fait de la faible vitesse de réaction. Les carbamates montrent des propriétés semblables aux amides. Concernant les sulfonamides, la difficulté synthétique pour leur obtention ne nous permet d'étudier que deux d'entre eux. Leur réactivité avec le BCN est supérieure à celle des amides d'un facteur d'environ 3 à 4 et avec des constantes de l'ordre de 0.03–0.04 M⁻¹.s⁻¹ (**Tableau 3**, Entrées 5 et 6).

S'agissant des urées, ce sont les composés les plus intéressants. Non seulement elles sont plus simples à synthétiser, mais elles présentent aussi les vitesses de réaction les plus rapides avec le BCN. La vitesse de réaction peut aller jusqu'à $0.061 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (**Tableau 3**, Entrée 9), ce qui représente un facteur 10 par rapport à la moyenne des amides qui sont les iminosydnonnes les plus étudiées dans la littérature. On note la même tendance que pour les amides, c'est-à-dire une moins bonne réactivité des produits possédant un groupement électroattracteur sur la position exocyclique (**Tableau 3**, Entrées 11 et 12).

On peut également remarquer que les aryl-urées sont moins réactives que les alkyl-urées (**Tableau 3**, Entrées 9 et 10). La thiourée testée (**Tableau 3**, Entrée 13) réagit avec les BCN, mais la réaction est trop lente pour qu'il soit possible d'évaluer la constante de cinétique dans ces conditions.

B. Influence de la substitution sur l'aryl en position N₃

Après avoir évalué les propriétés des différents substituants *N*-exocycliques, nous nous sommes intéressés à l'impact de la fonctionnalisation de l'aryl en position N₃ par des groupements possédant différentes propriétés électroniques (**Tableau 4**).



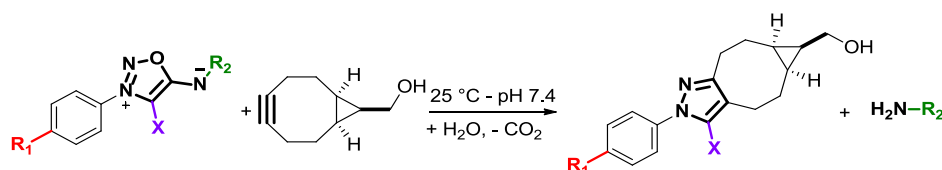
Entrée	ImSyd	R ₁	R ₂	k [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
1	7b	H	<i>t</i> BuOCO-	0.018
2	26h	CO ₂ Et	<i>t</i> BuOCO-	0.083
3	8a	H		0.047
4	8f	OH		0.008
5	8g	CH ₂ OH		0.024
6	26j	CO ₂ Et		0.181

Tableau 4 : Constantes de vitesse pour la réaction entre les iminosydnonnes et le BCN ;
Etude de l'influence du groupement en position N₃.

Nous constatons que comme dans le cas des sydnones, les propriétés électroniques du substituant de l'aryl ont une grande influence sur la cinétique. La présence du substituant électrodonneur inhibe la réaction (**Tableau 4**, comparer les Entrées 4 et 5 avec 3). En revanche la présence d'un groupement électroattracteur exalte la réactivité des iminosydnonnes. Comme exemple, nous pouvons comparer les Entrées 1 et 2 ainsi que les Entrées 3 et 6 (**Tableau 4**). Dans les deux cas, le substrat portant une fonction ester voit sa constante de vitesse augmenter d'un facteur 4 environ par rapport à son analogue non substitué. Ces résultats sont comparables à la tendance affichée par les sydnones dans leur réaction avec le BCN.

C. Influence de la substitution en position C₄

Pour finir nous avons engagé des iminosydnones substituées en position 4 dans la réaction avec les cycloalcyne (**Tableau 5**).



Entrée	ImSyd	R ₁	X	R ₂	k [M ⁻¹ .s ⁻¹]
1	7b	H	H	tBuOCO-	0.018
2	30a	H	Ph—C≡C—	tBuOCO	0.021
3	28	H	I	tBuOCO	0.111
4	27b	H	Br	tBuOCO	0.457
5	8d	H	H	BnNHCO	0.061
6	27c	CH ₃	Br	BnNHCO	0.936
7	8b	H	H		0.047
8	26j	CO ₂ Et	H		0.181
9	27f	CO ₂ Et	Br		0.686

Tableau 5 : Constantes de vitesse pour la réaction entre les iminosydnones et le BCN ;
Etude de l'influence du groupement en position C₄.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de trois substituants sur le même squelette comportant un groupement Boc (**Tableau 5**, Entrées 2–4). On observe que la présence d'un alcyne sur cette position impacte peu la réaction, malgré la taille non négligeable du groupement phénylacétylène. Concernant les halogènes, l'impact est de grande importance, notamment pour le dérivé bromé qui voit sa constante de vitesse augmenter d'un facteur 25.

Les dérivés urées bromées des iminosydnones affichent la même tendance (**Tableau 5**, Entrées 6 et 9), même si l'effet est moins spectaculaire. Curieusement, l'urée **27f** (**Tableau 5**, Entrée 9) possédant un brome et un groupement électroattracteur sur l'aryl montre une exaltation de réactivité plus faible que celle attendue puisqu'elle donne une constante de vitesse inférieure à l'urée **27a** qui n'est pas activée sur l'aryl. Nous pouvons en conclure que l'effet d'un groupement électroattracteur sur le noyau aromatique en position N₃ apporte une accélération de la réaction inférieure à l'utilisation d'une chaîne alkyle plutôt qu'aryle sur l'urée.

A nouveau on observe un comportement similaire à celui des sydnones. Dans de précédents travaux nous avons déjà reporté la réactivité fulgurante des sydnones halogénées, en particulier chlorées et fluorées.⁷⁶

Très récemment Liang et Houk ont mené des expériences de modélisation pour trouver l'origine de cet effet.⁷⁷ Ils ont démontré que contrairement aux prénotions, la théorie des orbitales moléculaires n'explique pas cette réactivité particulière. La baisse de l'énergie d'activation provient essentiellement de la distorsion de la sydnone induite par l'halogène. Il pourrait ainsi être intéressant de réaliser le même type d'études afin d'expliquer la meilleure réactivité de l'iminosydnone **10d** par rapport à l'iminosydnone **27f** qui porte tous les groupements accélérant la réaction.

Finalement, nous avons pu mettre à jour les facteurs structuraux des iminosydnones impactant la vitesse de la réaction avec le BCN (**Figure 116**).

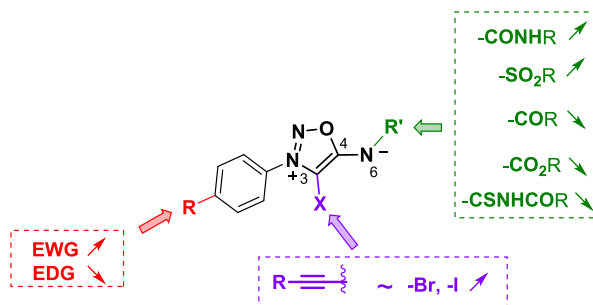


Figure 116 : Résumé des principaux facteurs influençant la cinétique de réaction entre les iminosydnones et les cycloalcynes.

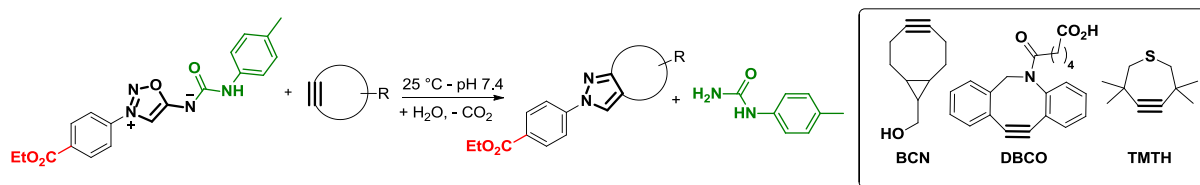
Cette relation structure/réactivité nous donne un guide des fonctions à introduire sur le squelette iminosydnone dans l'optique d'avoir une réaction rapide avec les alcynes cycliques. La réaction est favorisée par une fonction urée en N₆, un groupement électro-attracteur sur l'aryl en N₃ et un halogène en position C₄. La combinaison de ces critères structuraux permet d'avoir une réaction de l'ordre de 1 M⁻¹ s⁻¹ avec le BCN.

D. Autres facteurs influençant la cycloaddition

L'impact du cycloalcyne sur la vitesse de réaction a également été évalué. Pour cela, nous avons comparé 3 cycloalcynes : le BCN, le DBCO et le TMTH dans la réaction avec la même iminosydnone **26j**. Ces cycloalcynes sont communément employés pour la SPAAC et possèdent des constantes de vitesse respectives de 0.14, 0.31 et 4.0 M⁻¹.s⁻¹ avec les azotures.

Au cours de cette étude, nous nous sommes également intéressés au ratio entre le PBS et le DMSO. En effet, il a été montré dans le cas de la SPAAC que la proportion de solvant organique avait un impact sur la réaction.¹⁶⁹ La cycloaddition est généralement favorisée en conditions aqueuses, mais la vitesse maximale est atteinte lorsqu'un co-solvant organique est utilisé.

¹⁶⁹ D. L. Davis, E. K. Price, S. O. Aderibigbe, M. X.-H. Larkin, E. D. Barlow, R. Chen, L. C. Ford, Z. T. Gray, S. H. Gren, Y. Jin, et al., *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6816–6819.



Entrée	Cycloalcyne	Ratio PBS/DMSO	k [$M^{-1}.s^{-1}$]
1	BCN	2/8	0.181
2	DBCO	2/8	1.47
3	DBCO	8/2	3.15
4	TMTH	2/8	29.2

Tableau 6 : Influence du cycloalcyne utilisé ainsi que de la proportion de solvant organique sur la vitesse de la cycloaddition.

Nous obtenons le même ordre relatif de réactivité des cycloalcynes que pour la SPAAC, soit $BCN < DBCO < TMTH$ (Tableau 6, Entrées 1,2,4). En revanche l'augmentation de vitesse apportée par l'utilisation du DBCO par rapport au BCN est d'un facteur 8 alors que pour la SPAAC, la constante de vitesse n'était que doublée. De même l'utilisation du TMTH a un effet bien plus saisissant pour la réaction avec les iminosydones puisqu'il permet d'atteindre une constante de 29.

Concernant l'utilisation d'une plus grande proportion de solvant aqueux, on observe qu'en inversant le ratio entre le PBS et le DMSO, on obtient une nouvelle augmentation de la constante de vitesse d'environ 2. Cette accélération observée en milieu aqueux est d'autant plus intéressante pour des applications en bioconjugaison.

Nous avons pu montrer par cette étude cinétique que les iminosydones affichaient une bonne réactivité avec les cycloalcynes. Il est possible de contrôler la vitesse de la réaction par 5 facteurs. Les 3 premiers sont les 3 points de fonctionnalisation de l'iminosydnone. L'utilisation de différents cycloalcynes permet également de moduler la vitesse, tout comme la proportion aqueuse du solvant utilisé. Nous pouvons ainsi avoir une réaction de chimie click qui concurrence la SPAAC en termes de vitesse, mais qui possède une plus grande tolérance en termes de dérivation des partenaires réactionnels et qui de plus donne la possibilité de libérer une molécule suite à la réaction click.

PARTIE II – DEVELOPPEMENT

D'IMINOSYDNONES PRO-FLUORESCENTES POUR

DES APPLICATIONS EN IMAGERIE CELLULAIRE

Le premier chapitre de ce manuscrit a été consacré à la synthèse et à la fonctionnalisation du squelette iminosydnone. Au cours de cette étude nous avons déterminé les paramètres clés permettant d'accélérer la réaction entre les iminosydnones et les cycloalcynes. Ceci ouvre un certain nombre de perspectives intéressantes et nous a permis d'imaginer notamment des applications de bioconjugaison poussées comme, par exemple, des marquages dans les cellules.

Dans cette seconde partie, nous appliquons les méthodes de synthèse développées précédemment pour l'élaboration d'iminosydnones pro-fluorescentes, c'est-à-dire qui deviennent fluorescentes suite à la réaction avec un alcyne tendu. L'élaboration de ces sondes s'appuie sur les résultats obtenus précédemment au laboratoire qui seront rappelés.

Nota bene : Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus avant le développement de la méthodologie présentée dans le Chapitre I–I–B–2-Utilisation de nucléophiles. Ainsi nous n'avons pas utilisé la méthode de fonctionnalisation *N*-exocyclique des iminosydnones par des nucléophiles. Les difficultés de synthèse rencontrées et exposées ci-dessous mettent en évidence les désagréments de la fonctionnalisation par des électrophiles.

I. Les sondes pro-fluorescentes dans la littérature

A. Rappels sur la fluorescence

La fluorescence correspond au phénomène d'émission lumineuse par une substance après absorption d'un rayonnement d'une longueur d'onde différente de celle émise (λ_{ex}). D'un point de vue moléculaire, le phénomène de fluorescence débute par l'absorption d'un photon. Un électron du niveau fondamental de la molécule atteint alors un état singulet excité. Le retour à l'état fondamental de cet électron après quelques nanosecondes se fait avec l'émission d'un photon de plus faible énergie, *i.e.* à une longueur d'onde plus élevée. Des processus de décroissance non-radiative, telle que la perte d'énergie sous forme de chaleur, expliquent la différence d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis. L'absorbance et l'émission d'un composé fluorescent correspondent ainsi à l'énergie de ces transitions électroniques (**Figure 117**).

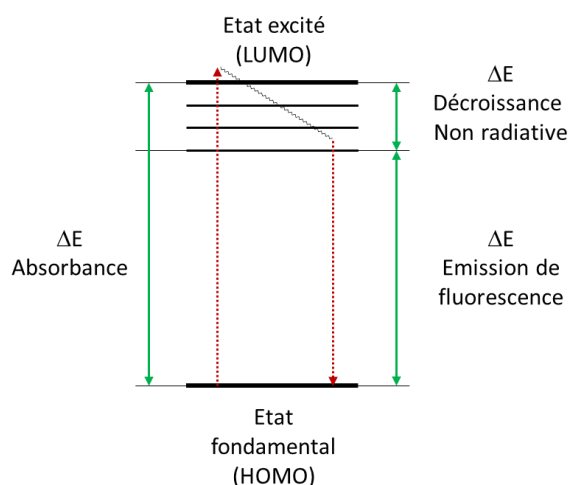


Figure 117 : Diagramme de Jablonski simplifié décrivant le phénomène de fluorescence.

Le principe de fluorescence a été utilisé pour de nombreuses applications notamment en biologie, en science des matériaux et en électronique. L'imagerie cellulaire est un domaine dans lequel la recherche de nouvelles molécules fluorescentes est en constante expansion. Ces molécules servent par exemple à marquer les différentes organelles des cellules afin d'obtenir ensuite des informations structurales par la microscopie confocale.¹⁷⁰

Un fluorophore est caractérisé par différents paramètres. Sa capacité à absorber et à réémettre de la lumière est représentée dans son *spectre d'absorption* et son *spectre d'émission* caractérisés principalement par leurs maximums. Ces deux spectres sont généralement l'image miroir l'un de l'autre. La différence entre ces deux maximums est appelée *déplacement de Stokes*, il correspond à la différence d'énergie entre le photon exciteur et le photon émis (**Figure 118**). En fluorescence, un grand déplacement de Stokes permet de faciliter la détection de la lumière réémise par le fluorophore.

¹⁷⁰ W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang, L. Yuan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13658–13699.

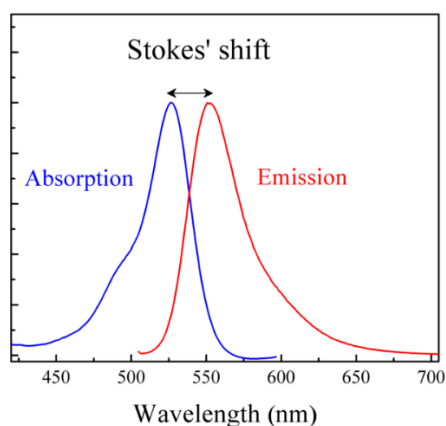


Figure 118 : Exemple de spectres d'absorption et d'émission—Illustration du déplacement de Stokes (Stokes' shift).

On peut ensuite définir le coefficient d'extinction molaire ε , qui caractérise la capacité d'une substance à absorber la lumière en solution à une longueur d'onde donnée. Cette valeur relie l'absorbance à la concentration au travers de la loi de Beer-Lambert présentée dans l'**Équation 3**, valable à une longueur d'onde donnée.

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

Équation 3 : Loi de Beer-Lambert

(avec A = absorbance ; ε = coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) ;
 l = épaisseur de solution traversée (cm) ; C = concentration du composé (M)).

Le rendement quantique Φ_f correspond au rapport des photons émis par une substance sur le nombre de photons absorbés. De manière expérimentale, on peut le calculer relativement à un fluorophore standard de rendement quantique connu¹⁷¹ en utilisant la formule suivante (**Équation 4**) :

$$\Phi_x = \Phi_{st} \times \left(\frac{A_{st}}{A_x} \right) \times \left(\frac{F_x}{F_{st}} \right) \times \left(\frac{n_x^2}{n_{st}^2} \right) \times \left(\frac{D_x}{D_{st}} \right)$$

Équation 4 : Equation exprimant le rendement quantique d'un échantillon x par rapport à un standard st
 (avec A , la valeur de l'absorbance ; F , l'aire sous la courbe d'émission ; n , la valeur d'indice de réfraction du solvant ;
 D , le facteur de dilution entre la mesure d'absorbance et la mesure de fluorescence).

La multiplication du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée donne la valeur de la brillance (**Équation 5**). Elle représente la quantité de lumière émise à une longueur d'onde d'excitation donnée.

$$Brillance = \varepsilon \times \Phi_x$$

Équation 5 : Equation de la brillance

(avec ε , coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) ; Φ_x , rendement quantique de l'échantillon).

Le potentiel d'une sonde fluorescente à être utilisée en imagerie est généralement déterminé par la valeur de brillance plus que par le rendement quantique. En effet, la brillance prend en compte à la fois la capacité d'une molécule à absorber la lumière ainsi que l'efficacité de la réémission de photons. Par exemple, les sondes de type cyanines, très utilisées en imagerie, possèdent un rendement quantique plutôt bas ($0,1 < \Phi_f < 0,3$), mais leur grande capacité à absorber la lumière ($\varepsilon > 100000 M^{-1}.cm^{-1}$) en font d'excellentes sondes.

¹⁷¹ A. T. R. Williams, S. A. Winfield, J. N. Miller, *Analyst* **1983**, *108*, 1067–1071.

Les fluorophores sont souvent utilisés pour suivre ou visualiser des molécules ou biomolécules dans des systèmes complexes comme l'intérieur d'une cellule. Lorsque l'on souhaite discriminer une molécule dans son état libre ou liée à son récepteur par exemple l'emploi de sondes fluorescentes classiques nécessite d'effectuer plusieurs lavages pour éliminer le fluorophore utilisé souvent en excès. Il est possible d'y remédier par l'usage de sondes dites pro-fluorescentes (ou turn-on)^{172, 173} dont la fluorescence est exaltée une fois liée au récepteur. Ce concept est particulièrement utilisé dans le cadre de sondes pro-fluorescentes capables de réagir par chimie click ou chimie bioorthogonale (**Figure 119**). Le principe de ces sondes est basé sur un état initial non (ou peu) fluorescent qui, suite à une réaction bioorthogonale, devient alors fluorescent. L'intérêt de telles sondes par rapport aux sondes fluorescentes classiques est qu'elles n'émettent pas/peu de signal avant d'avoir réagi. L'excès de sonde utilisé n'est donc pas détectable. Elles permettent ainsi d'augmenter le rapport signal sur bruit tout en se dispensant des lavages qui peuvent être laborieux.

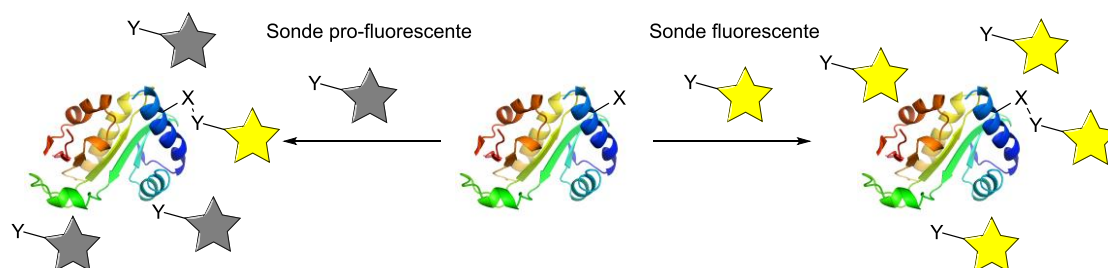


Figure 119 : Marquage d'une biomolécule par une sonde fluorescente ou pro-fluorescente.

Une sonde pro-fluorescente possède plusieurs caractéristiques à déterminer pour évaluer son potentiel et son intérêt. La première est la valeur de turn-on qui renseigne sur la sensibilité de la sonde. Dans la littérature, elle est souvent calculée comme le rapport des rendements quantiques des états "on" et "off" de la sonde. Ici, nous choisissons d'utiliser le rapport des intensités de fluorescence du produit final et du produit de départ excités à la même longueur d'onde. Plus ce rapport est élevé, meilleur sera le rapport signal sur bruit.

Par ailleurs, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont également à considérer, particulièrement pour une application en imagerie. Dans le cas de l'imagerie *in cellulo* il est nécessaire d'éviter les longueurs d'onde d'excitation trop basses qui seraient trop énergétiques et induiraient une phototoxicité pour les cellules. De plus, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission doivent être adaptées au matériel utilisé pour l'imagerie cellulaire. Pour imager *in vivo*, les contraintes en termes de longueurs d'ondes sont bien plus exigeantes. En effet, elles doivent être comprises entre 650 nm et 900 nm, correspondant à la fenêtre de transparence des tissus biologiques (**Figure 120**)¹⁷⁴. Il s'agit de la région où l'absorption de l'eau et de l'hémoglobine (Hb/HbO₂) sont minimales, la pénétration du rayonnement dans les tissus est donc favorisée dans cette fenêtre.

¹⁷² P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9307–9320.

¹⁷³ A. Nadler, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2408–2410.

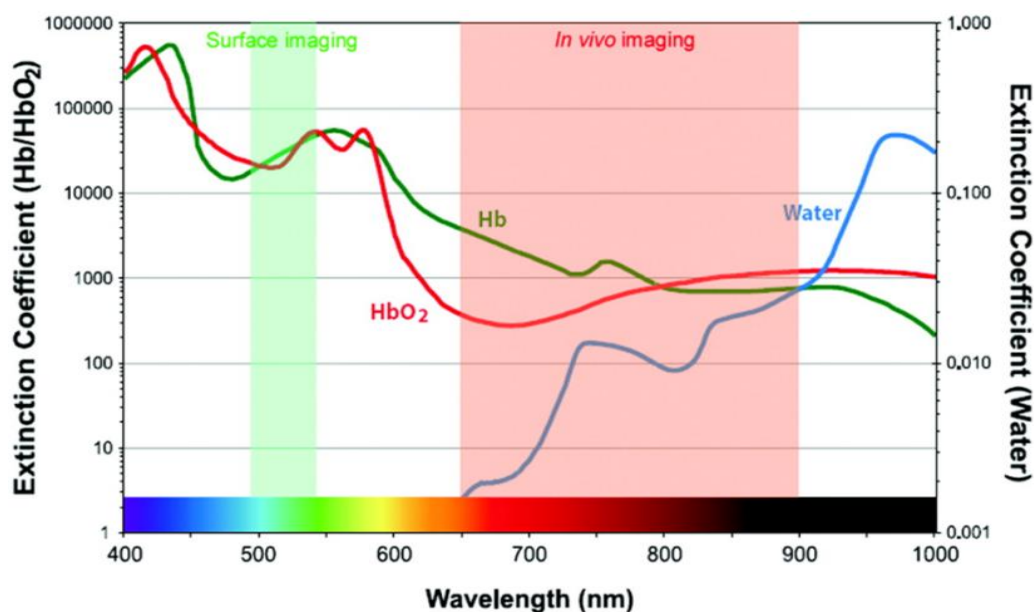


Figure 120 : Fenêtre de transparence des tissus biologiques dans le proche infra-rouge.
 Hb = déoxyhemoglobine ; HbO₂ = oxyhemoglobine ; water = eau.¹⁷⁴

Les mécanismes permettant un effet “turn-on” d’une sonde pro-fluorescente reposent sur différents effets d’extinction de fluorescence (quenching de fluorescence) que nous allons décrire.

B. Les effets d’extinction de fluorescence

La fonctionnalisation d’un fluorophore peut induire différents effets physiques comme l’ICT (Internal Charge Transfer) ou le PeT (Photo-induced electron Transfer) qui entraînent une extinction de fluorescence. Un troisième mécanisme d’extinction utilisé peut être l’emploi d’une molécule inhibitrice de fluorescence à proximité du fluorophore. La molécule inhibitrice peut être clivée, libérant ainsi la fluorescence originelle du fluorophore. Ce principe se nomme le FRET (Förster Resonance Energy Transfer).

Ces effets d’extinction de fluorescence ont été largement utilisés pour détecter des espèces ioniques, des métaux et des petites molécules réactives.^{175, 176} Nous nous intéresserons plus particulièrement aux sondes pro-fluorescentes qui fluorescent à la suite d’une réaction bioorthogonale.¹⁷⁷ Nous donnerons des exemples représentatifs de sondes pro-fluorescentes construites à partir de différents effets d’extinction de fluorescence que nous décrivons.

¹⁷⁴ H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640.

¹⁷⁵ D.-G. Cho, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1647–1662.

¹⁷⁶ J. Chan, S. C. Dodani, C. J. Chang, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973–984.

¹⁷⁷ G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 42001.

1. Le transfert de charge intramoléculaire (ICT)

Avant d'être utilisé pour la génération de sondes pro-fluorescentes, l'ICT est un effet responsable de l'émission de fluorescence pour certaines molécules. Cet effet est particulièrement important dans des molécules possédant un groupement électrodonneur et un groupement électroattracteur conjugués (système "push-pull"). Ce mécanisme est responsable d'effets tels que le solvato-chromisme et d'autres sensibilités d'un fluorophore vis-à-vis de son environnement.¹⁷⁸

Cet effet ICT a été largement exploité pour la conception de capteurs de diverses espèces ioniques, indicateurs de pH ou détecteur de petites molécules organiques.^{179, 180}

Au-delà de ces indicateurs très sensibles à leur environnement moléculaire, l'effet ICT a également été exploité pour la conception de sondes activables. L'activation de tels objets se fait par une modification chimique bioorthogonale induisant un changement de polarisation de la molécule, et donc un changement de comportement en fluorescence (**Figure 121**).

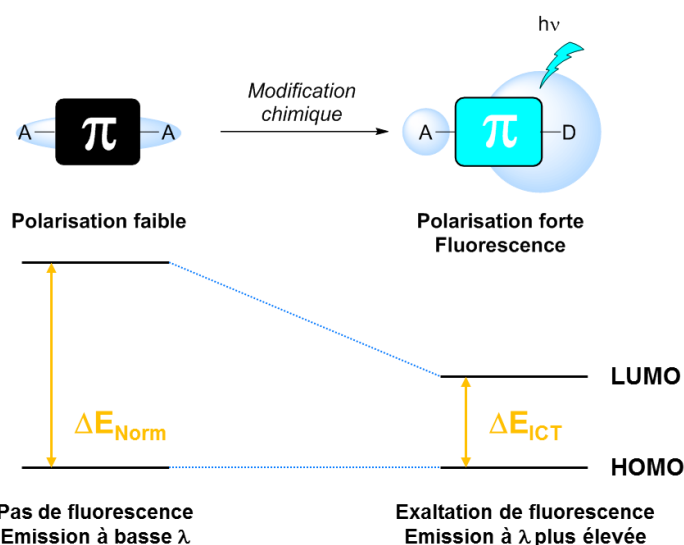


Figure 121 : Utilisation du principe de l'ICT pour la conception de sondes turn-on ;
A : groupement fonctionnel accepteur d'électrons ; B : groupement fonctionnel donneur d'électrons.

D'un point de vue orbitalaire, lorsque la molécule est polarisée, la différence énergétique (ΔE) entre la LUMO et la HOMO est réduite, facilitant ainsi le passage d'un électron de l'état fondamental à l'état excité (état ICT).

Une modification structurale allant d'une structure à polarisation faible à une structure fortement polarisée induit ainsi un abaissement de la différence d'énergie entre la HOMO et la LUMO. On peut alors observer un effet bathochrome de la fluorescence (spectre d'émission décalé vers le rouge) et/ou une exaltation de fluorescence.

Dans la littérature, ce phénomène ICT a notamment été exploité au travers de sondes portant un azote. Les travaux de Wang et ses collaborateurs à propos des azido-coumarines sont pionniers dans l'exploitation de la CuAAC comme activation de sondes fluorescentes.¹⁸¹ L'effet donneur de l'azote

¹⁷⁸ B. Valeur, *Molecular fluorescence*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001

¹⁷⁹ J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8551–8588.

¹⁸⁰ A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.

¹⁸¹ K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4603–4606.

en position 3 combiné à l'effet donneur du substituant en position 7 réduisent la polarité de la coumarine. Après la réaction de CuAAC, le doublet non liant de l'azote en position 3 est engagé dans le système d'électrons π du triazole, permettant alors la formation d'une molécule au caractère dipolaire plus élevé et donc une exaltation de fluorescence. Plusieurs sondes ont ainsi été développées et étudiées par des méthodes combinatoires. La 3-azido-7-hydroxy-coumarine est l'un des composés les plus intéressants de cette étude (**Figure 122**), le produit issu de la CuAAC avec ce composé montre une exaltation de fluorescence d'un facteur 100 à pH 7. Ce composé a ensuite été utilisé à plusieurs reprises dans des applications de marquage.^{182, 183}

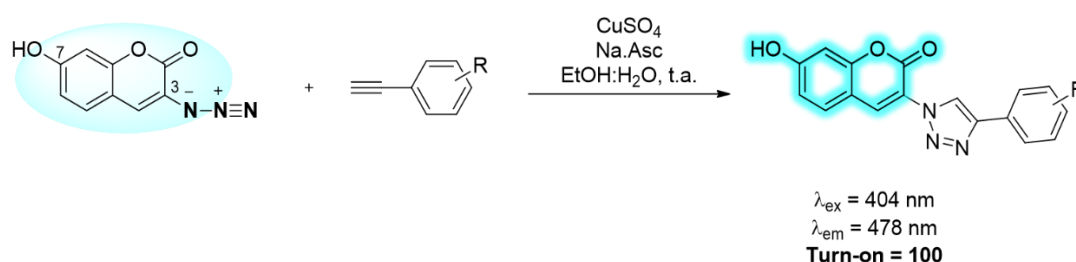


Figure 122 : Sondes azido-coumarines pro-fluorescentes.

Le squelette coumarine a également été utilisé par Bertozzi dans le but de développer une sonde pro-fluorescente. Le groupement réactif dans ce cas est une phosphine utilisée pour la ligation de Staudinger (**Figure 123**).¹⁸⁴ Le rôle d'électrodonneur joué précédemment par l'azoture est ici endossé par la phosphine. Le second effet donneur d'électrons est amené par une amine riche en position 7. Après la réaction de ligation de Staudinger, la phosphine est oxydée et le phosphore ne possède plus de doublet non liant permettant d'inhiber la fluorescence. Le produit formé présente alors une exaltation de fluorescence d'un facteur 30.

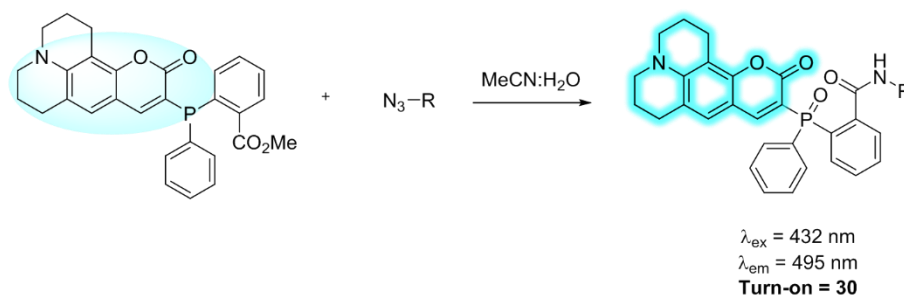


Figure 123 : Sonde activée par l'oxydation de la phosphine au cours de la ligation de Staudinger.

Malgré cette utilisation élégante de la ligation de Staudinger pour le marquage fluorescent de protéines *in vitro*, la viabilité de cette stratégie *in vivo* paraît compromise à cause de l'oxydation spontanée de la phosphine donnant lieu à un sous-produit fluorescent non désiré, et donc une augmentation du bruit de fond.

¹⁸² K. E. Beatty, F. Xie, Q. Wang, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14150–14151.

¹⁸³ K. E. Beatty, J. C. Liu, F. Xie, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, Q. Wang, D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7364–7367.

¹⁸⁴ G. A. Lemieux, C. L. de Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708–4709.

2. Le transfert d'électrons photoinduit (PeT)

L'effet de transfert d'électrons photoinduit est une voie de désexcitation d'un fluorophore sans émission de fluorescence. Pour obtenir un effet PeT efficace, il est nécessaire d'avoir trois éléments distincts : un fluorophore, un espaceur et une fonction réactive **X**. Même s'ils sont liés, la fonction réactive et le fluorophore possèdent des systèmes électroniques indépendants, ce qui diffère du mécanisme ICT. La fonction réactive possède typiquement un doublet d'électrons non liant dont l'énergie est située entre celle de la HOMO et de la LUMO du fluorophore.

Lors l'excitation (étape ①), un électron de la HOMO de **X** est transféré à la HOMO du fluorophore (étape ②) afin de satisfaire la règle de remplissage de Klechkowski des orbitales de plus basse énergie. L'électron excité à l'état singulet du fluorophore peut dégénérer et remplir l'orbitale du récepteur (étape ③) (**Figure 124**).

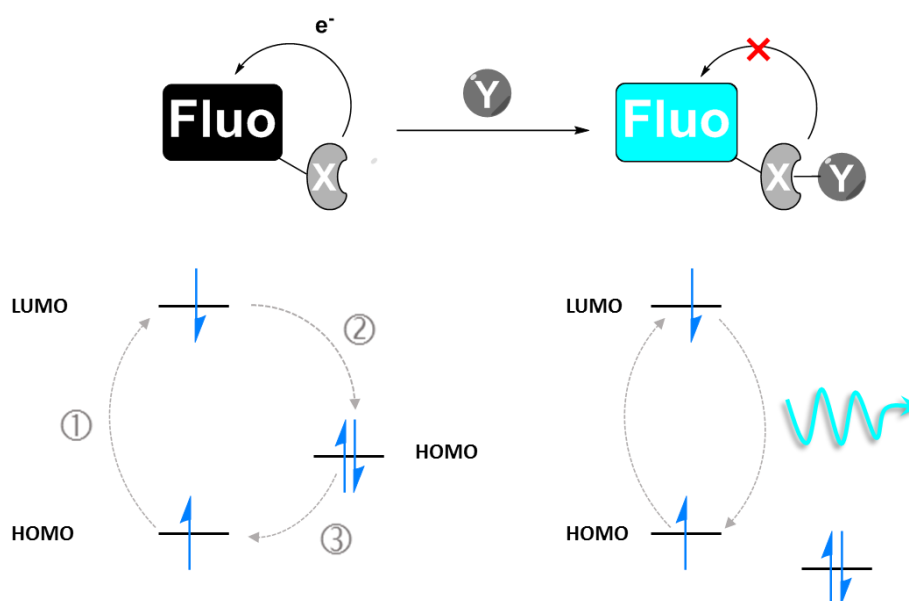


Figure 124 : Principe de l'effet PeT.

Pour que ce phénomène PeT soit effectif, il faut que la fonction réactive soit capable de participer à la fois à l'oxydation et à la réduction du fluorophore. Après modification chimique, l'énergie de la HOMO de X va être modifiée, devenant inapte à transférer et recevoir des électrons, et restaurant ainsi la fluorescence du composé.

Le phénomène PeT a été utilisé pour la conception de nombreuses sondes sensibles à la présence de protons, de cations alcalins et métalliques ainsi que des petites molécules organiques.^{179, 180}

La fonctionnalité réactive la plus utilisée pour la création de marqueurs pro-fluorescents utilisant le phénomène de PeT est à nouveau la fonction azoture, généralement avec des fluorophores possédant un noyau anthracénique. La première preuve de ce quenching a été faite sur l'anthracène (**Figure 125**).¹⁸⁵ Le processus d'extinction de fluorescence se produit bien par un mécanisme PeT puisque l'azoture et le noyau anthracène sont reliés par un lien méthylène.

¹⁸⁵ F. Xie, K. Sivakumar, Q. Zeng, M. A. Bruckman, B. Hodges, Q. Wang, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2906–2914.

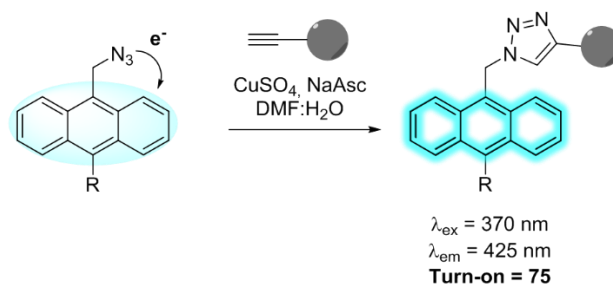


Figure 125 : Sonde PeT anthracène-azoture.

Cet exemple est prometteur quant aux propriétés de quenching PeT des azotures, mais cette sonde est peu exploitable pour le marquage de biomolécules.

En 2003, l'équipe de Nagano prédit, en se basant sur des méthodes calculatoires, la possibilité d'avoir un transfert électronique photoinduit entre l'unité xanthène des fluorescéines et le noyau benzénique adjacent.¹⁸⁶ En accord avec ces prévisions, le groupe de Bertozzi synthétise une fluorescéine éteinte par un azoture.¹⁸⁷ Cette sonde peut réagir avec des alcynes cycliques et terminaux selon les réactions de SPAAC et de CuAAC ; les triazoles issus de ces réactions affichent des exaltations de fluorescence d'un facteur 30 environ (**Figure 126**). Cette sonde a notamment été utilisée pour la visualisation de glycoprotéines fonctionnalisées par des azotures à la surface des cellules de mammifères.

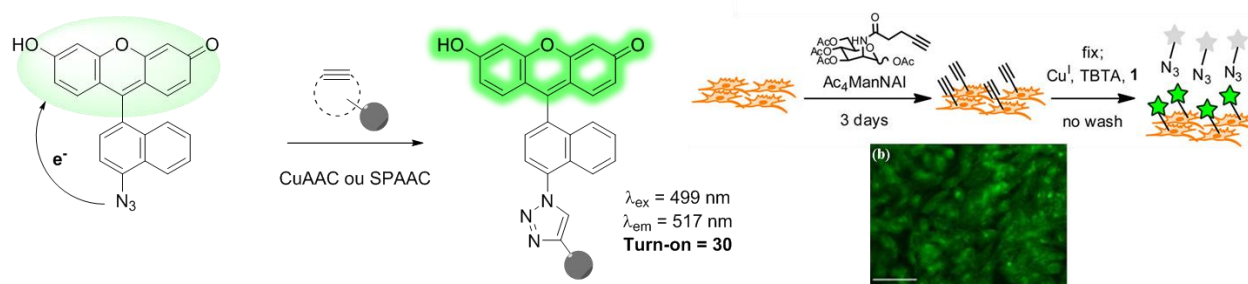


Figure 126 : Sonde PeT fluorescéine-azoture ; Application au marquage de glycoprotéines sur cellules.

Cette sonde s'est montrée particulièrement performante *in vitro*, malgré tout, sa longueur d'onde d'émission n'est pas idéale pour d'autres applications. En modifiant les substituants de l'aryl quencheur, Bertozzi et ses collaborateurs sont parvenus à obtenir un motif ayant un effet PeT effectif sur une plus large variété de fluorophores. Ils ont identifié le 3-azido-4,6-dialcoxy benzène comme groupement polyvalent pour le PeT. Grâce à ce motif, ils ont développé quatre nouvelles sondes pro-fluorescentes balayant un large spectre de longueurs d'onde allant jusqu'au proche infra-rouge (**Figure 127**).¹⁸⁸ Ces sondes sont appelées CalFluors pour Click Activated Luminogenic Fluorophores.

¹⁸⁶ T. Miura, Y. Urano, K. Tanaka, T. Nagano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8666–8671.

¹⁸⁷ P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17428–17431.

¹⁸⁸ P. Shieh, V. T. Dien, B. J. Beahm, J. M. Castellano, T. Wyss-Coray, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7145–7151.

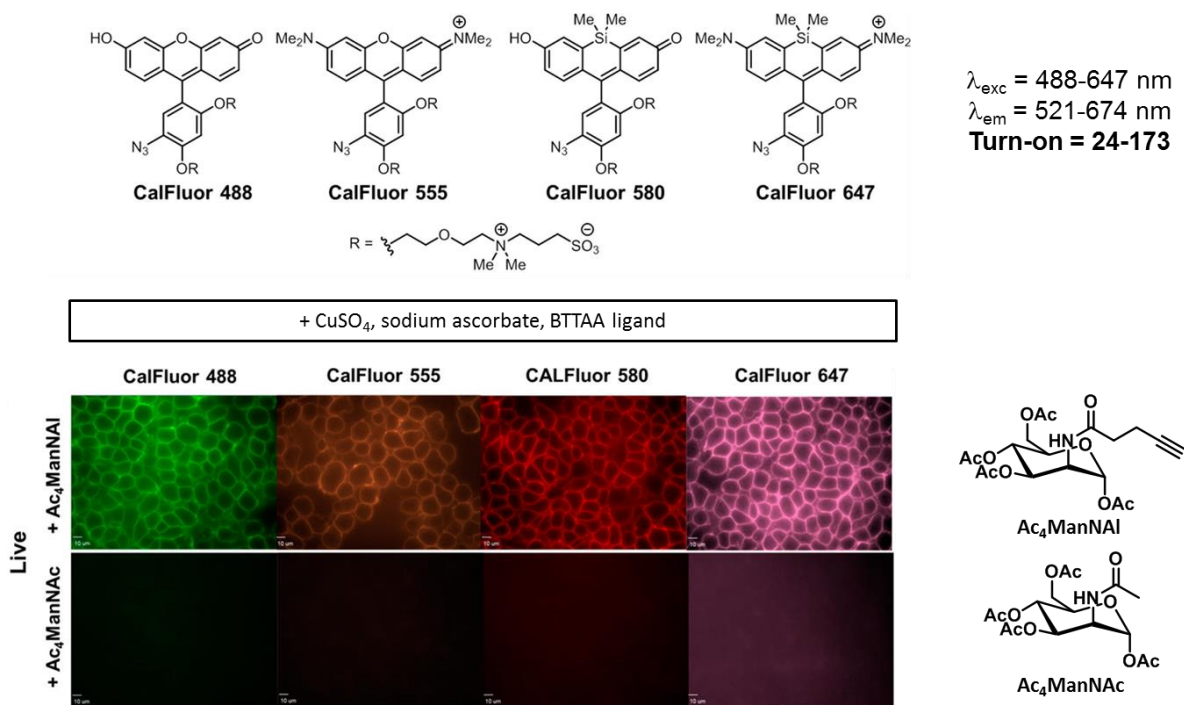


Figure 127 : Sondes PeT CalFluor, Application au marquage de cellules.¹⁸⁸

Ces sondes ont permis le marquage sans lavage de cellules vivantes décorées par des sucres-alcynes. Cette application *in cellulo* a pu être réalisée sans lavage pour retirer l'excédent de sonde, donnant des images peu bruitées avec un protocole peu contraignant. CalFluor 580 a également pu être utilisée *in vivo* pour la visualisation du glycane dans des embryons de poissons-zèbres.

L'effet PeT n'a pas été appliqué qu'aux fluorophores dérivés du xanthène, mais l'a aussi été aux coumarines¹⁸⁹ et aux BODIPYs,¹⁹⁰ entre autres.

3. Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence (FRET)

Le transfert d'énergie par résonance en fluorescence, parfois appelée transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), du nom de son découvreur, est un phénomène qui se produit entre un fluorophore donneur (D) et une entité acceptrice (A) fluorescente ou non.^{191, 192} Lorsque la paire donneur/accepteur est optimale, l'excitation du donneur provoque un transfert d'énergie non radiative vers l'accepteur. Si l'accepteur est un fluorophore, il émet alors un rayonnement à sa longueur d'onde d'émission (**Figure 128**). L'entité acceptrice peut également être un chromophore non fluorescent. Dans ce cas, l'énergie transmise sera dissipée par des processus non radiatifs ; on observera uniquement l'extinction de fluorescence du fluorophore donneur.

L'efficacité de ce phénomène dépend de plusieurs paramètres qui sont : l'intégrale de recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorbance de l'accepteur, la distance spatiale entre les deux partenaires ainsi que leur orientation.

¹⁸⁹ Y. Chen, C. M. Clouthier, K. Tsao, M. Strmiskova, H. Lachance, J. W. Keillor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13785–13788.

¹⁹⁰ J.-J. Shie, Y.-C. Liu, Y.-M. Lee, C. Lim, J.-M. Fang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9953–9961.

¹⁹¹ M.-C. Chirio-Lebrun, M. Prats, *Bioch. Educ.* **1998**, *26*, 320–323.

¹⁹² H. Sahoo, *J. Photoch. Photobio. C* **2011**, *12*, 20–30.

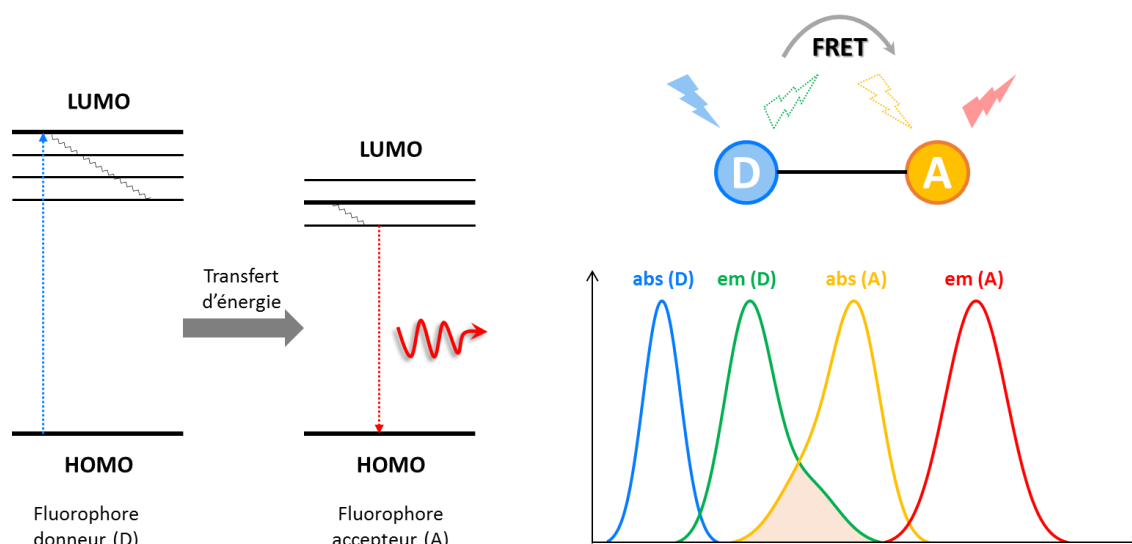


Figure 128 : Principe de l'effet FRET illustré lorsque l'accepteur est un fluorophore.

Le phénomène de FRET a été largement utilisé dans différents domaines dans le but d'obtenir des informations structurales des systèmes étudiés. Cela est particulièrement vrai en biologie où le FRET est un outil employé pour étudier les interactions entre différentes biomolécules ainsi que les changements conformationnels des protéines.¹⁹²

En ce qui concerne l'utilisation du FRET pour la conception de sondes activables pro-fluorescentes, les exemples de sondes utilisant ce phénomène ne sont pas très nombreux.

Le groupe de Bertozzi a développé une autre sonde pro-fluorescente activée par la ligation de Staudinger avec un azoture.¹⁹³ Le fluorophore donneur est une fluorescéine, introduite sur le même noyau aromatique que la phosphine. L'accepteur du système FRET ici est un inhibiteur de fluorescence. Au cours de la ligation de Staudinger avec l'azoture, l'inhibiteur est clivé et ne peut plus jouer le rôle d'accepteur pour la fluorescéine dont la fluorescence est restituée avec un effet turn-on de 160 (Figure 129).

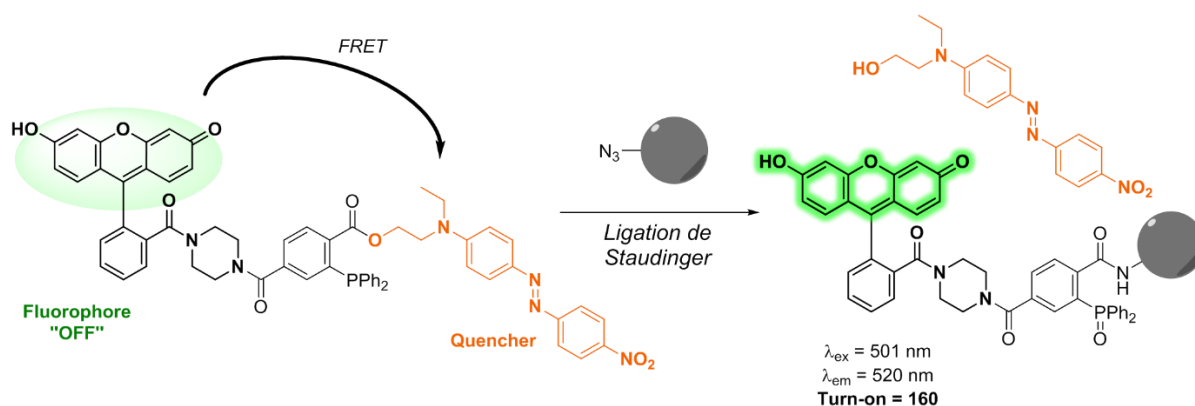


Figure 129 : Sonde activée par l'oxydation de la phosphine au cours de la ligation de Staudinger.

Cette sonde a également été utilisée comme marqueur de glycoprotéines fonctionnalisées par des azotures à la surface des cellules. En comparaison de la sonde activable par ligation de Staudinger précédemment développée par Bertozzi (cf Partie II-I-B-1-Le transfert de charge intramoléculaire (ICT) Autres sondes pro-fluorescentes), cette sonde possède l'avantage d'être toujours inhibée lorsque

¹⁹³ M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2394–2397.

la phosphine s'oxyde spontanément, lui donnant de meilleures facultés pour des applications de marquage.

Au sein de la palette de réactions de la chimie click, la réaction de Diels Alder à demande électronique inverse entre les tétrazines et les alcènes nous offre un partenaire chromophore aux propriétés spectrales intéressantes pour des sondes FRET. En effet, les tétrazines sont des composés dont le maximum d'absorption est aux alentours de 500–525 nm. En 2010, le groupe de Weissleder synthétise des sondes tétrazines liées à différents fluorophores. Comme attendu, les fluorophores possédant une émission entre 400 et 600 nm ont pu être inhibés efficacement, mais pas ceux dont l'émission est hors de cette zone.¹⁹⁴

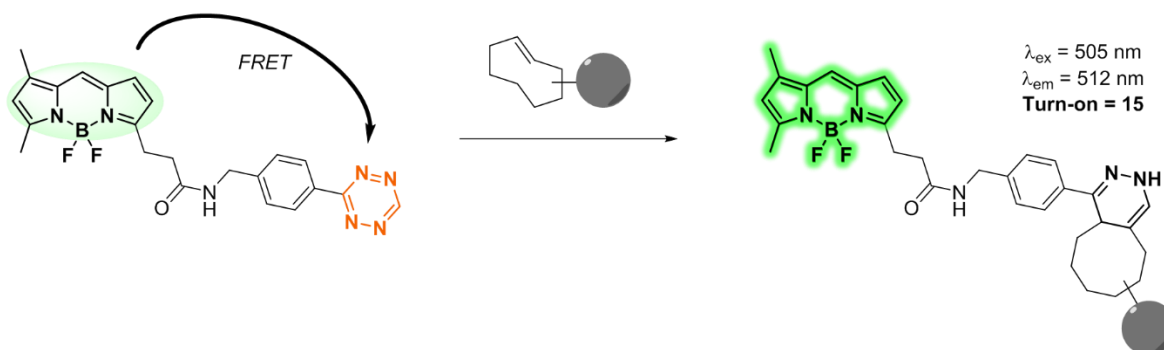


Figure 130 : Sonde FRET BODIPY-tétrazine.

La sonde possédant un BODIPY comme donneur (**Figure 130**) a pu être utilisée *in cellulo* avec comme partenaire un *trans*-cyclooctène fonctionnalisé avec le taxol. L'excellente cinétique de réaction, conjuguée au bon effet turn-on de la sonde ont ainsi permis de visualiser le réseau microtubulaire, cible du taxol, avec des images de haute qualité.¹⁹⁴

Le FRET entre la tétrazine et des fluorophores s'est montré efficace, mais ne concerne qu'une partie restreinte du spectre atteignable en fluorescence. En utilisant un lien plus court et moins flexible entre le fluorophore donneur et la tétrazine, il est possible d'obtenir des extinctions de fluorescence plus efficaces, mais également d'atteindre les zones spectrales hors du domaine d'absorbance de la tétrazine. Cela est dû à un autre effet d'extinction qui s'ajoute au FRET appelé TBET (Through Bond Energy Transfer), ce phénomène ne nécessite pas de recouvrement spectral entre les deux partenaires et a notamment été utilisé pour concevoir des fluorophores présentant de larges pseudo-déplacements de Stokes.^{195, 196}

Les efficacités d'extinction se sont révélées bien meilleures qu'avec l'utilisation seule du FRET. Effectivement, Weissleder et ses collaborateurs montrent qu'avec un espaceur rigide conjugué au BODIPY, il est possible d'avoir des sondes pro-fluorescentes BODIPY-tétrazines avec une exaltation de fluorescence allant jusqu'à 1600.¹⁹⁷ Cette stratégie a également permis aux groupes de Weissleder et

¹⁹⁴ N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2869–2872.

¹⁹⁵ G.-S. Jiao, L. H. Thoresen, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14668–14669.

¹⁹⁶ W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng, J. Song, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 375–379.

¹⁹⁷ J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917–6920.

Devaraj d'obtenir d'excellentes sondes turn-on avec différents fluorophores comme des coumarines,¹⁹⁸ des fluorescéines et rhodamines.¹⁹⁹

Bien plus récemment, l'équipe de Wombacher a synthétisé une série de tétrazines turn-on couvrant une plus grande partie du spectre visible (**Figure 131**).²⁰⁰

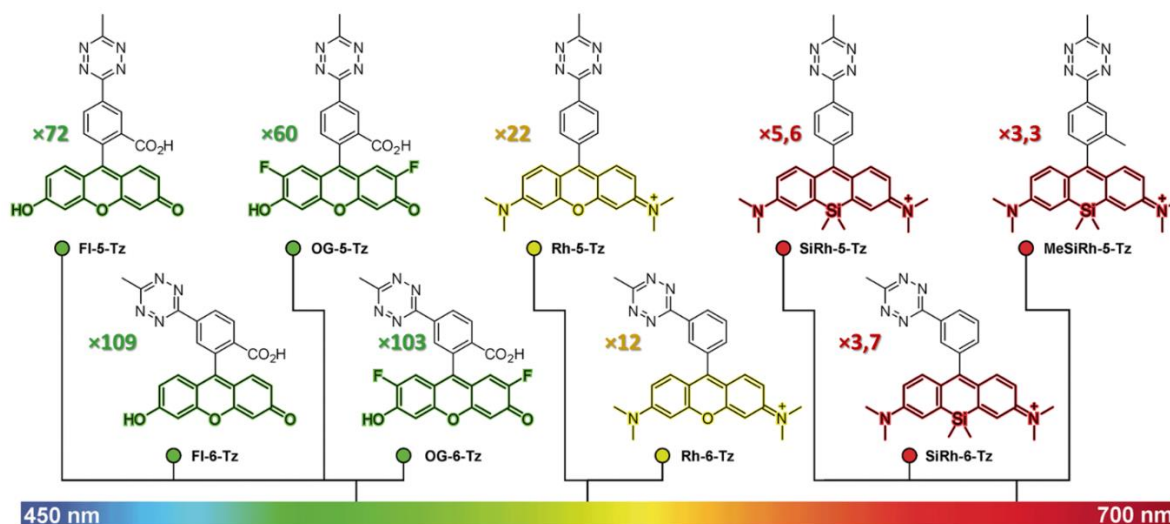


Figure 131 : Gamme de tétrazines pro-fluorescentes mise au point par Wombacher.²⁰⁰

L'efficacité d'extinction de fluorescence diminue en allant vers les plus grandes longueurs d'onde. Malgré des valeurs de turn-on modestes pour les Si-rhodamines, ces composés ont pu être utilisés pour du marquage cellulaire tout en s'affranchissant de lavage. A nouveau l'excellente réactivité de la réaction de click IEDDA permet également une bonne efficacité du marquage en seulement 30 minutes.

4. Autres sondes pro-fluorescentes

Les alcynes sont également des partenaires intéressants pour la conception de sondes pro-fluorescentes. A l'inverse des azotures qui possèdent un doublet non liant permettant d'intervenir dans des phénomènes PeT ou ICT, ou des tétrazines qui peuvent jouer le rôle d'accepteur dans les phénomènes de FRET et de TBET en tant que bons chromophores, ils ne possèdent pas de caractère structural particulier permettant de tels effets.

Néanmoins, de telles sondes ont pu être synthétisées avec succès, mais le mécanisme d'extinction de fluorescence opérant dans ces cas reste difficile à rationaliser. Cependant, par analogie avec les

¹⁹⁸ L. G. Meimetis, J. C. T. Carlson, R. J. Giedt, R. H. Kohler, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7531–7534.

¹⁹⁹ H. Wu, J. Yang, J. Šečutě, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5805–5809.

²⁰⁰ A. Wiczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506–1510.

travaux décrits précédemment, des sondes alcynes coumarine²⁰¹, xanthène²⁰², naphthalimide²⁰³, benzothiazole²⁰⁴, et benzoxadiazole²⁰⁵ ont été synthétisées (**Figure 132**).

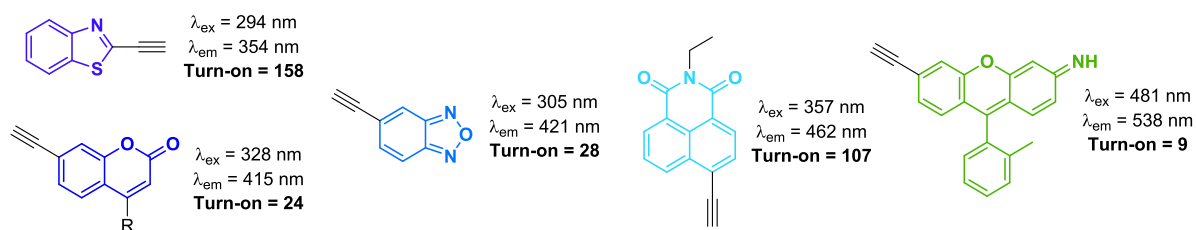


Figure 132 : Sondes pro-fluorescentes alcynes vrais.

Des études sur les alcynes cycliques ont également été menées. Ces derniers ont l'avantage de réagir avec différents dipôles sans métal avec une cinétique de réaction assez confortable pour envisager des applications de marquage. Deux cycloalcynes pro-fluorescents ont été utilisés. Le premier est un dérivé de coumarine nommé coumBARAC, synthétisé par l'équipe de Bertozzi.²⁰⁶ Ce composé montre une augmentation par 9 de l'intensité de fluorescence suite à la réaction avec un azoture (**Figure 133**).

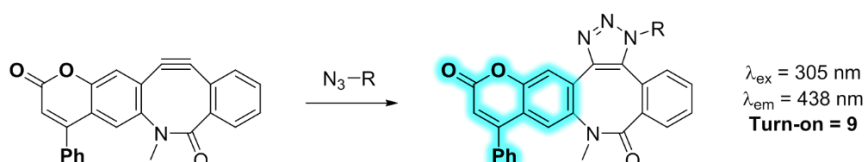


Figure 133 : Réaction entre coumBARAC et les azotures.²⁰⁶

De la même façon le FI-DIBO, un cyclooctyne pro-fluorescent dérivé du DIBO a été synthétisé. La cycloaddition entre cet alcyne et différents dipôles a été étudié. Les divers hétérocycles obtenus sont fluorescents (**Figure 134**).

²⁰¹ Z. Zhou, C. J. Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862–8863.

²⁰² J. Li, M. Hu, S. Q. Yao, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3008–3011.

²⁰³ M. Sawa, T.-L. Hsu, T. Itoh, M. Sugiyama, S. R. Hanson, P. K. Vogt, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 12371–12376.

²⁰⁴ J. Qi, C.-H. Tung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 320–323.

²⁰⁵ J. A. Key, C. W. Cairo, *Dyes Pigments* **2011**, *88*, 95–102.

²⁰⁶ J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937–5939.

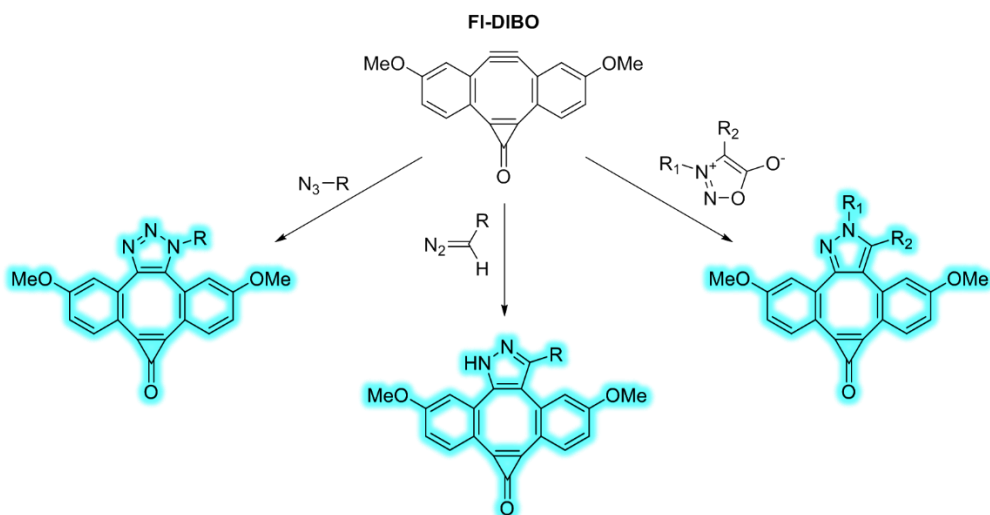


Figure 134 : Réaction du FI-DIBO avec différents dipôles.

La réaction de cycloaddition a été réalisée avec les azotures²⁰⁷, mais également avec des dipôles moins utilisés tels que les diazo²⁰⁸ ou les sydnones,²⁰⁹ donnant les pyrazoles associés. Le FI-DIBO induit une exaltation de fluorescence comprise entre 60 et 235 avec ces différents dipôles. Il s'agit de la première utilisation des sydnones en tant que partenaire d'une réaction produisant une exaltation de fluorescence.

Très récemment, les sydnones ont à nouveau été utilisées dans ce but, mais cette fois en tant que porteur des groupements apportant la fluorescence. La réaction exploitée dans ce cas est appelée SAP, pour sydnone-alkene photoclick chemistry. Elle consiste en un réarrangement photoinduit permettant d'obtenir un intermédiaire nitrile-imine qui va faire une cycloaddition [3+2] avec un alcène.

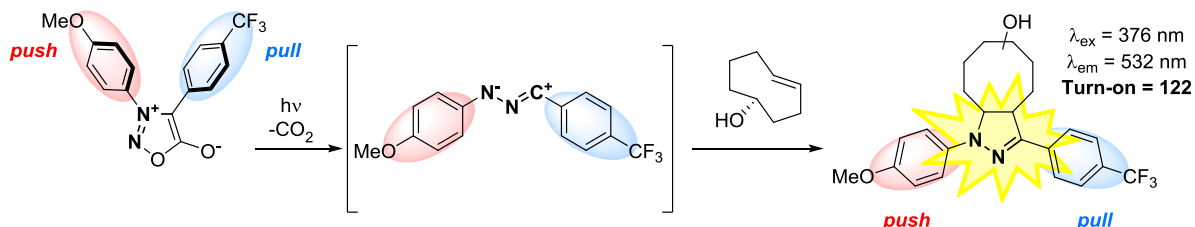


Figure 135 : Sonde pro-fluorescente diaryl-sydnone.²¹⁰

En utilisant un substituant électrodonneur en position 3 et un substituant électroattracteur en position 4, l'équipe de Yu est parvenue à créer un fluorophore push-pull après la réaction de SAP produisant un turn-on de 122 (**Figure 135**).²¹⁰ La diaryl-sydnone de départ n'est pas fluorescente à cause de l'orientation des deux aryls. Les auteurs ont utilisé cette diaryl-sydnone pour le marquage fluorescent de protéines modifiées par un trans-cyclooctène ; la durée d'irradiation utilisée est de seulement 2 minutes à 311 nm.

²⁰⁷ F. Friscourt, C. J. Fahrni, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809–18815.

²⁰⁸ F. Friscourt, C. J. Fahrni, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 13996–14001.

²⁰⁹ C. Favre, L. de Cremoux, J. Badaut, F. Friscourt, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 2058–2066.

²¹⁰ L. Zhang, X. Zhang, Z. Yao, S. Jiang, J. Deng, B. Li, Z. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 7390–7394.

II. Synthèse d'iminosydnonnes pro-fluorescentes

L'utilisation des composés mésoioniques pour la conception de sondes pro-fluorescentes est très récente et n'a été que peu décrite.^{209, 210} Ces dernières années, le laboratoire a développé plusieurs sondes pro-fluorescentes utilisant les sydnones et a étudié leur propension à réagir avec les alcynes (CuSAC et SPSAC).

Les iminosydnonnes possèdent une structure et des propriétés proches des sydnones mais elles présentent un site de fonctionnalisation supplémentaire. Nous avons ainsi envisagé la conception de sondes iminosydnonnes utilisant les mécanismes d'extinction de fluorescence que nous avons décrits pour les sydnones en prenant l'opportunité de la position N₆ pour imaginer de nouvelles sondes. Cette position supplémentaire nous permet également d'imaginer l'emploi simultané de différents phénomènes d'extinction afin de concevoir de sondes à multiples turn-on pouvant donner plusieurs informations après activation.²¹¹

Nous avons élaboré trois types d'iminosydnonnes libérant de la fluorescence après addition d'un cycloalcyne : celles substituées sur le cycle aromatique en position N₃, celles substituées en position N₆ et des iminosydnonnes combinant les deux substitutions (**Figure 136**).

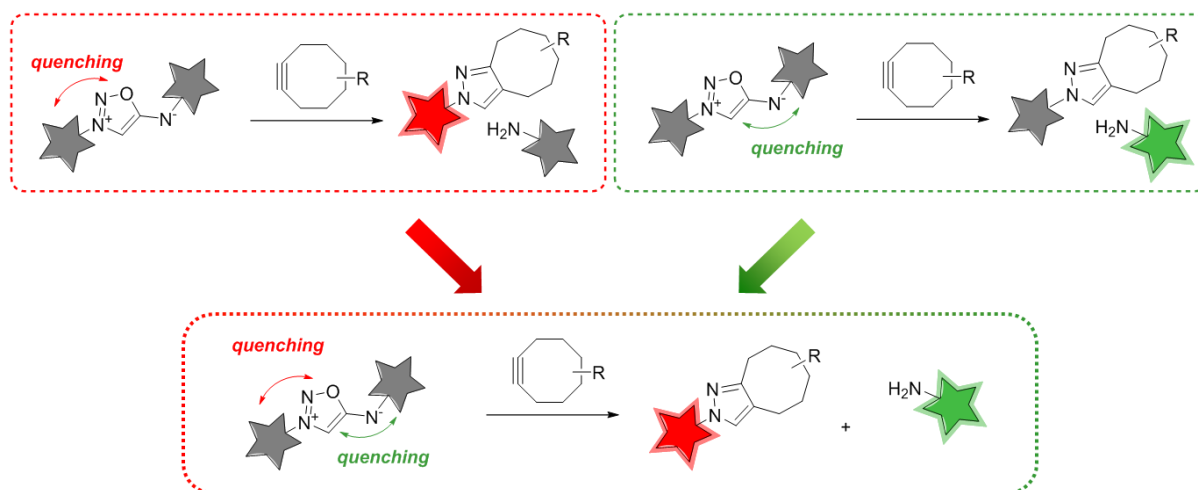


Figure 136 : Stratégie de sondes iminosydnonnes pro-fluorescentes activées par les cycloalcynes.

²¹¹ L. He, B. Dong, Y. Liu, W. Lin, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 6449–6461.

A. Synthèse de sondes iminosydnones pro-fluorescentes exploitant le phénomène ICT

1. Résultats antécédents du laboratoire sur le phénomène ICT et les sydnones²¹²

Récemment, le laboratoire a développé des sondes pro-fluorescentes comportant un noyau sydnone et utilisant la haute réactivité de ces dipôles avec les cycloalcynes pour l'activation de ces sondes. L'intérêt de ces sondes repose sur l'hypothèse que la transformation de la sydnone en pyrazole pourrait induire une réorganisation de la densité électronique. La sydnone possède des propriétés plutôt électroattractrices tandis que le pyrazole issu de la réaction de SPSAC est un substituant donneur d'électrons. Il se produit ainsi un changement dans la polarité de la sonde lors de la réaction pouvant mener à un effet ICT et donc à l'émission de fluorescence.

A cet égard, une librairie de 13 sydnones pro-fluorescentes substituées soit en position N₃, soit en position C₄ a été synthétisée au laboratoire (**Figure 137**). Les propriétés optiques de ces produits ainsi que des pyrazoles issus de la cycloaddition avec le BCN ont été évaluées.

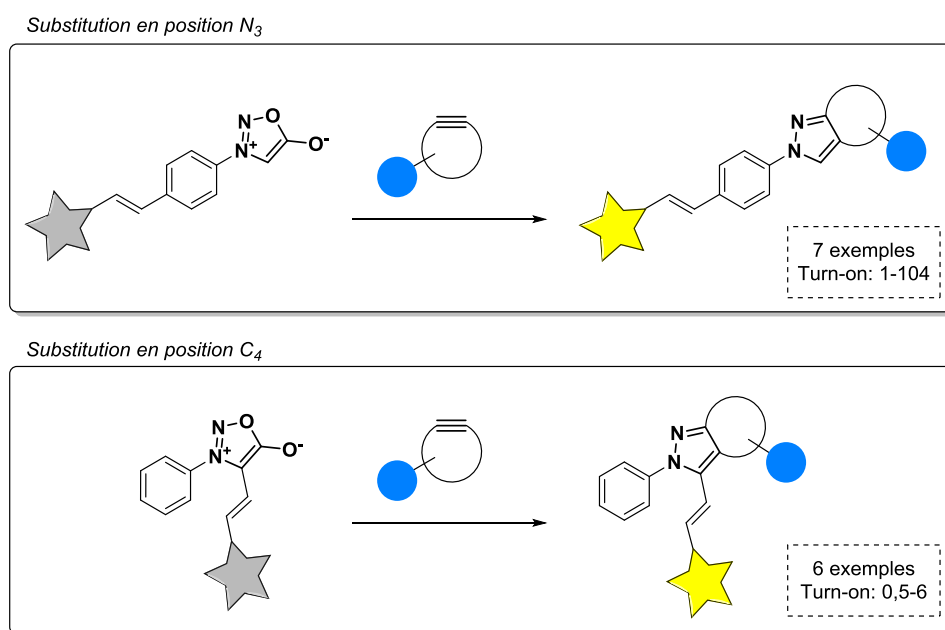


Figure 137 : Librairie de sydnones pro-fluorescentes synthétisées au laboratoire.

Parmi les différentes sydnones testées celles donnant les meilleurs résultats comportent un noyau pyridinium relié à la sydnone par une ou deux doubles liaisons. Les pyrazoles associés possèdent une émission située au-delà de 500 nm et des fluorescences bien supérieures aux sydnones de départ (environ 70x). La réaction avec l'alcyne cyclique DIBAC est rapide ($k > 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Ces sondes ont ainsi pu être utilisées avec succès en imagerie cellulaire et ont montré un rapport signal sur bruit convenable (**Figure 138**).

²¹² L. Plougastel, Développement de la cycloaddition entre les sydnones et les alcynes tendus pour des applications en bioconjugaison, Thèse de doctorat, Paris Saclay, 2016.

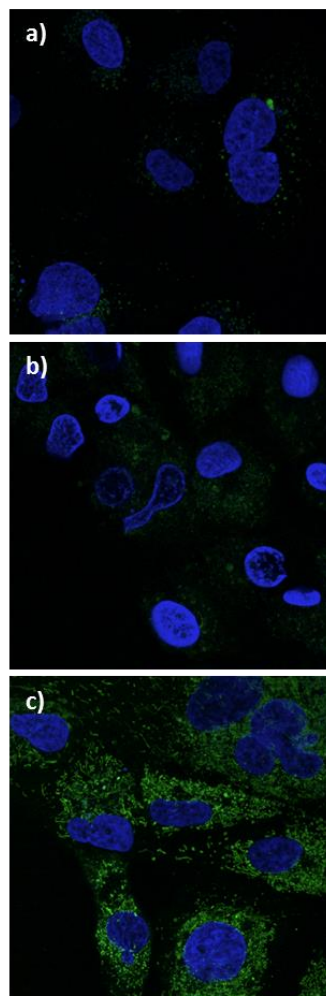
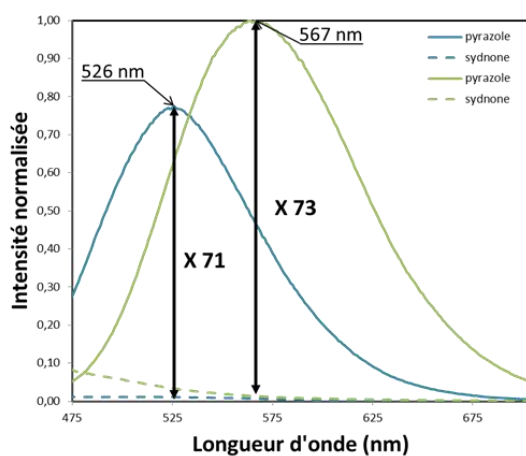
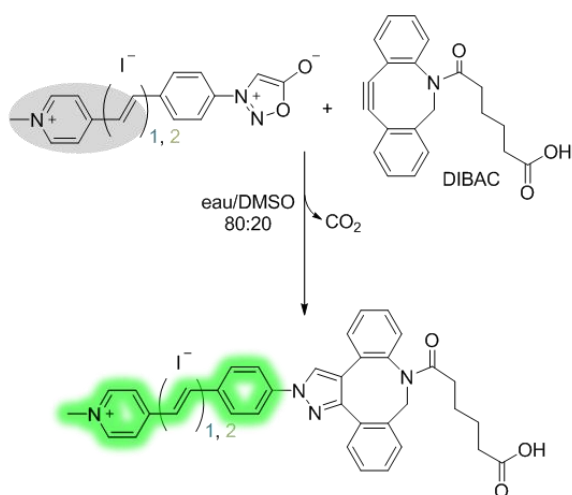


Figure 138 : Sondes pro-fluorescentes sydnones-pyridiniums, utilisation en imagerie cellulaire ; a) cellules seules ; b) cellules + sonde n=2 ; c) cellules + sonde n=2 + BCN.

De façon intéressante la position du pro-fluorophore sur le squelette sydnone a une très grande importance sur l'efficacité du turn-on de fluorescence suite à la réaction avec les alcynes cycliques. Les sondes les plus prometteuses sont celles substituées sur l'aryl en position N₃. Il s'agit donc de la stratégie que nous avons suivie pour la conception d'iminosydnones pro-fluorescentes basées sur un effet ICT. On peut noter que le pyrazole issu de la réaction de click avec les cycloalcynes est le même pour les sydnones et les iminosydnones. Les propriétés optiques post réaction de click nous sont ainsi déjà connues, il nous faut donc particulièrement évaluer les propriétés des iminosydnones associées.

2. Synthèse de sondes iminosydrones pro-fluorescentes substituées sur l'aryle en position N₃

Pour notre étude sur les sondes iminosydrones pro-fluorescentes par effet ICT, nous nous sommes basés sur les résultats obtenus précédemment avec les sydnones. Nous avons donc utilisé uniquement la position N₃ et étudié l'influence de quatre différents substituants **F1–5** (**Figure 139**). Une méthode de choix pour obtenir un décalage vers le rouge des longueurs d'onde d'excitation et d'émission d'un fluorophore est d'accroître la taille de son système conjugué. Nous avons donc envisagé à la fois l'utilisation d'un bras diéthylénique et l'introduction du noyau quinolinium **F5**, décrit pour son efficacité à obtenir des effets bathochromes.^{213, 214} Pour cela nous avons utilisé deux précurseurs iminosydrones dont l'azote N₆ est protégé par un groupement Boc dont nous avons décrit la synthèse précédemment (cf Partie I).

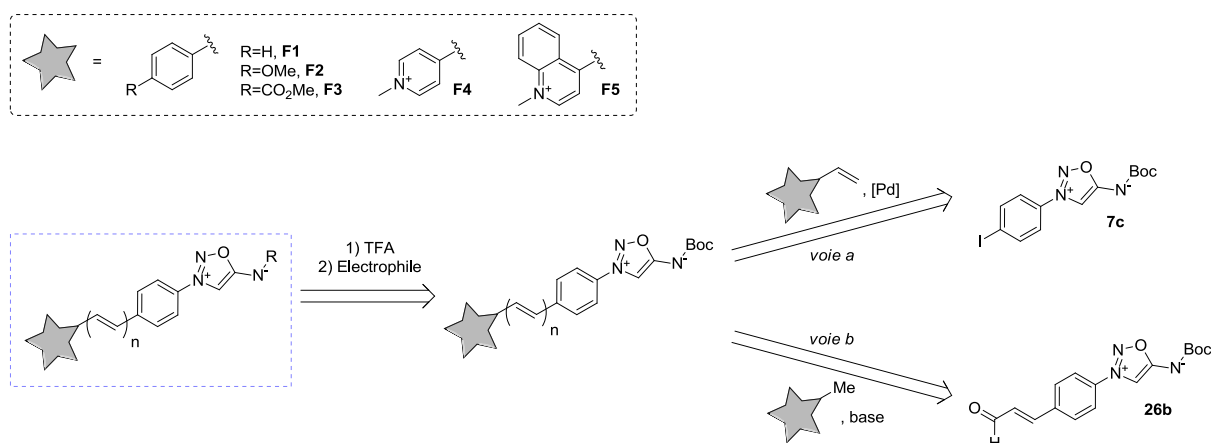


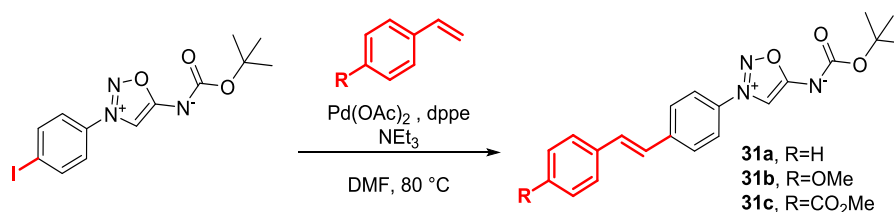
Figure 139 : Stratégies utilisées pour obtenir des iminosydrones pro-fluorescentes substituées sur l'azote N₃.

Nous avons souhaité introduire des groupements styryls possédant des substituants avec différentes propriétés électroniques. Pour cela, nous avons envisagé deux voies synthétiques : un couplage de Heck avec les styrènes correspondants **F1–3** selon la voie a ou une réaction de Knoevenagel à partir de sydnone possédant une fonction aldéhyde en position para du cycle aromatique selon la voie b.

²¹³ A. S. Brown, L.-M. Bernal, T. L. Micotto, E. L. Smith, J. N. Wilson, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2142–2148.

²¹⁴ G. B. Cserép, K. N. Enyedi, A. Demeter, G. Mező, P. Kele, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 494–502.

Nous avons dans un premier temps travaillé sur la voie a en menant une optimisation concernant l'addition de l'iminosydnone dans le milieu réactionnel (**Tableau 7**).



Entrée	R	Temps d'addition (h)	Rendement isolé (%)
1	H	2	77
2	H	4	32
3	H	12	39
4	OMe	2	30
5	CO ₂ Me	2	33
6	CO ₂ Me	12	41

Tableau 7 : Optimisation des conditions de la réaction de Heck avec 3 styrènes.

Nous avons utilisé un système catalytique classique avec du palladium (II) acétate comme précurseur de palladium (0), et de la 1,2-bis(diphénylphosphino)éthane (dppe) comme ligand bidentate. Afin de prévenir l'activation de la position C₄ et la formation d'oligomères d'iminosydnones, nous utilisons des conditions d'ajout lent de l'iminosydnone ainsi qu'un excès de styrène (5 équivalents).

La durée optimale d'ajout de l'iminosydnone a été déterminée dans un premier temps pour la réaction avec le styrène (**Entrées 1–3**). Nous n'avons pas détecté de produits d'oligomérisation pour cette réaction. En revanche, les réactions avec un plus long temps d'addition ont mené à de nombreux sous-produits, généralement fluorescents, rendant l'isolation du produit **31a** délicate et donnant des rendements inférieurs aux 77% obtenus pour une durée d'addition de 2h.

Nous avons dans un second temps appliqué ces conditions avec les deux autres styrènes sélectionnés (**Entrées 4–5**). Nous pouvons ainsi obtenir les iminosydnones possédant un groupement électrodonneur **31b** et un groupement électroattracteur **31c** avec des rendements de 30 et 33%. Pour la réaction avec le méthyl 4-formylbenzoate (**Entrée 5**), nous pouvons détecter des oligomères, une addition pendant un temps plus long (**Entrée 6**) a permis d'obtenir un meilleur rendement de 41% mais celui-ci reste modeste. En effet, la réaction n'atteint pas la conversion totale et un plus fort chauffage ou un temps de réaction plus long ne mènent qu'à une érosion du rendement.

Nous avons pu ainsi obtenir des iminosydnones portant un groupement styryl **31a–c**. La réaction de Heck s'est montrée compatible avec le squelette iminosydnone, mais de nombreux sous-produits réactionnels rendent la purification ardue. Ce couplage n'est pas la méthode à privilégier pour introduire de nouveaux substituants sur cette position.

Ces iminosydnones possèdent en position N₆ un groupement Boc, qu'il est possible de cliver pour introduire une nouvelle substitution. Pour en attester, nous avons introduit différents groupements sur cette position (**Figure 140**). Ceux-ci peuvent moduler la réactivité de l'iminosydnone avec les cycloalcynes, leur impact sur l'effet ICT que nous recherchons reste cependant à démontrer.

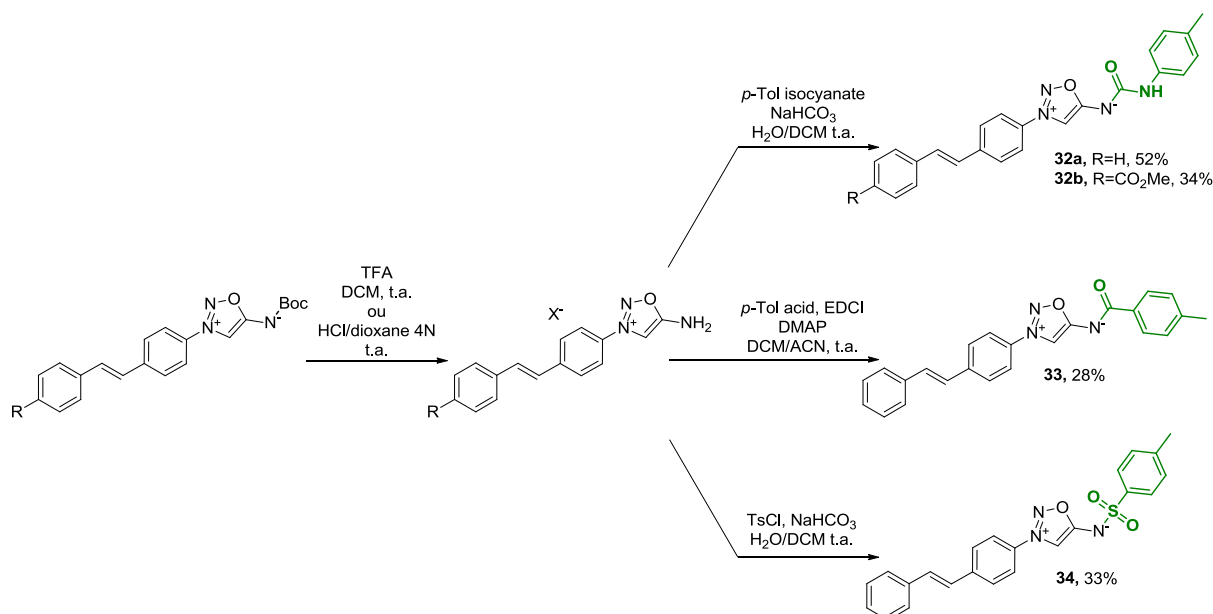


Figure 140 : Fonctionnalisation en N₆ des styryl-iminosydones. Rendements sur deux étapes.

Après déprotection de l'azote N₆ soit par du TFA, soit par de l'acide chlorhydrique, nous avons fait réagir les sels résultants avec plusieurs électrophiles comme décrit dans le Chapitre 1. Nous avons pu obtenir les urées **32a** et **32b** avec des rendements de 52 et 34%. L'amide **33** et le sulfonamide **34** ont été obtenus avec des rendements cohérents à ceux obtenus précédemment sur des iminosydones plus simples.

Concernant l'utilisation des substituants pyridinium et quinolinium **F4–5**, l'accès à ces dérivés a été imaginé par une condensation de type Knoevenagel entre l'iminosydone aldéhyde et le picolinium/méthyl-quinolinium (Figure 141).

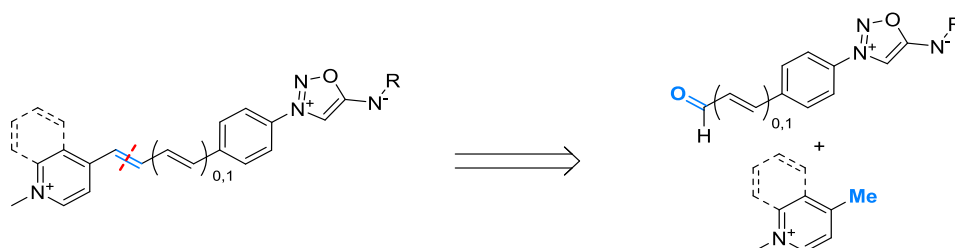


Figure 141 : Approche envisagée pour la formation d'iminosydones pyridinium et quinolinium.

Pour l'utilisation du substituant pyridinium **F4**, nous avons opté pour la synthèse de l'iminosydone portant deux double liaisons conjuguant l'aryl et le pyridinium puisqu'il a été montré antérieurement que les propriétés optiques du pyrazole en découlant étaient meilleures en intensité ainsi qu'en longueur d'onde d'émission (Figure 138).

L'intermédiaire clé pour obtenir cette iminosydone pyridinium comportant un lien diéthylénique est un aldéhyde α - β insaturé sur lequel il est possible d'effectuer une condensation de type Knoevenagel avec un picolinium. L'obtention du picolinium **35** par alkylation de la 4-picoline avec l'iodure de méthyle est une procédure éprouvée, fiable et déjà reportée.²¹⁵

²¹⁵ M. Busi, B. Cantadori, F. Boccini, R. D. Zorzi, S. Geremia, E. Dalcanale, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 2629–2642.

En ce qui concerne l'aldéhyde **26b**, nous avons d'abord expérimenté une homologation de l'aldéhyde **26l** (**Figure 142**) dont la synthèse a été décrite précédemment dans le Chapitre 1.

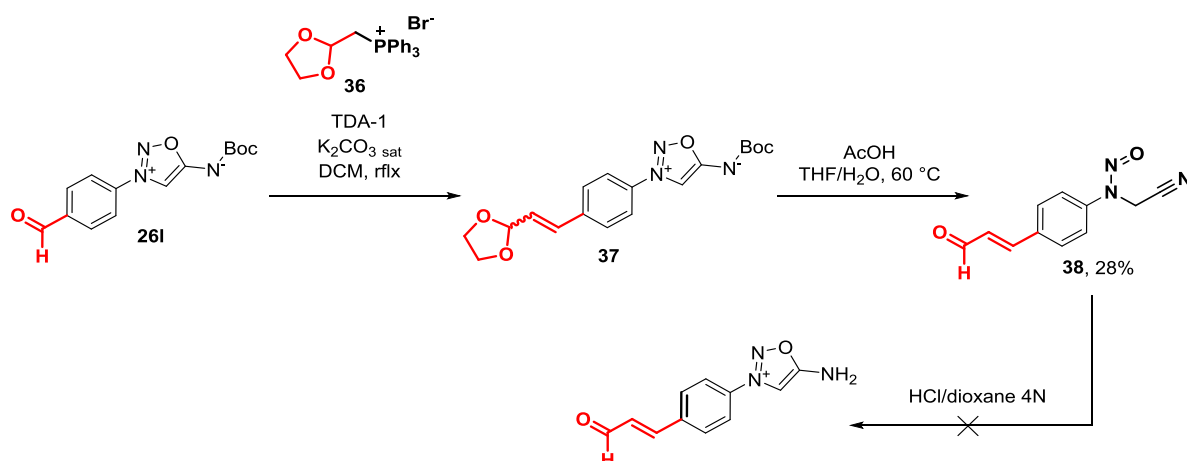


Figure 142 : Tentative de synthèse d'une iminosynone aldéhyde α - β insaturée.

La première étape est une réaction de Wittig entre l'iminosynone aldéhyde et l'ylure de phosphore généré à partir du phosphonium **36**. La réaction est effectuée en milieu biphasique en utilisant la tris(méthoxyéthoxyéthyl)amine (TDA-1) comme agent de transfert de phase et chélatant du potassium selon un protocole utilisé dans la littérature pour l'emploi de ce phosphonium.²¹⁶ Elle donne accès à l'acétal désiré dans un mélange Z/E de ratio 1:0,7. Nous utilisons ensuite des conditions douces de déprotection de l'acétal et d'isomérisation simultanée dont l'efficacité a été montrés dans le laboratoire sur les sydnones. Dans notre cas, elles aboutissent également au clivage du groupement Boc et à l'ouverture du noyau iminosynone conduisant à la nitrosamine **38** avec un rendement de 28% après purification. Les essais de reformation de l'iminosynone à partir de cet intermédiaire ont échoué, probablement à cause du caractère électro attracteur de l'aldéhyde.

A la suite de cette expérience, nous avons décidé d'utiliser une stratégie de couplage pallado-catalysé avec les dérivés d'acroléine décrite dans le Chapitre 1 (I-C-Fonctionnalisation de l'aryl en position N₃). Le couplage de Suzuki avec l'acétal dérivé du pinacol borane correspondant suivi de l'hydrolyse acide permet l'obtention du synthon-clé aldéhyde **26b** avec succès.

Cet aldéhyde été engagé avec le picolinium **35** dans la condensation catalysée à la pipéridine pour donner le produit **6** avec un rendement de 39% (**Figure 143**). Contrairement à l'analogue sydnone, ce sel est soluble dans différents solvants organiques et ne peut pas être obtenu propre par simple précipitation. Il est néanmoins possible de le purifier par colonne de chromatographie en phase normale en utilisant l'alumine comme phase stationnaire.

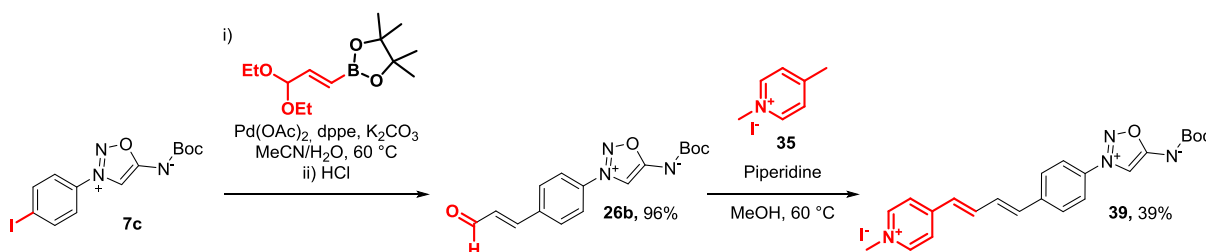


Figure 143 : Rappel concernant l'obtention de l'iminosynone-aldéhyde **26b**.
Condensation entre l'iminosynone **26b** et le picolinium.

²¹⁶ N. Daubresse, C. Francesch, C. Rolando, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10761–10770.

La condensation avec le quinolinium s'est révélée bien moins favorable qu'avec le pyridinium (**Figure 144**). L'utilisation de l'aldéhyde benzylique qui présente un moins grand défi ne permet pas d'obtenir le produit. Nous avons également essayé de favoriser la précipitation du produit en utilisant une iminosydnone-urée **40**, dont la solubilité est bien moindre en comparaison des dérivés N-Boc. Mais dans ce cas il ne nous a pas non plus été possible d'obtenir le produit désiré. La grande difficulté de purification de ces composés et la relative instabilité des aldéhydes utilisés sont les causes principales de cet échec.

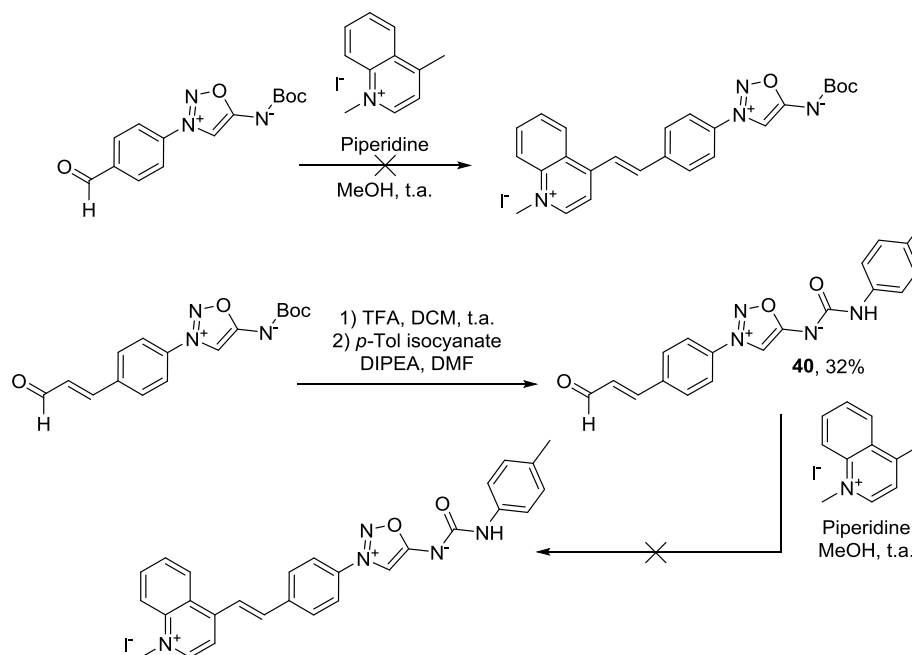


Figure 144 : Tentatives d'obtention d'une iminosydnone portant un quinolinium.

En somme, nous avons pu introduire 4 groupements conjugués **F1–4** sur l'aryl de la position N₃ des iminosydnones. Nous avons également post-fonctionnalisé la position N₆ de ces sondes et avons obtenu une librairie de 8 molécules s'appuyant sur un effet ICT dont les propriétés optiques doivent être évaluées (**Figure 145**).

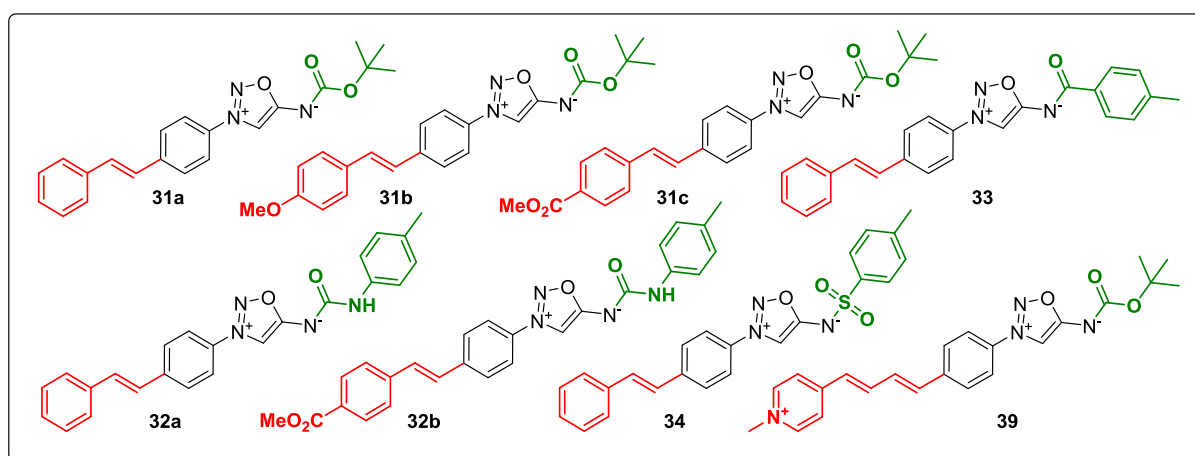


Figure 145 : Bilan sur la librairie de sondes iminosydnones synthétisée dont la conception repose sur l'effet ICT.

B. Synthèse de sondes iminosydnones pro-fluorescentes exploitant le phénomène PeT

1. Résultats antécédents du laboratoire sur le phénomène PeT et les sydnones²¹⁷

Des travaux antécédents du laboratoire ont été portés sur l'utilisation du squelette sydnone en tant que récepteur PeT. Le système électronique du noyau sydnone n'étant pas conjugué avec celui d'un noyau aromatique branché en position N₃, il est possible d'imaginer sa participation à un effet PeT avec des fluorophores, d'autant plus que les sydnones sont sensibles à l'oxydo-réduction²¹⁸. Le choix du système aromatique pro-fluorescent s'est rapidement tourné vers le squelette coumarine. Des calculs orbitaux des HOMOs et LUMOs de la coumarine et de la sydnone ont en effet montré que le transfert d'électrons de l'un vers l'autre était possible stimulant les travaux de recherche sur différentes coumarines-sydnones au sein du laboratoire. Le but de cette étude est d'obtenir une sonde sydnone non fluorescente qui émet un signal après réaction avec un alcyne terminal ou cyclique.

Dans ce but, une librairie de 12 sydnones-coumarine a été synthétisée au laboratoire. Une stratégie de criblage employant la CuSAC et la SPSAC a été utilisée pour trouver les combinaisons idéales entre les coumarines-sydnones et les alcynes (**Figure 146**).

²¹⁷ a) E. Decuypere, Etudes de réactions de cycloadditions [3+2] impliquant des composés mésoioniques et des dipolarophiles, Thèse de doctorat, Paris Saclay, **2016** ; b) E. Decuypère, M. Riomet, A. Sallustrau, S. Bregant, R. Thai, G. Pieters, G. Clavier, D. Audisio, F. Taran, *ChemCom* **2018**, *54*, 10758-10761.

²¹⁸ R. J. Mascarenhas, Y. Shivaraj, B. S. Sherigara, K. M. Mahadevan, B. Kalluraya, *Russ. J. Electrochem+* **2006**, *42*, 776–781.

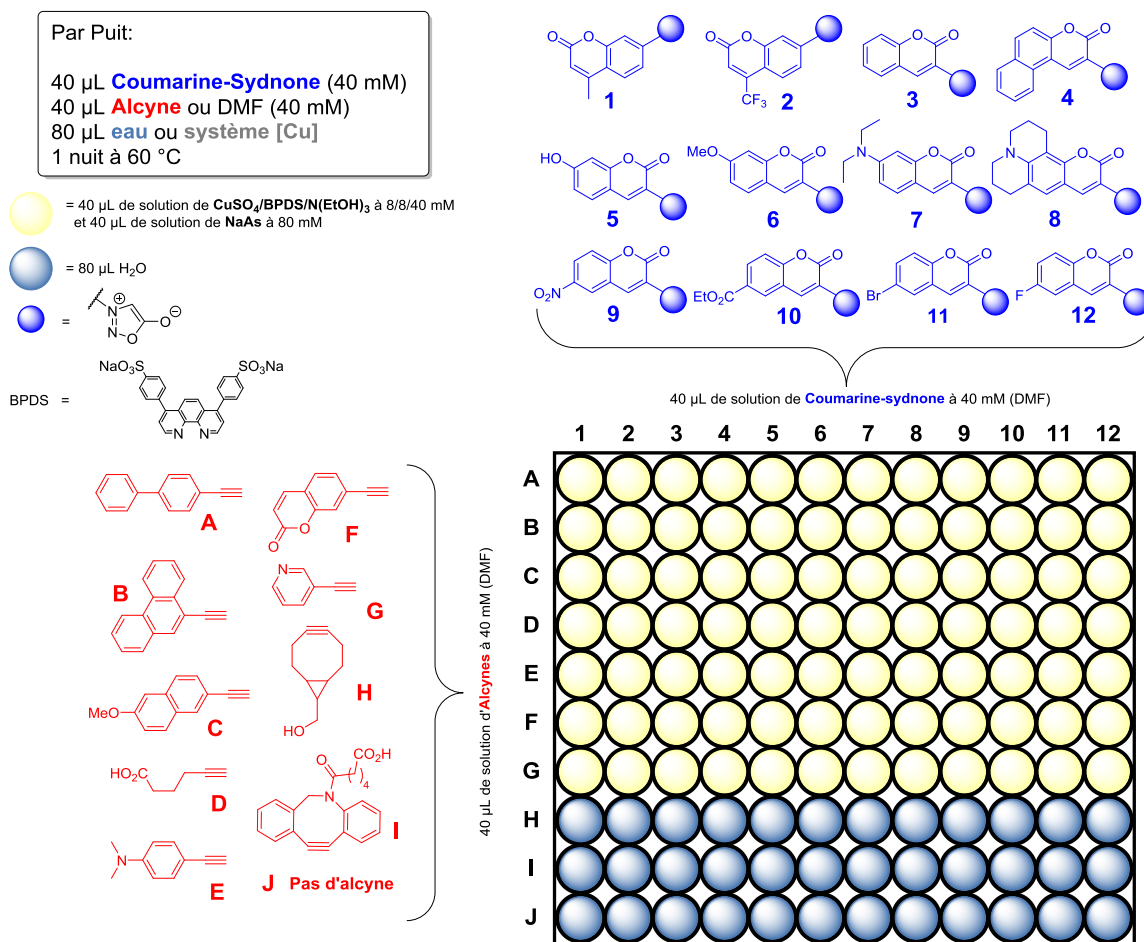


Figure 146 : Criblage effectué entre les alcyne et les coumarines-sydnones.

En comparant les intensités de fluorescence des milieux réactionnels (lignes A–I) avec les sydnones seules (ligne J), il a été facile de déterminer les meilleures combinaisons, c'est-à-dire celles provoquant la plus forte augmentation du signal fluorescent (**Figure 147a**). Celle-ci est due à la fois à l'effet turn-on mais également à la conversion de la réaction puisque l'émission de fluorescence observée dépend à la fois du rendement quantique/de la brillance du pyrazole et aussi de sa concentration. Un contrôle systématique par LC/MS de chaque réaction a montré que dans presque tous les cas la conversion était supérieure à 80%. Pour la réaction de CuSAC, seul l'alcyne hexynoïque **D** a formé des produits intéressants, tandis que pour la réaction SPSAC les cycloalcyne **H** et **I** ont tous les deux conduit aux plus fortes augmentation de fluorescence. Les sydnones-coumarines **4–8** sont les plus efficaces en termes d'exaltation de fluorescence. Les pyrazoles correspondants possèdent leur maximum d'émission sur une gamme de longueurs d'ondes comprises entre 430 et 520 nm.

Les meilleures combinaisons identifiées lors du criblage ont été reproduites à plus grande échelle afin d'isoler les produits pyrazole correspondant (**Figure 147b**) dont les propriétés photophysiques ont été scrupuleusement établies.

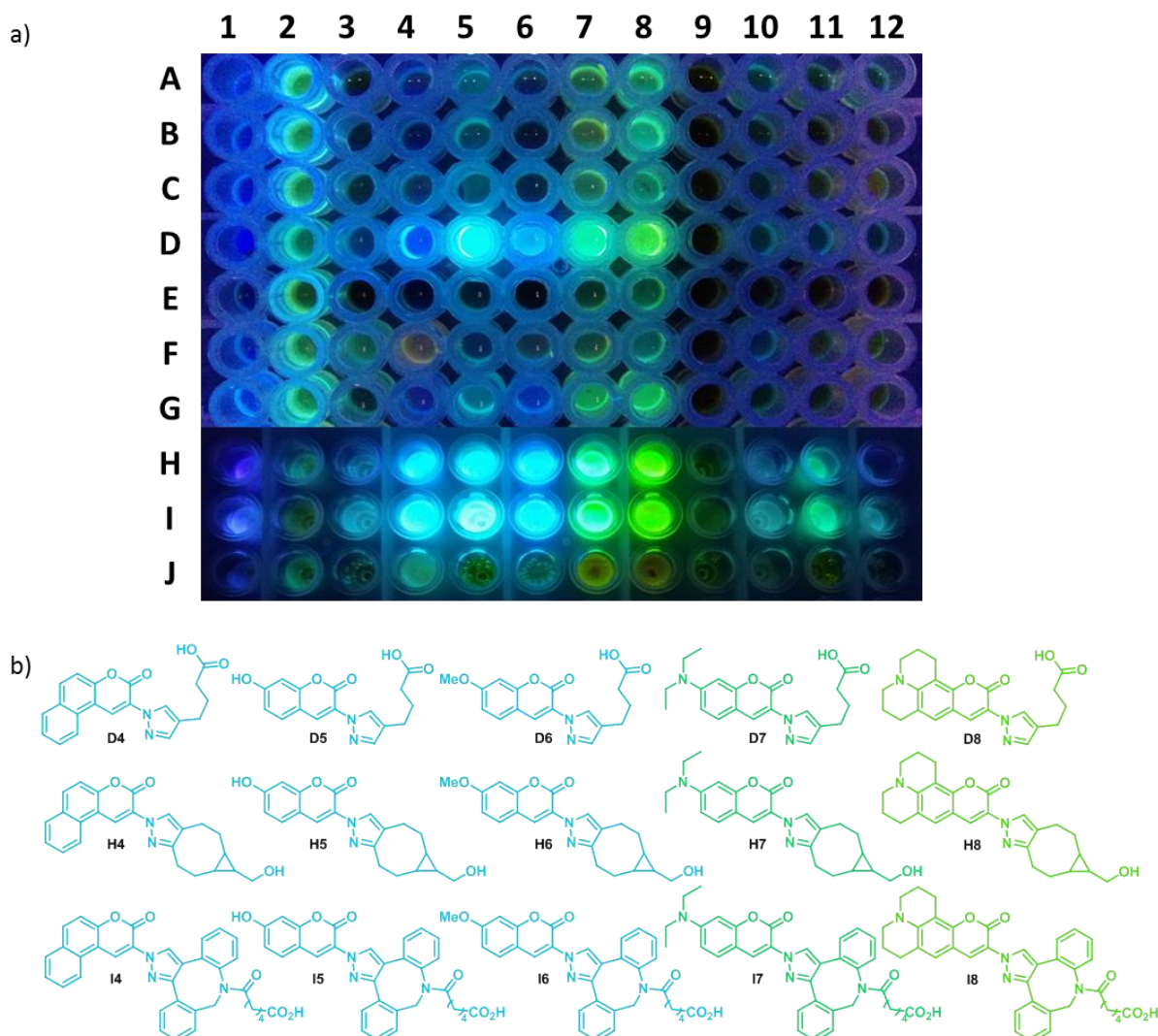


Figure 147 : Résultats du criblage ; a) Lecture des plaques de criblage après excitation à 220 nm ;
 b) Structures des produits résultant des meilleures combinaisons sydnone/alcyne.

Les coumarines-sydnones **5**, **7** et **8** ont été utilisées pour le marquage de protéines modifiées. Malheureusement, la réaction de CuSAC entre ces sydnones et une protéine portant un alcyne terminal ne s'est pas montrée biocompatible puisqu'une forte dégradation de la protéine a été observée. En revanche, ces sondes se sont révélées efficaces pour le marquage de protéines modifiées par un alcyne cyclique (DBCO). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la sydnone **8** qui provoque une augmentation du signal fluorescent à 515 nm d'un facteur x 131 après réaction sur la Myoglobine dérivatisée par le DBCO. La sydnone **8** a permis également de détecter sélectivement cette protéine lorsqu'elle a été mélangée dans du lysat cellulaire contenant des centaines d'autres protéines.

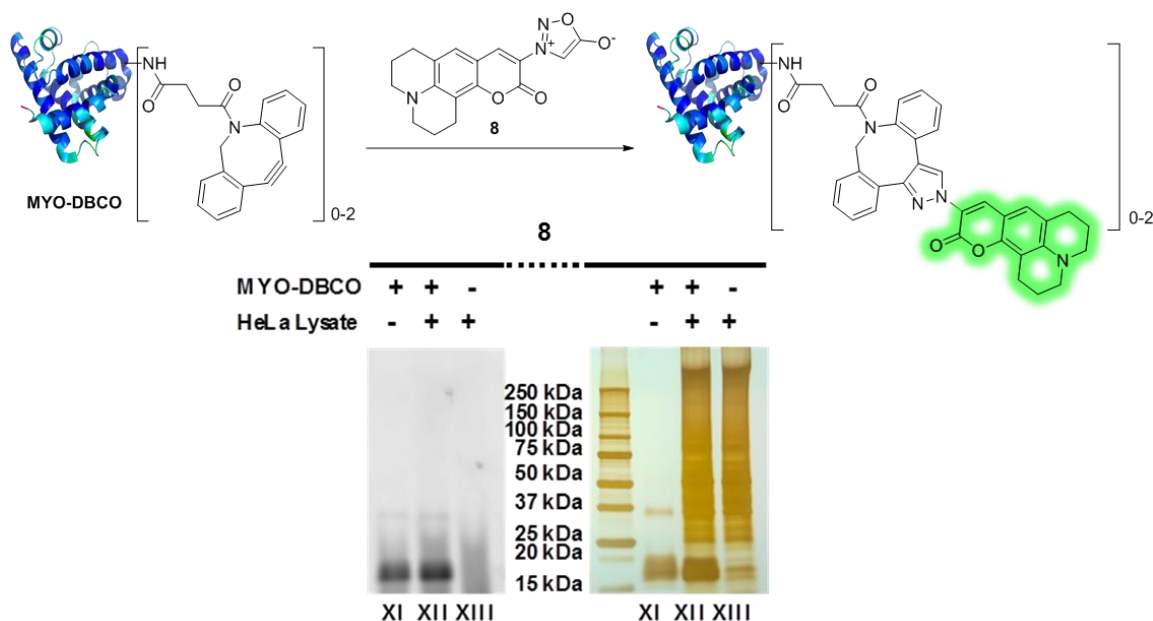


Figure 148 : Application des coumarines-sydnone au marquage de protéines ; Analyse SDS-PAGE, à gauche imagerie de fluorescence du gel, à droite, révélation au nitrate d'argent.

Ces résultats nous confirment que les sydnone peuvent éteindre la fluorescence de certains fluorophores. La nature de cette extinction n'est pas totalement claire à ce jour, en effet si des expériences de voltampérométrie cyclique semblent confirmer la possibilité d'un effet PeT, des calculs réalisés sur la sonde **8** semblent plutôt montrer un effet géométrique de cette sydnone à l'origine de désintégration non radiative de son état excité.

Ces expériences nous ont néanmoins permis d'imaginer l'emploi des iminosydnone en tant qu'inhibiteurs de fluorescence de différents fluorophores, possiblement par des phénomènes de PeT. Nous allons donc utiliser la position N₆, spécifique des iminosydnone pour explorer les possibilités d'inhibition de fluorescence de plusieurs entités par effet PeT.

2. Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes substituées sur l'aryle en position N₆

Afin d'étudier les capacités des iminosydnone à éteindre la fluorescence à travers l'espace, nous avons envisagé de lier différents fluorophores **P1-6** (Figure 149) sur la position N₆ des iminosydnone. Nous avons sélectionné ces différents fluorophores selon deux critères : la variété de leurs propriétés optiques et leur facilité d'accès.

Nous avons considéré les motifs coumarine **P1**, diméthyl-aminonaphtyl **P2** et naphthalimide **P3** dont les structures assez simples devraient faciliter la synthèse. Notre choix s'est aussi porté sur des sondes au noyau xanthénique, les fluorescéines **P4**, rhodamines **P5** et sulfo-rhodamines **P6**.

Le lien chimique que nous avons utilisé dépend surtout de l'accès synthétique ou commercial des précurseurs. En fonction des réactifs disponibles, nous avons utilisé une stratégie pour lier l'iminosydnone et le fluorophore *via* un lien urée **L1**, thiourée **L2**, amide **L3** et sulfonamide **L4**.

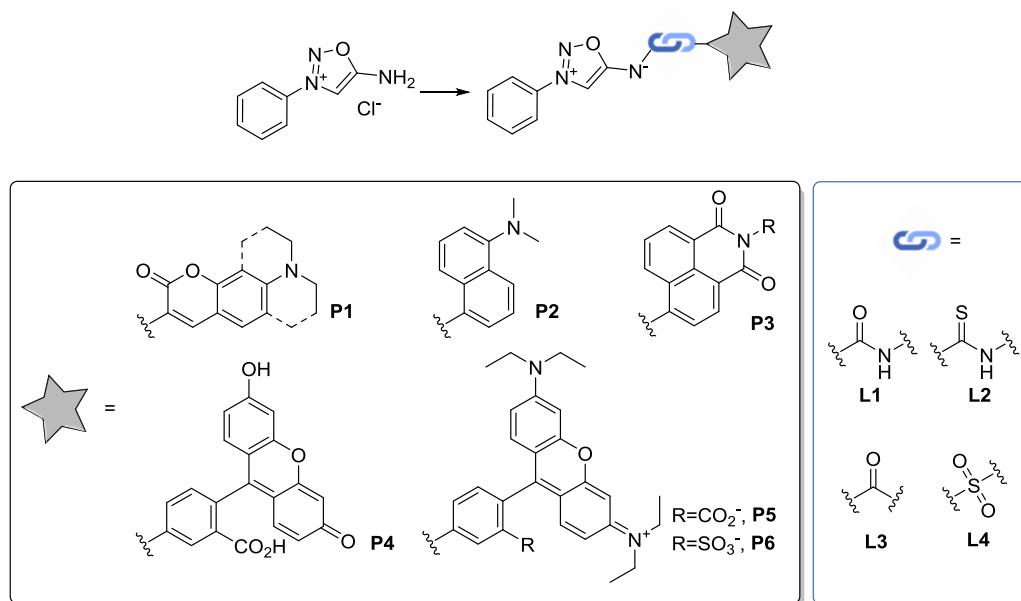


Figure 149 : Conception d'iminosydnone portant un fluorophore en position N₆.

Dans un premier temps il est nécessaire de synthétiser les précurseurs fluorescents greffables sur le squelette iminosydnone.

a. Synthèse des fluorophores

Certains fluorophores couramment utilisés pour du marquage de protéines sont disponibles commercialement sous la forme d'électrophiles comme par exemple le chlorure de dansyl (DNS-Cl)¹²³ ou la fluorescéine isothiocyanate (FITC).²¹⁹

En revanche, d'autres fluorophores ne sont pas commerciaux et nécessitent plusieurs étapes de synthèse. C'est le cas typiquement des naphthalimides qui nécessitent quelques étapes de synthèse pour obtenir l'unité fluorescente fonctionnalisée. De même, nous avons synthétisé une coumarine possédant une amine en position 3 pour générer l'isocyanate par la suite. Une voie d'accès plus directe consiste à passer par l'azoture d'acyl commercial (**Figure 150**). Une première preuve de concept d'accroche du noyau coumarine à l'iminosydnone a été réalisée selon cette voie, mais les faibles quantités disponibles pour un coût élevé nous ont orienté vers une autre voie d'accès pour la suite.

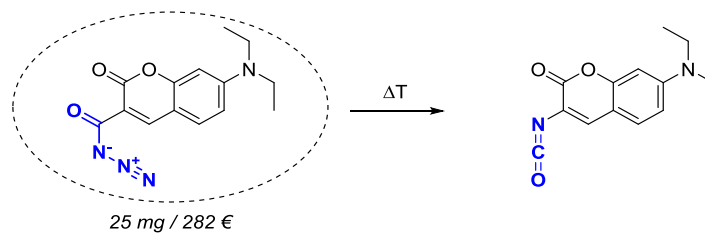


Figure 150 : Réarrangement de Curtius donnant accès à la coumarine isocyanate.

La synthèse de la coumarine-amine **42** est décrite dans la littérature puisqu'il s'agit d'un intermédiaire pour obtenir la coumarine-azoture correspondante.¹⁸¹ La synthèse se fait en deux étapes (**Figure 151**). La formation du noyau coumarine se fait par une réaction tandem de Knoevenagel suivie d'une *trans*-estérification entre un dérivé de malonate et un salicylaldéhyde pour donner le composé **41** avec un rendement de 68%, cohérent avec celui de l'article. Le groupement nitro est ensuite réduit

²¹⁹ Y. Hama, Y. Urano, Y. Koyama, M. Bernardo, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1426–1431.

par le chlorure d'étain pour fournir la coumarine désirée **42** avec un rendement de 76%. Celle-ci pourra être utilisée ultérieurement pour générer un isocyanate greffable sur les iminosydnones.

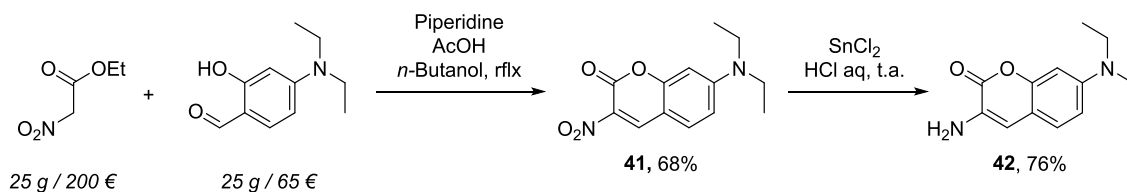


Figure 151 : Synthèse de la coumarine **42**.

On obtient ainsi un précurseur d'isocyanate de manière efficace avec des précurseurs plus abordables que l'azoture d'acyl commercial de la **Figure 150**.

Les naphthalimides sont obtenus à partir de l'intermédiaire clé anhydride naphthalique nitré. L'obtention de l'unité naphthalimide se fait par addition d'une amine sur l'anhydride. L'intermédiaire clé possède également un groupement nitro qu'il faut réduire pour obtenir l'amine correspondante, précurseur de l'isocyanate (**Figure 152**). Il est possible de réaliser dans un premier temps l'addition de l'amine (*Voie a*)²²⁰ ou alors débiter par la réduction du nitro (*Voie b*).²²¹

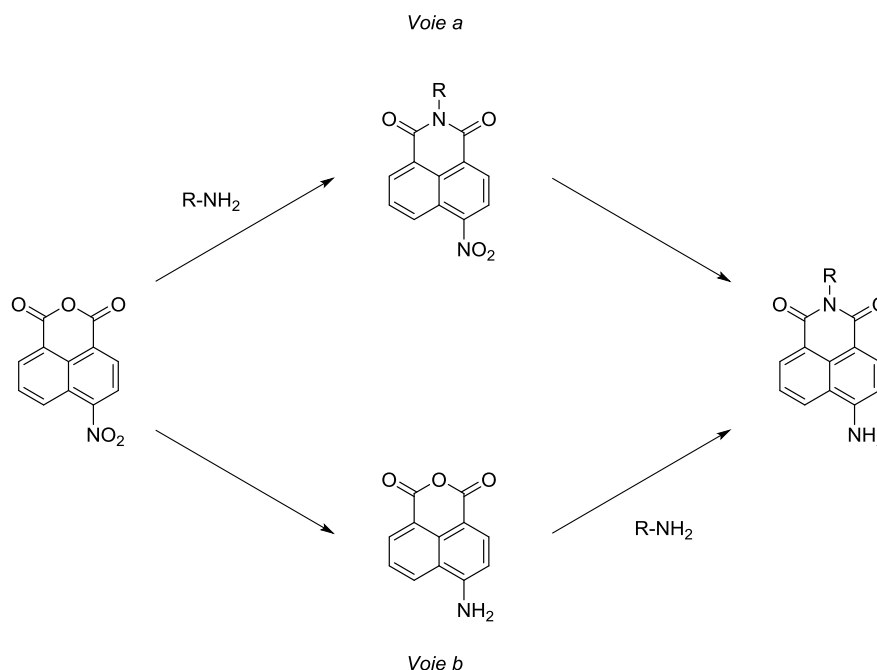


Figure 152 : Stratégies de synthèse des naphthalimides.

L'avantage de ces fluorophores est leur modularité puisqu'il est facile d'introduire de nombreuses amines. De ce point de vue la voie b est la plus intéressante car elle permet d'introduire la diversité moléculaire lors de la dernière étape.

Nous avons testé ces deux voies pour la synthèse d'un naphthalimide modèle **46** substitué par une chaîne *n*-butyl sur l'azote (**Figure 153**). Nous observons que ces deux méthodes ont globalement la même efficacité puisque leurs rendements globaux respectifs sont de 46 et 57%. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature.^{220, 221}

²²⁰ X.-L. Liu, X.-J. Du, C.-G. Dai, Q.-H. Song, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 9481–9489.

²²¹ L. Zhang, D. Duan, Y. Liu, C. Ge, X. Cui, J. Sun, J. Fang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 226–233.

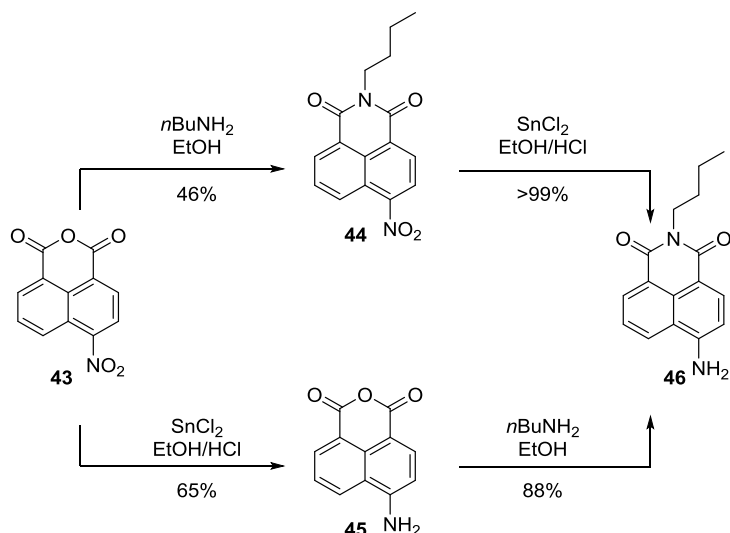


Figure 153 : Deux voies d'accès pour le naphthalimide **46**.

Le naphthalimide **46** est un fluorophore simple d'accès, qui possède une bonne solubilité dans les solvants organiques grâce à la chaîne *n*-butyl. Il s'agit d'un synthon utile pour la conception de sondes, cependant, sa localisation cellulaire n'est pas reportée dans la littérature.

Nous avons donc synthétisé deux autres naphthalimides possédant des groupements ciblant spécifiquement certaines organelles.

A titre d'exemple, nous avons synthétisé le **48** qui possède un sulfonamide ciblant le réticulum endoplasmique (**Figure 154**).^{222, 223}

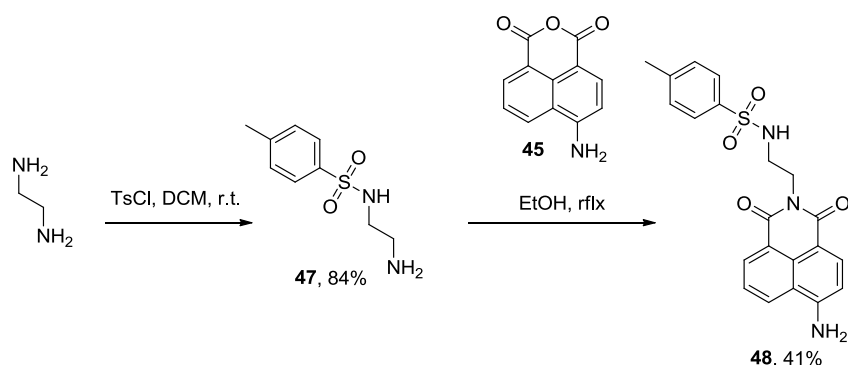


Figure 154 : Synthèse du composé **48**.

Pour ce produit nous avons utilisé la *Voie b* en faisant réagir l'anhydride **45** avec l'amine **47** pour obtenir le composé désiré avec un rendement de 41%. L'amine **47** est obtenue avec un rendement de 84% en une étape par réaction de l'éthylène diamine avec le chlorure de tosyl, selon un mode opératoire de la littérature.²²⁴

Les lysosomes sont des organelles à pH acide. Il est possible de les cibler avec des composés aminés lipophiles de petite taille qui ont une bonne perméabilité membranaire. Une fois dans le lysosome, ces composés sont protonés et donc piégés. En effet, devenus cationiques, ils ne peuvent alors plus passer

²²² B. K. McMahon, R. Pal, D. Parker, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5363–5365.

²²³ H. Xiao, P. Li, X. Hu, X. Shi, W. Zhang, B. Tang, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 6153–6159.

²²⁴ R. Pedrosa, J. M. Andrés, R. Manzano, C. Pérez-López, *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 3101–3104.

la membrane.¹⁷⁰ Pour cibler les lysosomes, le naphthalimide peut être fonctionnalisé par un groupement 4-(2-aminoéthyl)morpholine.^{225, 226}

La synthèse du naphthalimide **52** a été réalisée en 4 étapes à partir du 2-(2-Bromoéthyl)phthalimide (**Figure 155**).

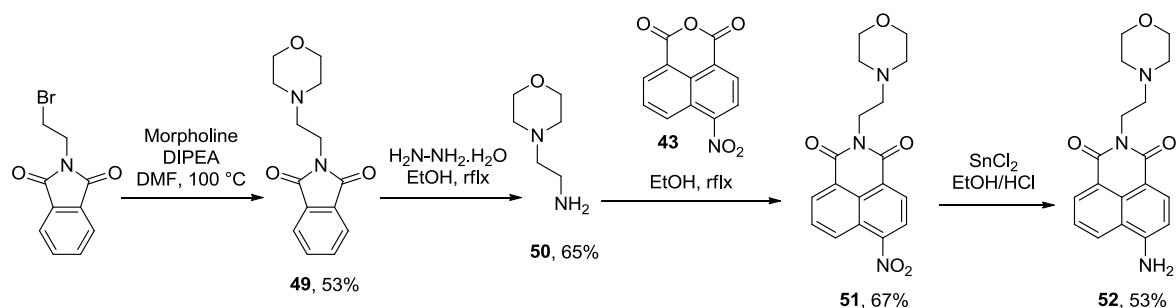


Figure 155 : Synthèse du composé **52**.

La 2-morpholinoethan-1-amine **50** a été obtenue avec un rendement global de 34% selon une voie de synthèse décrite auparavant par alkylation de la morpholine par la 2-bromoethan-1-amine protégée par un phthalimide puis déprotection du phthalimide.²²⁷ Cette amine obtenue peut être additionnée sur **43** pour donner le produit **51**, suivi par la réduction du nitro aboutissant au **52** avec un rendement de 36% sur deux étapes.

b. Synthèse de sondes iminosydones pro-fluorescentes substituées sur l'aryle en position N₆

La première sonde a été synthétisée dans le cadre de l'étude de la fonctionnalisation des iminosydones. Il s'agit de l'iminosydnone-sulfonamide **6b** portant un groupement dansyl (**Figure 156**).

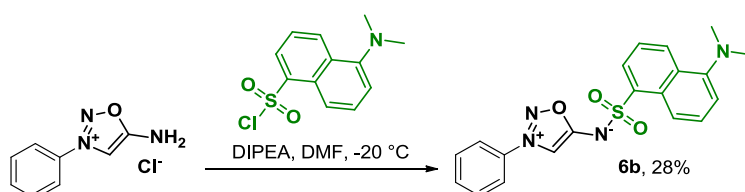


Figure 156 : Rappel de la synthèse de l'iminosydnone **6b**.

Nous avons pu observer de manière qualitative l'absence de fluorescence du produit **6b**, particulièrement par chromatographie sur couche mince. Intrigués, nous avons poussé l'expérimentation à d'autres fluorophores comme les coumarines qui ont montré leur capacité à être éteintes par d'autres mésoioniques (*i.e.* les sydnones).

Nous avons donc mis en réaction le sel d'iminosydnone **4a** et deux coumarines (**Figure 157**). La réaction avec la coumarine isocyanate (obtenue dans ce cas *via* un réarrangement de Curtius -**Figure 150**) permet d'obtenir la sonde **53** avec un rendement de 68%. En revanche le couplage avec la

²²⁵ H. Yu, Y. Xiao, L. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17486–17489.

²²⁶ T. Liu, Z. Xu, D. R. Spring, J. Cui, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2310–2313.

²²⁷ X.-M. Yu, F. Ramiandrasoa, L. Guetzoyan, B. Pradines, E. Quintino, D. Gabelle, P. Forterre, T. Cresteil, J.-P. Mahy, S. Pethe, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 587–605.

coumarine-julolidine fonctionnalisée en position 3 par un acide ne permet pas d'obtenir l'iminosydnone-amide désirée mais la nitrosamine résultant de l'ouverture de l'iminosydnone.

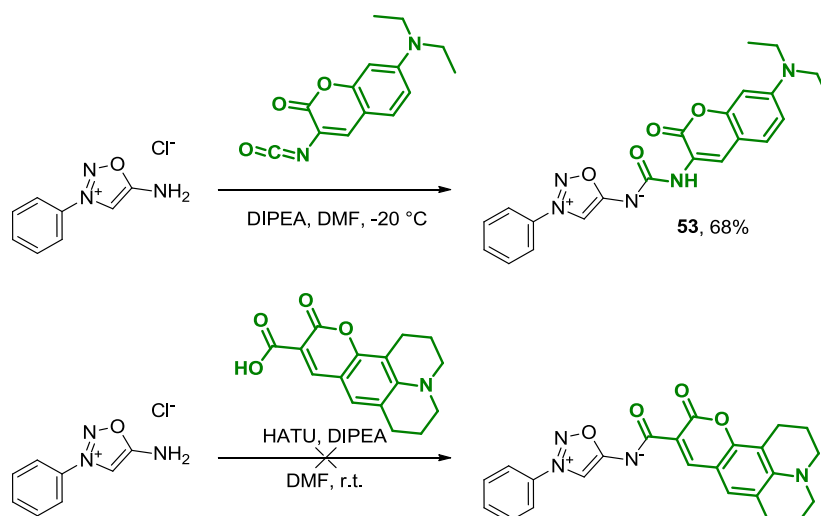


Figure 157 : Réactions entre le sel d'iminosydnone **4a** et différentes coumarines.

En ce qui concerne les naphthalimides, la génération de l'isocyanate avec le triphosgène dans le toluène avec la DIPEA précédemment décrite dans la littérature²²¹ n'a pas permis d'obtenir l'iminosydnone désirée probablement à cause de l'excès de DIPEA restant dans le milieu qui conduit à l'ouverture du squelette iminosydnone. Nous avons alors utilisé le protocole de génération des isocyanates avec le triphosgène en milieu biphasique. L'ajout du sel d'iminosydnone **4a** a mené à la formation de la sonde désirée **53** avec un rendement de 45% (**Figure 158**).

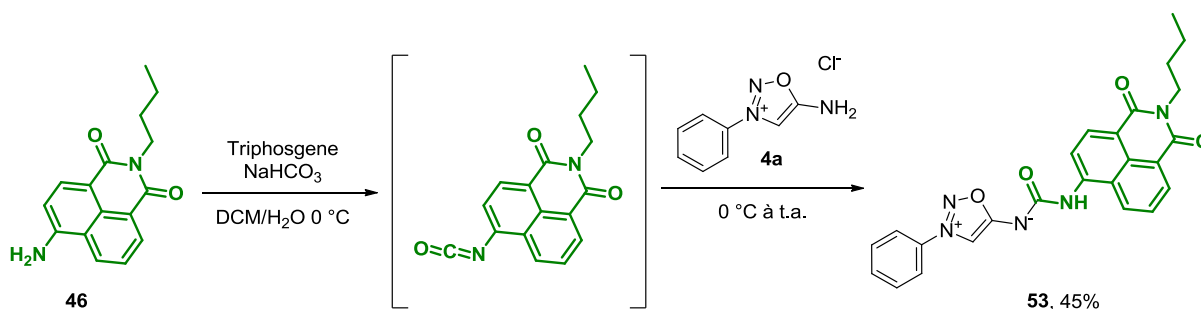


Figure 158 : Synthèse de la sonde **53**.

Pour la suite de nos travaux, nous nous sommes tournés vers des fluorophores ayant une émission à des longueurs d'onde plus élevées. Nous avons sélectionné les sondes xanthéniques fluorescéines et rhodamines.

La forme électrophile de la fluorescéine la plus utilisée est la fluorescéine-isothiocyanate (FITC). Malheureusement, cet isocyanate ne réagit pas avec l'iminosydnone **4a**. Nous avons alors utilisé une amino-fluorescéine pour générer l'isocyanate et le faire réagir avec **4a**. Les conditions habituelles en milieu biphasique ne permettent pas d'obtenir l'isocyanate. La formation de cet isocyanate est décrite de manière anecdotique dans un rapport datant de 1950.²²⁸ En nous inspirant de cet article dans lequel les auteurs utilisent une solution d'acétone saturée de phosgène, nous avons changé le solvant réactionnel pour l'acétone. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, nous pouvons observer un changement de couleur du milieu réactionnel (du vert à l'orange), cohérent avec les

²²⁸ A. H. Coons, M. H. Kaplan, *J. Exp. Med.* **1950**, *91*, 1–13.

observations décrite dans l'article précédent. L'urée désirée se forme après ajout du sel d'iminosydnone et nous avons pu isoler le produit **55** avec un rendement de 13% après purification (**Figure 159**).

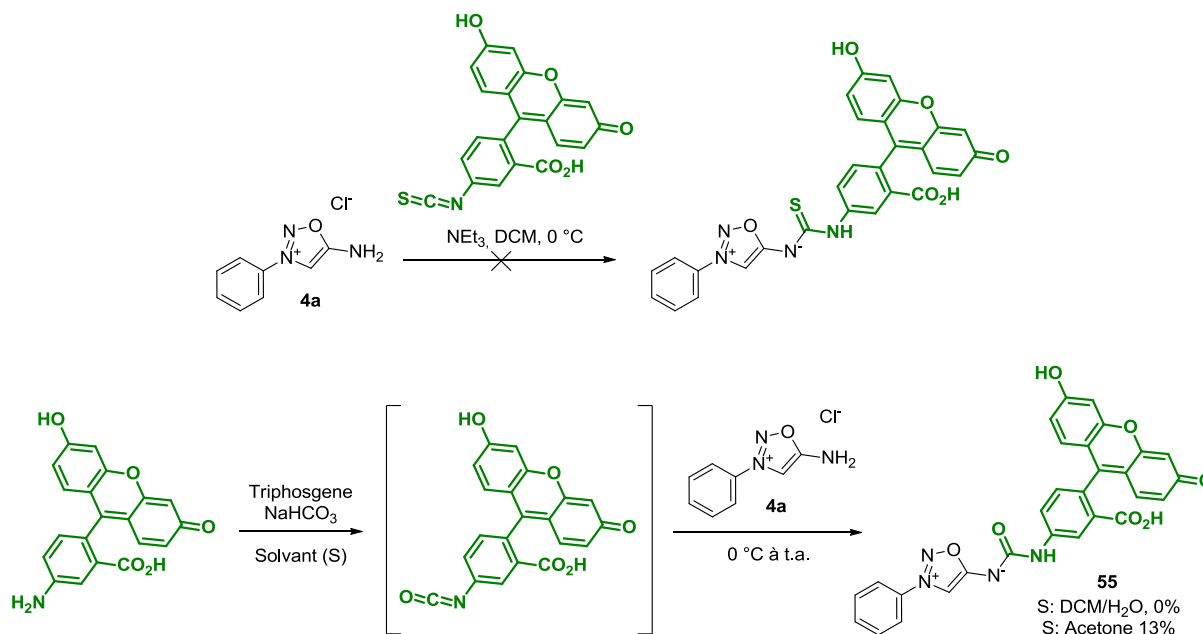


Figure 159 : Réactions entre le sel d'iminosydnone **4a** et différentes fluorescéines.

Les rhodamines sont des fluorophores largement utilisés pour l'imagerie *in vivo*. Plus particulièrement, le TAMRA, dont les azotes sont chacun substitués par deux méthyls et qui possède un acide carboxylique, se démarque des autres rhodamines par ses propriétés spectrales, sa stabilité et son bon rapport signal sur bruit *in vivo*.²²⁹ L'acide carboxylique présent sur la structure lui permet notamment d'être conjugué aux biomolécules *via* un couplage peptidique. La rhodamine B, dérivée du TAMRA, possède des chaînes éthyliques à la place des méthyls. Son émission de fluorescence s'en trouve légèrement décalée vers le rouge.

La disponibilité commerciale de l'isothiocyanate de rhodamine B en fait un réactif de choix pour former un conjugué entre une iminosydnone et un fluorochrome à fluorescence rouge. Mais comme pour son analogue FITC, la réaction avec le sel d'iminosydnone ne permet pas l'obtention du produit désiré.

En revanche, en utilisant la méthode développée pour le chlorure de dansyl, nous avons pu conjuguer le dérivé chlorure de sulfonyl de la rhodamine B avec le sel d'iminosydnone **4a** pour obtenir le produit attendu **56** avec un rendement de 28% (**Figure 160**).

²²⁹ M. R. Longmire, M. Ogawa, Y. Hama, N. Kosaka, C. A. S. Regino, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1735–1742.

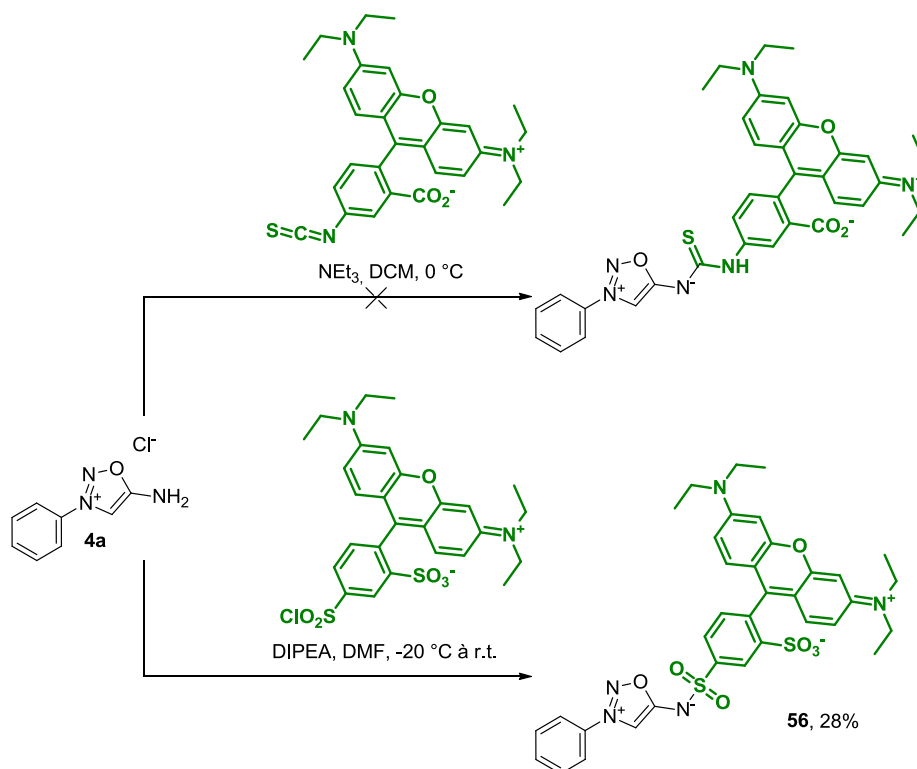


Figure 160 : Réactions entre le sel d'iminosydnone **4a** et des dérivés de rhodamine B.

c. Synthèse de sondes iminosydnone pro-fluorescentes substituées en position N₆ et halogénées en position C₄

L'extinction de fluorescence par effet d'atome lourd est un phénomène intéressant pour compléter notre étude de sondes iminosydnone pro-fluorescentes substituées en position N₆.

Cet effet est une conversion inter-système, c'est-à-dire ici le passage d'un état singulet S₁ à un état triplet T₁ sans émission de rayonnement. L'efficacité de cette extinction est proportionnelle à Z⁴, (avec Z représentant le numéro atomique). Ce phénomène est illustré dans le **Tableau 8**.²³⁰

²³⁰ B. Valeur, I. John Wiley & Sons, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.






	Φ_F (Rendement quantique de fluorescence)
	0.55
	0.84
	0.058
	0.0016
	<0.0005

Tableau 8 : Effet d'atome lourd en série naphthalène.²³⁰

Par ailleurs, l'atome lourd ne doit pas forcément se situer sur le noyau fluorescent pour avoir un effet d'extinction.²³¹ Nous pouvons considérer l'utilisation de ce phénomène avec les iminosydones portant un fluorophore en position N-exocyclique puisque d'une part nous avons montré que la méthodologie de synthèse d'iminosydones iodées et bromées en position C₄ était robuste (cf. Chapitre I-1-D-Fonctionnalisation des iminosydones en position C₄) ; d'autre part parce qu'après réaction avec les alcynes cycliques, l'halogène n'est plus sur la même molécule que le fluorophore.

D'un point de vue synthétique, il n'est pas envisageable de réaliser les réactions d'halogénéation sur les iminosydones fonctionnalisées par les pro-fluorophores. En effet ceux-ci pourraient réagir avec les réactifs d'halogénéation. Nous avons donc dû passer par l'intermédiaire halogéné portant un groupement Boc sur l'azote exocyclique. Après déprotection des produits **27b** et **28** avec du TFA dans le dichlorométhane (**Figure 161**), le sel formé est engagé dans la réaction avec les électrophiles correspondants.

Devant le succès de la formation de l'isocyanate de fluorescéine dans l'acétone, nous avons conservé cette méthode pour le naphthalimide et la coumarine.

²³¹ G. G. Guilbault, Eds. , *Practical Fluorescence*, M. Dekker, New York, **1990**.

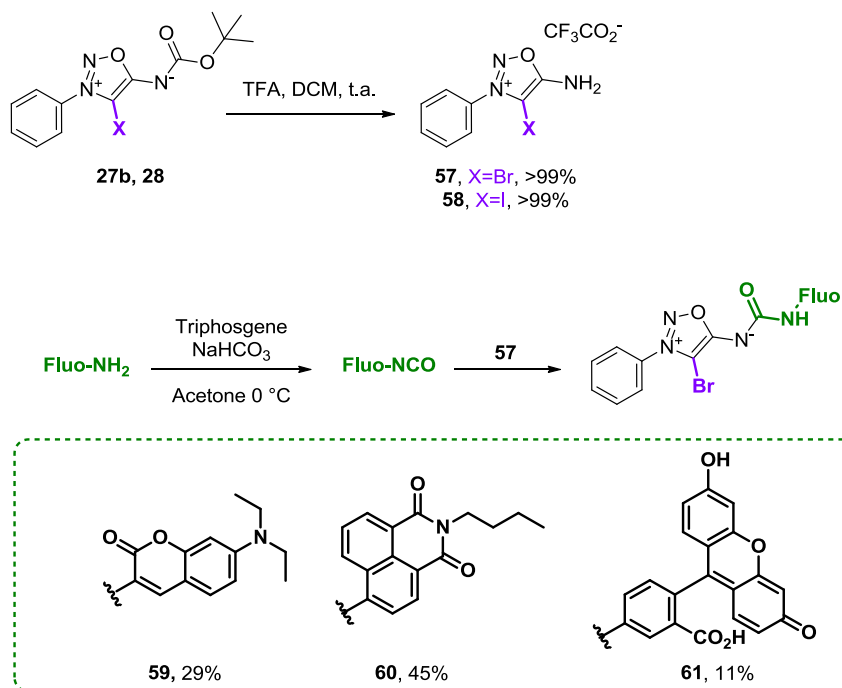


Figure 161 : Formation des iminosydrones bromées pro-fluorescentes fonctionnalisées par une urée.

Nous avons donc obtenu les iminosydrones-urées correspondantes **59**, **60** et **61** (Figure 161). Les dérivés fluorescéine et naphthalimide **60** et **61** sont isolés avec un rendement comparable aux produits portant un hydrogène en C₄. Le rendement de la coumarine est inférieur à celui observé pour le composé **53**. Cette différence provient probablement de la conversion de la **42** en isocyanate, étape que nous n'avons pas réalisée pour **53** puisque l'isocyanate était issu du réarrangement de Curtius de la coumarine azoture d'acyle.

Nous avons également synthétisé les dérivés bromé et iodés de l'iminosydnone-rhodamine **56** (Figure 162).

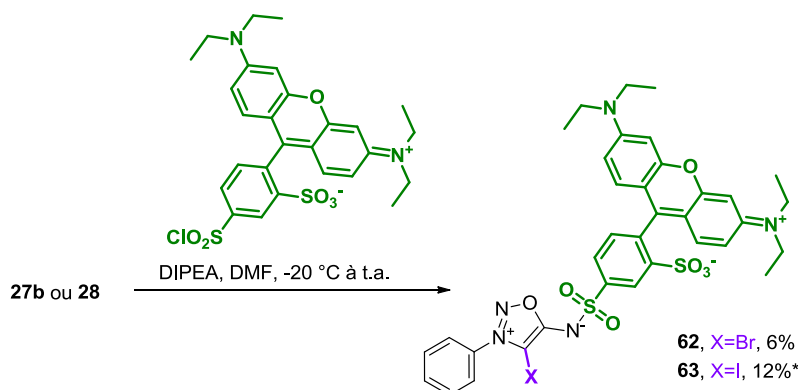


Figure 162 : Synthèse des iminosydrones bromée et iodée **62** et **63** ; *Réaction réalisée avec de la DMAP.

Les conditions réactionnelles sont identiques à celles utilisées auparavant et permettent d'obtenir le composé **62** avec un rendement de 8% et le composé **63** avec un rendement de 12%.

Pour conclure à propos des travaux sur les sondes iminosydnones fonctionnalisées en N₆, nous avons dans un premier temps synthétisé des dérivés avec 5 fluorophores différents à partir du sel d'iminosydnone **4a**. Pour compléter cette série et étudier l'effet des atomes lourds sur les propriétés optiques de nos sondes, nous avons dans un second temps synthétisé 5 autres iminosydnones portant ces fluorophores ainsi qu'un halogène en position C₄ (**Figure 163**).

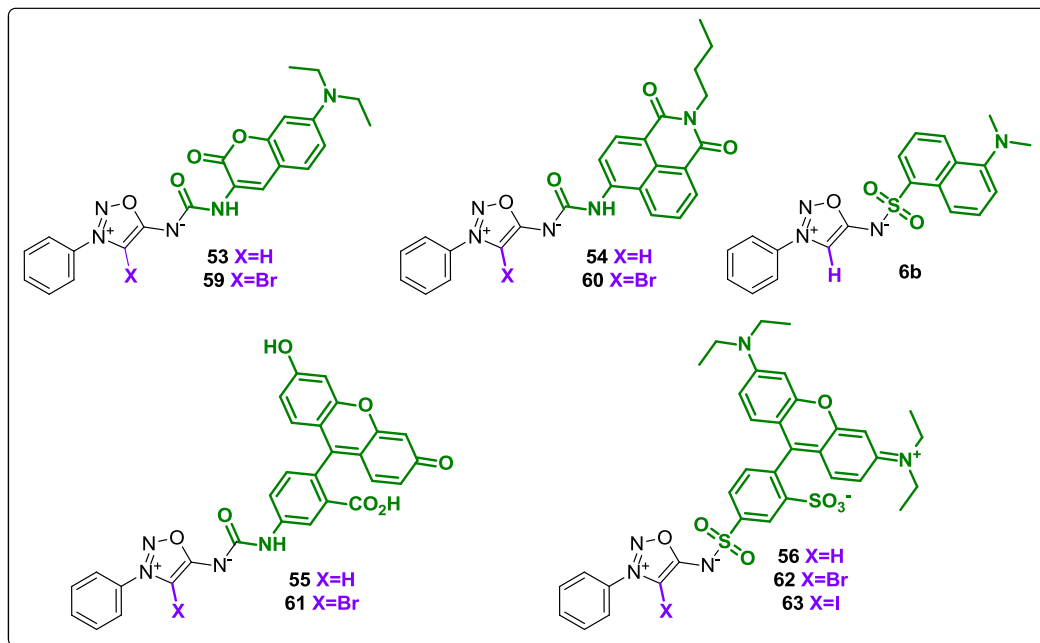


Figure 163 : Librairie de sondes iminosydnones substituées en position N₆ synthétisées.

C. Synthèse de double sondes iminosydrones, substituées en position N₃ et N₆

La combinaison des deux types d'iminosydrones que nous venons de décrire ouvre la voie vers la génération d'un type de sondes très peu décrites, qui à partir d'une seule molécule donnent deux signaux distincts de fluorescence après activation. Elles peuvent permettre de suivre plusieurs phénomènes ou de visualiser plusieurs compartiments cellulaires à l'aide d'un seul outil.

1. Introduction bibliographique sur les sondes à double exaltation de fluorescence

Un premier exemple de composé menant à la formation de deux produits fluorescents ayant des propriétés distinctes a été rapporté par Jung.²³² L'outil développé dans cet article est un carbène de ruthénium lié à un BODIPY. Cet outil a été développé pour l'étude de la régiosélectivité de la réaction de métathèse avec le styrène puisque les deux produits formés possèdent des propriétés de fluorescence très différentes (**Figure 164**).

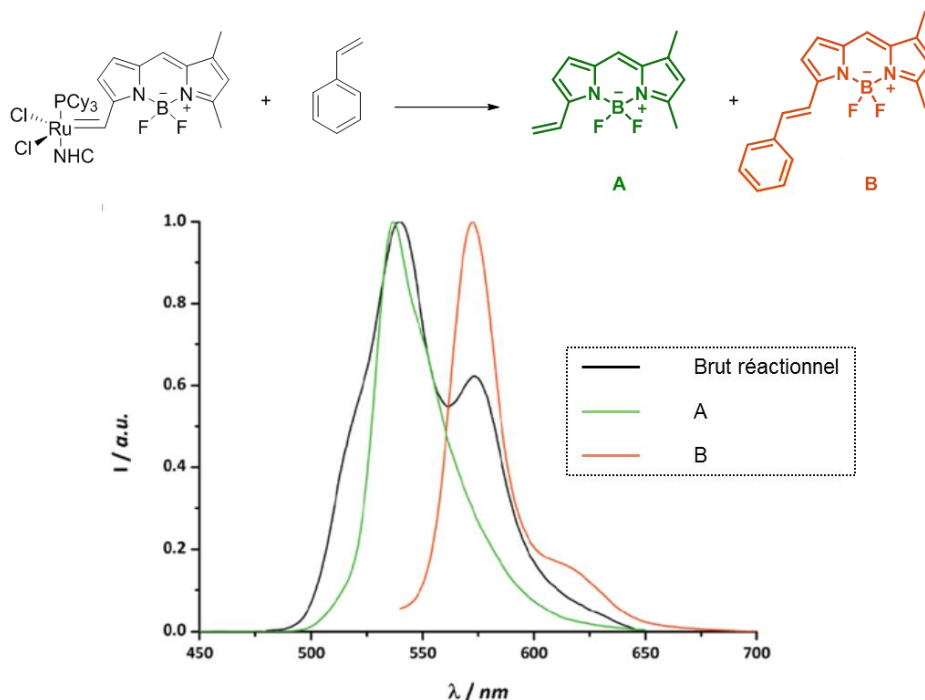


Figure 164 : Sonde BODIPY-carbène développée pour l'étude de la régiosélectivité de la métathèse.

D'autres exemples de sondes à deux émissions ont été développées principalement dans le cadre de l'imagerie cellulaire.

Dans le cadre de l'étude du relargage concomitant d'un substrat et d'un témoin fluorescent par un bras auto-immolable, l'équipe de Jullien a conçu une molécule répondant à la problématique de la double exaltation de fluorescence. Après irradiation à 365 nm conduisant à la déprotection d'un phénol, une série de déplacements de doublets électroniques mène au relargage des deux molécules,

²³² M. Wirtz, A. Grüter, F. Heib, V. Huch, J. Zapp, D.-P. Herten, Michael Schmitt, G. Jung, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, 3, 44001.

favorisé par l'extrusion de CO₂. Le but de ce bras auto-immolable libérant simultanément deux molécules est de pouvoir quantifier le relargage d'une molécule bioactive *via* l'allumage de la seconde entité qui est un pro-fluorophore (**Figure 165**).²³³

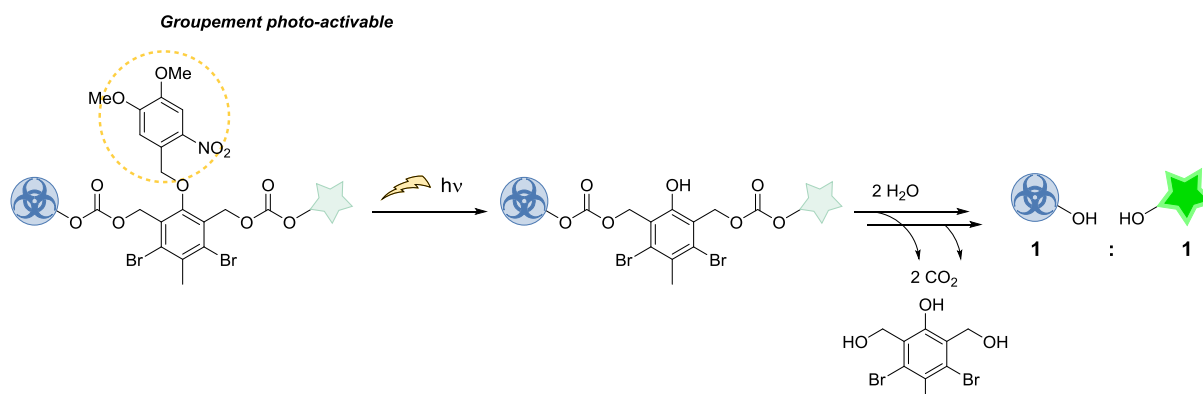


Figure 165 : Principe des composés auto-immolables pour le relargage de molécules accompagnée d'un signal fluorescent.

Pour faire la preuve de concept de cette technologie, les auteurs ont attaché au bras auto-immolable deux fluorophores, dont la fluorescence est inhibée par la fonction carbonate qui les lie au bras auto-immolable, afin de visualiser plus facilement les deux espèces libérées. L'un de ces fluorophores est une coumarine, tandis que l'autre est le DDAO, un fluorophore dont l'émission est dans le rouge. La réaction de clivage photo-induite a été réalisée *in cellulo* et on observe une nette augmentation de fluorescence dans les canaux dédiés à la détection des fluorophores (**Figure 166**). De plus, un étalonnage avec des solutions des deux fluorophores isolés a été réalisé et a montré que le relargage de ces entités était quantitatif.

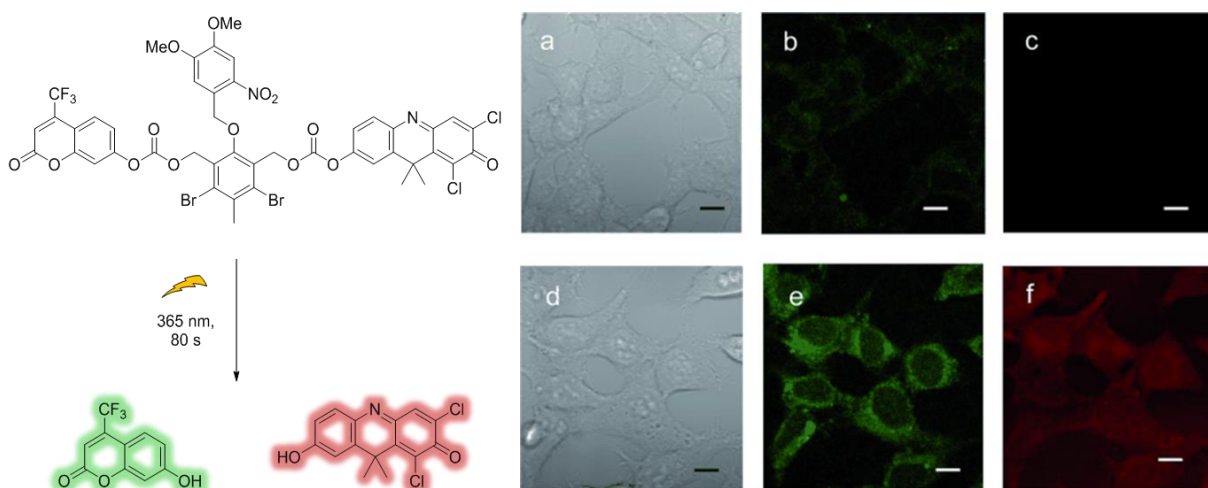


Figure 166 : Libération des deux fluorophores *in cellulo*²³³ – (a-c): Incubation de la sonde seule; (d-f): incubation de la sonde puis irradiation à 365 nm pendant 80 s; a, d) Transmission ; b, e) excitation à 405 nm ; c, f) excitation à 633 nm.

Un autre exemple de sonde permettant l'allumage de deux entités différentes a été reporté plus récemment par Liu. La partie centrale de cette sonde correspond à un enchainement de deux séquences peptidiques coupées par deux caspases différentes. Aux sites de clivages sont reliés deux fluorophores AIE (Aggregation-Induced Emission) différents qui ne sont pas ou peu fluorescents en

²³³ R. Labrière, A. Alouane, T. Le Saux, I. Aujard, P. Pelupessy, A. Gautier, S. Dubruille, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9344–9347.

solution, mais émettent un signal lorsqu'ils forment des agrégats. La sonde est soluble dans l'eau et n'émet pas de fluorescence. Si l'un des sites est clivé par une caspase, le fluorophore AIE correspondant est dissocié du lien peptidique apportant la solubilité. Une émission rouge ou verte selon la nature de la caspase peut alors être observée.²³⁴

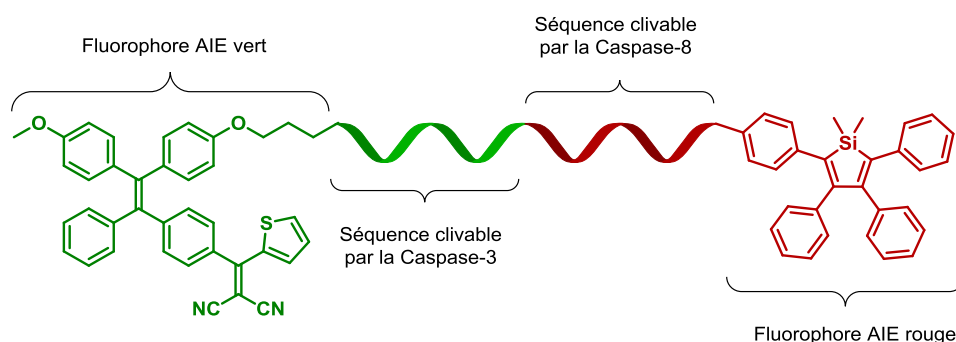


Figure 167 : Sonde à double exaltation de fluorescence conçue par Liu.

Cette sonde a par la suite été utilisée pour imager la caspase 3 activée par la caspase 8 dans des cellules en apoptose (induite par un traitement avec H₂O₂).

2. Synthèse de sondes iminosydones double, substituées en position N₃ et N₆

Après avoir fonctionnalisé les iminosydones avec des fluorophores ou des unités susceptibles de participer à la formation d'une entité fluorescente, nous nous sommes aventurés dans la combinaison de ces deux approches en une seule molécule.

Pour ce faire, deux voies sont possibles, soit en commençant par l'introduction du groupement fonctionnel en N₆ en premier, soit par celui sur la position *para* de l'aryl en N₃. La stratégie de fonctionnalisation initiale par l'azote N₆ a l'avantage de nécessiter deux étapes réactionnelles de moins –la protection et déprotection de ce même azote– dans le schéma de synthèse général d'obtention de ces doubles sondes.

La première stratégie a été évaluée à partir du sel d'iminosydnone iodé **4d** que nous sommes capables d'obtenir sur grosse échelle. Nous avons essayé d'introduire sur ce produit les substituants dansyl (**Figure 168**), ainsi que 2 naphthalimides (**Figure 169**) portant un groupement ciblant soit le réticulum endoplasmique, soit le lysosome.

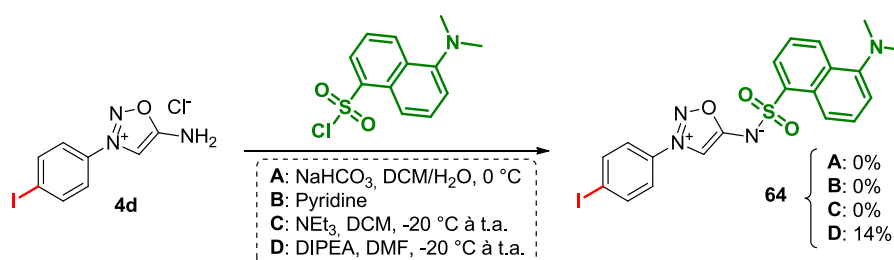


Figure 168 : Conditions utilisées pour la formation de l'iminosydnone **64**.

Nous avons déjà pu constater que la formation des iminosydones-sulfonamides est délicate à partir du simple sel d'iminosydnone portant un phényl **4a**. Pour pouvoir obtenir le produit **64**, il nous

²³⁴ Y. Yuan, C.-J. Zhang, R. T. K. Kwok, D. Mao, B. Z. Tang, B. Liu, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2723–2728.

a été nécessaire de cribler de nombreuses conditions réactionnelles (**Figure 168**). Seul l'emploi de DIPEA dans le DMF nous a permis d'obtenir l'iminosydnone désirée **64** avec un rendement de seulement 14%. La quantité de produit obtenue n'est cependant pas suffisante pour procéder à la fonctionnalisation de l'aryl en N₃. En outre, une impureté inséparable du produit réactionnel se forme lorsque la réaction est effectuée sur plus grosse échelle.

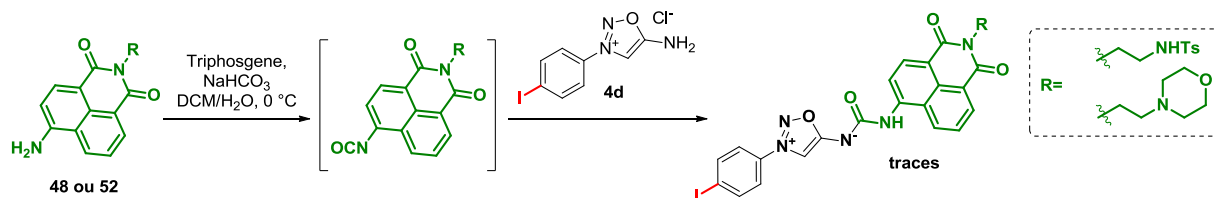


Figure 169 : Réactivité du sel d'iminosydnone **4d** avec les isocyanates de naphthalimides.

Pareillement, la formation des iminosydnones iodées portant un naphthalimide en position N₆ s'est révélée périlleuse (**Figure 169**). Nous avons sélectionné ici les naphthalimides avec des groupements possédant un ciblage cellulaire connu. Nous observons la formation des produits désirés, mais ils restent noyés dans un mélange de nitrosamine (issue de l'ouverture de l'iminosydnone) et du naphthalimide de départ. La séparation de ces produits du naphthalimide n'ayant pas réagi n'a pas été possible puisqu'ils sont largement minoritaires et qu'ils adoptent un comportement similaire lors de la purification. Changer la méthode d'obtention de l'isocyanate soit par un temps de réaction supérieur, soit par un mode d'activation plus rude du triphosgène (en chauffant ou en utilisant des bases aminées) n'a pas donné lieu à de meilleurs résultats.

Nous nous sommes donc tournés vers l'autre voie de synthèse, qui est certes plus coûteuse en nombre d'étapes, mais qui met en jeu les iminosydnones protégées par un Boc en position N₆, des composés plus simples à manipuler de par leur meilleure solubilité.

Nous nous sommes d'abord concentrés sur l'utilisation d'électrophiles isocyanates puisque la fonctionnalisation par les chlorures de sulfonyls est plus délicate. En revanche un défi reste à relever, puisque ni l'isocyanate, ni l'iminosydnone déprotégée ne peuvent être isolés. Le premier est généré *in situ*, tandis que l'iminosydnone obtenue après clivage du Boc est obtenue par simple évaporation du milieu réactionnel. Nous avons appliqué cette méthode pour la synthèse de 5 sondes (**Figure 170**).

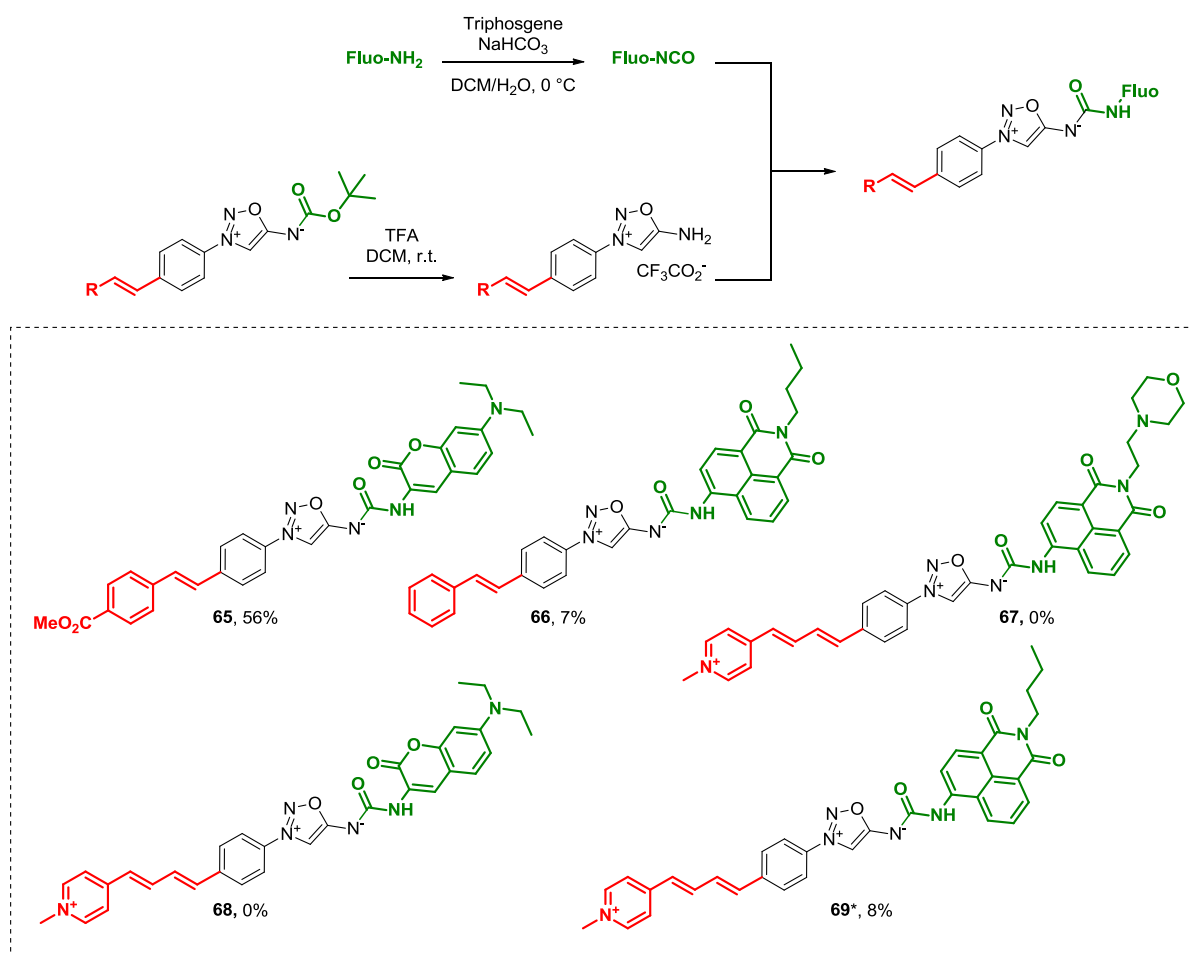


Figure 170 : Formation de doubles sondes iminosydnone fonctionnalisées par une urée ;
*Formation de l'isocyanate réalisée dans l'acétone.

Des cinq produits désirés, nous avons pu en obtenir trois. L'iminosydnone portant la coumarine et le groupement styryl-ester **65** a été isolée avec un bon rendement de 56%. Les iminosydnone-naphthalimides portant un groupe styryl **66** et pyridinium **69** ont été obtenues avec un très faible rendement en raison de la séparation laborieuse entre le produit et le naphthalimide n'ayant pas réagi. Enfin, les produits **67** et **68** n'ont pas pu être obtenus, le premier parce qu'il ne se forme pas, le second est très minoritaire et se décompose lors de la purification.

Pour finir, nous avons également souhaité introduire le groupement dansyl dans des doubles sondes (**Figure 171**).

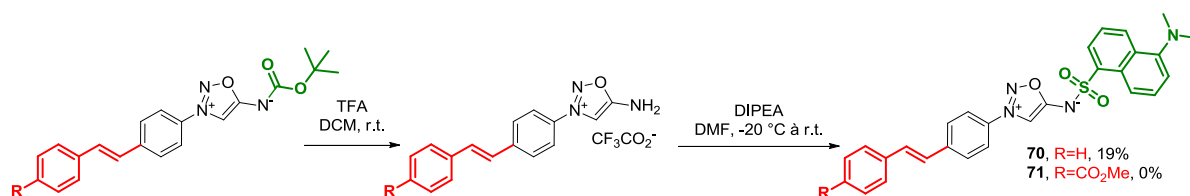


Figure 171 : Formation de doubles sondes iminosydnone fonctionnalisées par un sulfonamide.

Nous obtenons ainsi le produit **70** en utilisant le protocole DIPEA/DMF pour la formation du sulfonamide avec un rendement de 19%, comparable à celui obtenu pour la formation du produit **64**. En revanche l'iminosydnone possédant un ester sur le groupement styryl ne réagit pas avec le chlorure de dansyl et nous obtenons uniquement le produit d'ouverture nitrosamine à l'issue de cette réaction.

En résumé, nous avons démontré que pour obtenir des doubles sondes iminosydnones, la stratégie de synthèse la plus efficace consistait à fonctionnaliser le groupement aromatique situé en position N₃ de l'iminosydnone protégée en position N₆ puis de réaliser la fonctionnalisation en N₆, suite au clivage du groupement Boc, par réaction avec l'électrophile dérivé du fluorophore désiré. Par cette méthode nous avons construit quatre doubles sondes dont les propriétés optiques seront évaluées (**Figure 172**).

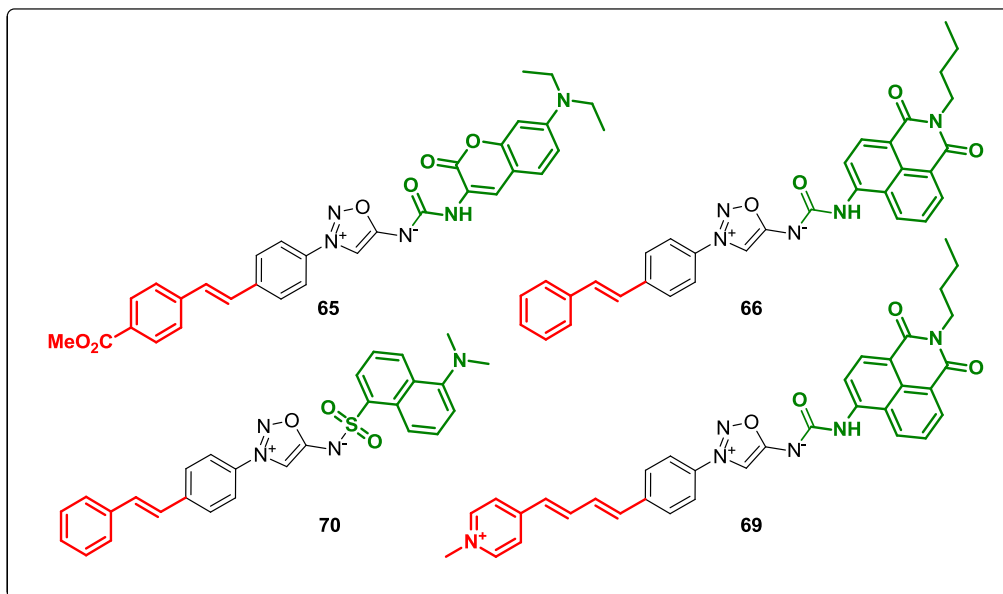


Figure 172 : Résumé des doubles sondes iminosydnones synthétisées.

III. Etude des propriétés optiques des sondes synthétisées

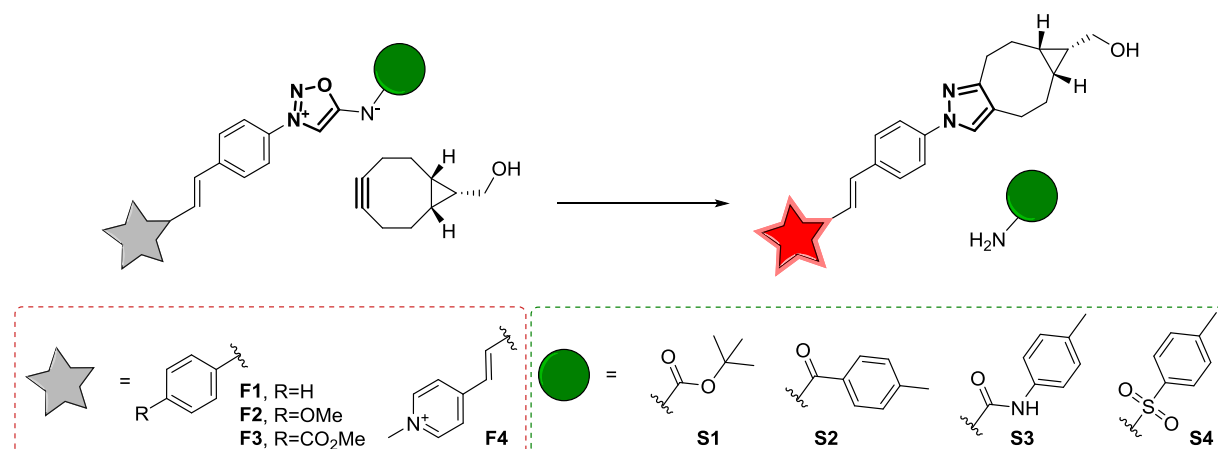
Pour chacune des sondes étudiées, nous avons mesuré les spectres d'absorbance et de fluorescence des iminosydnones, des pyrazoles et/ou produits relargués. Les valeurs de turn-on ont été déterminées en excitant les produits à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'état "on".

Nous avons obtenu les produits issus de la réaction de click avec les cycloalcyne de différentes manières. Les pyrazoles proviennent de la réaction avec les sydnones correspondantes pour s'affranchir de la séparation du produit relargué par l'iminosydnone. Les coumarines et naphthalimides susceptibles d'être relargués ont été isolés suite à la réaction entre les sondes **53** et **54** avec le BCN. Les spectres de la fluorescéine et de la rhodamine B ont été pris sur les bruts réactionnels. Quant au dansyl sulfonamide libérée par les sondes **6b** et **70**, il est disponible commercialement.

La valeur du coefficient d'extinction molaire ϵ a été déterminée par régression linéaire au maximum d'absorption de trois solutions de concentrations différentes du même composé. Le rendement quantique a été déterminé de manière relative grâce à l'Équation 4 en utilisant une référence adaptée au rendement quantique connu, qui absorbe à la valeur d'excitation de notre produit et qui possède une émission dans la même zone.

A. Les iminosydnones substituées en position N₃

Le **Tableau 9** récapitule les propriétés optiques obtenues pour les iminosydnones substituées sur l'aryl en position N₃ ainsi que celles des pyrazoles correspondants après réaction avec le BCN.



Entrée	Iminosydnone				Pyrazole					Turn-on			
	F	S	Sonde	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)		Φ_f	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brill.
1	F1	S1	31a	344	446	0.017	25 575						33
2	F1	S2	33	355	508	0.049	22 306	339	374	0.196	33 192	6 505	26
3	F1	S3	32a	340	412	0.020	26 781						23
4	F1	S4	34	342	529	0.255	12 243						19
5	F2	S1	31b	361	591	0.327	24 806	342	370	0.099	27 313	2 703	21
6	F3	S1	31c	346	419	0.019	22 170	354	455	0.232	28 227	6 548	27
7	F3	S3	32b	344	392	0.008	26 259						47
8*	F4	S1	39	378	493	0.019	28 128	403	582	0.105	33 948	3 564	19

Tableau 9 : Propriétés optiques des iminosydnones substituées sur l'aryl de la position N₃ ainsi que des pyrazoles correspondants ; Solvant : DMSO. * eau/DMSO, 80/20.

Nous constatons que les propriétés électroniques du substituant jouent un rôle important dans les propriétés optiques (**Entrées 1, 5, 6, 8**). On note un déplacement bathochrome de l'absorption et de l'émission des pyrazoles avec l'électroattractivité du substituant situé en *para* de l'aromatique branché en position N₃. La gamme d'émission des pyrazoles est comprise entre 370 nm pour le substituant méthoxy-styryl, et 582 nm pour le pyridinium, permettant d'atteindre une large zone du spectre du bleu au jaune. Pour des applications d'imagerie, le motif pyridinium est particulièrement intéressant puisqu'il se rapproche du rouge, région dans laquelle l'auto-fluorescence des cellules est plus faible.

Les iminosydnones possèdent également une fluorescence résiduelle variable en fonction des substituants. L'effet observé est inversé au regard de celui obtenu avec les pyrazoles, c'est-à-dire que les groupements électroattracteurs sur la position N₃ induisent un déplacement hypsochrome de l'émission. De la sorte, l'iminosydnone **31b** portant un groupement donneur a une émission de fluorescence étonnamment élevée à 591 nm ainsi qu'un rendement quantique de l'ordre de 30% ce qui est assez significatif pour une émission si décalée vers le rouge. Cela en fait un piètre candidat en tant que sonde turn-on activée par réaction avec les alcynes puisque le pyrazole associé fluoresce bien trop bas.

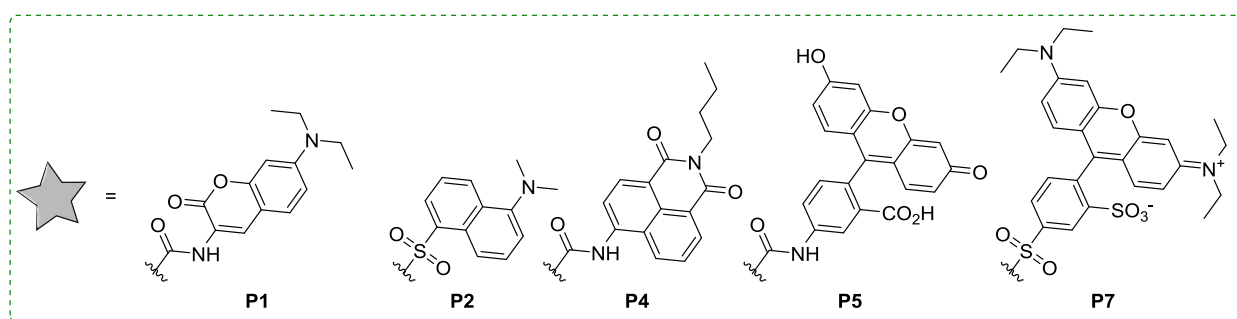
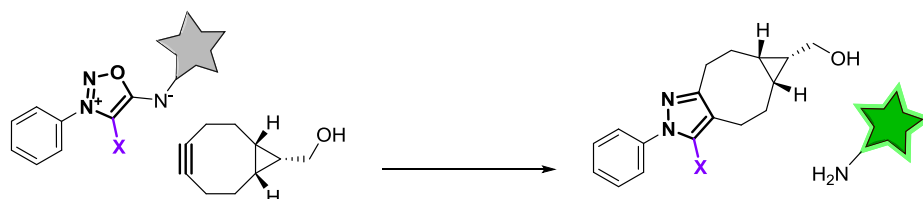
Les effets observés sont facilement rationalisés puisque le noyau iminosydnone possède des qualités électroattractrices tandis que le pyrazole est donneur. Ainsi l'effet bathochrome, observé lorsque le moment dipolaire de la molécule est grand, est remarqué pour des couples iminosydnone/donneur et pyrazole/accepteur. C'est cette seconde possibilité qui est à sélectionner pour obtenir des sondes pro-fluorescentes efficaces pour le marquage.

L'influence des groupements situés sur l'azote exocyclique est moins évidente à rationaliser. Nous avons étudié l'impact de différents substituants en N₆ pour la même substitution en N₃ (**Entrées 1–4**). Les substituants les plus attracteurs, amides et sulfonamides (**Entrées 2, 4**), induisent un accroissement du moment dipolaire et donc une émission de fluorescence décalée vers le rouge pour l'iminosydnone. Pour le carbamate et l'urée (**Entrées 1, 3**), la fluorescence résiduelle observée pour l'iminosydnone est plus faible.

L'ensemble des valeurs de turn-on est du même ordre de grandeur, avec comme meilleure sonde l'iminosydnone **32b** qui a un turn-on de 47. Il s'agit également de l'iminosydnone possédant le rendement quantique le plus bas, c'est-à-dire la plus grande extinction ici.

B. Les iminosydnones substituées en position N₆

Le **Tableau 10** récapitule les propriétés optiques obtenues pour les iminosydnones substituées en position N₆ ainsi que celles des fluorophores relargués après réaction avec le BCN. Concernant la fluorescéine et la rhodamine B (**Entrées 6–10**), les turn-ons ont été déterminés sur les bruts réactionnels de réaction avec le BCN. Le signal fluorescent apporté par le pyrazole ainsi que le léger excès d'alcyne utilisé sont négligeables aux longueurs d'ondes utilisées pour ces fluorophores. Face à l'absence d'exaltation de fluorescence pour ces composés et aux faibles quantités d'iminosydnone en main, nous n'avons pas isolé les fluorophores relargués et n'avons pas déterminé les propriétés du fluorophore relargué (coefficient d'extinction molaire, rendement quantique et brillance).



Entrée	Iminosydnone				Fluorophore relargué								
	P	X	Sonde	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	Brill.	Turn-on
1	P1	H	53	411	466	0.006	10 294	387	465	0.510	10 516	5 363	86
2	P1	Br	59	407	469	0.041	28 438						6
3	P2	H	6b	341	405	0.004	10 294	338	510	0.439	4 884	2 144	283
4	P4	H	54	411	516	0.033	27 929	392	483	0.503	13 001	6 539	38
5	P4	Br	60	406	522	0.097	24 572						22
6*	P5	H	55	495	515	n.d.	35 199	n.d.	515	n.d.	n.d.	n.d.	1,3
7*	P5	Br	61	495	515	n.d.	65 356						1,3
8	P7	H	56	566	585	n.d.	92 177						1
9	P7	Br	62	566	585	n.d.	84 827	n.d.	585	n.d.	n.d.	n.d.	1,4
10	P7	I	63	566	585	n.d.	82 075						1

Tableau 10 : Propriétés optiques des iminosydnones substituées en position N₆ ainsi que des fluorophores relargués correspondants ; Solvant : DMSO –* PBS/DMSO, 80/20 – n.d. = non déterminé.

Nous constatons que le noyau iminosydnone éteint les fluorophores avec une efficacité variable (**Entrées 1, 3, 4, 6, 8**). La coumarine, le dansyl ainsi que le naphthalimide sont éteints de manière efficace (**Entrées 1, 3, 4**) avec des valeurs de turn-on comprises entre 38 et 283. Ces fluorophores peuvent ainsi être envisagés pour la conception de double sondes. En revanche, contrairement à nos attentes, la présence du brome en position C₄ accroît l'émission de fluorescence de l'iminosydnone et

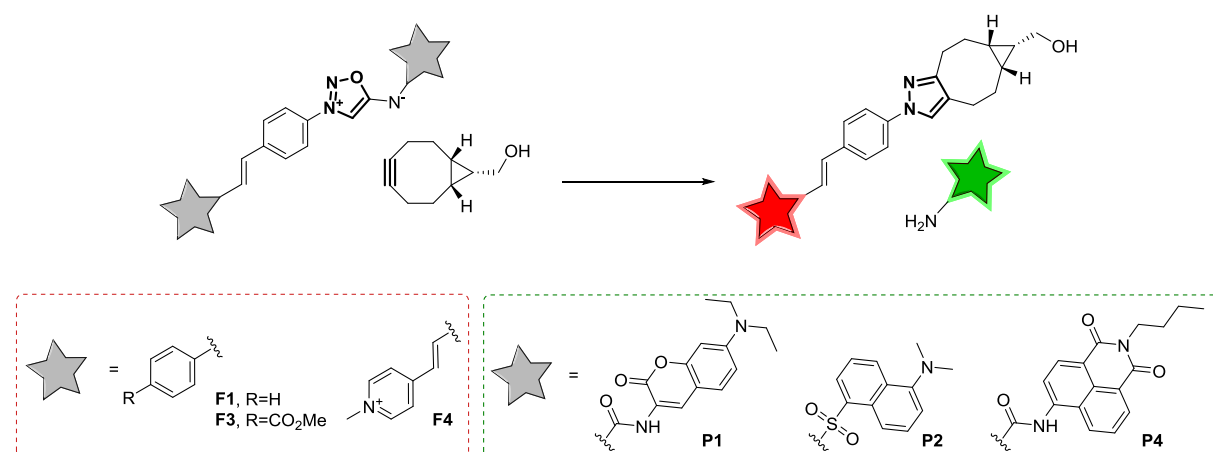
fait chuter la valeur du turn-on en comparaison des dérivés hydrogénés (comparer les **Entrées 1, 4** avec les **Entrées 2, 5**).

Le naphthalimide-urée libéré n'avait jamais été décrit auparavant, ses propriétés optiques nous étaient donc inconnues. L'émission de fluorescence de ce produit présente un décalage vers le bleu par rapport à son analogue aminé.²²¹ Malgré une longueur d'onde d'émission plus basse que celle attendue, ce fluorophore reste intéressant dans le cadre de notre étude.

L'extinction de fluorescence de la fluorescéine et de la rhodamine B est négligeable voire inexistante (**Entrées 6 et 8**). Ces fluorophores ne sont pas exploitables pour l'élaboration de sondes turn-on à partir d'iminosydnones ; d'autant plus que l'on n'observe pas d'amélioration significative de l'exaltation de fluorescence avec l'introduction des halogènes en position C₄ (**Entrées 7, 9, 10**).

C. Les iminosydnones substituées en position N₃ et N₆

Dans le **Tableau 11** nous avons résumé les propriétés optiques obtenues pour les iminosydnones à double exaltation de fluorescence. En ce qui concerne les deux produits générés après la réaction de click avec le BCN, nous rappelons ici leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les propriétés optiques détaillées de ces molécules issues de la réaction de click & release sont récapitulées dans le **Tableau 9** pour les pyrazoles et dans le **Tableau 10** pour les fluorophores relargués.



Entrée	Iminosydnone			Pyrazole			Fluorophore relargué						
	F	P	Sonde	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Turn-on	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Turn-on
1	F1	P2	70	345	377	0.003	18 654	339	374	29	338	510	97
2	F1	P4	66	415	473	0.012	32 349			26	392	483	31
3*	F4	P4	69	396	482	0.015	35 561	403	582	18			22
4	F3	P1	65	349	467	0.007	29 441	354	455	33	387	465	22

Tableau 11 : Propriétés optiques des iminosydnones à double exaltation de fluorescence et des produits formés suite à la réaction avec le BCN; Solvant : DMSO. * eau/DMSO, 80/20.

Les valeurs de turn-on pour la partie pyrazole de ces sondes sont complètement cohérentes avec celles déterminées pour les iminosydnones ne portant pas de second groupe pro-fluorescent. En revanche, le turn-on relatif au fluorophore lié à l'azote N₆ est bien moindre que pour les iminosydnones analogues portant un phényl en position N₃. On observe que le dansyl est le groupement délivrant le meilleur turn-on puisqu'il est 97 fois plus fluorescent que la sonde **70** (**Entrée 1**). La coumarine et le

naphthalimide (**Entrées 2–4**), bien que moins efficaces que le dansyl, donnent des turn-on supérieurs à 20, suffisamment élevés pour obtenir de bons rapports signal sur bruit pour ces sondes.

Pour toutes les sondes, on obtient des rendements quantiques inférieurs aux iminosydnone à simple exaltation de fluorescence correspondantes. En effet, ces composés sont de meilleurs chromophores mais n'émettent pas de signal fluorescent plus élevé.

La sonde **65 (Entrée 4)** donne après la réaction avec le BCN deux produits dont l'émission de fluorescence est trop proche pour être distinguée efficacement. Elle ne sera pas choisie pour réaliser les études suivantes. L'iminosydnone **69 (Entrée 3)** est idéale pour l'imagerie *in cellulo* puisque les deux fluorophores générés possèdent des émissions distinctes et une longueur d'onde d'excitation suffisamment élevée, donc impliquant une irradiation pas trop énergétique pour imager les cellules. Par contre, l'intensité de fluorescence du naphthalimide relargué est largement supérieure à celle du pyrazole-pyridinium. Ainsi, la fluorescence observée à 582 nm provenant du pyridinium est équivalente en intensité à celle provenant du naphthalimide dont l'émission est large et intense. Cela nous empêche d'observer distinctement les deux signaux "*in vitro*", mais cela est possible en microscopie comme nous le verrons par la suite (cf. Partie II-IV-B).

D. Suivi de la réaction des iminosydnones libérant deux fluorophores "*in vitro*"

Nous avons désiré suivre la réaction entre les iminosydnones à double exaltation de fluorescence et le BCN par l'augmentation de fluorescence relative aux deux produits formés dans le cas où les propriétés optiques de ces derniers nous le permettent.

La sonde qui nous paraissait la plus adaptée pour cette visualisation est l'iminosydnone **70**. En effet, les deux produits issus de la réaction avec le BCN sont excitables à la même longueur d'onde et donc observables sur le même spectre de fluorescence, ce qui facilite l'expérience. Leurs *maxima* d'émission sont séparés de 136 nm tout en étant de même intensité relative (cf SI), permettant théoriquement d'observer les deux émissions distinctement.

La réaction a été réalisée dans la cuve d'analyse de fluorescence à 1 μ M dans le DMSO avec 50 équivalents de BCN. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 173**.

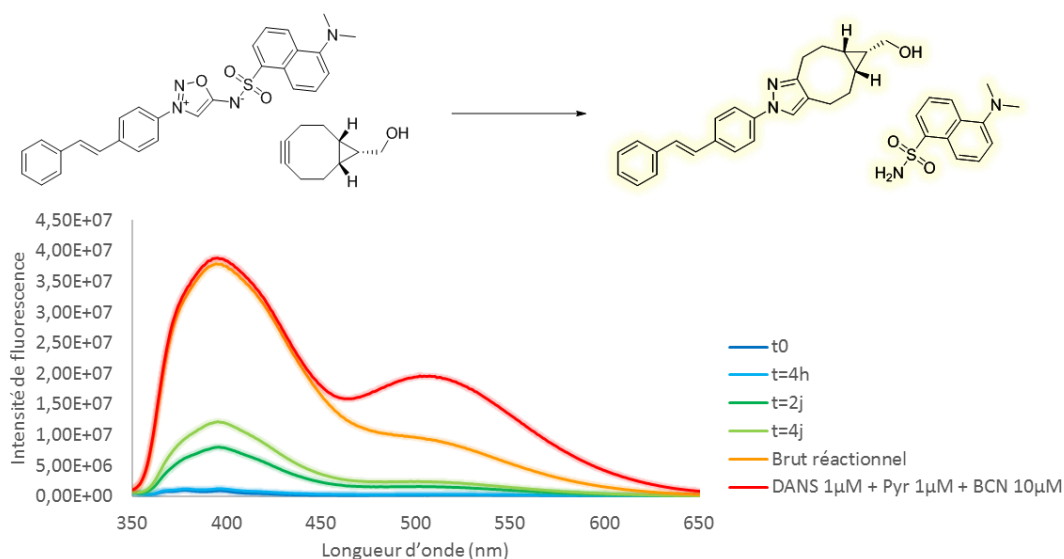


Figure 173 : Suivi de la réaction entre l'iminosydnone **70** (1 μM) et le BCN (50 μM) ; solvant : DMSO ; excitation : 340 nm
 * brut réactionnel obtenu en effectuant la réaction à 0.33 mM, concentration finale en pyrazole et DANS = 1 μM.

La constante de vitesse de l'analogue **6a** de ce produit portant un tosyl à la place du groupement dansyl est de 0,022. Cela nous donne un ordre d'idée du temps nécessaire pour atteindre la conversion totale de cette réaction selon la loi de cinétique :

$$\frac{\Delta[\text{produit}]}{\Delta t} = k \times [\text{iminosydnone}] \times [\text{BCN}]$$

Équation 6 : Approximation de la loi de cinétique donnant un ordre de grandeur du temps nécessaire pour atteindre la complétion de la réaction.

Avec une concentration en iminosydnone de 1 μM (la concentration utilisée pour les mesures de fluorescence), la réaction atteint la complétion en 10 jours expliquant la faible intensité observée après 4 jours de réaction. Nous avons alors réalisé l'expérience en milieu bien plus concentré (0,33 mM) ; une dilution du brut réactionnel permet de rajuster la concentration à 1 μM pour obtenir un spectre comparable à l'expérience précédente. Le signal correspondant au pyrazole est bien visible. En revanche, on n'observe qu'un simple épaulement à 510 nm, plutôt qu'un signal de même intensité comme attendu, correspondant au noyau dansyl.

Pour tenter de comprendre ce phénomène, nous avons simulé le brut réactionnel en mélangeant les produits finaux de la réaction en quantité équimolaire et en ajoutant un excès de BCN (**Figure 173**, spectre rouge). Dans ce cas, le signal observé est bien conforme aux attentes.

Pour autant, les analyses LCMS et RMN indiquent que la réaction est totale et aucun autre produit que le pyrazole et le sulfonamide n'est détecté. Nous avons envisagé que la restriction du signal puisse être due à l'isocyanate ou l'acide carbamique dérivés du dansyl, mais ceux-ci sont décrits pour ne pas tolérer la présence d'eau,^{235, 236} leur présence est donc peu probable. Ces résultats compromettent l'utilisation du dansyl groupement fluorescent sur les iminosydnones.

²³⁵ E. P. Johnson, E. Schaumann, in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, American Cancer Society, **2009**.

²³⁶ J.-B. Malaubier, *Synlett* **2004**, 2004, 2644–2645.

Notre attention s'est donc naturellement portée sur la sonde **66** qui libère deux substances aux émissions de fluorescence bien distinctes (109 nm). En revanche les longueurs d'onde d'excitation du pyrazole et du naphthalimide sont également éloignées, ce qui implique de faire deux spectres de fluorescence pour un instant *t*. La réaction a également été réalisée à 1 μM avec cette fois-ci 10 équivalents de BCN et a été suivie pendant plusieurs jours. Les spectres obtenus au cours du temps sont présentés dans la **Figure 174**.

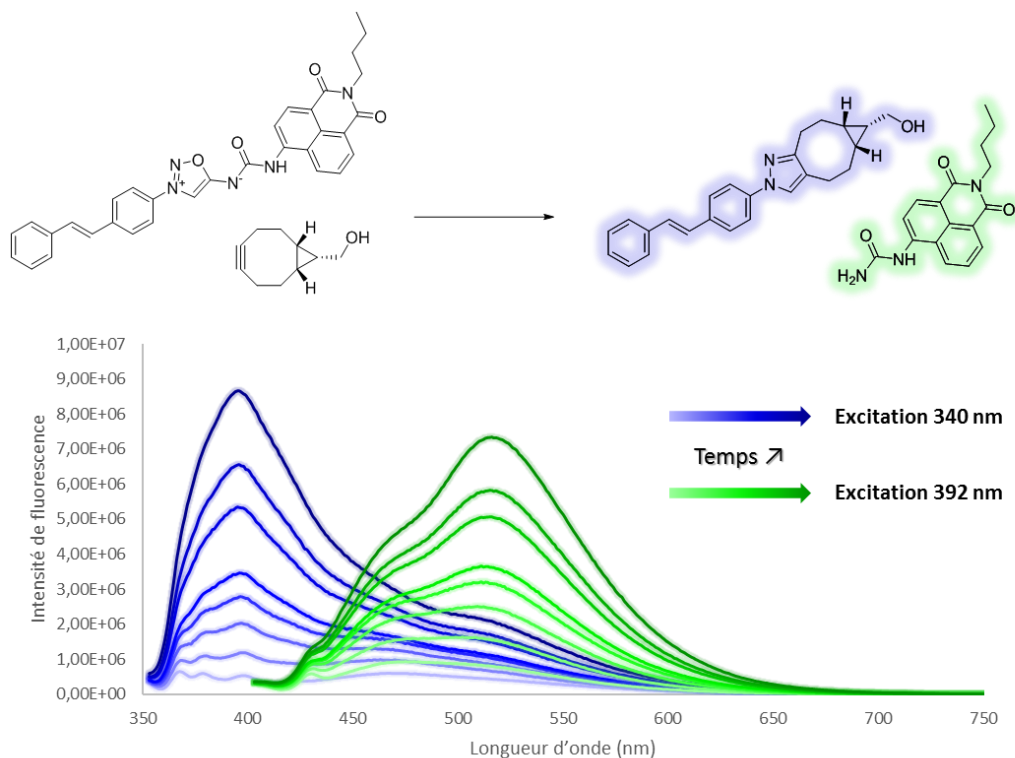


Figure 174 : Suivi de la réaction entre l'iminosynone **66** (1 μM) et le BCN (10 μM) ; solvant : DMSO ; excitation : 340 nm – 392 nm.

Cette fois-ci, on peut observer la double exaltation de fluorescence obtenue avec la réaction de click & release. Lorsque l'on excite à 340 nm, on voit une nette augmentation de fluorescence à 400 nm correspondant au pyrazole, ainsi qu'un léger signal aux alentours de 520 nm, correspondant au naphthalimide qui absorbe faiblement à cette longueur d'onde d'excitation. Lorsqu'on excite à 392 nm, on distingue l'augmentation de l'émission du naphthalimide au cours du temps.

Nous avons ainsi montré le principe de double exaltation de fluorescence en utilisant la réactivité des iminosynones avec les cycloalcyne. Après avoir déterminé les propriétés optiques de ces objets et leurs capacités théoriques à être activés par la réaction de click & release, nous avons pu suivre la réaction en observant l'exaltation de fluorescence relative aux deux produits formés.

IV. Utilisation des iminosydnonnes à double exaltation de fluorescence en microscopie confocale pour l'imagerie cellulaire

Après l'observation de la double exaltation de fluorescence en solution, l'étape suivante dans l'étude de nos sondes est la visualisation de cellules par microscopie confocale à fluorescence. Les résultats présentés dans cette partie ont été obtenus en collaboration avec Karine Porte (Service de Chimie Bioorganique et de Marquage, CEA) et le Dr. Anne Wijkhuisen (Service de pharmacologie et d'immunoanalyse, CEA) pour la culture cellulaire. Les images de microscopie confocale ont été obtenues sur la plateforme Imagerie-Gif (Gif-sur-Yvette).

A. Choix de la sonde et des conditions d'observation

Les microscopes à fluorescence que l'on trouve le plus couramment disposent de cubes de fluorescence. Il s'agit d'unités optiques constituées de différents filtres. Un système typique possède 3 filtres (**Figure 175**) :

- le filtre d'excitation, généralement un passe-bande qui sélectionne les longueurs d'ondes irradiant l'échantillon ;
- un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière à la fréquence d'excitation et transmet les longueurs d'ondes plus grandes ;
- un filtre d'émission, passe-bande ou passe-haut qui sélectionne les longueurs d'ondes à observer.

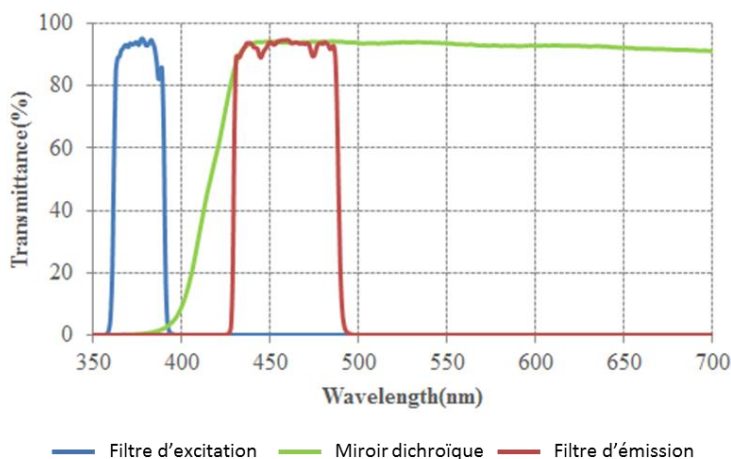


Figure 175 : Propriétés du cube de fluorescence utilisé pour visualiser le DAPI.

Ces cubes de fluorescence sont construits pour correspondre aux longueurs d'ondes caractéristiques des fluorophores commerciaux employés couramment en biologie (DAPI, GFP, FITC, TRITC, Texas Red ... etc). C'est pourquoi ils se révèlent peu adaptés à l'observation de nos fluorophores qui ont des données spectrales particulières.

Nous avons donc utilisé un microscope confocal muni de lasers monochromes et sur lequel il est possible de sélectionner la plage de visualisation au nm près. Ce système nous permet d'observer indépendamment les deux unités fluorescentes relarguées.

Le facteur majeur déterminant le choix de la sonde que nous avons utilisé pour visualiser les cellules est la longueur d'onde d'excitation. En effet, parmi les lasers que nous pouvons utiliser, celui émettant le plus bas est à 405 nm. Les pyrazoles portant un groupement styryl n'absorbent pas à cette longueur d'onde et ne peuvent pas être utilisés. Nous sommes donc limités à la sonde **69**.

Il nous faut par la suite déterminer les paramètres de visualisation pour distinguer les deux fluorophores. Nous utilisons pour cela deux jeux de paramètres (**Figure 176**).

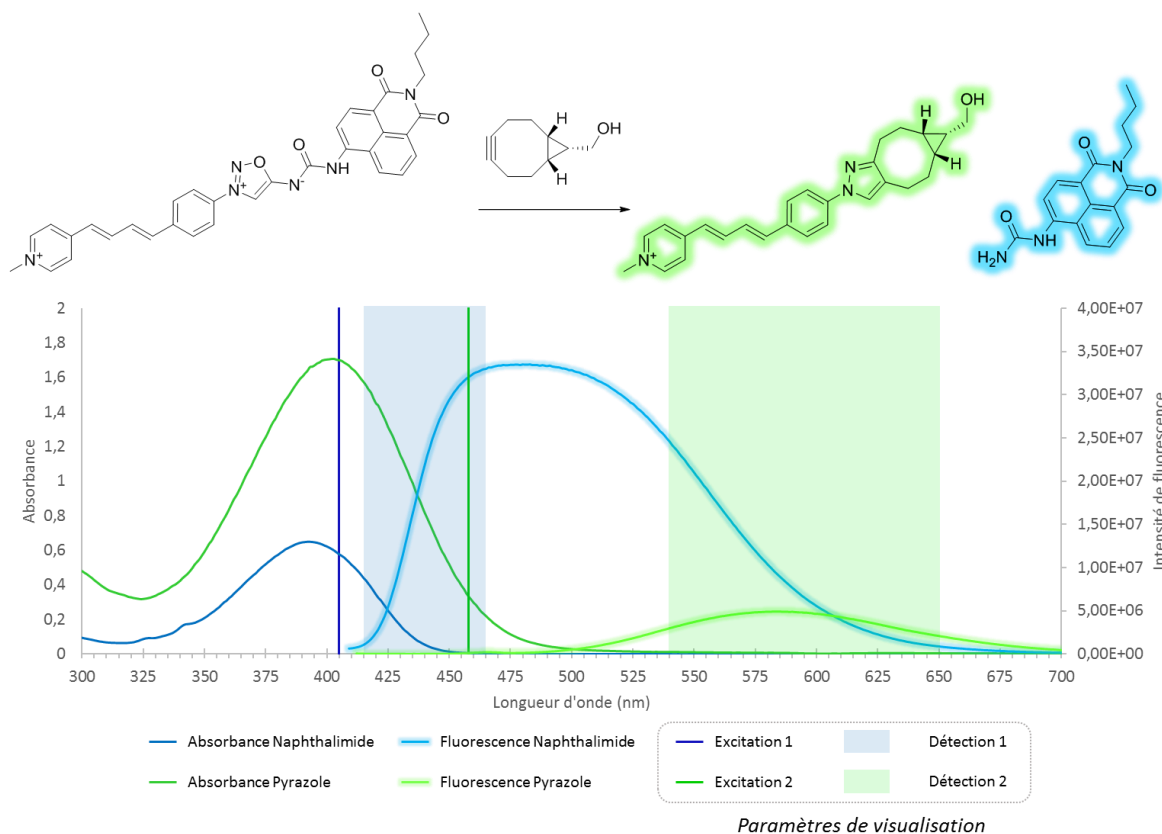


Figure 176 : Spectres d'absorbance et de fluorescence des produits obtenus par réaction de l'iminosydnone **69** avec le BCN ; Paramètres du microscope permettant la visualisation distincte des deux entités.

Pour observer le naphthalimide, nous utilisons une excitation à 405 nm (Excitation 1), longueur d'onde à laquelle les deux fluorophores ont leur absorption maximale. Les deux molécules émettent donc de la fluorescence, mais nous ne collectons qu'entre 415 et 465 nm (Détection 1), soit en dehors de la zone d'émission du pyrazole. Celui-ci est détecté dans la fenêtre 540-650 nm (Détection 2). Le naphthalimide fluoresce également dans ce domaine, nous employons donc une excitation à 458 nm (Excitation 2). A cette longueur d'onde, le naphthalimide n'absorbe pas, ce qui permet d'attribuer la fluorescence observée au pyrazole pour ce second jeu de paramètres.

B. Utilisation de l'iminosydnone **69** pour le marquage cellulaire

Le but de cette étude est de voir s'il est possible de réaliser la réaction de click & release à l'intérieur de cellules. Nous avons utilisé des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), dont la culture est simple à mettre en œuvre. Ces cellules sont adhérentes, ce qui veut dire que la culture se fait à même la lamelle du montage de visualisation.

Les premières expériences ont été menées sur cellules fixées et perméabilisées. Ces deux étapes permettent la stabilisation des structures cellulaires sans en perturber l'état natif, ainsi que la perméabilisation des membranes, facilitant la diffusion de la sonde.

La sonde a été incubée en premier lieu avant ajout du cycloalcyne. Nous avons utilisé le DBCO afin d'augmenter la cinétique de réaction. Le marqueur de noyau le plus utilisé généralement est le DAPI. Dans notre cas, il n'est pas utilisable puisque son signal serait confondu avec celui du naphthalimide. Nous avons utilisé le marqueur DRAQ5, fluoresçant dans le rouge lointain.

Dans un premier temps, nous avons testé deux DBCO, l'un fonctionnalisé par un acide carboxylique et l'autre portant une amine. Cette différence structurelle est susceptible de modifier la distribution au sein de la cellule et peut avoir un effet important sur les images obtenues. La concentration de sonde **69** utilisée est de 10 μM , à laquelle nous avons opposé 40 équivalents de DBCO. Un témoin sans addition de cycloalcyne a également été fait (**Figure 177**). Les paramètres utilisés pour enregistrer les images restent inchangés entre les différentes expériences afin d'avoir une intensité de fluorescence comparable.

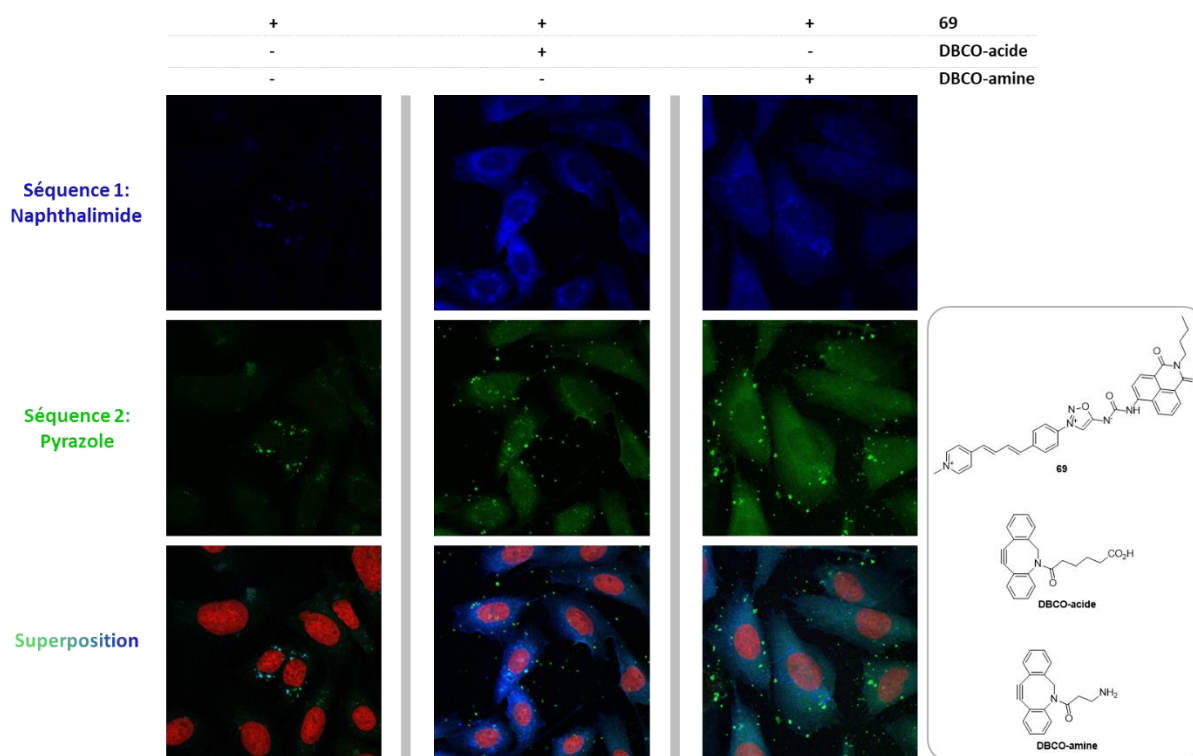


Figure 177 : Images obtenues par microscopie confocale sur cellules CHO fixées et perméabilisées de la sonde **69** seule (10 μM , première colonne), après addition de DBCO-acide (400 μM , deuxième colonne), de DBCO-amine (400 μM , troisième colonne).

Lorsque la sonde est incubée seule, on observe un signal de fluorescence faible et les signaux en provenance des deux séquences sont co-localisés (première colonne). Après l'addition du cycloalcyne, on observe une exaltation de fluorescence sur les deux canaux. Le turn-on vert est plus grand pour le

DBCO-amine, tandis que c'est le bleu qui est plus intense pour DBCO-acide. On observe que le naphthalimide et le pyrazole ont une distribution différente. Le naphthalimide est plus localisé dans des compartiments cellulaires proches du noyau et a tendance à former des amas fluorescents bleus, alors que le pyrazole est réparti de manière plus éparse, y compris dans le noyau. Cette différence de localisation est d'autant plus flagrante lorsqu'on regarde la superposition des signaux sans le marqueur du noyau (**Figure 178**).

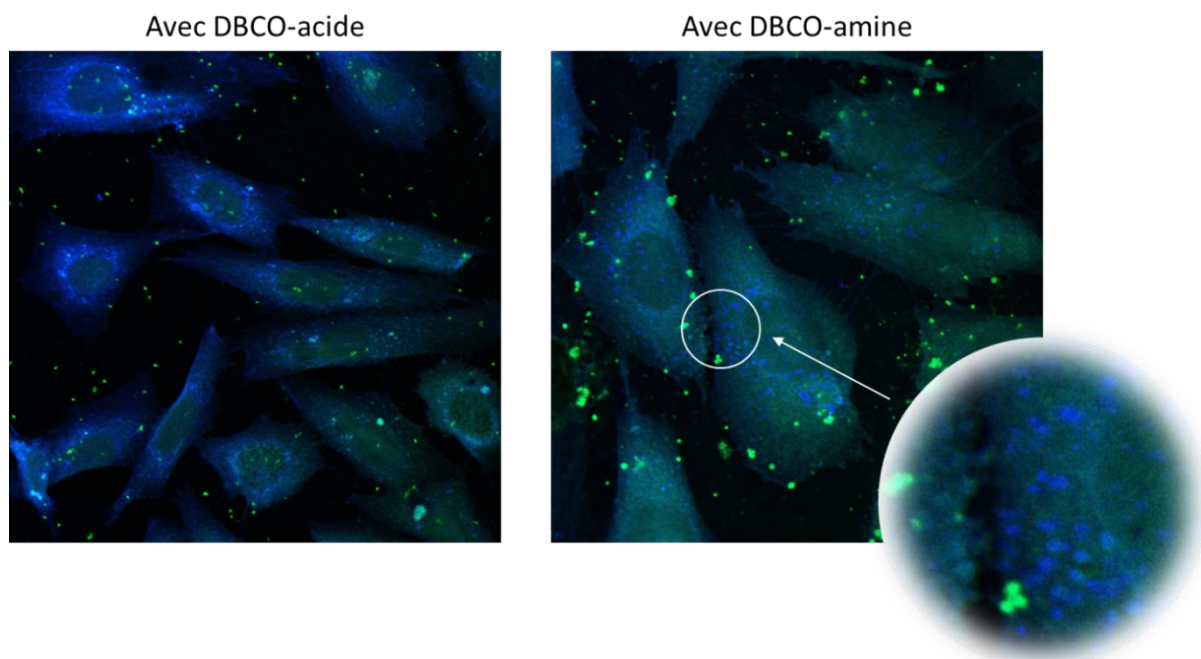


Figure 178 : Superposition des signaux bleu et vert pour la réaction entre 69 (10 µM) et DBCO (400 µM) sur cellules CHO fixées et perméabilisées.

Cependant, on observe des amas fluorescents verts en dehors des cellules, probablement du pyrazole qui aurait précipité. Ce phénomène est d'autant plus visible lorsque le DBCO-amine est utilisé.

Pour pallier cela, nous avons répété le marquage à 5 µM en sonde et 500 µM de DBCO-acide (**Figure 179**).

On observe un effet de turn-on similaire aux conditions précédentes ainsi que le même profil de localisation des deux fluorophores dans la cellule. La réduction de concentration a eu un effet très positif sur la formation d'agrégats que nous avions à 10 µM.

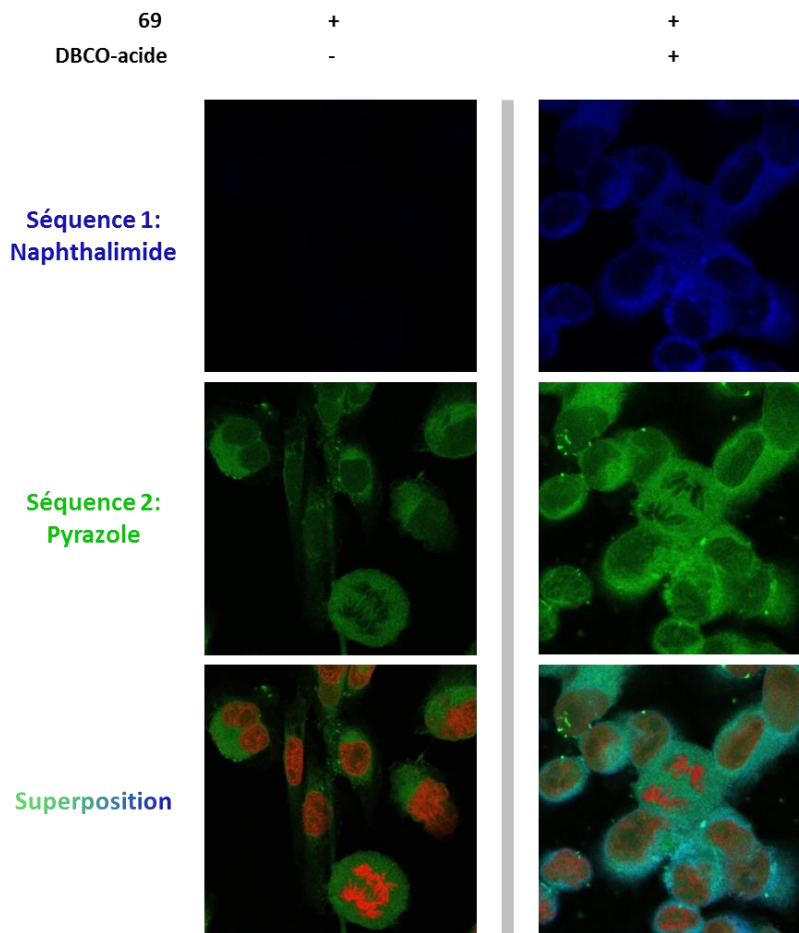


Figure 179 : Images obtenues par microscopie confocale sur cellules CHO fixées et perméabilisées de la sonde **69** seule (5 μ M, première colonne), après addition de DBCO-acide (500 μ M, deuxième colonne).

Il est également intéressant d'obtenir des images de marquage avec cette sonde sur cellules vivantes. En effet, sur cellules fixées et perméabilisées, les membranes laissent passer la sonde et les produits formés qui diffusent de manière relativement homogène dans la cellule. Ce n'est pas le cas pour des cellules vivantes. Les différentes organelles possèdent des propriétés physico-chimiques très différentes et ne permettent pas la libre circulation des molécules. On s'attend donc à une accumulation plus localisée dans le cas du vivant.

Pour le marquage des cellules vivantes, nous avons gardé la concentration de 5 μ M en sonde. Les deux DBCO précédemment étudiés ont été testés. Le marquage du noyau s'est montré très défavorable sur les cellules vivantes ; il n'est donc pas présenté ici.

Les images obtenues sur cellules vivantes sont présentées dans la **Figure 180**.

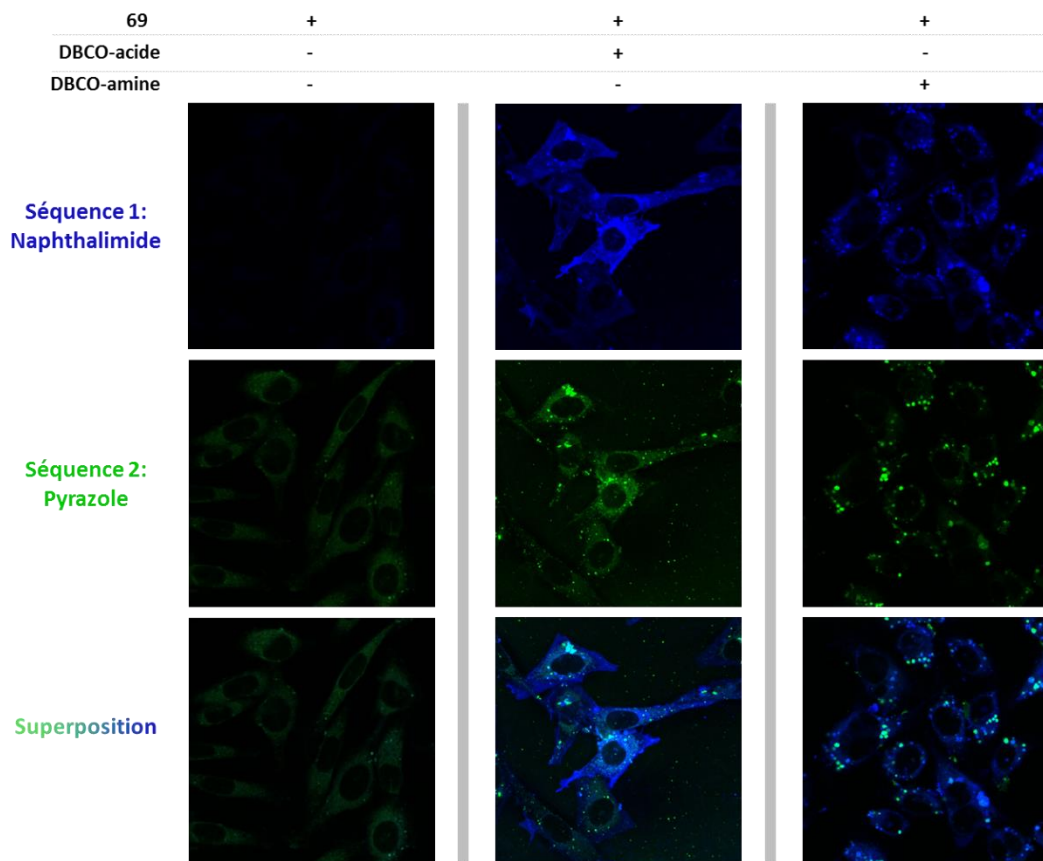


Figure 180 : Images obtenues par microscopie confocale sur cellules CHO vivantes de la sonde **69** seule (5 μ M, première colonne) ; après addition de DBCO-acide (200 μ M, deuxième colonne), de DBCO-amine (200 μ M, troisième colonne).

La réaction de click ainsi que la double exaltation de fluorescence se font de manière efficace dans les cellules vivantes. La distribution au sein de la cellule est bien différente de celle obtenue sur cellules fixées et perméabilisées comme nous l'avions supposé.

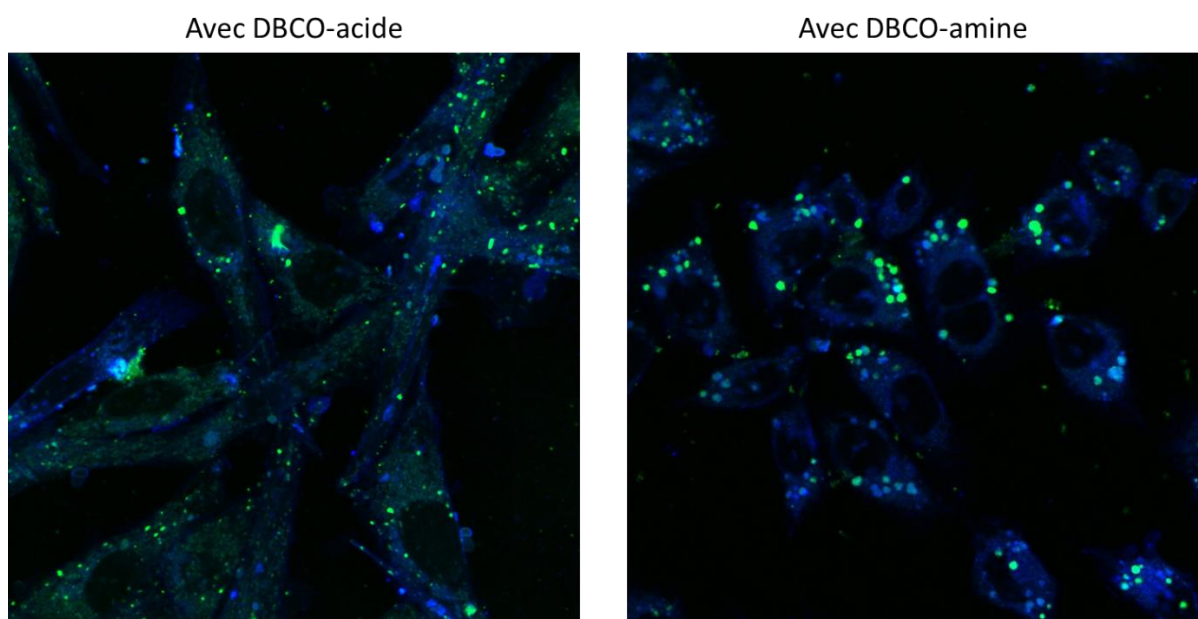


Figure 181 : Zoom sur la superposition des signaux obtenus sur cellules CHO vivantes pour l'addition de la sonde **69** (5 μ M) et de DBCO (200 μ M).

En particulier, le pyrazole est présent dans des organelles particulières (**Figure 181**). Le caractère plutôt lipophile et chargé positivement du pyridinium ainsi que la distribution observée laisse penser à une accumulation dans les lysosomes. Mais sans co-localisation avec un fluorophore spécifique de cette organelle, nous ne pouvons pas tirer de conclusion définitive.

La fluorescence émise par le naphthalimide est localisée également assez spécifiquement, surtout lorsque le DBCO-amine est utilisé. L'établissement des organelles ciblées ainsi que les facteurs menant à une différence de localisation selon le cycloalcyne utilisé restent encore à étudier.

Ces expériences indiquent que la sonde **69** peut être efficacement clivée à l'intérieur des cellules vivantes. Cela montre que la réaction de click & release des iminosydones avec les cycloalcynes est bien bioorthogonale. Cela ouvre également un certain nombre de perspectives telles que la libération contrôlée de principes actifs suivi par fluorescence.

PARTIE III – DEVELOPPEMENT D'ESPACEURS CLIVABLES BIOORTHOGONAUX POUR DES APPLICATIONS EN BIOLOGIE

La réactivité particulière des iminosydnonnes avec les cycloalcynes a été étudiée lors du premier chapitre de ce manuscrit. Cette réaction de click & release permet la ligation de deux unités et dans un même temps la coupure d'un composé.

Ce troisième chapitre concerne l'exploitation des propriétés de coupure des iminosydnonnes en présence des cycloalcynes pour l'élaboration d'espaceurs clivables. Nous montrons ici deux applications distinctes que sont le "target-fishing" et les conjugués anticorps/médicaments. Avant toute chose une brève introduction sur les espaceurs clivables et leur utilisation est présentée.

I. Introduction sur les espaceurs clivables

Le clivage d'une liaison chimique entre deux unités a été étudié en premier lieu pour des application en synthèse organique pour la synthèse sur support solide et la chimie combinatoire.²³⁷ Ces espaceurs permettant de lier une petite molécule à un support solide doivent se montrer résistants face aux diverses conditions réactionnelles utilisées lors de la synthèse. Cette contrainte implique que leur clivage se fasse dans des conditions drastiques, inutilisable pour des applications en biologie.

De nouveaux espaceurs ont vu le jour plus récemment, satisfaisant en partie les critères de bioorthogonalité. Ces nouveaux outils doivent répondre à des demandes additionnelles relatives à l'application recherchée. Les domaines d'applicabilité des espaceurs clivables sont le développement de médicaments, la protéomique, le séquençage ADN et l'imagerie (**Figure 182**).²³⁸

²³⁷ F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091–2158.

²³⁸ G. Leriche, L. Chisholm, A. Wagner, *Bioorgan. Med. Chem.* **2012**, *20*, 571–582.

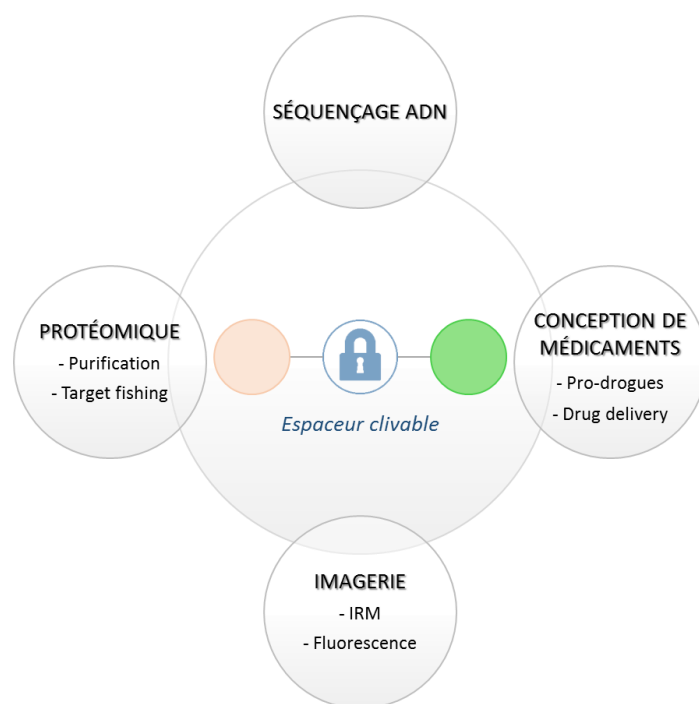


Figure 182 : Champs d'application pour les espaceurs clivables bioorthogonaux.

Différents mécanismes ont été envisagés pour la conception de ces espaceurs. Nous les décrivons brièvement de manière non exhaustive en introduction de ce chapitre en les classant selon leur mécanisme d'activation.

A. Clivage enzymatique

Parmi les grandes classes d'enzymes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases), les hydrolases sont les plus utilisées pour induire le clivage d'un espaceur. Elles utilisent l'eau comme nucléophile pour couper une liaison chimique, généralement de type ester, amide ou glycosidique.

Cette méthode de clivage est parfaitement biocompatible et se distingue des autres coupures par sa grande spécificité. Les protéases sont les hydrolases capables de cliver une liaison peptidique. En absence de ces enzymes, un lien amide est très robuste et ne s'hydrolyse pas en conditions physiologiques. Chaque protéase reconnaît un acide aminé ou une séquence peptidique spécifique. Elle pourra être introduite au sein de l'espaceur en vue de son clivage.

Les espaceurs clivables par des protéases ont été largement utilisés pour du relargage de principes actifs²³⁹ ou dans le développement d'outils diagnostiques²⁴⁰ puisque ces enzymes sont surexprimées dans de nombreux cas de cancers et autres affections. Typiquement, une séquence peptidique liant un fluorophore et un quencheur clivable par des enzymes surexprimées dans les tumeurs est une technologie assez utilisée pour imager des tumeurs (**Figure 183**).²⁴¹

²³⁹ K. Y. Choi, M. Swierczewska, S. Lee, X. Chen, *Theranostics* **2012**, 2, 156–179.

²⁴⁰ C. Bremer, C.-H. Tung, R. Weissleder, *Nat. Med.* **2001**, 7, 743–748.

²⁴¹ M. Whitney, E. N. Savariar, B. Friedman, R. A. Levin, J. L. Crisp, H. L. Glasgow, R. Lefkowitz, S. R. Adams, P. Steinbach, N. Nashi, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 325–330.

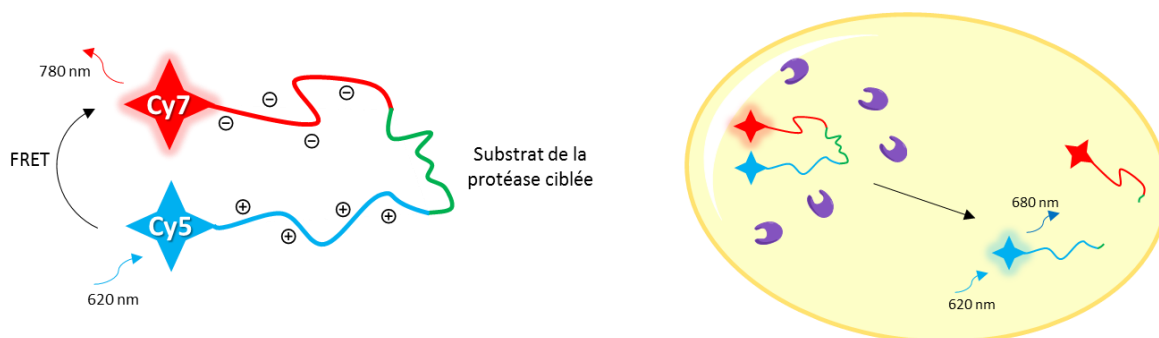


Figure 183 : Concept de sonde fluorescente utilisant un linker clivable enzymatiquement et un couple FRET Cy5/Cy7.

Les estérases et glycosidases sont également exploitées pour la conception d'espacesurs clivables enzymatiquement mais elles sont moins employées que les peptidases, probablement en raison de la possible hydrolyse non enzymatique inhérente à la fonction ester.

L'utilisation d'enzymes permet d'avoir des espacesurs très spécifiques. Le maintien de cette spécificité peut néanmoins être un défi car les modifications apportées par les substituants peuvent être une entrave à la reconnaissance enzymatique.

B. Clivage photo-induit

Les réactions de clivages activées par un rayonnement sont sélectives et permettent de contrôler la coupure spatialement et temporellement. Ces réactions sont largement inspirées des réactions de photo-déprotection et autres coupures activées par la lumière. Elles nécessitent la présence d'un groupement photo-activable.

Les dérivés de l'alcool *ortho*-nitro benzylique sont sans conteste les groupements photosensibles les plus employés en tant qu'espacesurs photo-activables. Après excitation dans le proche UV (300- 365 nm), il se produit un transfert de proton de la position benzylique au groupement nitro. L'acide azinique formé se réarrange pour libérer un composé nitroso et le composé d'intérêt (**Figure 184**).

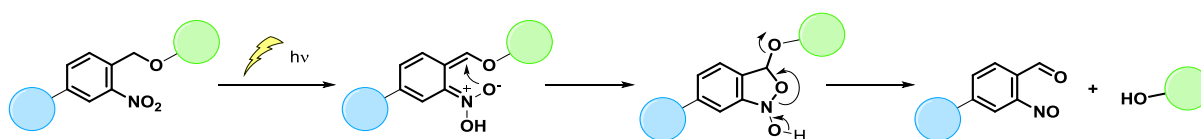


Figure 184 : Clivage photo-induit d'un espacesur dérivé de l'alcool *ortho*-nitro benzylique.

Ce clivage possède les inconvénients de l'irradiation UV dans les milieux biologiques : la toxicité de l'irradiation UV très énergétique et la faible profondeur de pénétration du rayonnement dans les tissus. Pour y remédier, Specht et ses collaborateurs ont développé un autre groupement nitro photo-labile par excitation à deux photons à 800 nm.²⁴²

Les composés nitroso libérés par ces espacesurs sont toxiques pour les cellules et restent un frein important dans l'utilisation de ces dérivés en tant que groupement photo-clivables.

²⁴² L. Donato, A. Mourot, C. M. Davenport, C. Herbivo, D. Warther, J. Léonard, F. Bolze, J.-F. Nicoud, R. H. Kramer, M. Goeldner, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1840–1843.

D'autres espaceurs photoactivables ont été développés entre autres en utilisant un noyau coumarine.^{243, 244} Ces composés se révèlent plus efficaces que la classe des *ortho*-nitrobenzènes.

C. Clivage à pH acide

Les espaces clivables par un changement de pH sont généralement utilisés dans le domaine du "drug delivery" car il est connu que le pH local au sein des tumeurs et dans les zones inflammatoires est plus acide.²⁴⁵ L'équilibre entre des conditions de clivage biocompatibles et une bonne stabilité est difficile à atteindre.

Il existe une grande variété de fonctions sensibles à pH acide pouvant jouer le rôle d'espaceur clivable. Les principales sont résumées dans la **Figure 185**.²⁴⁶

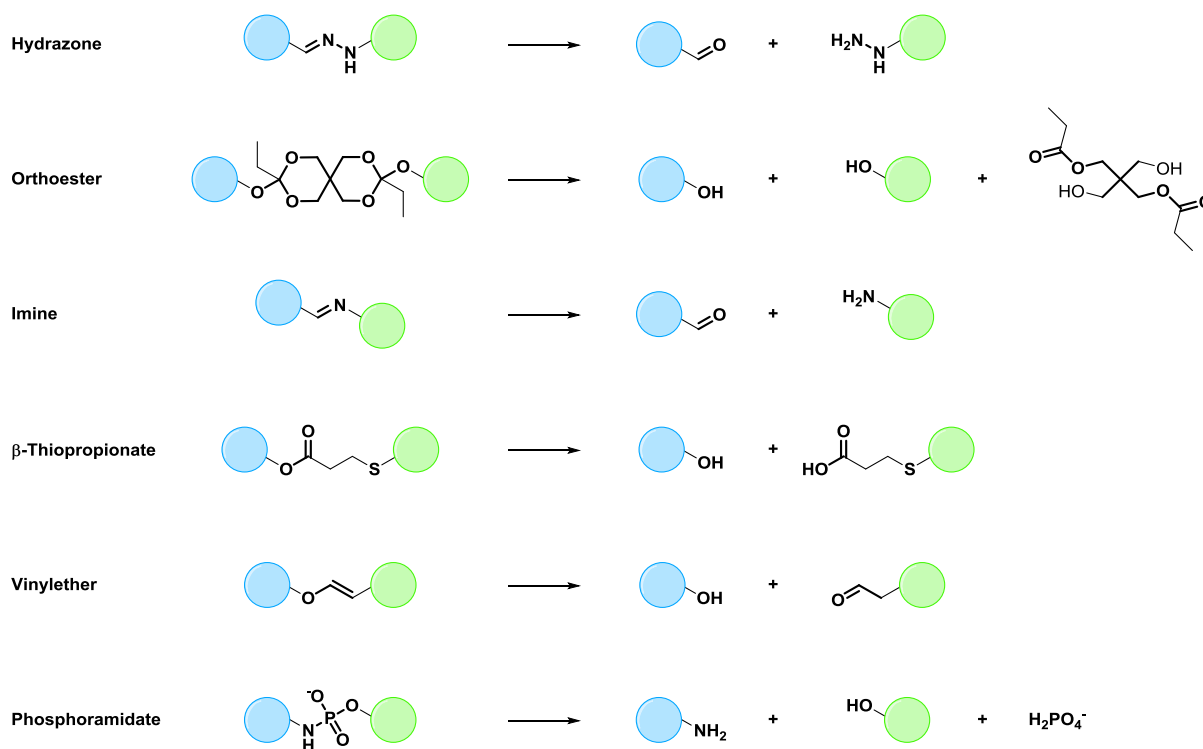


Figure 185 : Principaux espaceurs clivables à pH acide.

Le choix du bon espaceur pour une application donnée reste délicat. Le pH de coupure est un paramètre crucial qui n'est pas étudié de manière systématique, or les variations de pH nécessaires pour une application donnée peuvent être subtiles.

La liaison hydrazone est assez souvent sélectionnée pour des raisons synthétiques puisqu'elle possède l'avantage d'être également une réaction bioorthogonale de ligation (cf. Introduction générale—I-B—La condensation entre les carbonyles et les amines nucléophiles). Cette liaison a été par exemple employée avec la doxorubicine, un anticancéreux qui possède une fonction cétone. Il a été

²⁴³ K. Katayama, S. Tsukiji, T. Furuta, T. Nagamune, *Chem. Commun.* **2008**, 0, 5399–5401.

²⁴⁴ S. Härtner, H.-C. Kim, N. Hampp, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, 45, 2443–2452.

²⁴⁵ I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer research* **1989**, 49, 4373–4384.

²⁴⁶ W. Gao, J. M. Chan, O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics* **2010**, 7, 1913–1920.

montré que l'hydrazone formée sur ce carbonyl était stable à pH 7.4. Dans des milieux plus acides, la liaison est hydrolysée, libérant la doxorubicine sous sa forme libre (**Figure 186**).²⁴⁷

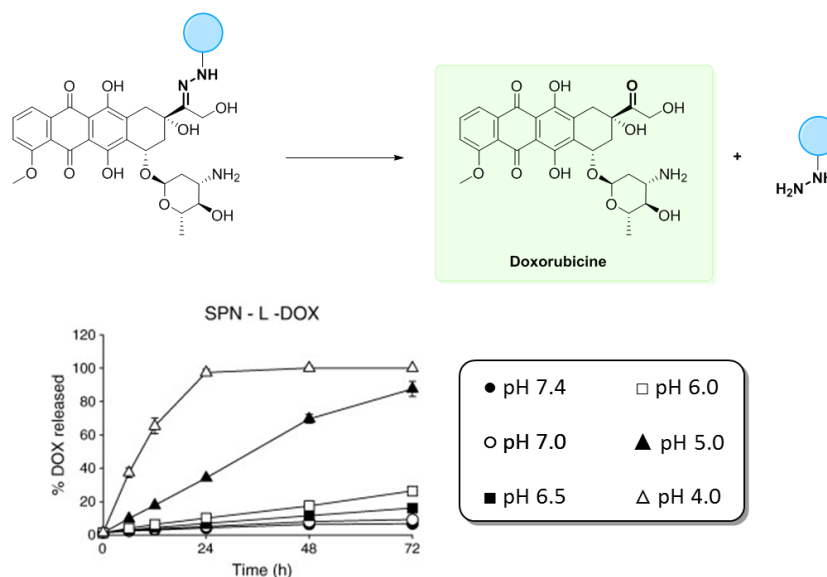


Figure 186 : Libération de la doxorubicine à différents pH à partir de l'hydrazone correspondante. Modifié à partir de ²⁴⁷

D. Clivage par voie chimique

Dans ce paragraphe nous pouvons inclure les réactions de *click & release* décrites auparavant dans l'introduction générale de ce manuscrit *i.e.* la ligation de Staudinger décrite par Florent ainsi que la cycloaddition tétrazine/*trans*-cyclooctène décrite par Robillard (cf. Introduction générale). A ces réactions s'ajoutent des méthodes n'engendrant qu'une coupure sans ligation.

1. Clivage activé par des métaux de transition

Les réactions de clivages bioorthogonales catalysées par les métaux de transition sont généralement inspirées des méthodes de déprotection en chimie organique. Bien que couramment utilisées en synthèse, le développement de conditions compatibles avec les milieux biologiques est un enjeu important. Le champ d'application de ces réactions reste le relargage de principes actifs dont une fonction est masquée, généralement par un groupement allyl ou propargyl.²⁴⁸

Trois métaux dominent dans cette stratégie : le palladium, le ruthénium et le cuivre. L'un des premiers exemples de clivage biocompatible assisté par un métal a été développé par le groupe de Meggers en 2006. Il s'agit du clivage de carbamates allyloxycarbonyls (Alloc) pour la libération d'amines. La réaction utilisant un complexe de ruthénium a pu être menée dans des cellules pour libérer une rhodamine (**Figure 187**).²⁴⁹

²⁴⁷ L. M. Kaminskas, B. D. Kelly, V. M. McLeod, G. Sberna, D. J. Owen, B. J. Boyd, C. J.H. Porter *J. Control. Release* **2011**, *152*, 241–248.

²⁴⁸ T. Völker, E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 48–54.

²⁴⁹ C. Streu, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645–5648.

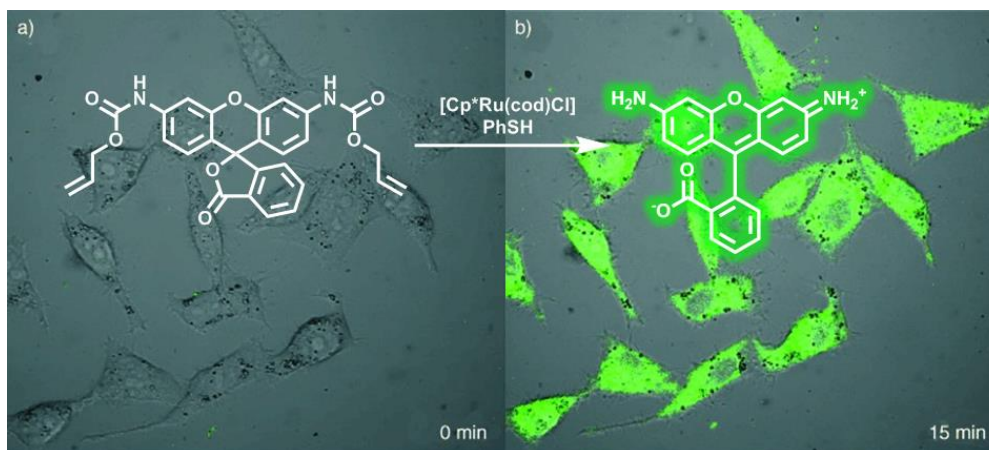


Figure 187 : Microscopie de fluorescence de la déprotection au ruthénium de la rhodamine-alloc à l'intérieur de cellules HeLa. Les cellules ont été incubées avec la rhodamine-alloc (100 μM) pendant 30 minutes, lavées au tampon PBS et puis traitées avec du $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}]$ (20 μM) et du thiophenol (500 μM). L'image a) représente les cellules juste après l'addition de $[\text{Ru}]$ et l'image b) représente les cellules après 15 minutes d'incubation. Modifiée à partir de ²⁴⁹

Plus récemment, la même équipe a perfectionné le système catalytique, permettant l'utilisation de concentrations en ruthénium plus faibles. Ce nouveau complexe a été employé avec succès dans une approche pro-drogue sur cellules (Figure 188).²⁵⁰

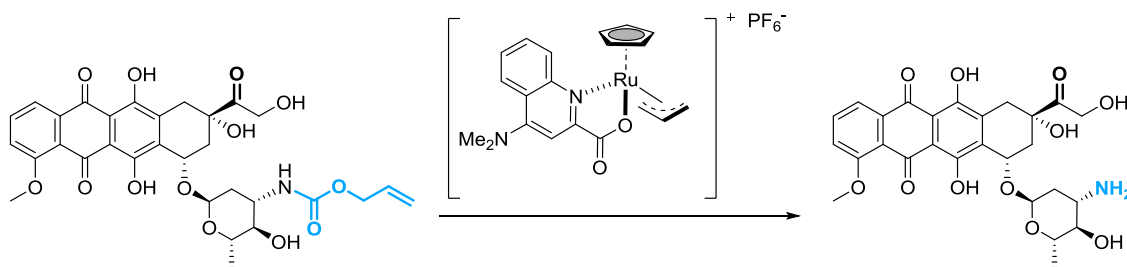


Figure 188 : Utilisation de la déprotection bioorthogonale de groupements Alloc au ruthénium dans une stratégie "pro-drogue".

Les groupements Allocs et Poc (propargyloxycarbonyl) peuvent être également clivés de manière bioorthogonale à l'aide de catalyseurs au palladium. La réaction a été menée *in cellulo* pour l'activation de protéines par clivage du groupement Poc masquant une lysine du site actif de la protéine d'intérêt (Figure 189).²⁵¹

²⁵⁰ T. Völker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10536–10540.

²⁵¹ J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, et al., *Nat. Chem.* **2014**, 6, 352–361.

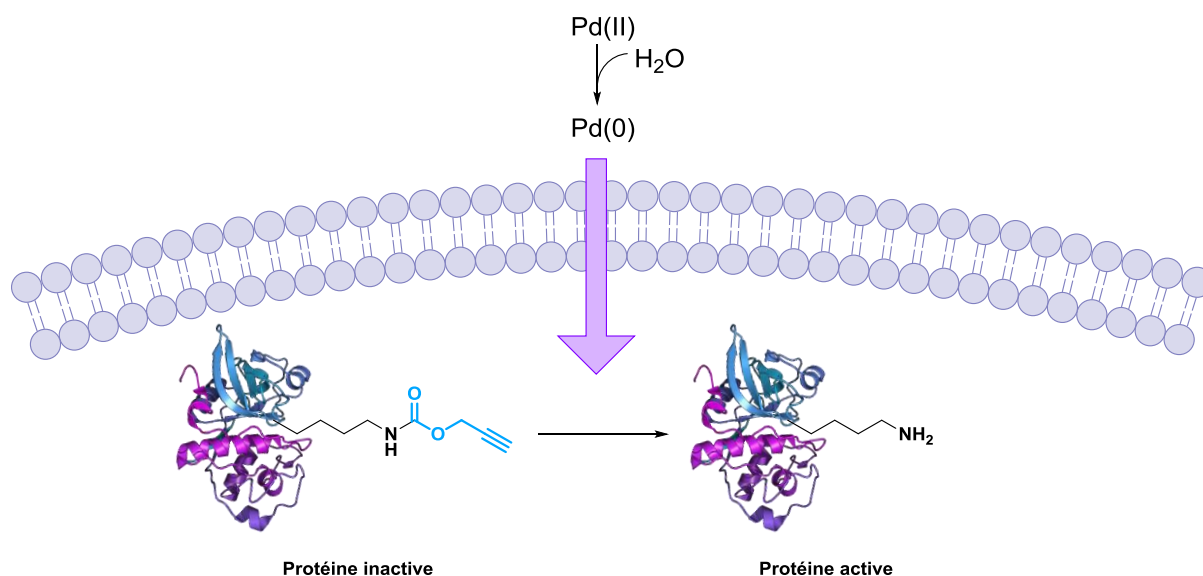


Figure 189 : "Decaging" de protéines par déprotection du groupement Boc dans des cellules.

Ces méthodes impliquent malgré tout un excès de palladium du fait de sa séquestration par les protéines présentes dans le milieu cellulaire. Dans le but de réduire la toxicité du métal et sa capture par les biomolécules du milieu, une formulation nanoparticulaire du palladium se révèle efficace.²⁵²

2. Clivage par échange de thiol

Dans la nature, les ponts disulfures ont pour rôle de maintenir la structure tridimensionnelle des protéines. Plusieurs réactifs permettent de les cliver de façon douce et sont fréquemment utilisés pour la réduction de pont disulfures en biochimie (**Figure 190**).

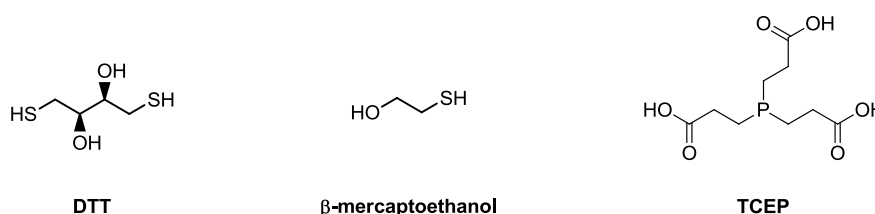


Figure 190 : Réducteurs de ponts disulfures communément utilisés.

Les espaceurs basés sur un pont disulfure ont été largement utilisés en "chemical biology" pour leur facilité d'accès. Ils peuvent être clivés par un échange disulfure avec les thiols endogènes (cystéine, homocystéine, glutathion ...) ou par réduction électrochimique.

Cette stratégie a été appliquée pour le relargage de nombreux composés cytotoxiques. En effet, la concentration cytoplasmique de glutathion est bien plus élevée que dans le milieu extra-cellulaire, plus particulièrement dans les cellules tumorales. Les espaceurs basés sur un pont disulfure sont ainsi clivés bien plus rapidement dans les cellules et permettent de cibler le relargage de façon intracellulaire (**Figure 191**).²⁵³

²⁵² R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín, M. Bradley, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239–243.

²⁵³ L. Bildstein, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2011**, *63*, 3–23.

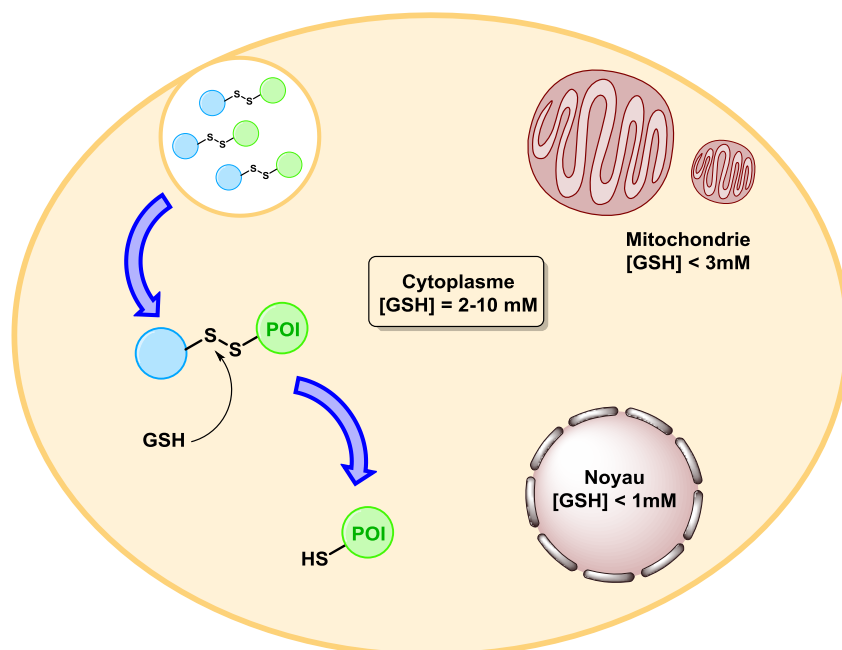


Figure 191 : Principe de relargage d'un produit d'intérêt (POI) par rupture d'un pont disulfure par les thiols endogènes ; GSH = glutathion.

Les ponts disulfures sont utilisés en tant qu'espaceur clivable dans d'autres domaines comme la protéomique,²⁵⁴ ou l'imagerie²⁵⁵. Ces espaceurs restent cependant peu robustes dans les milieux biologiques et peuvent être clivés de manière non spécifique.

Plus récemment de nouveaux espaceurs basés sur un échange de thiols ont été mis au point par l'équipe d'Anslyn. L'espaceur est un dérivé d'acide de Meldrum qui permet de lier ensemble un thiol et une amine par des réactions de Michael (étapes 1 et 2). Ces deux substituants peuvent à la suite être clivés sur simple addition de DTT (**Figure 192**).²⁵⁶

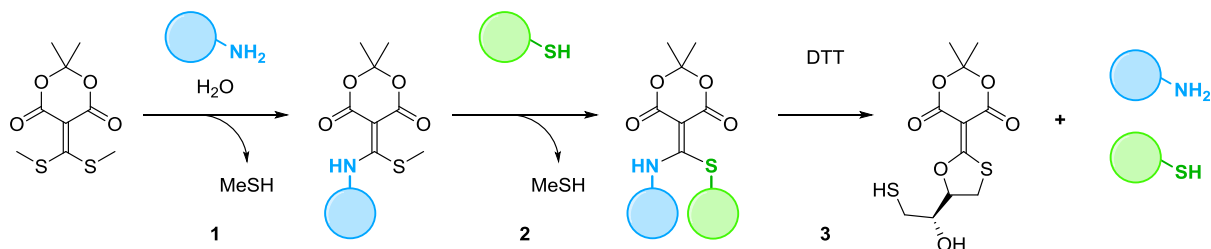


Figure 192 : Clivage d'un conjugué libérant un thiol et une amine.

De manière générale, les molécules d'intérêt accrochées à l'espaceur ne possèdent pas de thiol libre. Ainsi, ces espaceurs clivables sont généralement couplés à un bras auto-immolable.

²⁵⁴ S. J. Williams, O. Hekmat, S. G. Withers, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 116–124.

²⁵⁵ J. Razkin, V. Josserand, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, J.-L. Coll, I. Texier, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 1069–1072.

²⁵⁶ K. L. Diehl, I. V. Kolesnichenko, S. A. Robotham, J. L. Bachman, Y. Zhong, J. S. Brodbelt, E. V. Anslyn, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 968–973.

E. Espaceurs auto-immolables

Les espaceurs clivables mentionnés précédemment impliquent des modifications structurales des molécules d'intérêt à délivrer. Par ailleurs, l'espèce libérée est généralement proche du site d'activation, pouvant engendrer une gêne stérique. Les espaceurs auto-immolables permettent d'introduire une distance entre le site d'activation et l'espèce relarguée. Le clivage du premier espaceur génère une cascade de réactions spontanées libérant le composé actif souhaité (**Figure 193**).²⁵⁷

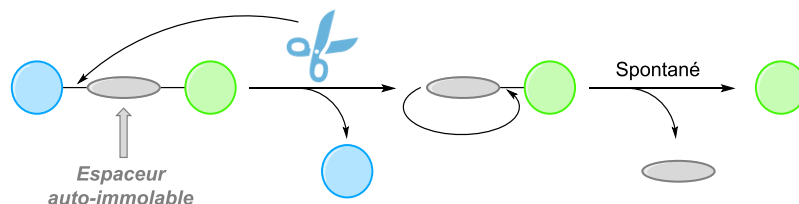


Figure 193 : Illustration schématique du principe d'un espaceur auto-immolable.

Ces espaceurs peuvent être classés selon leur mécanisme d'activation dans deux catégories : les cascades électroniques aboutissant à la formation d'une quinone ou azaquinone et les cyclisations. Dans les deux cas, le réarrangement provient de la libération d'un groupement nucléophile tels qu'un alcool, une amine ou un thiol.

La première catégorie d'espaceurs auto-immolables nécessite un noyau aromatique sur lequel se trouve le groupement nucléophile. Lorsque ce groupement est démasqué, il se produit alors une cascade électronique permettant la libération du groupement partant. Cette élimination spontanée peut être de type [1,4] (a), [1,6] (b) ou [1,8] (c et d) (**Figure 194**).

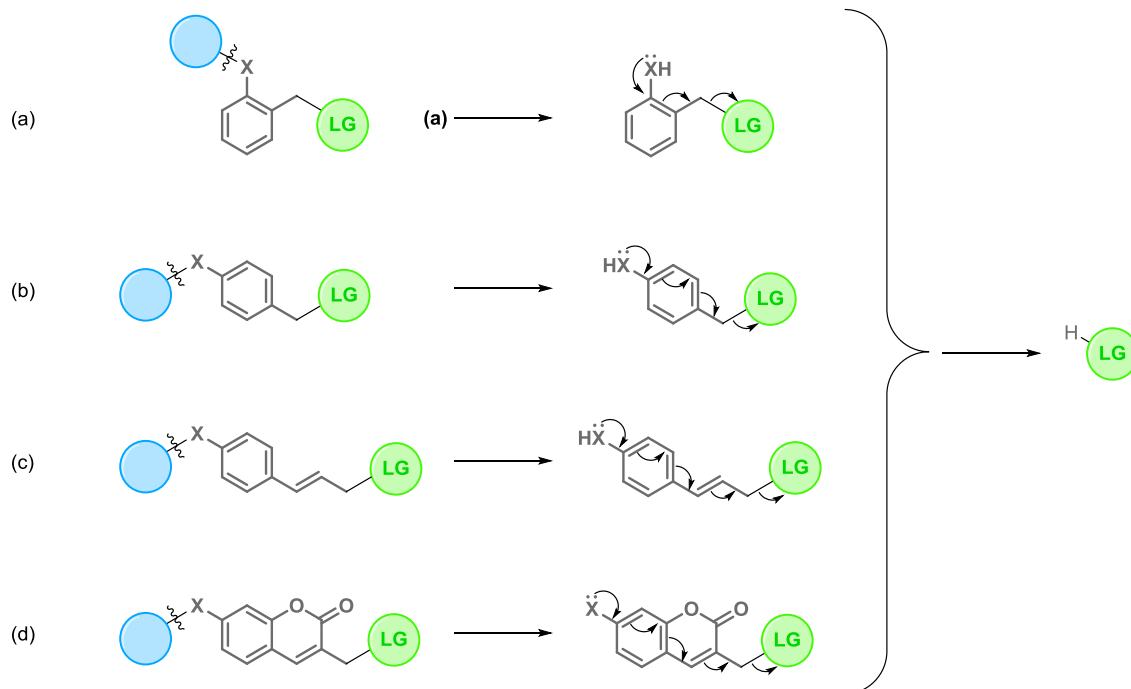


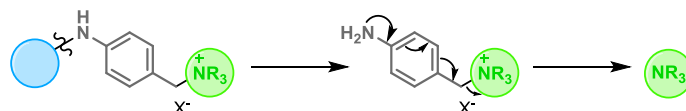
Figure 194 : Espaceurs auto-immolables basés sur une cascade électronique. X = O, NH, S. LG = groupement partant.

²⁵⁷ A. Alouane, R. Labruère, T. Le Saux, F. Schmidt, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7492–7509.

Le groupement relargué est généralement de type carbonate ou carbamate qui est ensuite décarboxylé, donnant l'amine ou l'alcool correspondant.

Récemment le groupe de Pillow a développé un espaceur auto-immolable libérant une amine tertiaire *via* l'élimination [1,6] d'un ammonium quaternaire (**Figure 195**).²⁵⁸ Cette méthode permet d'utiliser les amines tertiaires des composés d'intérêt comme point d'accroche et ainsi de relarguer de nouveaux substrats qui ne possédaient ni amine, ni alcool susceptibles d'être modifiés.

a)



b)

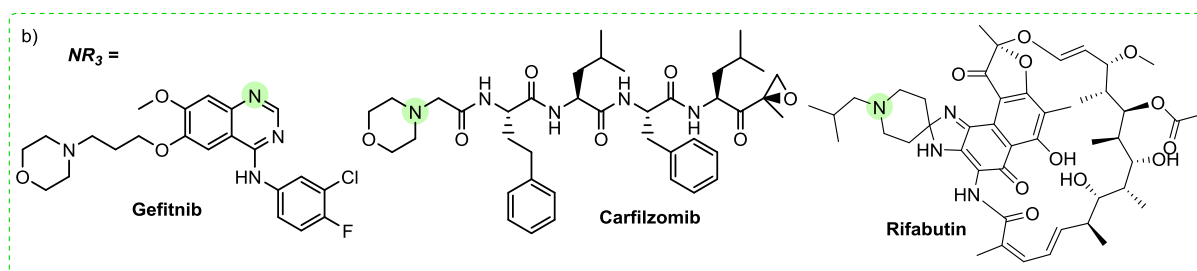


Figure 195 : a) Espaceur auto-immolable relargant des amines tertiaires.
b) Exemples représentatifs de composés biologiquement actifs relargués.

Les espaceurs auto-immolables exploitant une réaction de cyclisation impliquent l'attaque d'un groupement nucléophile sur un carbonyle ou un autre électrophile (e) (**Figure 196**). Une étape d'élimination peut également précéder l'étape de cyclisation (b). Le processus est thermodynamiquement favorisé par la formation d'un cycle stable à 5 ou 6 atomes.

La cinétique d'immolation de ces espaceurs est inférieure à celle observée pour les espaceurs utilisant une élimination. L'ajout de groupements méthyles ("trimethyl lock", **Figure 196d-e**) permet d'augmenter la cinétique de réaction d'un facteur 10^{11} suivant un effet Thorpe-Ingold.²⁵⁹

²⁵⁸ L. R. Staben, S. G. Koenig, S. M. Lehar, R. Vandlen, D. Zhang, J. Chuh, S.-F. Yu, C. Ng, J. Guo, Y. Liu, et al., *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 1112–1119.

²⁵⁹ M. N. Levine, R. T. Raines, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2412–2420.

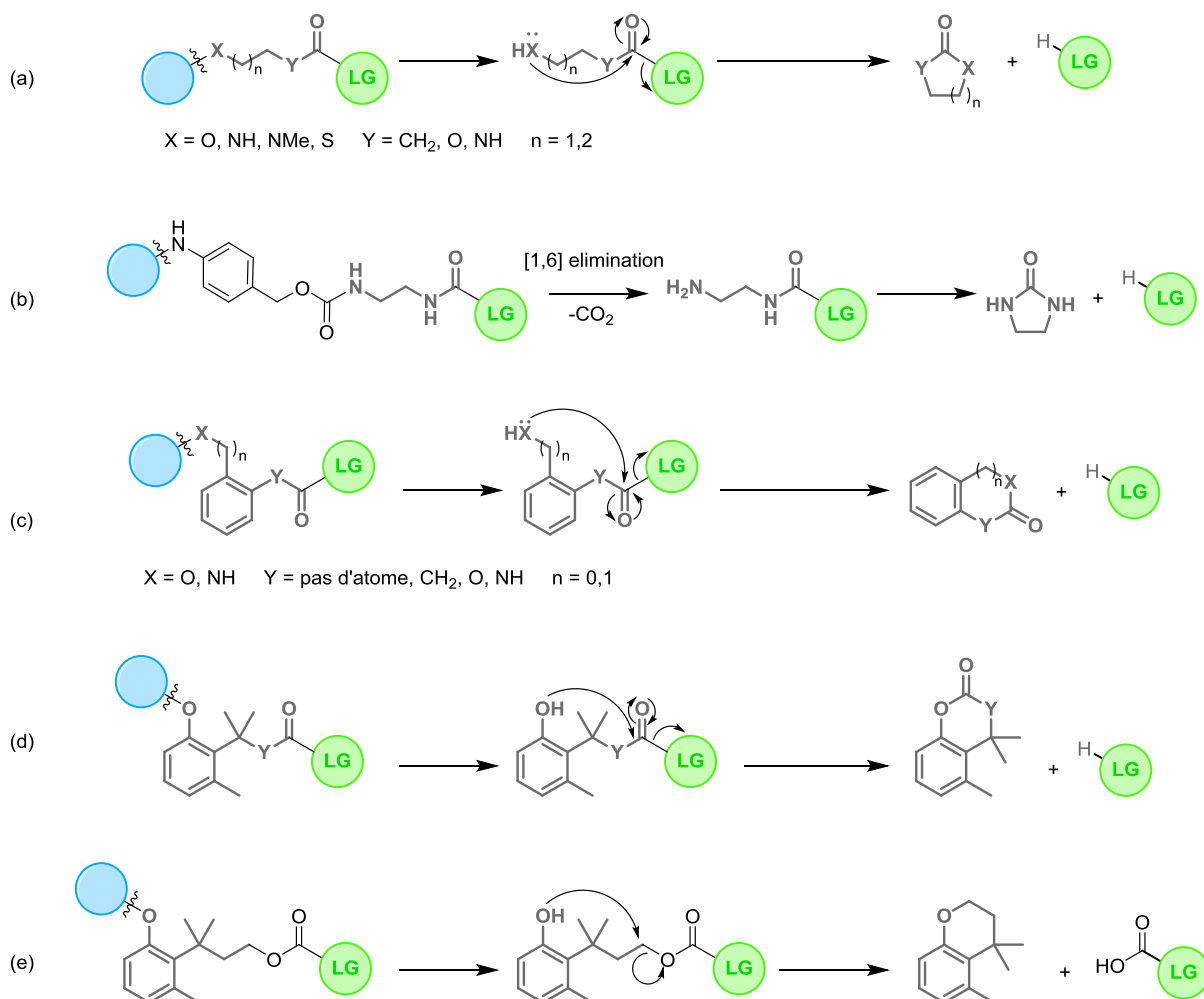


Figure 196 : Espaces auto-immolables basés sur une réaction de cyclisation. LG = groupement partant.

Les espaces auto-immolables ne sont ainsi pas utilisés sans une autre unité clivable par un moyen d'activation indépendant. Ils sont très employés pour moduler la fonctionnalité d'accroche ainsi que la distance entre le site d'activation et l'espèce relarguée.

F. Création d'un building-block bifonctionnel clivable employant les iminosydnones

Nous avons imaginé que les iminosydnones pouvaient s'inscrire dans la problématique des espaces clivables bioorthogonaux. Les composés capables d'être coupés de façon exogène, c'est-à-dire par une espèce non présente dans les milieux biologiques sont rares et nous pensons que les iminosydnones pourraient étoffer cette catégorie.

Pour être utilisables dans ce but, les iminosydnones doivent :

- Posséder des groupements permettant de greffer des molécules ou biomolécules de part et d'autre du squelette iminosydnone ;
- Afficher une vitesse de réaction avec les cycloalcyne suffisamment élevée pour réagir de manière efficace en conditions diluées ;

En prenant en compte ces critères, nous avons mis au point la synthèse d'iminosydnone bifonctionnelles à l'aide des réactions développées dans le Chapitre I que nous rappelons brièvement ici.

La stratégie de synthèse utilise le sel d'iminosydnone iodé **4d** (Figure 197) comme synthon. Nous introduisons tout d'abord une fonction urée sur l'azote exocyclique puisque cette fonction accélère la réaction avec les cycloalcyne. Le bras ajouté présente une amine protégée par un groupement Boc, dont les conditions de clivage sont compatibles avec le squelette iminosydnone. L'isocyanate correspondant est généré *in situ* avec du triphosgene activé par des conditions douces en milieu biphasique. L'urée **8k** est obtenue avec un rendement de 70% par filtration et une simple trituration dans l'éther diéthylique comme unique purification sur une échelle de 2.8 g. Nous pouvons ensuite introduire un groupement ester électroattracteur sur l'aryl en position N₃ *via* une carbonylation palladocatalysée comme nous l'avons décrit précédemment. L'iminosydnone **26i** est ainsi obtenue avec un rendement quantitatif, là encore sur grosse échelle (1.9 g). L'ester introduit peut ensuite être clivé par une réaction de saponification pour obtenir l'iminosydnone-acide **26k**. Cette réaction est assez sensible et est optimale dans un mélange d'eau, de THF et d'éthanol avec 5 équivalents d'hydroxyde de sodium. Le suivi réactionnel doit être strict pour stopper la réaction immédiatement après avoir consommé le produit de départ. Une simple extraction permet d'isoler l'acide carboxylique de façon quantitative à petite échelle et avec un rendement de 80% sur une échelle de 800 mg.

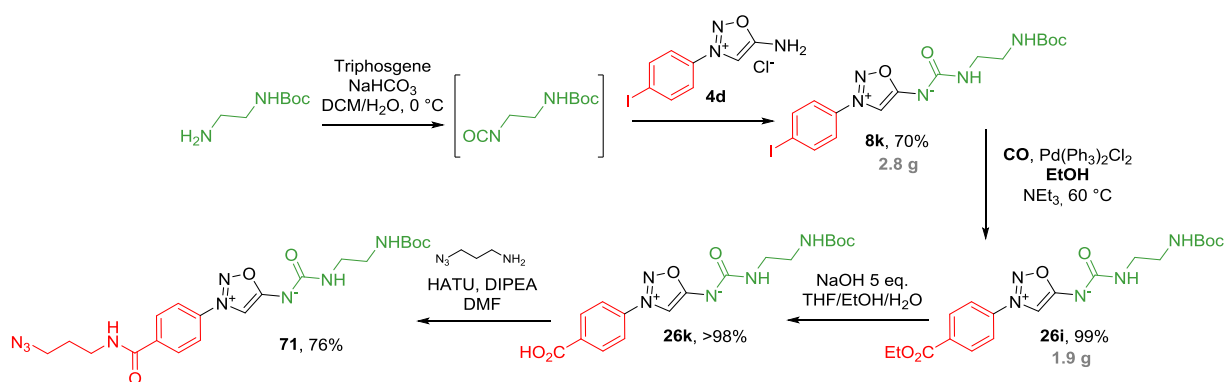


Figure 197 : Synthèse de l'iminosydnone **26k** sur large échelle, formation du produit **71** portant un azoture.

La synthèse précédemment décrite permet ainsi d'obtenir l'iminosydnone **26k** sur large échelle avec des méthodes de purification simples. Elle possède un acide carboxylique et une amine protégée dérivatisables par des couplages peptidiques. Les positions N₃ et N₆ du squelette iminosydnone ont été également fonctionnalisées de sorte à avoir une réaction de click & release rapide et efficace.

Afin de différencier les réactions nécessaires pour fonctionnaliser les deux extrémités de nos espaceurs, nous avons introduit un groupement azoture sur la structure. Il pourra réagir selon une réaction de CuAAC avec les alcynes terminaux par la suite. Un couplage peptidique entre l'iminosydnone acide **26k** activée par HATU et la 3-azidopropan-1-amine permet d'obtenir l'iminosydnone azoture **71** avec un rendement de 76% (Figure 197).

A partir des synthons **26k** et **26i**, il est possible d'obtenir des iminosydnone conçues pour se cliver rapidement et/ou possédant des fonctions d'accroche orthogonales.

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'introduction d'un brome en position C₄ des iminosydnone permet d'accélérer la réaction de click & release. Celle-ci se fait en utilisant NBS et permet d'obtenir l'iminosydnone bromée bifonctionnelle **27e** avec un rendement de 74% (Figure 198).

Le dérivé bromé **72** est obtenu avec un rendement de 38% sur deux étapes (saponification et couplage peptidique) à partir de l'iminosydnone **27e** (Figure 198).

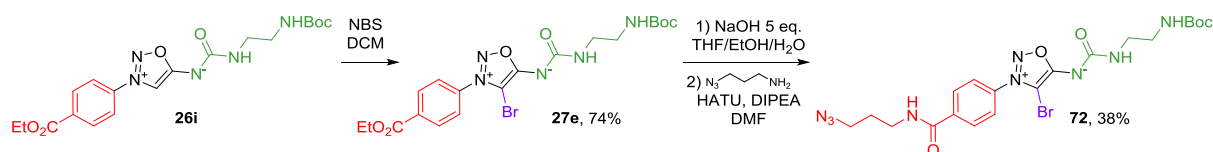


Figure 198 : Formation des synthons **27e** et **72**

Nous avons ensuite souhaité vérifier que les vitesses de coupure de ces iminosydnones étaient conformes à celles attendues. Nous avons utilisé les produits **26i** et **27e** qui ne portent pas d'azote susceptible de réagir avec les alcynes cycliques. Les constantes de cinétique ont été mesurées dans le PBS 10 mM contenant 1% de DMSO avec le BCN et le DBCO (Figure 199).¹²⁰

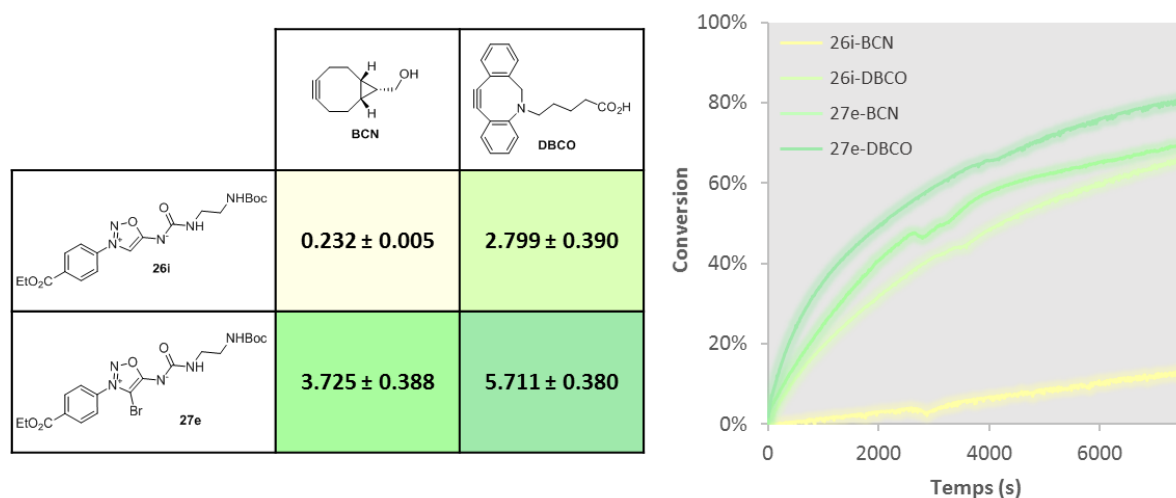


Figure 199 : Valeurs de constante de cinétique entre les iminosydnones **26i**, **27e** et **BCN**, **DBCO** en $M^{-1}.s^{-1}$.
Mesure par absorbance UV ; Solvant : PBS (10 mM)/DMSO 99/1.

L'iminosydnone **26i** comportant un groupement électroattracteur en N_3 et une urée en N_6 réagit avec une constante de l'ordre de $0.2 M^{-1}.s^{-1}$ avec BCN et de $3 M^{-1}.s^{-1}$ avec DBCO, conformément à ce qui est attendu. L'espaceur bromé **27e** affiche des vitesses supérieures. Typiquement, l'ajout du brome permet une accélération de la réaction comparable à l'emploi de DBCO sur **26i**, soit d'un facteur 10 environ. Curieusement, la réaction entre **27e** et le DBCO ne se révèle pas aussi rapide qu'attendu.

Par la suite, nous avons souhaité vérifier la bioorthogonalité de la réaction de click & release. Pour cela, nous avons synthétisé l'iminosydnone **73** par réaction de CuAAC entre **72** et une coumarine-alcyne (Figure 200).

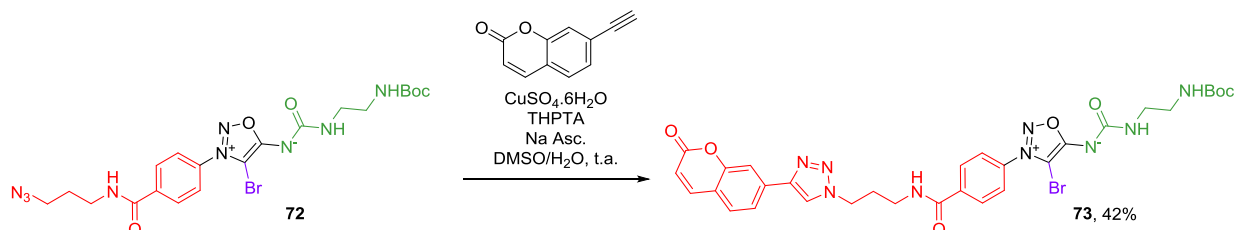


Figure 200 : Formation de l'iminosydnone-coumarine **73**.

Nous obtenons le produit désiré **73** avec un rendement de 42% et montrons ainsi que la réaction de CuAAC est compatible avec le squelette iminosydnone puisqu'aucun produit résultant d'une cycloaddition entre le noyau iminosydnone et l'alcyne n'a été observé. La valeur plutôt moyenne de rendement provient de difficultés de purification à cause de la polarité et du manque de solubilité du

produit. De plus, nous avons stoppé la réaction avant complétion car une incubation prolongée avec le système catalytique mène à la débromation du produit.

L'ajout du noyau coumarine permet d'augmenter le coefficient d'extinction molaire et d'avoir une meilleure détection de l'iminosydnone. Nous avons donc utilisé cette iminosydnone pour vérifier la biocompatibilité de la réaction de click & release (**Figure 201**) en laissant incubé l'iminosydnone dans du plasma humain pendant 95h pour nous assurer de sa stabilité puis en ajoutant le cycloalcyne pour contrôler sa réactivité après cette période d'incubation.

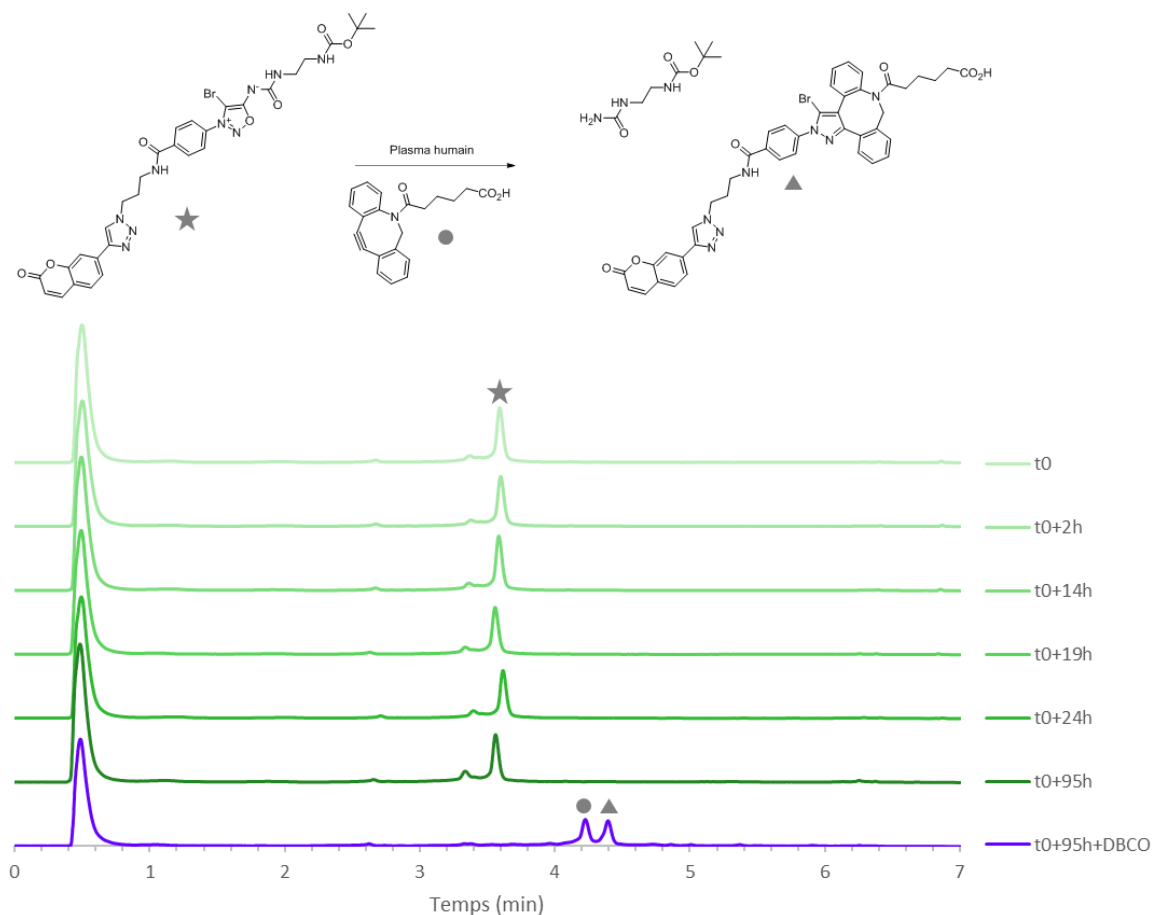


Figure 201 : Stabilité de l'iminosydnone **73** dans le plasma pendant 95 heures avant réaction avec le DBCO. Suivi HPLC après précipitation des protéines.

L'espaceur se montre stable dans le plasma sur une période de 4 jours. La réaction de clivage de l'iminosydnone reste efficace malgré son incubation prolongée dans le plasma et la présence de centaines de protéines.

Nous avons ainsi développé des espaceurs clivables facilement dérivatisables issus d'un synthon commun **26i** dont la synthèse peut être effectuée à l'échelle du gramme. Le clivage de ces espaceurs s'est montré efficace en milieu biologique. Ces résultats préliminaires nous permettent d'envisager d'utiliser ces espaceurs pour les applications qui nous intéressent.

II. Développement de sondes pour le target-fishing

Ce projet de développement de sondes iminosydnones pour le target-fishing a été réalisé en collaboration avec le Dr. Sarah Bregant (CEA-DRF-IBITEC-S-SIMOPRO) et le Dr. Antoine Sallustrau.

A. Contexte bibliographique

La protéomique est une discipline définie comme l'étude du protéome, c'est-à-dire l'identification, la caractérisation et l'étude des protéines d'une cellule, d'un organe, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme. Le target-fishing est un concept regroupant des outils permettant l'extraction, la séparation et la purification de protéines pour leur identification. Les sondes utilisées en protéomique doivent à la fois cibler et permettre la purification d'une classe spécifique de protéines.²⁶⁰ Elles doivent donc posséder une fonction d'accroche pour les protéines ainsi qu'un marqueur pour la purification.

Le système de purification employé principalement repose sur la forte interaction entre une biotine intégrée à la sonde et la streptavidine greffée sur un support solide. Les méthodes traditionnelles de clivage de cette interaction streptavidine/biotine ($K_d \sim 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$) sont dénaturantes et non quantitatives. Par ailleurs, elles peuvent provoquer le relargage de protéines interagissant avec la streptavidine, d'autant plus que certaines protéines sont naturellement biotinylées. L'introduction d'espacesur clivables entre les deux fonctions des sondes est une solution qui a été développée pour s'affranchir de la séparation entre la biotine et la streptavidine (**Figure 202**).²⁶¹

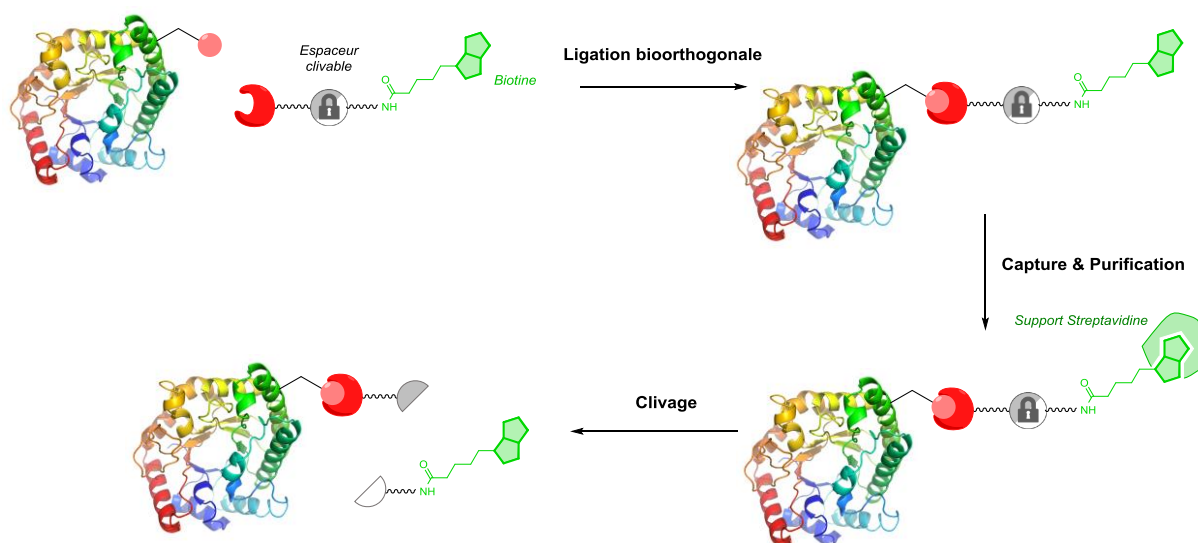


Figure 202 : Principe général des sondes de target-fishing portant un espaceur clivable.

Les méthodes de bioconjugaison utilisées sont les outils de chimie bioorthogonale standards (cf. Introduction générale I–La chimie bioorthogonale). Plusieurs types d'espacesur clivables ont été employés pour la libération des protéines cibles à partir du support solide. Ils utilisent des motifs

²⁶⁰ K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 822–827.

²⁶¹ G. C. Rudolf, W. Heydenreuter, S. A. Sieber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 110–117.

clivables sous irradiation lumineuse, à pH acide, en conditions réductrices ou en conditions oxydantes.^{262, 263}

Pour améliorer la détection des protéines pêchées, des outils trifonctionnels portant une étiquette permettent de libérer une protéine marquée (**Figure 203**).

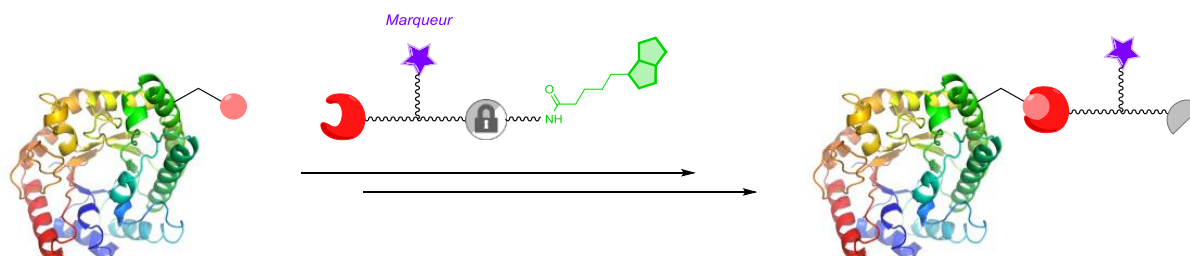


Figure 203 : Sonde trifonctionnelle pour le target-fishing permettant le marquage des protéines pêchées.

Le marquage peut être fluorescent pour permettre une visualisation sensible des protéines sur gel.^{263, 264} En 2010 l'équipe de Wong a ainsi développé une sonde de target-fishing profluorescente qui s'allume lorsqu'elle est conjuguée à sa cible. Pour cela ils utilisent une azido-coumarine et la CuAAC pour l'étape de ligation à la protéine; la partie clivable de la sonde est composée d'un pont disulfure (**Figure 204**).²⁶⁴

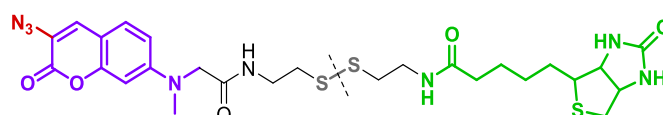


Figure 204 : Sonde profluorescente clivable développée par Wong.

Il est également possible d'introduire une étiquette marquée isotopiquement pour la quantification des protéines. Ainsi Johnson et Weerapana utilisent une sonde portant une valine marquée par les isotopes stables de l'azote et du carbone.²⁶⁵ La CuAAC est à nouveau utilisée pour la bioconjugaison et un espaceur azobenzène, clivable en conditions réductrices ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), est incorporé à la sonde (**Figure 205**).

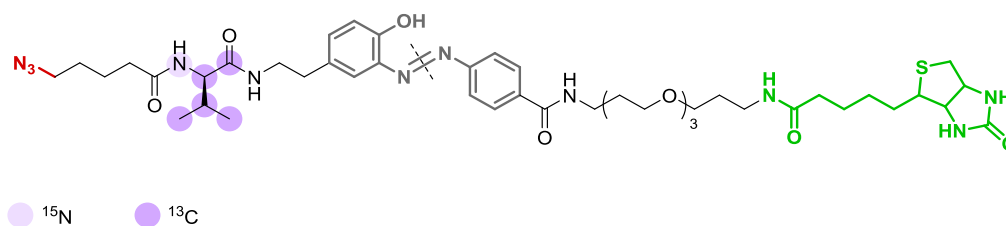


Figure 205 : Sonde de target-fishing développée par Johnson et Weerapana.

²⁶² J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18351–18360.

²⁶³ Y. Yang, S. H. L. Verhelst, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5366–5368.

²⁶⁴ C.-S. Tsai, P.-Y. Liu, H.-Y. Yen, T.-L. Hsu, C.-H. Wong, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5575–5577.

²⁶⁵ Y. Qian, J. Martell, N. J. Pace, T. E. Ballard, D. S. Johnson, E. Weerapana, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1410–1414.

B. Conception d'une sonde de target-fishing incorporant une iminosydnone en tant qu'espaceur clivable (Génération 1)

1. Concept et synthèse de la sonde

Dans ce contexte, nous avons imaginé que la capacité des iminosydnones à réagir avec les cycloalcyne selon une réaction de click & release permettait de les employer en tant qu'espaceur clivable au sein d'une sonde de target-fishing (**Figure 206**).

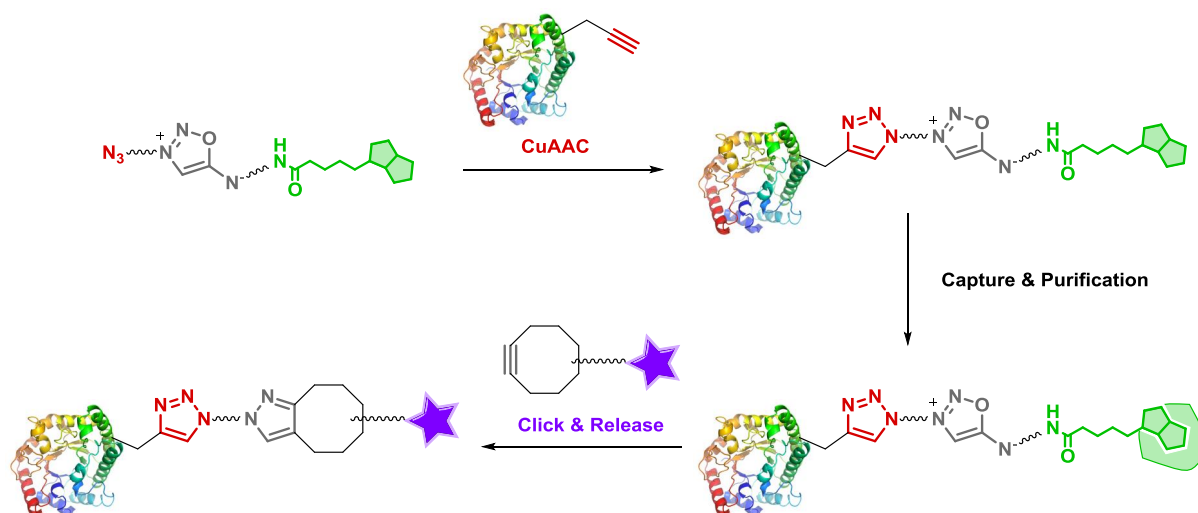


Figure 206 : Concept d'iminosydnone pour le target-fishing.

Le clivage par un alcyne cyclique est une méthode douce et biocompatible. La réaction permet également d'introduire un nouveau substituant, permettant ainsi le marquage de la protéine simultanément au clivage. Le marquage ne peut être ainsi appliqué qu'aux protéines pêchées *via* la biotine et relarguées, permettant en principe une excellente spécificité.

Comme nous venons de le voir, la CuAAC s'est révélée être une réaction de choix pour la bioconjugaison dans les applications en protéomique. Puisqu'elle est également compatible avec le squelette iminosydnone, nous l'adoptons aussi pour la ligation aux protéines et incorporons un azoture dans la conception de notre sonde. De même, nous recourons à la séparation d'affinité utilisant l'interaction streptavidine/biotine qui s'est révélée être la méthode de prédilection pour la purification des protéines.

Pour obtenir la sonde finale, nous sommes donc partis du synthon **71** portant un azoture. Le groupement Boc protégeant l'amine présente à l'autre extrémité de la molécule est clivé. L'intermédiaire est directement engagé dans le couplage avec une biotine portant un PEG-ester activé (12 unités) (**Figure 207**).

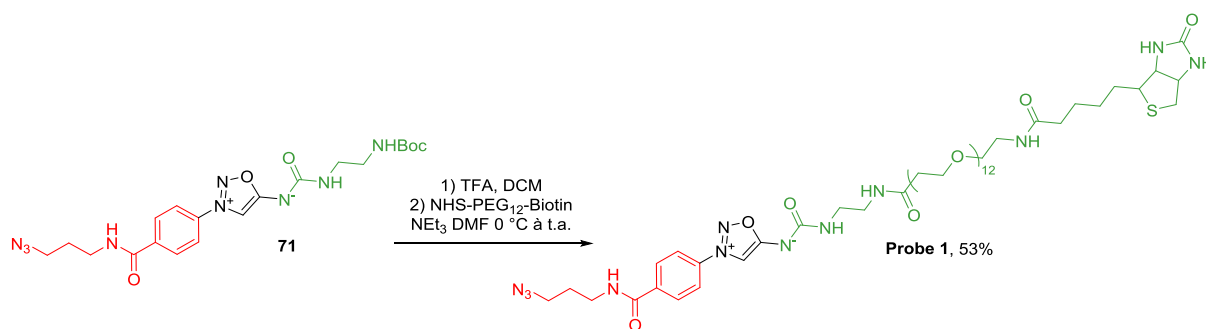


Figure 207 : Formation de la sonde **Probe 1**.

L'iminosynone désirée **Probe 1** est obtenue avec un rendement de 53% sur deux étapes après purification par HPLC préparative. Nous avons sélectionné pour cette sonde un polyéthylène glycol monodisperse de 12 unités. Ceci permet d'avoir une grande distance entre la biotine et l'iminosynone, ainsi que d'augmenter la solubilité aqueuse de la sonde. Cette dernière devrait ainsi se situer en dehors du site de liaison de la streptavidine et être accessible pour la réaction avec le cycloalcyne.

2. Utilisation de l'iminosynone **Probe 1** pour le target-fishing

L'iminosynone **Probe 1** comporte un azoture permettant une bioconjugaison avec des objets portant un alcyne terminal. Pour faire la preuve de concept de cet outil de target fishing, nous avons utilisé une myoglobine modifiée par un alcyne terminal par réaction des lysines accessibles avec un alcyne-ester activé par un groupement NHS. Les analyses de masse réalisées à la suite de ce couplage indiquent un mélange statistique de myoglobine (**MYO-Alk**) portant entre 1 et 4 alcynes avec une moyenne de 2,8 alcynes par myoglobine (**Figure 208**).²⁶⁶

La myoglobine **MYO-Alk** a été mise en présence d'un mélange pré-activé de système catalytique et de sonde **Probe 1**. Nous avons généré l'espèce de cuivre I par réduction de CuSO_4 par l'ascorbate de sodium. Le ligand THPTA possède un double rôle de ligand du cuivre ainsi que de piège pour les radicaux générés par l'ascorbate de sodium et la réduction du cuivre. Nous obtenons ainsi la myoglobine biotinylée **MYO-Biot** (**Figure 208**) qui peut être utilisée dans des expériences de capture sur un support portant des Streptavidines.

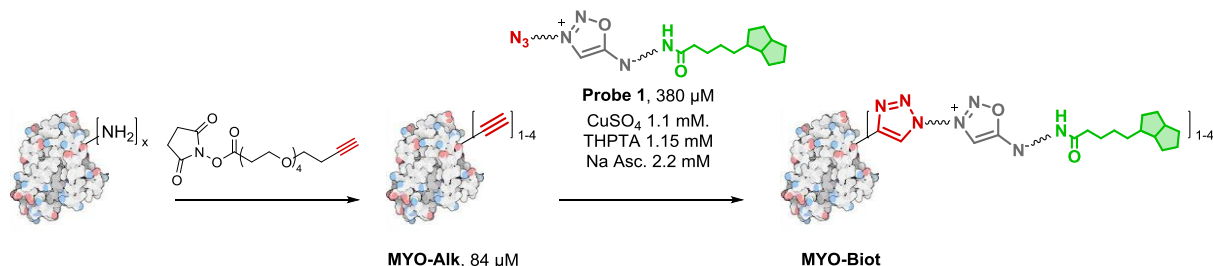


Figure 208 : Fonctionnalisation de la myoglobine par des alcynes terminaux, puis CuAAC avec la sonde **Probe 1**.

Le support solide que nous avons utilisé pour la capture des protéines biotinylées et leur purification est composé de billes magnétiques greffées avec des Streptavidines. Ce matériau est

²⁶⁶ A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran *Chem. Commun.* **2017**, 53, 7890-7893.

particulièrement efficace pour effectuer les rinçages nécessaires et pour prélever les différents surnageants.²⁶⁷

La capture de **MYO-Biot** a été réalisée sur la protéine seule en solution dans le tampon PBK ainsi que dans de l'extrait de foie de souris (1,25 µg de protéines/µL). Ce mélange a été incubé avec les billes magnétiques de Streptavidine. Les billes sont ensuite lavées par du tampon phosphate pour retirer les protéines non biotinylées. Elles sont ensuite soumises à l'addition de DBCO portant une étiquette fluorescente (TAMRA), clivant l'iminosydnone et marquant la protéine de manière concomitante (**Figure 209**).

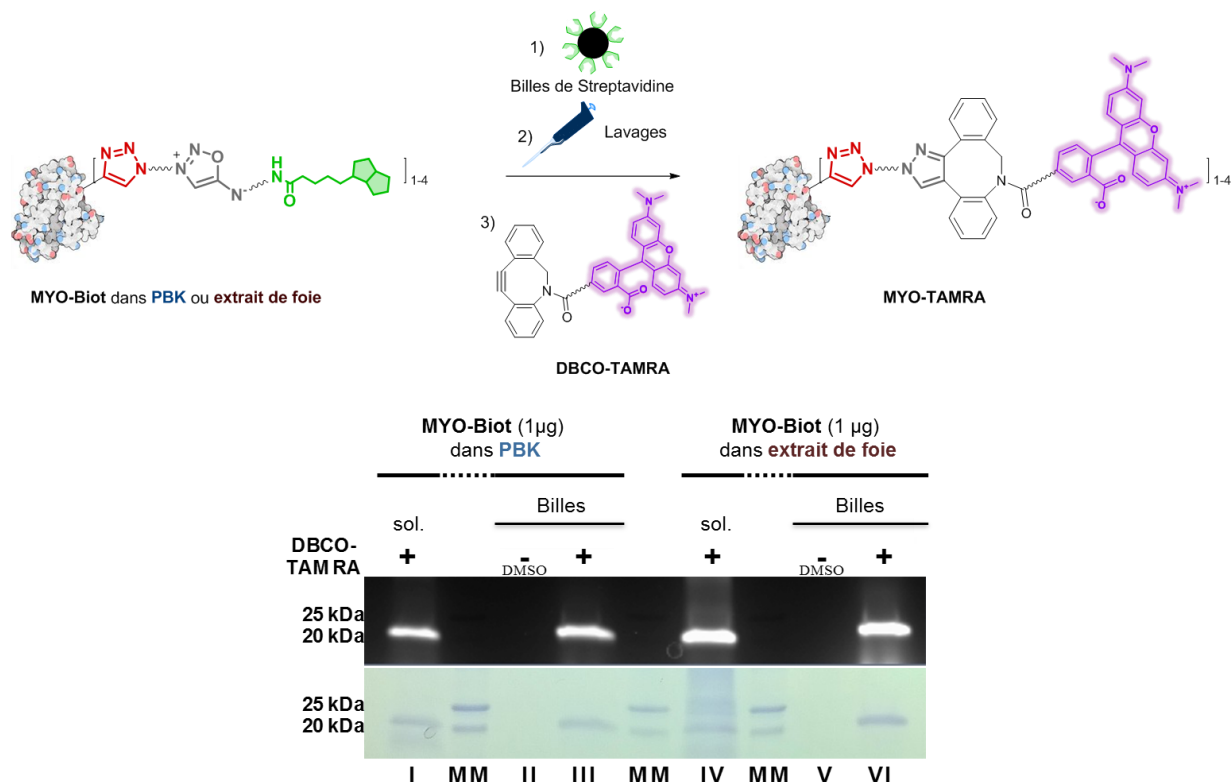


Figure 209 : Expérience de capture puis trans-tagging de **MYO-Biot** en **MYO-TAMRA** ; Gel d'électrophorèse capillaire : (I) et (IV) : expérience de trans-tagging entre **MYO-Biot** et **DBCO-TAMRA** réalisée dans PBK (I) et dans l'extrait protéique (IV) ; (II), (III), (V), (VI) : Surnageants obtenus après traitement des billes avec du DMSO (II & V) ou avec une solution de **DBCO-TAMRA** dans le DMSO (III & VI) ; MM = marqueurs moléculaires ; Partie inférieure : Révélation au bleu de Coomassie ; Partie supérieure : Signal de fluorescence.

Cette expérience nous montre l'efficacité des iminosydnones en tant qu'espaces clivables au sein de sondes de target-fishing. Leur réaction avec les cycloalcynes permet le recouvrement spécifique de la protéine ciblée. La libération est quantitative comme le montre la comparaison des signaux entre les expériences en solution et celles ayant subi la capture sur le support.

²⁶⁷ H. Lee, T.-H. Shin, J. Cheon, R. Weissleder, *Chemical Reviews* **2015**, *115*, 10690–10724.

C. Nouvelles générations de sondes pour le target-fishing

1. Axes d'amélioration des iminosydnone pour le target-fishing

La limitation de cet outil provient de la réaction de CuAAC. Dans cet exemple la ligation a été effectuée dans le PBK à "haute" concentration (84 μM) avant de créer le mélange artificiel de myoglobine dans l'extrait protéique. A faible concentration et en milieu complexe, cette réaction s'est montrée inefficace. Notre premier objectif concernant ces sondes de target-fishing est d'être aptes à effectuer l'étape de bioconjugaison en milieu complexe et à faible concentration. Ainsi, nous imaginons que l'utilisation d'azotures chélatants permettrait d'obtenir une réaction de CuAAC répondant à ces critères.⁴⁵

Par ailleurs, nous utilisons la réaction de click & release pour apporter un marquage fluorescent. Dans les outils communs de target fishing, ce marquage est inhérent à la sonde. Nous imaginons ajouter l'information fluorescente à la sonde iminosydnone et utiliser le cycloalcyne pour apporter une seconde information, tel qu'une étiquette pour la spectrométrie de masse.²⁶⁸ Pour cela, nous souhaitons utiliser une iminosydnone pro-fluorescentes s'inspirant de celles développées précédemment (cf. Chapitre 2).

Notre objectif est donc de concevoir de nouvelles générations de sondes répondant à ces deux problématiques (**Figure 210**).

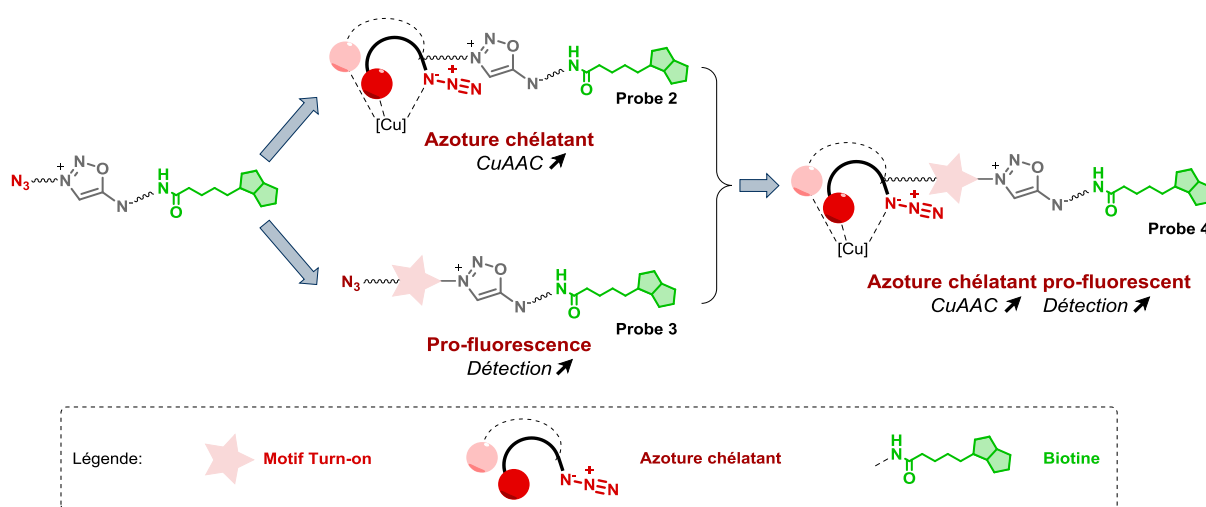


Figure 210 : Nouvelles générations d'iminosydnone envisagées

²⁶⁸ O. Koniev, G. Leriche, M. Nothisen, J.-S. Remy, J.-M. Strub, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorsselaer, R. Baati, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 202–206.

2. Synthèse

a. Synthèse d'une sonde iminosydnone-chelazide pour le target-fishing

L'azoture chélatant que nous avons sélectionné pour fonctionnaliser l'iminosydnone possède un groupement benzimidazole. Il a été décrit par notre groupe pour accélérer la CuAAC d'un facteur de l'ordre de 2000.^{45, 269} Afin de greffer cet azoture à l'iminosydnone, nous avons synthétisé le composé **78** portant une amine en suivant une voie de synthèse décrite au laboratoire (**Figure 211**).²⁶⁹

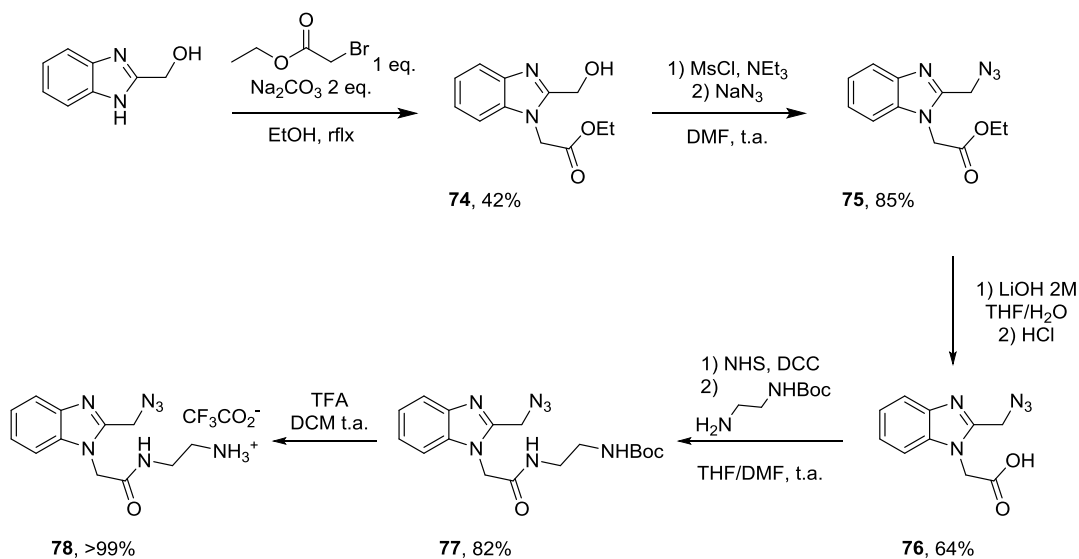


Figure 211 : Accès synthétique à l'azoture chélatant **78**.

Le (1H-benzoimidazol-2-yl)méthanol est tout d'abord alkylé par un bromo-ester dans l'éthanol au reflux pour obtenir le produit **74** avec un rendement de 42%. L'alcool primaire est méthylié puis substitué par un azoture pour donner le synthon **75** avec un rendement de 85%. L'ester est alors clivé et l'acide résultant **76** est couplé avec une diamine monoprotégée par un groupement Boc avec un rendement de 52% sur deux étapes. Le produit **78** est enfin obtenu de manière quantitative par déprotection du groupement Boc avec l'acide trifluoroacétique.

Le synthon **78** peut ensuite être couplé avec l'iminosydnone acide **26k** décrite précédemment en utilisant HATU comme agent de couplage. On obtient ainsi l'iminosydnone **79** avec un rendement de 54%. Celle-ci subit alors une déprotection au TFA pour être couplée avec le même bras PEG-biotine portant un ester activé que pour le produit **Probe 1**. La sonde **Probe 2** est ainsi obtenue avec un rendement de 42% après purification par HPLC préparative (**Figure 212**).

²⁶⁹ V. Bevilacqua, Développement de nouveaux ligands et azotures chélatants pour la cycloaddition alcyne-azoture catalysée au cuivre, Thèse de doctorat, Paris Sud, **2012**.

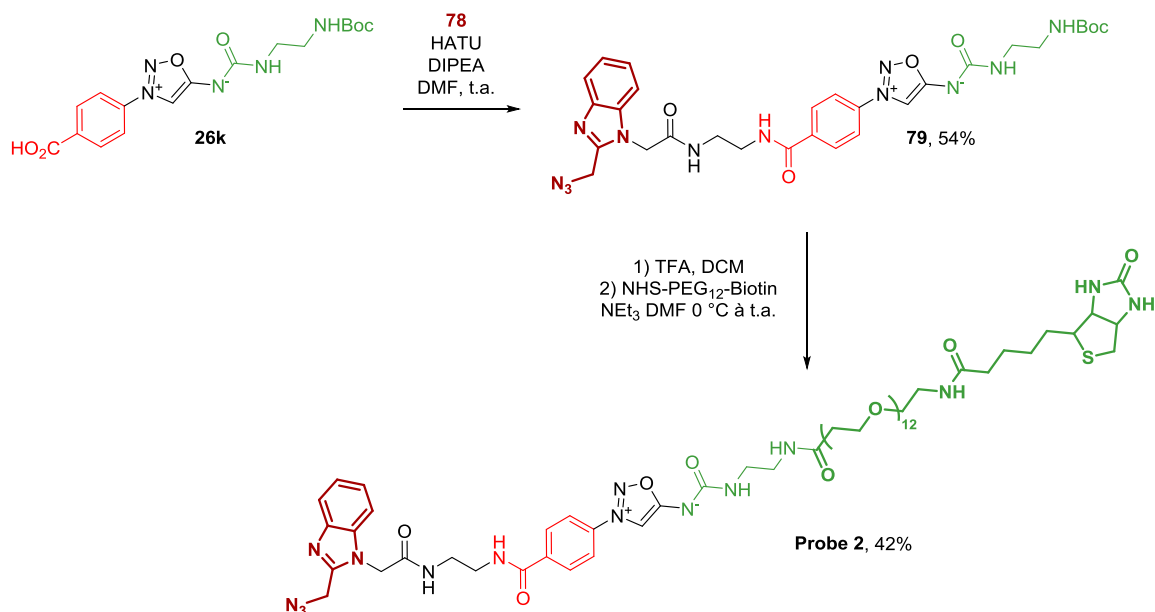


Figure 212 : Synthèse de la sonde **Probe 2** à partir de l'iminosydnone **26k**.

b. Synthèse d'une sonde de target-fishing pro-fluorescente

Parmi les sondes pro-fluorescentes synthétisées précédemment, seules celles possédant le groupement pro-fluorescent sur l'azote N_3 de l'iminosydnone sont intéressantes pour notre concept de sondes. Il s'agit en effet de cette partie de la sonde qui restera liée à la protéine après la réaction de click & release.

Malgré les facilités synthétiques évidentes que représentent les sondes substituées par les styryls, nous avons sélectionné le motif styryl-pyridinium pour ses propriétés optiques plus intéressantes.

La synthèse d'une telle sonde nécessite la condensation d'un aldéhyde avec le picolinium **81** portant un azoture. Celui-ci a été obtenu selon une procédure de la littérature (Figure 213).²⁷⁰

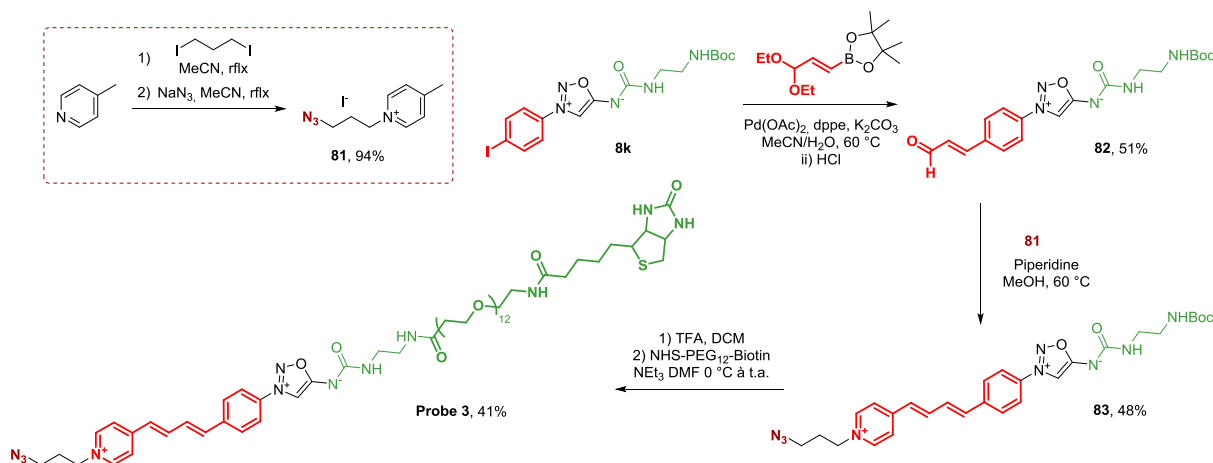


Figure 213 : Synthèse de la sonde **Probe 3**.

Pour obtenir la sonde de target-fishing correspondante, nous avons généré l'aldéhyde **82** à partir de l'iminosydnone **8k** déjà fonctionnalisée en position N_6 . Nous avons utilisé le couplage de Suzuki avec

²⁷⁰ P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 344–347.

le boronate portant un acétal comme précédemment (cf. Chapitre I). La condensation avec le picolinium **81** est ensuite réalisée dans le méthanol à 60 °C pour obtenir le produit **83**, isolé par précipitation dans l'éther diéthylique avec un rendement de 48%. Ce dernier subit alors les étapes de déprotection et couplage déjà employée pour la synthèse de **Probe 1** et **Probe 2** pour obtenir la sonde profluorescente **Probe 3**, purifiée par HPLC préparative, avec un rendement de 41%.

c. Synthèse d'une sonde de target-fishing profluorescente portant un azoture chélatant

La préparation de cette nouvelle sonde portant à la fois un pyridinium et un azoture chélatant de type benzimidazole s'est révélée délicate et a nécessité de nombreuses approches.

Notre première stratégie a été la formation d'un picolinium portant un azoture chélatant en suivant la même stratégie que précédemment, soit *via* l'alkylation de la 4-méthyl picoline par le 1,3-diiodopropane suivie d'une seconde alkylation (**Figure 214**).

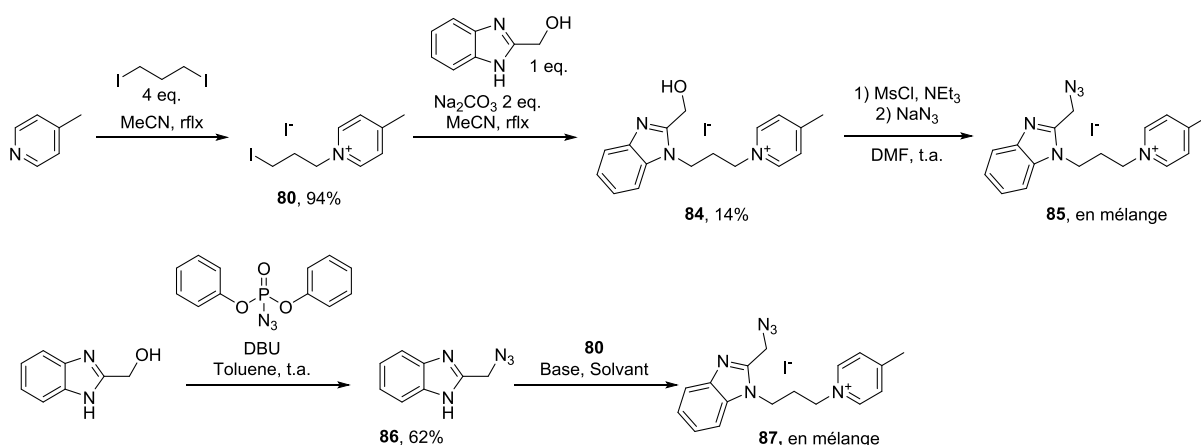


Figure 214 : Essais de formation d'azoture chélatant benzimidazole portant un picolinium en utilisant **80**.

La formation de **80** se fait avec un excellent rendement et aucun produit portant deux picolines n'est observé. Les conditions optimisées d'alkylation de **80** avec le (1H-benzimidazol-2-yl)méthanol donnent le produit **84** avec un rendement de 14%. D'autres stœchiométries et d'autres solvants ont été évalués pour cette réaction, ils mènent soit à la formation exclusive du produit vinylique issu de l'élimination de l'iode, soit à un mélange inséparable dans nos mains du fait de la polarité des produits. La problématique de purification a été le frein majeur pour toutes les réactions employant des benzimidazoles portant un picolinium. Ainsi, toute réaction incomplète ou générant de multiples sous-produits n'est pas utilisable pour cette synthèse. Le produit **85**, issu de la méthylation de **84** puis substitution par un azoture peut ainsi être observé, mais la réaction n'atteignant pas complétion, il nous a été impossible d'obtenir le produit propre.

En utilisant l'azoture de diphenyl-phosphoryle, nous avons pu générer le produit **86** avec un rendement de 62%.²⁷¹ Malheureusement, la réaction suivante qui est l'alkylation avec le produit **80** donne à nouveau un mélange de produits inséparables.

²⁷¹ S. Tommasi, C. Zanato, B. C. Lewis, P. C. Nair, S. Dall'Angelo, M. Zanda, A. A. Mangoni, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 11315–11330.

Notre seconde approche (**Figure 215**) a été d'alkyler la picoline avec un bromo-ammonium. La réaction se fait en l'absence de base pour obtenir le double sel désiré **88** avec un rendement de 90%.²⁷² Ce produit peut ensuite être couplé avec **76** pour donner le synthon **89** avec un rendement de 50%. Malgré sa grande polarité, il a été possible de purifier ce produit par chromatographie sur colonne en phase normale.

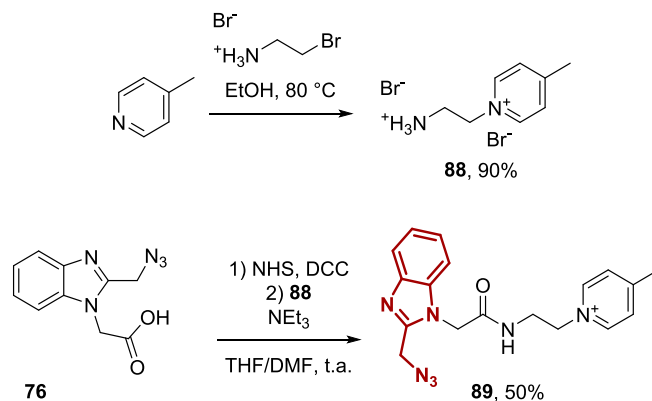


Figure 215 : Synthèse de l'azoture chélatant **89** portant un picolinium.

Nous avons ensuite réalisé la condensation entre **89** et **82**. Le produit est obtenu en mélange avec le produit de départ. Ce mélange est engagé dans les deux étapes suivantes permettant d'obtenir la sonde **Probe 4** après purification par HPLC préparative avec un rendement de 13% sur trois étapes (**Figure 216**).

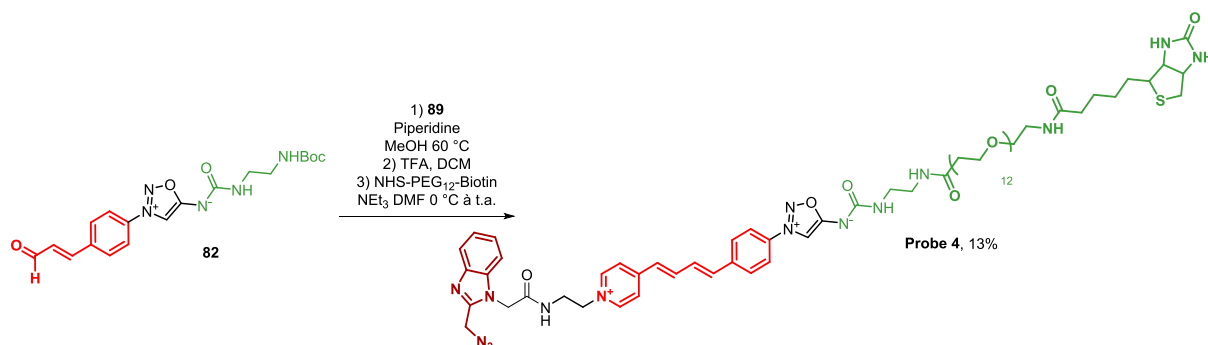


Figure 216 : Synthèse de la sonde de target-fishing pro-fluorescente portant un azote chélatant **Probe 4**.

²⁷² S. P. Gromov, A. I. Vedernikov, N. A. Lobova, L. G. Kuz'mina, S. N. Dmitrieva, Y. A. Strelenko, J. A. K. Howard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 11416–11430.

3. Résultats des nouvelles sondes dans des expériences de target-fishing

Après avoir accompli la synthèse de ces sondes, nous avons souhaité évaluer leurs capacités au cours d'expériences de target-fishing. La protéine utilisée est le même modèle que précédemment, c'est-à-dire une myoglobine portant des alcynes terminaux **Myo-Alk**.

a. Etude en milieu homogène du comportement des sondes

Des expériences de contrôle ont été réalisées en milieu homogène, c'est-à-dire sans réaliser de capture sur support solide, dans le but d'optimiser les différents paramètres réactionnels.

Nous avons tout d'abord souhaité contrôler la capacité des sondes **Probe 1–4** à réagir avec la myoglobine **Myo-Alk**. Pour cela, nous avons réalisé la CuAAC, directement suivie de la réaction de click & release avec le DBCO, sans l'étape de capture sur le support (**Figure 217**).

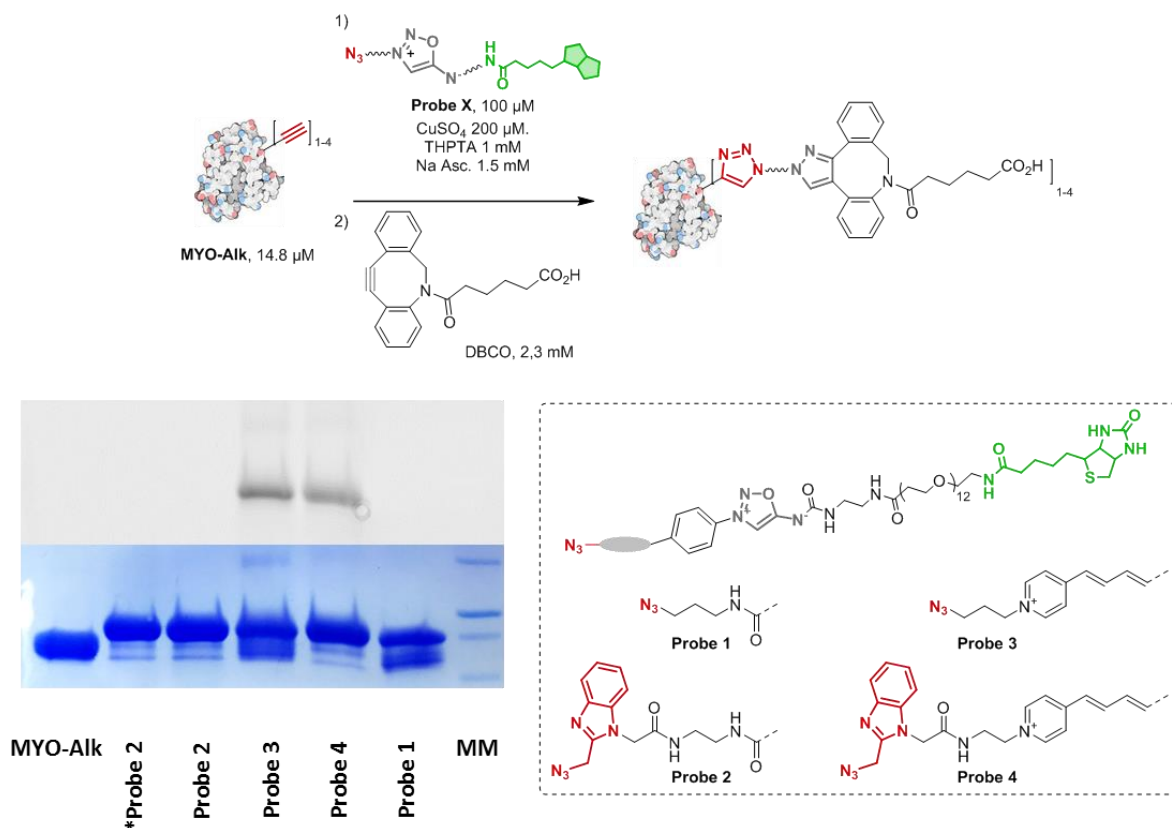


Figure 217 : CuAAC suivie d'addition de DBCO monoïpe ;
Gel d'électrophorèse, * Etape 1 uniquement ; MM = marqueurs moléculaires ;
Partie inférieure : Révélation au bleu de Coomassie ; Partie supérieure : Signal de fluorescence ;
Rappel des structures des quatre sondes utilisées.

La réaction de CuAAC a été réalisée à plus basse concentration en protéines que précédemment afin de s'approcher des conditions physiologiques (14.8 μM plutôt que 84 μM). Après révélation au bleu de Coomassie, nous retrouvons de la myoglobine **MYO-Alk** n'ayant pas réagi quantitativement lors de la CuAAC pour les sondes ne portant pas un azoture chélatant **Probe 1** et **Probe 3**. A l'inverse, les sondes **Probe 2** et **Probe 4** conduisent à la conversion totale de **MYO-Alk** en protéine marquée. Les concentrations en protéine que nous souhaitons pêcher étant inférieures à celle de cette réaction test, nous choisissons de ne pas poursuivre l'étude de la sonde **Probe 3**. Nous pouvons également observer

l'allumage en fluorescence de la protéine marquée pour les sondes **Probe 3** et **Probe 4**, confirmant la possibilité d'apporter un signal supplémentaire de façon intrinsèque à la sonde.

Nous avons ensuite souhaité déterminer la quantité minimale de sonde à utiliser pour réaliser la CuAAC de manière quantitative à la fois dans du tampon mais également en présence d'autres protéines. Cela a été fait avec la molécule **Probe 4**, dont le signal fluorescent post réaction avec le DBCO permet la visualisation par un imageur et l'évaluation de la conversion de la réaction, ce qui est particulièrement pratique lorsque la réaction est réalisée dans de l'extrait protéique (**Figure 218**).

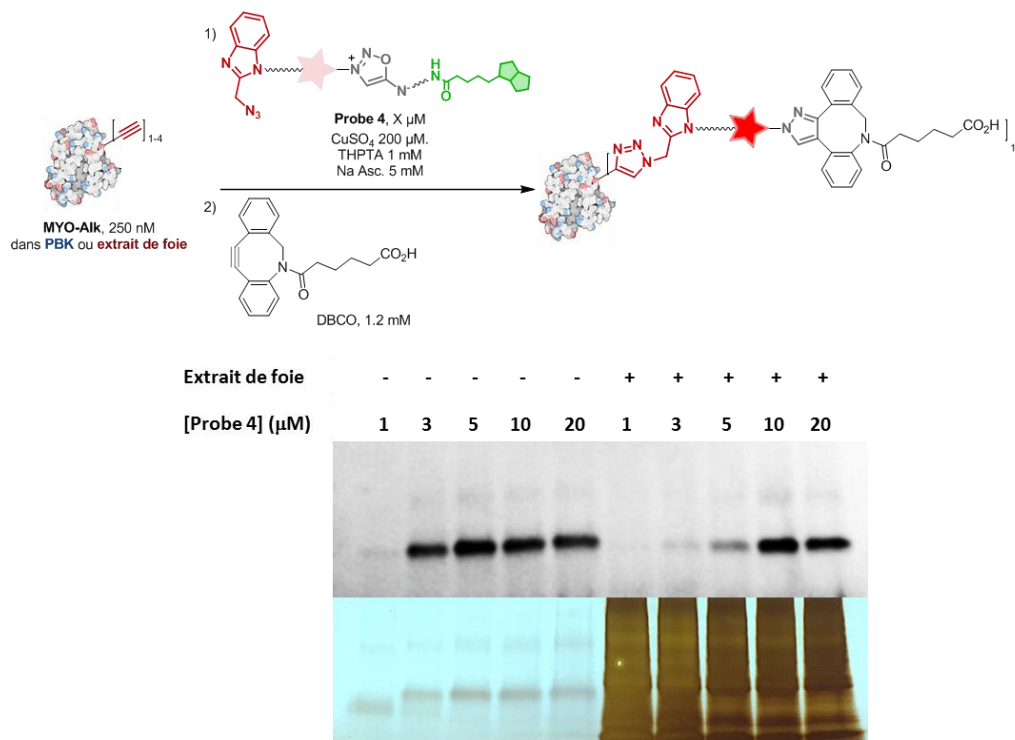


Figure 218 : : CuAAC suivie d'addition de DBCO monoatome dans le PBK ou en milieu complexe ; **MYO-Alk**/autres protéines < 1/200 ;

Gel d'électrophorèse : Partie inférieure : Révélation au nitrate d'argent ; Partie supérieure : Signal de fluorescence.

Cette étude a été réalisée sur une plus faible concentration de **Myo-Alk** (250 nM) en employant des concentrations de sonde allant de 1 à 20 μM. Dans le PBK, nous constatons qu'il faut au minimum 3 μM de sonde pour observer un marquage et que celui-ci est total à 5 μM. En milieu complexe, la CuAAC est moins efficace puisqu'il faut utiliser une concentration en sonde de 10 μM pour avoir un marquage quantitatif. Cela est probablement dû à une captation de la sonde par les autres protéines, réduisant sa disponibilité.

Concernant le système catalytique, des expériences ont montré qu'une incubation préalable à haute concentration de l'azoture chélatant avec le cuivre et le THPTA suivie de l'addition du réducteur étaient favorables à la CuAAC. Il a également été montré que le THPTA avait le rôle de piège pour les espèces radicalaires issues de la réduction du cuivre par l'ascorbate de sodium. En milieu complexe, la CuAAC fonctionne en l'absence de THPTA, validant l'effet chélatant du cuivre par le benzimidazole. Dans ce cas les radicaux sont piégés par les protéines du milieu.

Enfin, nous avons vérifié que la réaction de click & release se faisait de manière satisfaisante en utilisant différents cycloalcynes. Cela a été établi par des expériences de spectrométrie de masse MALDI (voir SI) avec les sondes **Probe 2** et **Probe 4** ainsi que par fluorescence pour la sonde **Probe 4** portant un groupement pro-fluorescent (**Figure 219**).

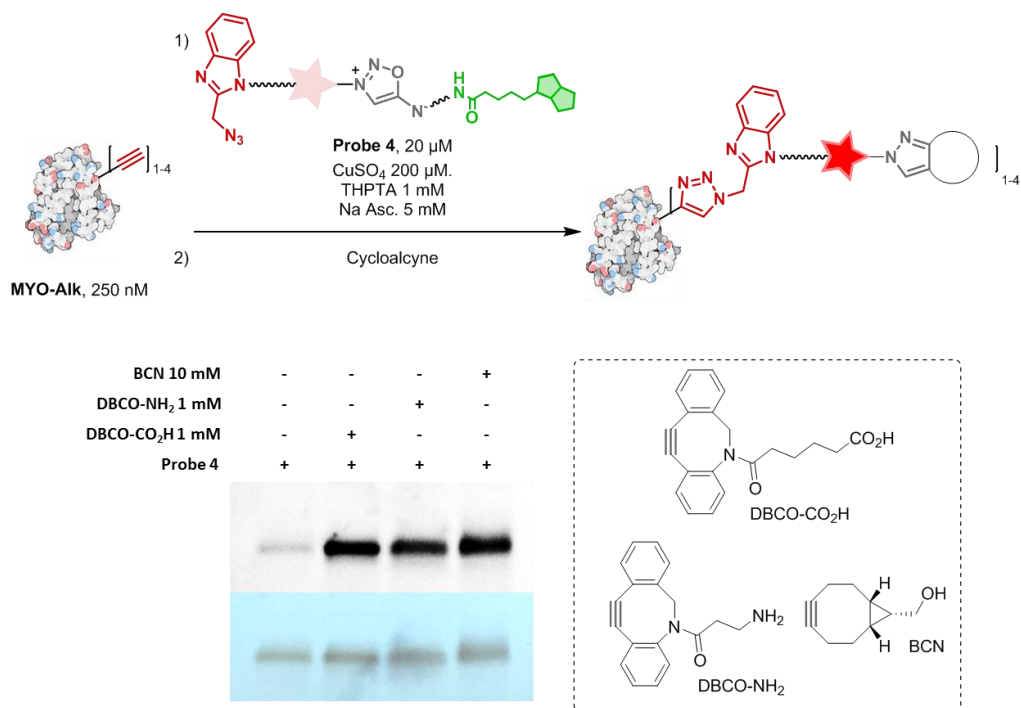


Figure 219 : Tests des différents cyclooctynes avec la sonde pro-fluorescente **Probe 4** ; Gel d'électrophorèse : Partie inférieure : Révélation au nitrate d'argent ; Partie supérieure : Signal de fluorescence

Grâce à cette expérience en solution, nous confirmons la compatibilité de différents cycloalcyne, en l'occurrence de DBCO fonctionnalisé par un acide ou une amine, ainsi que du BCN. La cinétique de réaction des iminosydnone avec le BCN étant en moyenne 10 fois plus lente qu'avec le DBCO, nous avons utilisé une concentration en BCN de 10 mM (*versus* 1 mM pour les DBCO) afin d'avoir un avancement comparable à un temps donné. L'intensité de fluorescence ainsi que la bonne définition des bandes sur le gel d'électrophorèse nous indiquent que ces trois conditions sont équivalentes.

b. Expériences de target-fishing : CuAAC, Capture, Clivage

Après avoir étudié les deux réactions clés de l'expérience en solution, nous avons ajouté l'étape de capture et de lavage. La protéine pêchée sera ainsi séparée des autres espèces présentes dans le milieu initial. Nous avons pour cela utilisé la sonde **Probe 2**, que nous avons généralement clivée avec un DBCO fluorescent pour marquer la protéine, ainsi que la sonde pro-fluorescente **Probe 4** que nous avons généralement clivée avec un DBCO non fonctionnalisé.

Le clivage du support solide apporte un défi supplémentaire par rapport à la réaction effectuée en solution. En effet des problématiques d'accès aux fonctions réactives deviennent essentielles à l'interface liquide/solide. De plus il est nécessaire d'envisager d'éventuelles interactions non-spécifiques entre les différentes espèces.

Le protocole général de ces expériences de target-fishing est illustré dans la **Figure 220**.

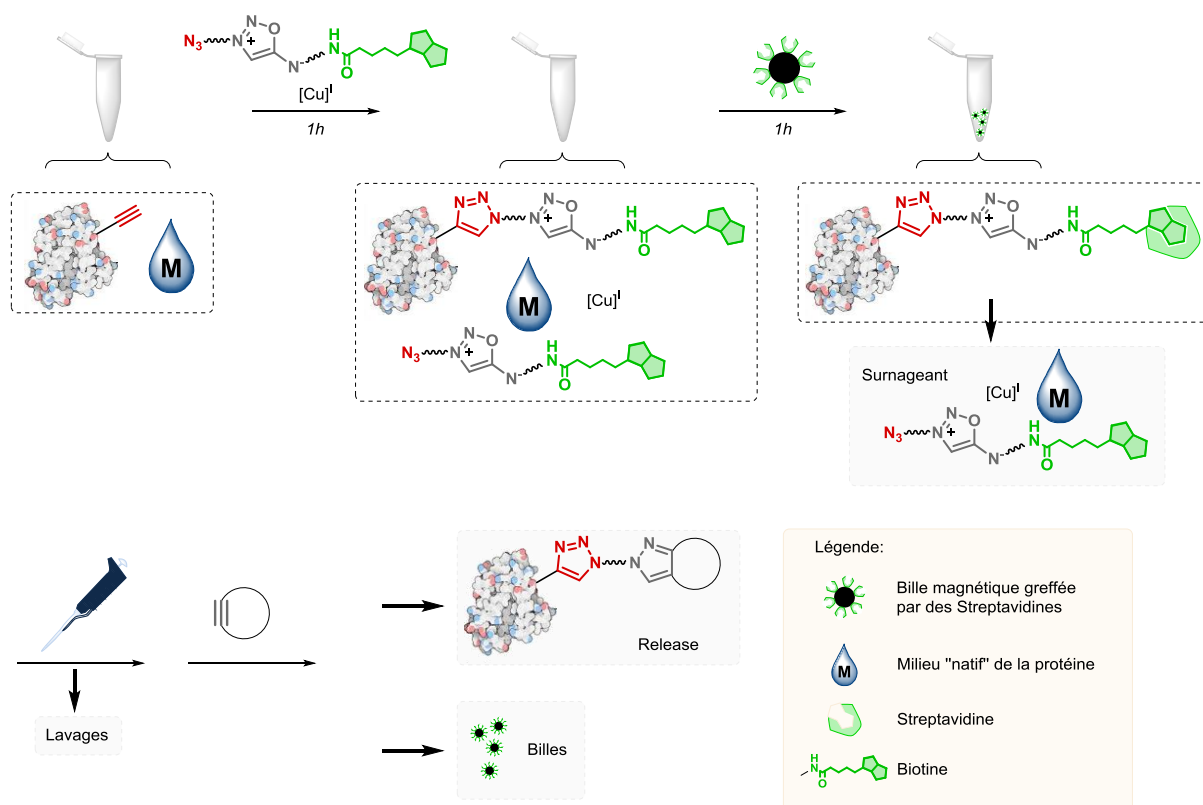


Figure 220 : Protocole général des expériences de target-fishing réalisées ; M = milieu (PBK ou extrait protéique).

Pour toutes les expériences présentées par la suite, nous avons systématiquement analysé les surnageants, lavages et billes obtenus durant la procédure en plus des protéines décrochées par addition du cycloalcyne. Cela nous permet de vérifier :

- si la CuAAC est totale (surnageant),
- si l'intégralité des produits biotinylés sont captés par les billes (surnageant),
- s'il existe des interactions non spécifiques (lavages, billes, release),
- si le clivage par les cycloalcyne est total (billes).

Encouragés par l'efficacité des réactions effectuées en solution, nous avons engagé la sonde **Probe 4** dans la première expérience de target-fishing pour pêcher **MYO-alk** à 1 μM en milieu simple ainsi qu'en milieu complexe (**Figure 221**).

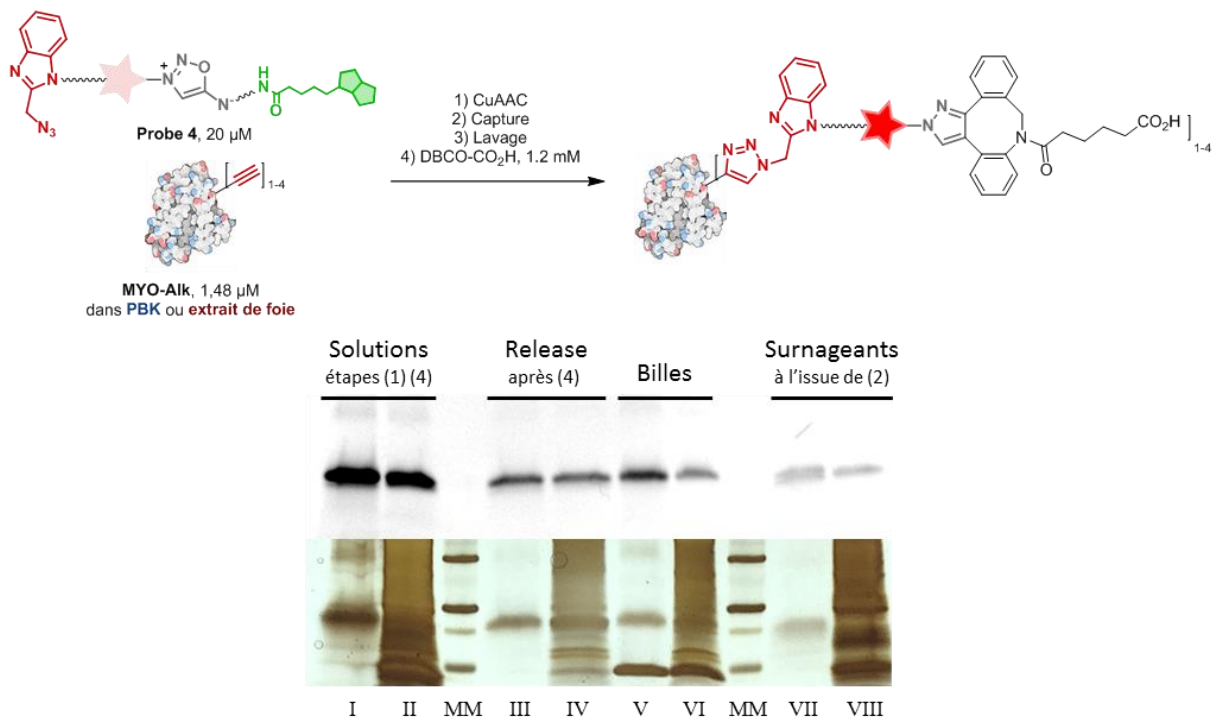


Figure 221 : Expérience de target-fishing de **Myo-Alk** avec **Probe 4** en milieu simple (I, III, V, VII) et en milieu complexe (II, IV, VI, VIII); Gel d'électrophorèse capillaire : (I), (II) Expérience réalisée en solution (étapes 1 et 4) ; (III), (IV) Surnageants obtenus après traitement des billes avec une solution de **DBCO-CO₂H** dans le DMSO ; (V), (VI) Billes de Streptavidine post clivage ; (VII), (VIII) Surnageants obtenus après le lavage des billes (VII & VIII) ; MM = marqueurs moléculaires ; Partie inférieure : Révélation au nitrate d'argent ; Partie supérieure : Signal de fluorescence.

L'expérience a également été réalisée en solution (I et II), aux mêmes concentrations que pour les expériences de target-fishing complètes, afin d'avoir une référence en termes d'intensité de fluorescence et pour la révélation à l'argent. L'intensité de fluorescence obtenue pour ces puits est similaire, confirmant la bioorthogonalité des réactions.

Les résultats observés sur le gel d'électrophorèse (**Figure 221**) nous permettent de tirer plusieurs conclusions et points d'amélioration :

- Pour les différentes étapes analysées, les puits correspondants au tampon PBK et ceux correspondants à l'extrait protéique montrent la même intensité de fluorescence. La CuAAC, ainsi que la réaction de click & release se font avec la même efficacité quel que soit le milieu.
- La présence de myoglobine non capturée dans les surnageants démontre que le volume de billes utilisé doit être augmenté.
- On retrouve de la myoglobine cible sur les billes de Streptavidine. Celle-ci peut s'y trouver soit parce que la réaction avec les cycloalcyne n'est pas totale, soit à cause d'interactions non spécifiques.
- Pour le milieu complexe, on observe une proportion non négligeable de protéines du milieu dans ce qui a été clivé. Ceci peut être dû à des interactions non spécifiques entre ces protéines et les différentes surfaces (billes, eppendorf). Les expériences suivantes nécessiteront des étapes de lavage supplémentaires, ainsi qu'un transfert du support solide dans un eppendorf propre au cours des lavages.

La capture est la première optimisation que nous avons faite. Nous avons réalisé cette expérience avec les deux sondes **Probe 2** et **Probe 4** sur la même échelle de myoglobine que la réaction précédente. Nous leur avons opposé différentes quantités de billes pour déterminer une quantité

minimale de bille par nmole de sonde utilisée, représentant la quantité de biotine à capter. Ainsi nous avons déterminé qu'il fallait 25 μL de billes de Streptavidine pour capter 0.1 nmole de biotine à la fois pour **Probe 2** et pour **Probe 4** (250 $\mu\text{L}/\text{nmole}$).

Nous avons par la suite focalisé notre attention sur l'optimisation de la réaction de click & release avec les cycloalcynes. De nombreuses expériences ont été réalisées dans ce but en faisant varier un grand nombre de paramètres qui sont résumés dans le **Tableau 12**. Pour comparaison avec les résultats précédents, on quantifie le clivage obtenu précédemment (**Figure 221**) comme partiel (M).

Entrée	Sonde	$\frac{V_{\text{billes}}}{\text{nmole}_{\text{Probe X}}}$ ($\mu\text{L}/\text{nmole}$)	Equivalents de sonde Probe X	Autres paramètres	Résultat
1	Probe 4	125	13		M
2	Probe 4	500	10	- DBCO 10 fois plus concentré	S
3	Probe 4	500	10	- Lavage Laemmli 1/20X	S
4	Probe 4	500	10	- Lavage Brij - Clivage avec 3 cyclooctynes	0
5	Probe 4	110	6.6	- Lavage avec EDTA 1mM	S
6	Probe 2	125	6.6	- Deuxième clivage DBCO-CO ₂ H	Clivage 1 : M Clivage 2 : 0
7	Probe 2	125	6.6	- Lavage Laemmli 1/20X post-clivage	Clivage : M Lavage : M
8	Probe 2	300	3.3	- Lavage Laemmli 1/20X post-clivage	Clivage : M Lavage : M

Tableau 12 : Variation de paramètres pour optimiser le clivage des iminosydnone sur le support solide ; Entrée 1 : rappel de l'expérience décrite en **Figure 221** ; S = traces de clivage ; M = Clivage partiel. La sonde **Probe 4** est clivée avec DBCO-CO₂H tandis que **Probe 2** est clivée avec DBCO-TAMRA.

Afin d'intervenir sur la réactivité entre l'iminosydnone et le cycloalcyne en tant que telle, nous avons fait varier la nature du partenaire alcyne ainsi que sa concentration (Entrées 2, 4). Ces facteurs sont restés sans impact sur la quantité de myoglobine récupérée. L'ajout de DBCO sur le support ayant subi un premier clivage ne relargue pas de protéine supplémentaire (Entrée 5).

Nous avons imaginé que l'éventuelle présence de cuivre resté chélaté ainsi que des autres composants du système catalytique pourrait perturber la réaction de click & release. Nous avons ainsi procédé à des lavages supplémentaires du support avant l'ajout du cyclooctyne (Entrées 3, 4, 5). Ces différents lavages n'ont pas permis d'améliorer le clivage.

En revanche, il apparaît qu'une quantité non négligeable de protéine relarguée est retenue sur le support par des interactions intolérantes au lavage par du Laemmli dilué puisque celui-ci permet de décrocher plus de protéines (Entrées 7 et 8).

Enfin, nous observons une amélioration nette du clivage lorsque le nombre moyen de biotine par myoglobine diminue (Entrées 6, 7, 8). Nous avons en effet observé que les protéines restant sur les billes étaient fluorescentes, impliquant que la réaction avec le cycloalcyne se faisait. Notre hypothèse

est que les iminosydnone les plus accessibles réagissaient en premier lieu, créant le signal fluorescent par accroche du TAMRA / formation du pyrazole. L'unité générée pouvait alors créer une gêne stérique pour l'accès à l'iminosydnone la plus enfouie, retenant la protéine sur le support.

Nous avons alors réalisé l'expérience de target-fishing en utilisant uniquement un équivalent de sonde afin d'avoir une seule iminosydnone par protéine. Cette expérience a été réalisée à la fois avec la sonde **Probe 2** ainsi que la sonde **Probe 4** (Figure 222).

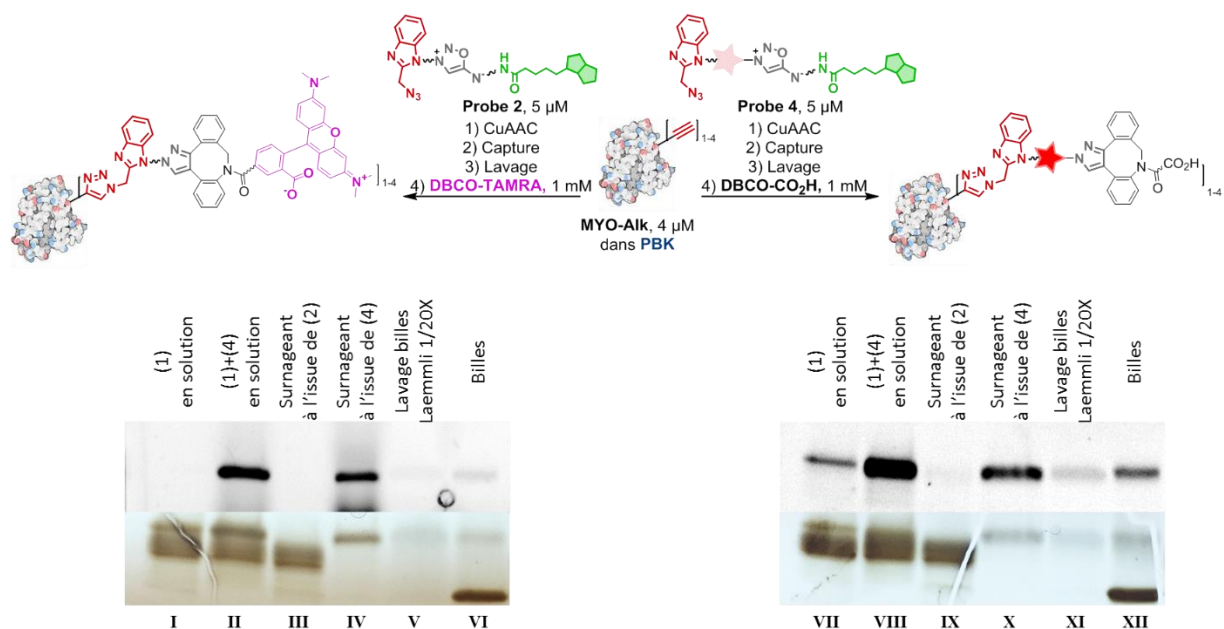


Figure 222 : Expérience de target-fishing de **Myo-Alk** avec un équivalent de **Probe 2** (I–VI) et **Probe 4** (VII–XII) dans PBK ; Gel d'électrophorèse capillaire : (I), (VII) Référence CuAAC, étape 1 ; (II), (VIII) Référence CuAAC + Click & Release, étapes 1 + 4 ; (III), (IX) Surnageants post capture ; (IV), (X) Surnageants obtenus après traitement des billes avec une solution de **DBCO-CO₂H** ou **DBCO-TAMRA** ; (V), (XI) Lavage des billes avec du Laemmli 1/20X ; (VI), (XII) Billes de Streptavidine post clivage ; Partie inférieure : Révélation au nitrate d'argent ; Partie supérieure : Signal de fluorescence.

La réaction de CuAAC n'est pas totale, la protéine n'ayant pas réagi est retrouvée ainsi dans le surnageant (III, IX). En revanche, notre hypothèse concernant le bénéfice d'une fonctionnalisation moindre sur le clivage de l'iminosydnone se révèle exacte puisque l'intégralité de la protéine est décrochée du support pour la sonde **Probe 2**. En revanche, la sonde **Probe 4** montre toujours un clivage incomplet.

c. Conclusions et perspectives des sondes de target-fishing

Nous avons synthétisé 4 sondes de target-fishing et éprouvé leurs capacités dans diverses expériences sur des protéines modèles. Deux d'entre elles possèdent un azoture portant un groupement benzimidazole chélatant et permettent d'abaisser les concentrations d'alcynes pouvant réagir dans la CuAAC. En revanche, le clivage quantitatif des sondes a été observé lorsque nous n'avons utilisé qu'un très léger excès de sonde **Probe 2**, favorisant la formation d'espèces mono-biotinylées. Ce cas se rapproche plus d'une application à une problématique concrète de target-fishing pour des protéines ne possédant qu'un seul alcyne. La généralisation de cette preuve de concept est actuellement en cours au laboratoire.

Nous avons ainsi démontré l'efficacité des iminosydnonnes en tant qu'espaceurs clivables. L'étape de "click" de la réaction de click & release a également été valorisée puisqu'elle permet d'apposer un marquage à la protéine pêchée.

Nous souhaitons également montrer la généralité de la méthode pour du trans-tagging avec d'autres types de marquages. La synthèse d'un cycloalcyne portant un marqueur pour l'analyse de masse est en cours de préparation.

III. Développement de conjugués Anticorps/Antibiotiques

A. Introduction bibliographique sur les conjugués Anticorps/Médicament (ADC)

L'heure est à la médecine de précision et à la médecine personnalisée dans le domaine médical. Les thérapies généralistes sont de moins en moins développées et les médicaments administrés doivent être adaptés à chaque patient et délivrés spécifiquement dans les tissus malades.²⁷³ Cette spécificité thérapeutique peut être atteinte par l'accroche d'un ligand spécifique à la molécule bioactive (**Figure 223**).²⁷⁴



Figure 223 : Concept de ciblage de médicament.

Ce type de médecine est particulièrement employé en oncologie. Lorsque les agents ciblant utilisés sont des anticorps monoclonaux, on parle d'ADC (Antibody-Drug Conjugates). Idéalement choisi, l'agent de ciblage va permettre de limiter la toxicité du médicament en le délivrant uniquement dans les cellules malades. L'efficacité du conjugué va plutôt être déterminée par l'activité de la substance relarguée (**Figure 224**).²⁷⁵ La fenêtre thérapeutique a été également élargie lors du développement d'ADCs de 3ème génération dont le DAR (Drug-Antibody Ratio) est contrôlé avec plus de précision.

²⁷³ E. A. Ashley, *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 507–522.

²⁷⁴ M. Srinivasarao, P. S. Low, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 12133–12164.

²⁷⁵ A. Beck, L. Goetsch, C. Dumontet, N. Corvaia, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315–337.

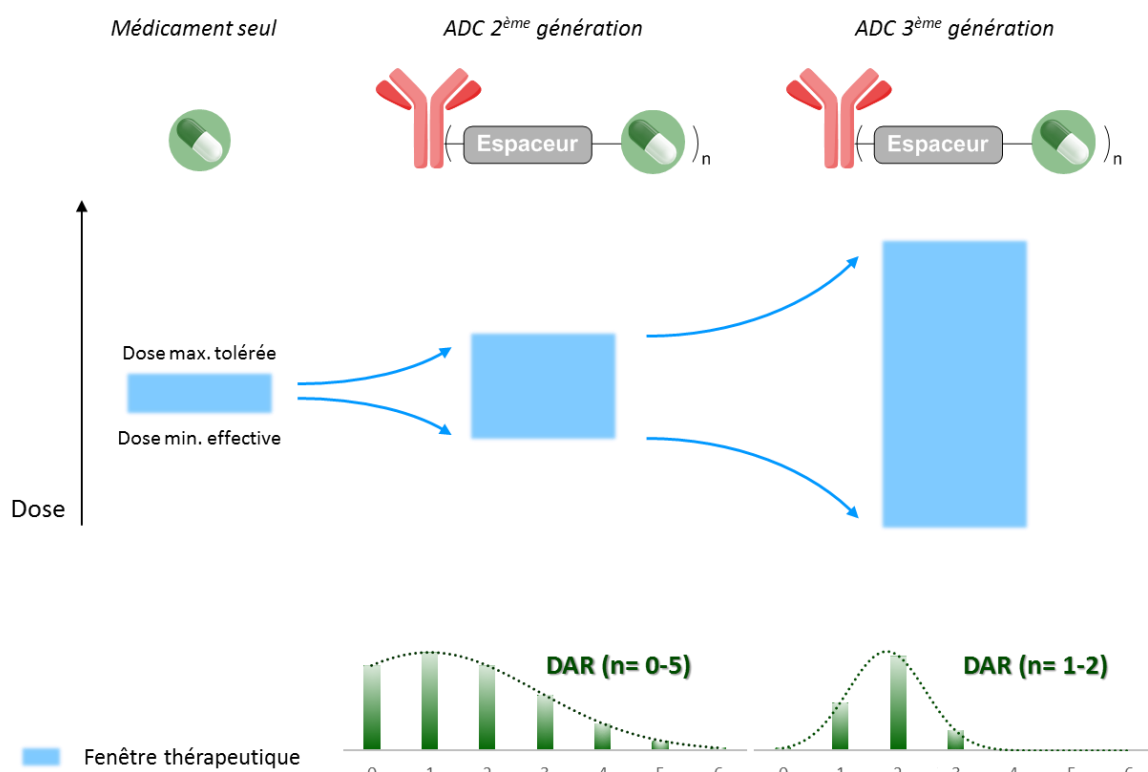


Figure 224 : Expansion de la fenêtre thérapeutique selon l'espèce utilisée ; DAR = "Drug-Antibody Ratio".

Le concept d'ADC remonte aux années 1960s avec la première bioconjugaison entre un composé anti-tumoral et un anticorps ciblant des cellules cancéreuses. Les premiers essais cliniques de tels objets ont commencé quant à eux dans les années 1980s et le premier ADC, Mylotarg, fut mis sur le marché en 2000.²⁷⁶ Ce domaine est en expansion fulgurante ces dernières années puisqu'à l'heure actuelle 4 ADCs ont été approuvés pour être mis sur le marché (le dernier en date est Besponsa en août 2017), et plus d'une soixantaine sont en essais cliniques.²⁷⁷ Des études concernant les différents constituants de l'ADC ont été réalisées. Nous allons brièvement illustrer ici les technologies les plus efficaces et les plus utilisées relatives :

- aux types de médicaments utilisés et relargués,
- aux espaceurs,
- au ciblage,
- à la bioconjugaison avec l'anticorps.

²⁷⁶ H. L. Perez, P. M. Cardarelli, S. Deshpande, S. Gangwar, G. M. Schroeder, G. D. Vite, R. M. Borzilleri, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 869–881.

²⁷⁷ T. Rodrigues, G. J. L. Bernardes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2032–2034.

1. Principes actifs utilisés

Les critères qui permettent à un médicament d'être choisi pour une stratégie ADC sont nombreux. Parmi ceux-ci, on trouve bien évidemment une haute activité ($IC_{50} \sim 10^{-10}$ - 10^{-12} M). L'espèce accrochée ne doit pas non plus être plutôt hydrophobe afin de limiter à la fois l'agrégation des conjugués, l'immunogénicité ainsi qu'une élimination trop rapide du corps. Enfin, le médicament doit être accessible synthétiquement et posséder une fonction d'accroche dont la modification n'affecte pas ou peu l'activité. De ce fait, les deux tiers des ADCs en essai cliniques sont des antimétabolites, soit appartenant à la famille des auristatines soit à celle des maytansinoides.

2. Le ciblage

Le ciblage de l'ADC dépend fondamentalement de l'antigène reconnu par l'anticorps. Pour réduire la toxicité dans les tissus sains, il est nécessaire de choisir un antigène surexprimé par les cellules tumorales et peu ou non exprimé par les cellules saines.²⁷⁸ De plus, les antigènes sélectionnés doivent être internalisants, c'est-à-dire déclencher l'endocytose de l'anticorps une fois celui-ci lié à sa cible.

L'anticorps utilisé doit également posséder certaines spécificités. Typiquement il doit être monoclonal. Afin de réduire l'immunogénicité il est également préférable d'utiliser un anticorps humanisé ou humain.

3. L'espaceur

Les espaceurs utilisés, qu'ils soient clivables ou non, doivent être stables pendant plusieurs jours dans la circulation sanguine. En effet, un relargage prématuré du composé actif mènera à une toxicité généralisée et une baisse de l'indice thérapeutique.

Lorsque l'espaceur utilisé est clivable, les motifs choisis sont coupés dans le cytoplasme des cellules après internalisation, par des protéases, un changement de pH ou des thiols. Récemment, l'équipe de Robillard a mis au point un ADC basé sur la réaction entre les tétrazines et les *trans*-cyclooctènes portant un carbamate en position allylique.²⁷⁹ Ceci permet de lever certaines contraintes du ciblage, notamment la nécessité de cibler des antigènes internalisants.

4. La bioconjugaison

La méthode de bioconjugaison utilisée impacte directement le ratio médicament/anticorps et donc la fenêtre thérapeutique (**Figure 224**). L'étape de bioconjugaison de la plupart des ADCs se fait par une addition de Michael d'un thiol sur un maléimide. Cette réaction est à la fois rapide et quantitative en conditions physiologiques. Elle est malgré tout réversible, provoquant de la déconjugaison dans la circulation sanguine.

²⁷⁸ M. Damelin, W. Zhong, J. Myers, P. Sapra, *Pharm Res* **2015**, 32, 3494–3507.

²⁷⁹ R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, 27, 1697–1706.

Cet inconvénient majeur, accompagné de la grande distribution de population en termes de DAR a mené au développement de nouvelles méthodes de bioconjugaison.^{280, 281}

Les différents facteurs à contrôler pour la conception d'un ADC sont résumés dans la **Figure 225**.

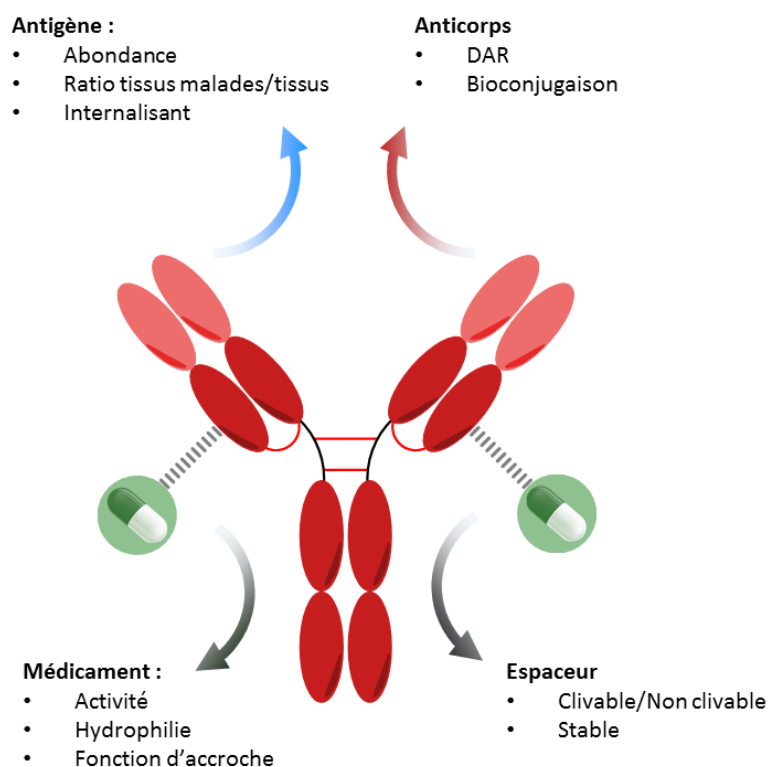


Figure 225 : Facteurs d'importance pour les ADCs.

B. Preuve de concept pour la formation d'un ADC clivable par un cycloalcyne¹⁰¹

Les voies de clivage chimique sont extrêmement peu représentées en ce qui concerne les espaceurs utilisés pour la stratégie ADC. Nous avons souhaité développer cette famille en utilisant les iminosydnone en tant qu'espaceur entre un anticorps et un médicament. Le relargage du médicament pourrait ainsi se faire par simple addition d'un cycloalcyne.

Pour réaliser la preuve de concept d'un ADC comportant une iminosydnone, un conjugué modèle entre le Trastuzumab et un fluorophore a été synthétisé. Ce travail s'est fait en collaboration avec le Dr. Sergii Kolodych (Syndivia, Illkirch). Une iminosydnone portant un TAMRA ainsi qu'un maléimide a été couplée à l'anticorps dont les ponts disulfures ont été partiellement réduits. Le conjugué obtenu possède un DAR de 5.4 avec une distribution comprise entre 2 et 8 ce qui lui confère un signal fluorescent intense (**Figure 226**).

²⁸⁰ P. Agarwal, C. R. Bertozzi, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 176–192.

²⁸¹ P. Akkapeddi, S.-A. Azizi, A. M. Freedy, P. M. S. D. Cal, P. M. P. Gois, G. J. L. Bernardes, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2954–2963.

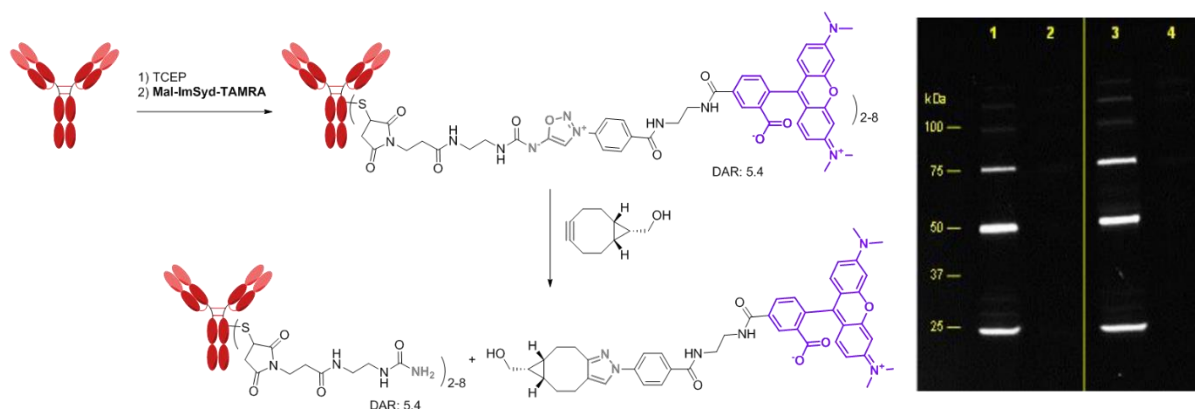


Figure 226 : Préparation du conjugué trastuzumab-TAMRA et réaction avec le BCN; Gel d'électrophorèse révélé par fluorescence; 1) Conjugué dans PBS ; 2) Conjugué + BCN (1mM) dans PBS ; 3) Conjugué dans le plasma sanguin ; 4) Conjugue + BCN (1mM) dans le plasma sanguin.

Cet anticorps a par la suite été incubé avec du BCN pendant 16h dans du tampon phosphate ou dans du plasma sanguin. L'extinction complète de fluorescence des bandes relatives à l'anticorps sur gel d'électrophorèse témoigne du succès de la réaction de click & release. Par ailleurs l'anticorps portant les urées résultant de la réaction a pu être détectés par spectrométrie de masse.

Cette preuve de concept nous permet d'imaginer l'utilisation d'iminosydnones au sein d'ADC pour la libération *in vivo* de principes actifs. Cela permet en particulier de concevoir des conjugués anticorps-médicament destinés au traitement d'autres pathologies que les cancers.

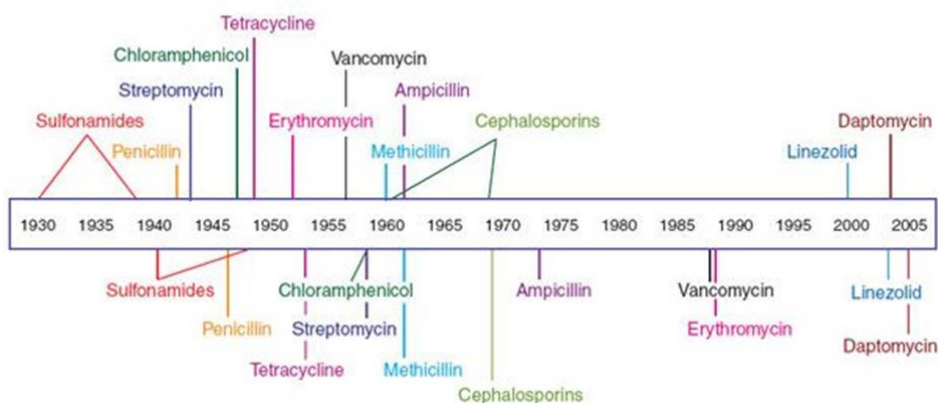
C. Utilisation des ADC pour le traitement d'infections bactériennes

Le clivage d'un ADC par voie chimique est particulièrement intéressant pour le traitement d'infections bactériennes. En effet des objets aussi volumineux que les anticorps ne peuvent pas être internalisés par les bactéries. Les mécanismes de clivages sur lesquels la stratégie ADC repose usuellement ne peuvent pas être utilisés puisqu'ils se font principalement dans le cytoplasme.

Une stratégie de ciblage pourrait être pour autant très pertinente pour l'antibiothérapie qui souffre de l'apparition rapide et préoccupante de résistances.²⁸² Pour chaque nouvel antibiotique mis sur le marché, il existe des mécanismes de résistance qui apparaissent de plus en plus vite. Au contraire, la recherche de nouvelles molécules actives s'essouffle (**Figure 227**).

²⁸² Walsh, Wright, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 391–394.

Antibiotic deployment



Antibiotic resistance observed

Figure 227 : Frise chronologique illustrant l'apparition des résistances aux antibiotiques suivant leur mise sur le marché.²⁸³

Cet écart entre la fulgurance de la montée des résistances et le ralentissement du développement de nouveaux médicaments actifs sur les souches bactériennes résistantes a mené à de nouvelles approches thérapeutiques.²⁸⁴

La stratégie ADC contre les infections bactériennes n'a été envisagée pour la première fois que très récemment, en premier lieu pour traiter la tuberculose.²⁸⁵ A notre connaissance, il n'existe qu'un seul exemple d'ADC qui ait été appliqué à une infection bactérienne. Il a été développé en 2015 pour éliminer le staphylocoque doré (*S. aureus*) dans les cellules.²⁸⁶ Ce composé novateur est à l'heure actuelle en phase d'essais cliniques.²⁸⁷ En effet, les antibiotiques employés pour lutter contre *S. aureus* ont une faible pénétrabilité cellulaire. Les bactéries dissimulées dans les cellules sont ainsi protégées et vont avoir une tendance à développer de nouveaux mécanismes de résistance.

L'anticorps a été conjugué avec un antibiotique (AAC = Antibody-Antibiotic Conjugate), le rifalogue un dérivé de la rifampicine (**Figure 228**). L'espaceur est clivable par des protéases après opsonisation de l'AAC lié à *S. aureus*. La libération du rifalogue se fait ainsi dans le cytoplasme et permet de détruire les bactéries.

²⁸³ A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat. Chem. Biol* **2007**, *3*, 541–548.

²⁸⁴ M. F. Chellat, L. Raguž, R. Riedl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6600–6626

²⁸⁵ S. Ekins, *Tuberculosis* **2014**, *94*, 715–716.

²⁸⁶ S. M. Lehar, T. Pillow, M. Xu, L. Staben, K. K. Kajihara, R. Vandlen, L. DePalatis, H. Raab, W. L. Hazenbos, J. H. Morisaki, et al., *Nature* **2015**, *527*, 323–328.

²⁸⁷ X. Linghu, N. L. Segraves, I. Abramovich, N. Wong, B. Müller, N. Neubauer, S. Fantasia, S. Rieth, S. Bachmann, M. Jansen, et al., *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 2837–2840.

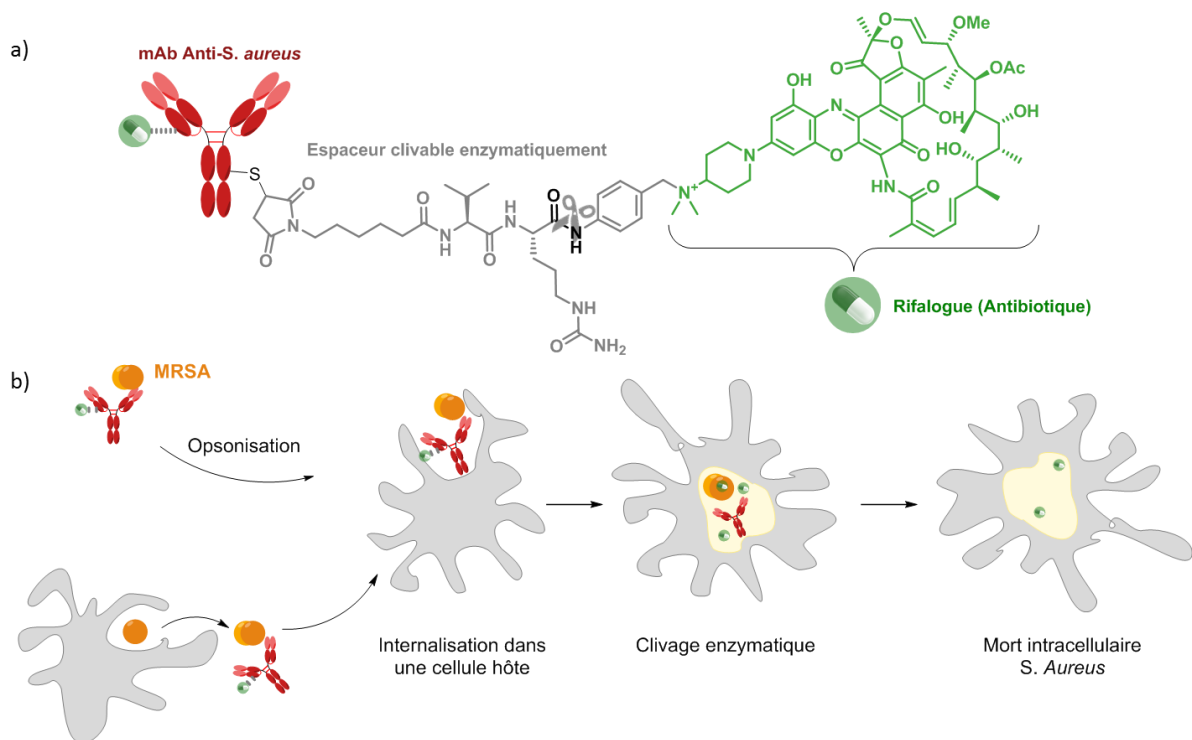


Figure 228 : Structure et mécanisme de l'AAC pour combattre les staphylocoques dorés multi-résistants (MRSA).

In vivo l'AAC s'est montré plus efficace que le rifalogue seul pour le traitement de souris infectées par un staphylocoque doré multi-résistant.

Mis-à-part cet exemple, aucun autre AAC n'a été décrit à notre connaissance. Par ailleurs ce conjugué repose à nouveau sur un mécanisme de clivage intracellulaire, nous pensons que la technologie de click & release permettrait de concevoir un conjugué clivable de manière chimique extracellulairement et ainsi être appliqué au traitement de infections bactériennes (**Figure 229**).

En effet, les bactéries ne peuvent pas internaliser les anticorps, et le peptidoglycane composant leur paroi n'est pas perméable aux macromolécules. Une stratégie de clivage déclenché par un acteur chimique semble être une stratégie de choix pour cette problématique.

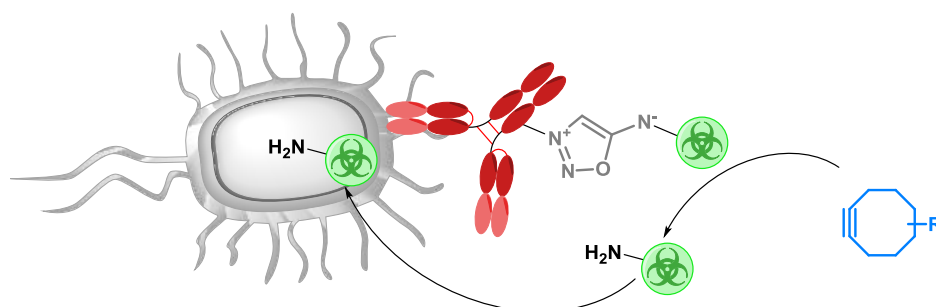


Figure 229 : Principe d'action d'un AAC comportant une iminosynone.

D. Le choix des antibiotiques

Pour notre concept d'AAC, le choix de l'antibiotique est primordial. Il est nécessaire de trouver un antibiotique très actif et dont la modification structurale apportée n'aura pas d'impact sur son activité. L'antibiotique doit également posséder une fonction d'accroche facilement dérivatisable d'un point de vue synthétique.

Les antibiotiques sont classés selon leur structure et leur mode d'action (**Tableau 13**).²⁸⁸

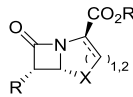
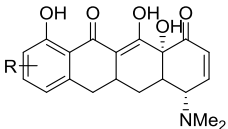
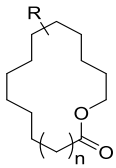
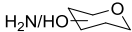
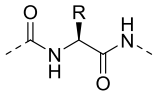
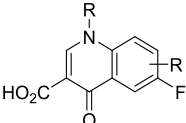
Classe (exemples)	Structure	Cible
β -lactames (pénicillines, céphalosporines)		Peptidoglycane
Cyclines (tétracycline, doxycycline)		Ribosome
Macrolides (érythromycine, pristinamycine)		Ribosome
Amino-glycosides (streptomycine, entamicine)		Ribosome
Peptides (polymixines)		Membrane cytoplasmique
Quinolones (ciprofloxacine)		ADN gyrase

Tableau 13 : Sélection de quelques classes d'antibiotiques.

Parmi ces différentes familles, nous ne sélectionnons pas d'emblée les β -lactames car bien que très utilisée, cette classe est la cible de nombreuses résistances. Nous avons été attirés par la famille des quinolones, notamment par la présence d'un acide carboxylique sur la structure qui pourrait servir de point d'accroche. Malheureusement, des études de relation structure-activité (SAR) ont montré qu'il était essentiel pour l'activité de ces antibiotiques.²⁸⁹

²⁸⁸ M. Ohno, M. Otsuka, Y. Okamoto, M. Yagisawa, S. Kondo, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, American Cancer Society, **2011**.

²⁸⁹ a) J. M. Domagala, *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, 33, 685–706. b) P. C. Appelbaum, P. A. Hunter, *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2000**, 16, 5–15.

Un angle d'attaque intéressant pour le choix d'un antibiotique est d'utiliser un "vieux" médicament. Cela sous-entend une molécule qui n'est plus d'usage et qui a été développée il y a assez longtemps pour que les résistances contre celle-ci aient disparu.²⁹⁰

Suivant ce raisonnement, nous avons sélectionné le chloramphenicol (**Figure 230**), un antibiotique possédant un très large spectre développé dans les années 1950s puis dont l'usage a été restreint à cause de ses effets secondaires. La partie la plus à-même d'être modifiée sur cette molécule est le groupement nitro.

Notre choix s'est également porté sur la novobiocine (**Figure 230**) développée à la même époque que le chloramphenicol. L'atout principal de cette molécule est qu'elle possède un carbamate-NH₂, fonction pouvant être libérée après la réaction de click & release donnant ainsi accès au relargage du médicament sans modification structurale.

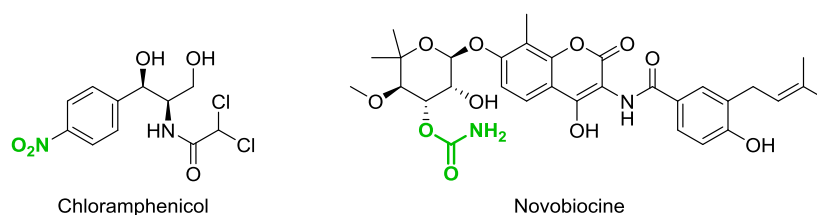


Figure 230 : Structure du chloramphenicol et de la novobiocine.

Nous avons également considéré le greffage d'antibiotiques plus actifs dont la fonctionnalisation serait possible. Dans cette optique, nous avons sélectionné la vancomycine (**Figure 231**) qui possède une fonction acide carboxylique libre. Il a été montré que celle-ci se trouvait hors du site de reconnaissance et que des modifications telles que l'introduction d'un amide n'influaient pas sur les capacités inhibitrices de la molécule.²⁹¹ Nous avons également choisi d'utiliser la tobramycine (**Figure 231**) qui est un antibiotique de la famille des aminoglycosides possédant une haute activité et un spectre large. Elle possède un alcool primaire dont la fonctionnalisation a été décrite et dont les dérivés gardent une activité antibactérienne.²⁹² Les dérivés de la tobramycine modifiée en position C₅ ont été étudiés de manière plus approfondie et montre une excellente activité sur les bactéries.²⁹³ Nous essaierons également de modifier ce site pour le greffage à l'iminosydnone.

²⁹⁰ a) M. E. Falagas, A. P. Grammatikos, A. Michalopoulos, *Expert Rev Anti Infect Ther* **2008**, *6*, 593–600. b) U. Theuretzbacher, F. Van Bambeke, R. Cantón, C. G. Giske, J. W. Mouton, R. L. Nation, M. Paul, J. D. Turnidge, G. Kahlmeter, *J Antimicrob Chemother* **2015**, *70*, 2177–2181.

²⁹¹ S. S. Printsevskaya, S. E. Solovieva, E. N. Olsufyeva, E. P. Mirchink, E. B. Isakova, E. De Clercq, J. Balzarini, M. N. Preobrazhenskaya, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3885–3890.

²⁹² R. J. Fair, L. S. McCoy, M. E. Hensler, B. Aguilar, V. Nizet, Y. Tor, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2164–2171.

²⁹³ a) S. Hanessian, M. Tremblay, E. E. Swayze, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 983–993. b) G. Guchhait, A. Altieri, B. Gorityala, X. Yang, B. Findlay, G. G. Zhanel, N. Mookherjee, F. Schweizer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6278–6282.

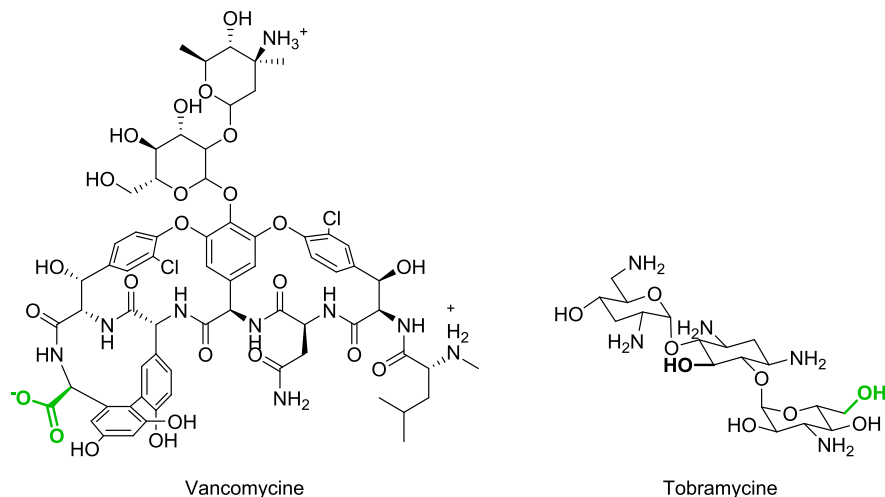


Figure 231 : Structure de la vancomycine et de la tobramycine.

La conception des AAC a été envisagée en plusieurs étapes (**Figure 232**). Nous allons tout d’abord synthétiser l’analogue de l’antibiotique qui sera relargué puis vérifier son activité vis-à-vis de différentes souches bactériennes. S’il reste actif, nous sélectionnerons un anticorps ciblant la souche bactérienne sensible et synthétiserons l’AAC. Celui-ci pourra alors être testé *in vitro*.

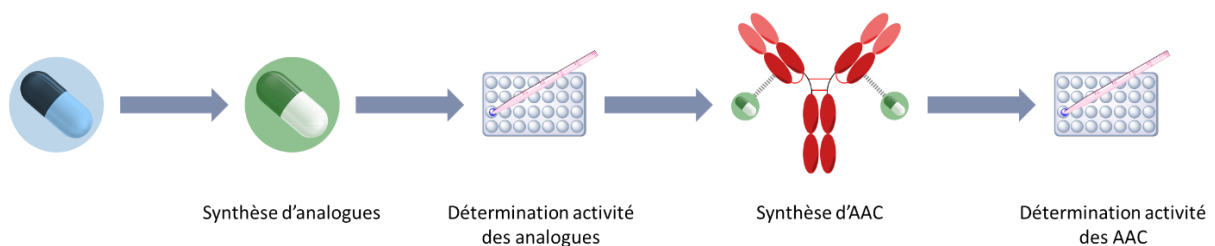


Figure 232 : Mise en œuvre expérimentale pour la synthèse d’AAC.

La novobiocine ne nécessite pas la synthèse d’un analogue puisque la molécule libérée n’est pas modifiée. En revanche, elle nécessite d’être modifiée pour être greffée. Concernant la vancomycine et la tobramycine, nous synthétiserons directement les conjugués avec l’iminosydnone, les conjugués seront obtenus par la réaction avec les cycloalcyne.

E. Synthèse des analogues

1. Chloramphenicol

Nous avons envisagé d'accrocher le chloramphenicol aux iminosydnone par une fonction urée puisqu'il s'agit de la fonctionnalisation permettant la réaction de click & release la plus rapide. Pour la synthèse de l'analogue de chloramphenicol nous envisageons de réduire le nitro aromatique puis de faire réagir l'amine formée avec le cyanate de potassium afin d'obtenir le composé désiré (**Figure 233**).

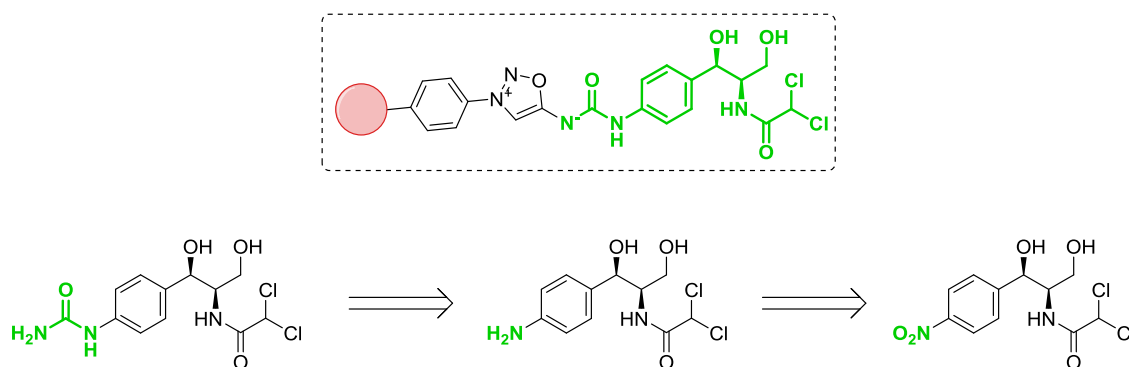


Figure 233 : Rétrosynthèse envisagée pour obtenir le chloramphénicol-urée.

Le chloramphenicol se révèle sensible aux conditions réductrices de par son carbone asymétrique en position benzylique ainsi que du résidu *gem*-dichloro. Les conditions de réduction de la fonction nitro que nous avons essayées se sont traduites par l'isomérisation du carbone asymétrique et même la perte d'un chlore dans le cas de l'hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon (**Figure 234**).

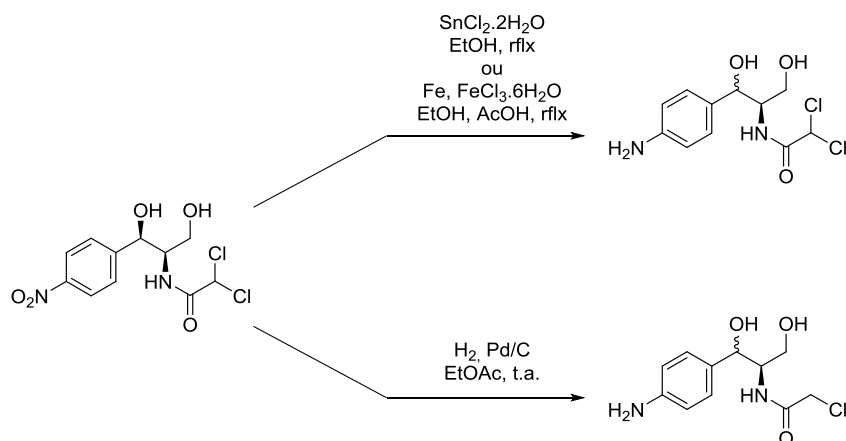


Figure 234 : Conditions de réduction du nitro sur le chloramphenicol.

Pour avoir un substrat moins sensible, nous avons envisagé d'introduire la chaîne portant le *gem*-dichloro après l'étape de réduction (**Figure 235**). Le précurseur envisagé a donc été réduit par hydrogénolyse en présence de palladium sur charbon pour obtenir l'aniline correspondante avec un rendement de 92%. Aucune racémisation du centre benzylique n'est observée dans ce cas.

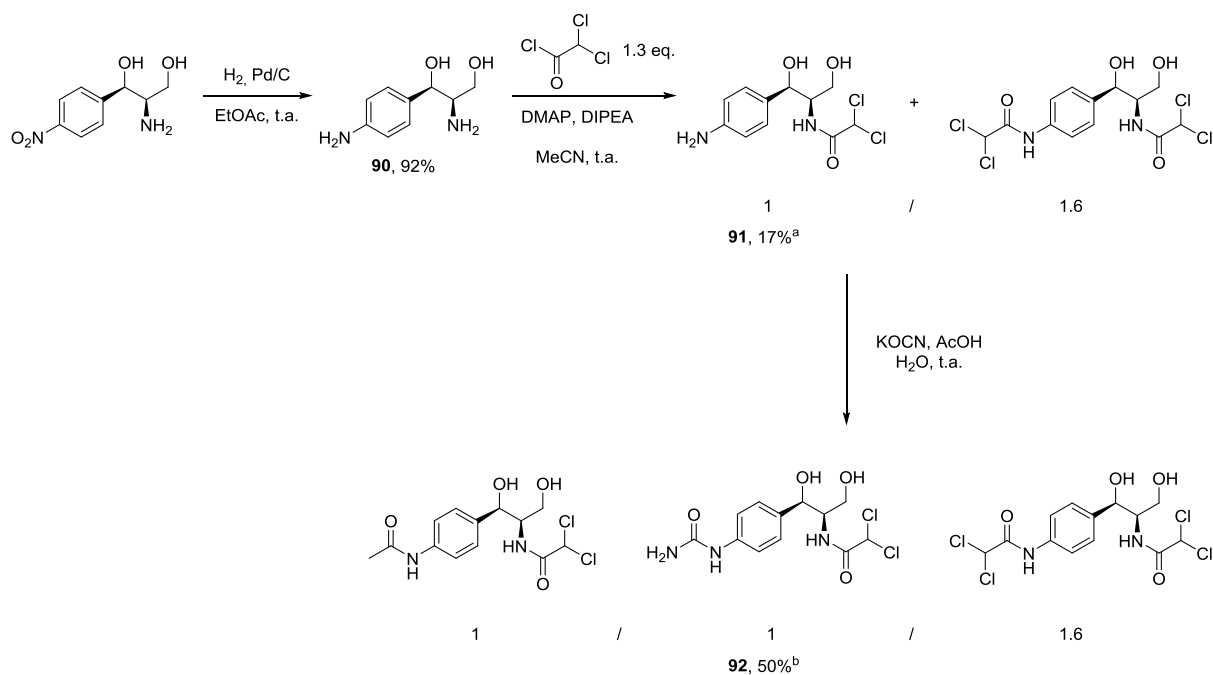


Figure 235 : Obtention de l'analogue de chloramphenicol **92** ; ^aRendement estimé par RMN ;
^bRendement déterminé par rapport à **91**.

L'étape de couplage suivante se fait avec le chlorure de 2,2-dichloroacétyle. Deux azotes sont susceptibles de réagir avec ce produit. Bien que l'aniline soit moins nucléophile, on obtient un mélange inséparable dans nos mains du produit désiré et du di-amide. Ce mélange est utilisé tel-quels dans l'étape suivante avec le cyanate de potassium. Le produit **91** est converti en urée désirée **92** mais est également acétylé. Le mélange obtenu est purifié par colonne de chromatographie pour obtenir l'analogue de chloramphénicol désiré avec un rendement de 50%.

Nous obtenons ainsi l'analogue libéré par la réaction de click & release. Si celui-ci s'avère actif, la synthèse de l'iminosydnone associée sera à établir en considérant une nouvelle voie de synthèse.

2. Novobiocine

La problématique de la novobiocine ne réside pas dans la synthèse d'un analogue mais dans son greffage à l'iminosydnone dont la rétrosynthèse envisagée est présentée en **Figure 236**.

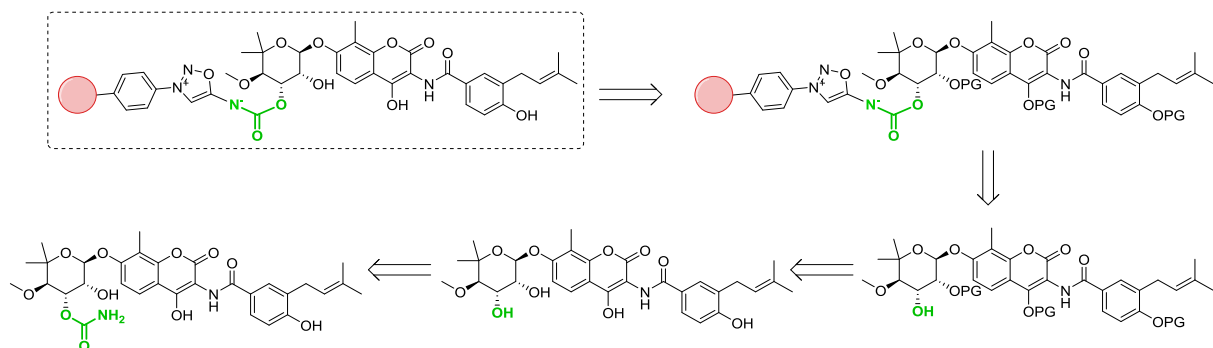


Figure 236 : Analyse rétrosynthétique pour l'obtention d'une iminosydnone portant la novobiocine.

La synthèse repose sur le clivage du carbamate et la protection des alcools pour obtenir uniquement un alcool libre en position C₃ du sucre.

La première étape de clivage du carbamate a déjà été décrite auparavant ; elle est réalisée en chauffant la novobiocine au reflux en présence de cyanate de sodium (**Figure 237**).²⁹⁴

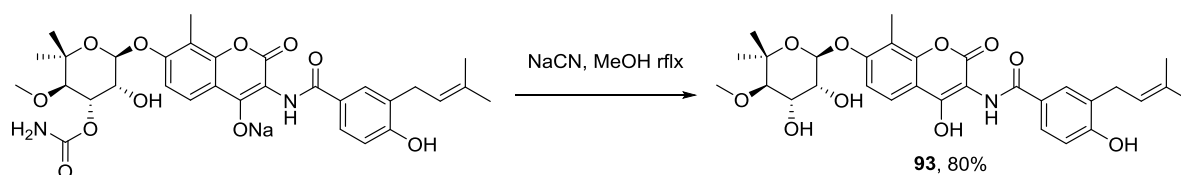


Figure 237 : Clivage du carbamate de la novobiocine.

La protection des alcools n'est en revanche pas décrite. Nous savons que les deux alcools les plus nucléophiles sont le phénol et l'alcool substituant la coumarine puisque ce sont les premiers à réagir avec le sulfate de méthyle.²⁹⁴ L'ordre suivant de réactivité devrait être l'alcool en α de l'hémiacétal. Suivant cette idée, nous avons essayé d'introduire des groupements protecteurs, soient silylés, soit acétyles (**Figure 238**).

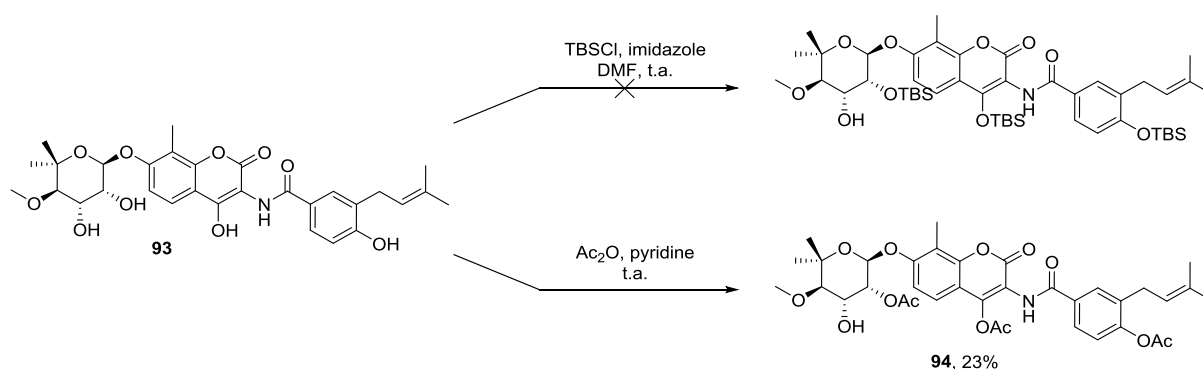


Figure 238 : Protection des groupements hydroxyyles du composé **93**.

Le composé **93** est resté inerte dans les conditions de silylation des alcools. Le traitement par un excès d'anhydride acétique (6 équivalents) a permis en revanche d'obtenir le produit tri-acétylé **94** avec un rendement de 23%. Malheureusement, l'alcool libre du composé **94** n'a montré aucune réactivité en présence de triphosgène pour la formation du chloroformate correspondant, ou en présence de CDI pour la formation du carbamate d'imidazole. Cette stratégie de synthèse est antérieure au développement d'iminosydnone-carbonylimidazoliums (cf. Chapitre I). L'addition du composé **94** sur une iminosydnone activée est actuellement en cours au laboratoire pour l'obtention d'une iminosydnone-novobiocine.

²⁹⁴ G. M. K. B. Gunaherath, M. T. Marron, E. M. K. Wijeratne, L. Whitesell, A. A. L. Gunatilaka, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5118–5129.

3. La vancomycine

Etant donné la taille de la vancomycine, nous avons souhaité utiliser un petit bras espaceur pour sa fonctionnalisation. Cela permet à la fois d'utiliser une iminosydnone-urée optimale pour la réaction avec les cyclooctynes, mais également de limiter l'encombrement stérique autour du mésoionique.

Nous avons utilisé le bras iminosydnone bi-fonctionnel **26k** portant une amine protégée et un acide carboxylique (**Figure 239**).

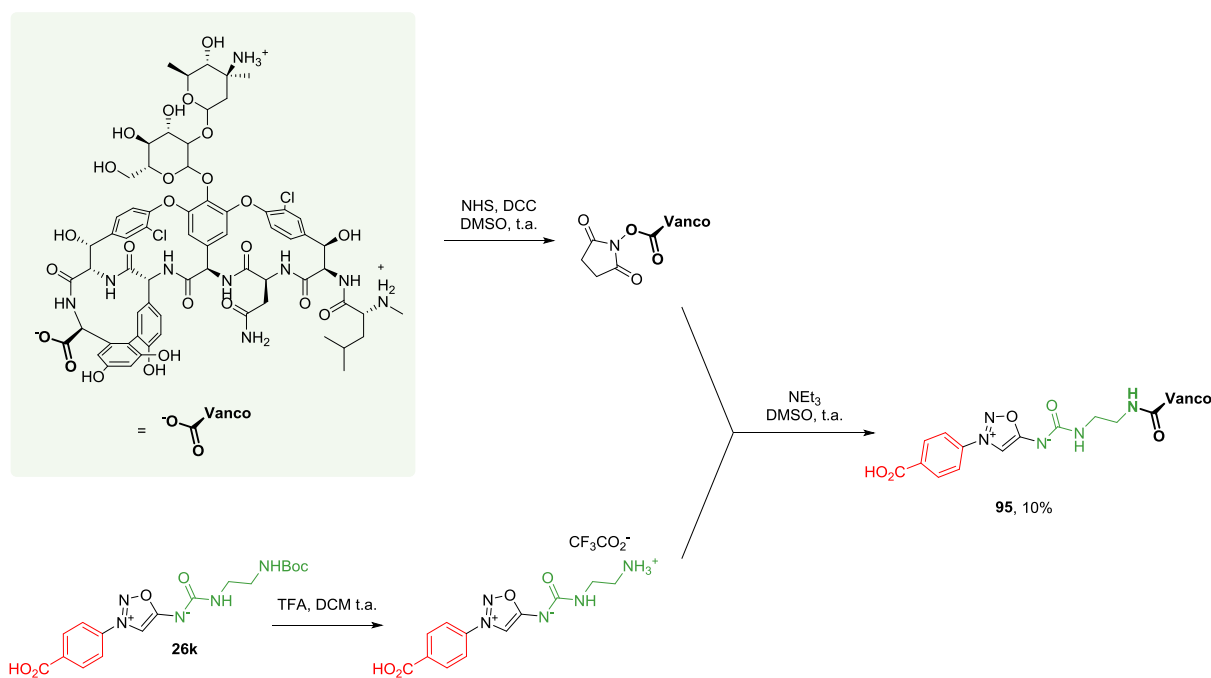


Figure 239 : Formation du produit **95**.

Dans la littérature, les réactions de couplage entre la vancomycine et des amines sont réalisées sur l'acide carboxylique nu en présence de HBTU comme agent de couplage.²⁹⁵ L'iminosydnone **26k** portant également un acide carboxylique, nous avons préalablement activé l'acide de la vancomycine par le succinimide. Parallèlement le groupement Boc de l'iminosydnone **26k** a été clivé avant de réaliser le couplage entre les deux partenaires. Nous avons ainsi obtenu l'iminosydnone **95** avec un rendement de 10% après purification par HPLC préparative. Ce rendement, bien que faible, ne fait étonnamment pas écho à des réactions parasites avec la grande diversité et le grand nombre de fonctionnalités présentes sur la vancomycine. La chémosélectivité du couplage avec l'amine libre de l'iminosydnone est totale.

Par la suite, nous avons vérifié que la réaction de click & release restait effective sur ce substrat (**Figure 240**).

²⁹⁵ a) V. Yarlagadda, P. Akkapeddi, G. B. Manjunath, J. Haldar, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4558–4568; b) D. A. MacKenzie, A. R. Sherratt, M. Chigrinova, A. J. Kell, J. P. Pezacki, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 12501–12504; c) V. Yarlagadda, P. Sarkar, S. Samaddar, J. Haldar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7836–7840.

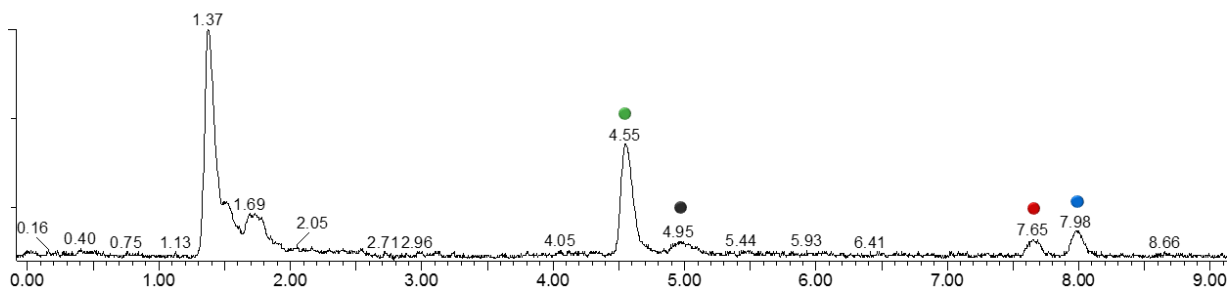
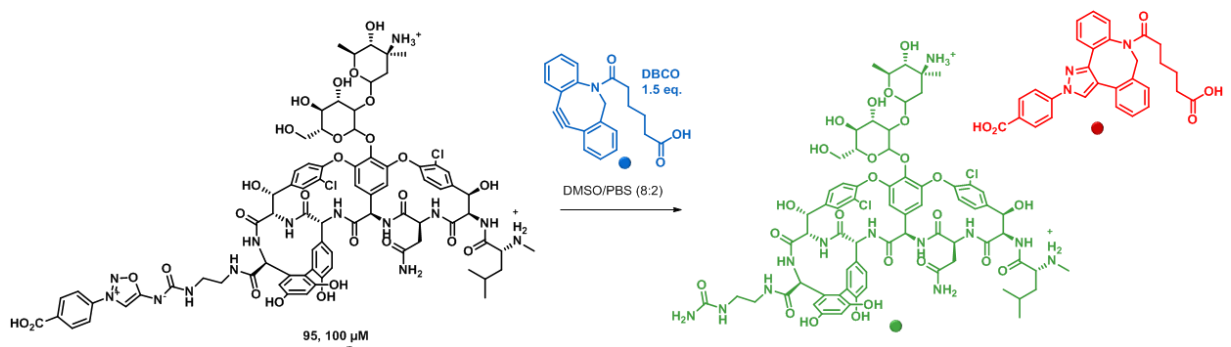


Figure 240 : Coupure de l'iminosydnone **95** par le DBCO à 100 μM : chromatogramme après 6h.

Après 6h de réaction en présence d'un équivalent et demi de DBCO, on observe les deux produits désirés. L'excès de DBCO ainsi que du produit de départ **95** sont également présents. Après 16h, la réaction est totale et **95** n'est plus détectable.

4. La tobramycine

Nous envisageons deux sites pour le greffage des iminosydnone à la tobramycine en nous basant sur la littérature décrivant la synthèse d'analogues de tobramycine. Comme pour la vancomycine, nous utiliserons un espaceur entre la fonction iminosydnone et l'antibiotique.

a. Greffage en C₆''

La position C₆'' de la tobramycine est l'alcool dont la dérivatisation est la plus simple. Nous avons suivi la stratégie généralement employée pour cette fonctionnalisation²⁹⁶ (**Figure 241**).

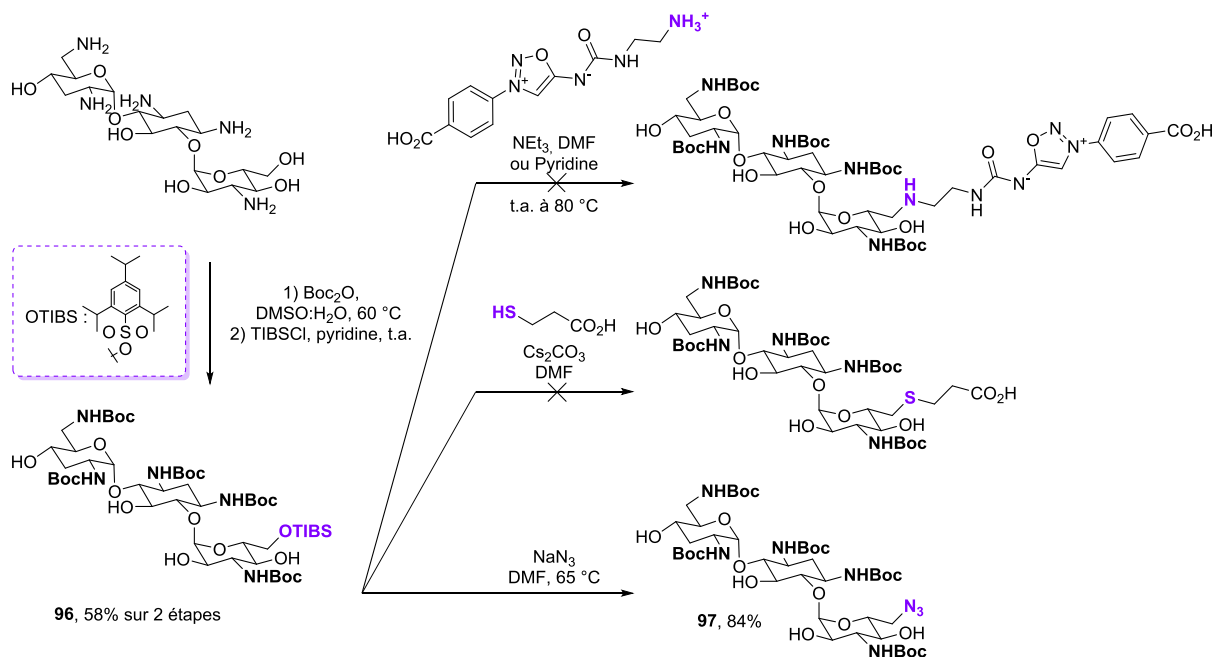


Figure 241 : Fonctionnalisation de la position C₆'' de la tobramycine.

Le précurseur **96** est préparé en deux étapes avec un rendement de 58% à partir de la tobramycine. Les amines sont d'abord protégées par des groupements Boc. Puis l'alcool en position C₆'' qui est le seul alcool primaire de la structure réagit sélectivement avec un chlorure de sulfonyl très encombré (TIBS-Cl).

Le composé **96** possède alors un groupement partant susceptible d'être substitué par un nucléophile. La substitution par l'iminosydnone portant une amine primaire est restée sans succès, tout comme l'introduction d'un thiol. En revanche, la réaction entre **96** et l'azoture de sodium dans le DMF a permis d'obtenir la tobramycine fonctionnalisée par un azoture **97** avec un très bon rendement de 84%.

Comme nous l'avons montré auparavant, la réaction de CuAAC est orthogonale avec le motif iminosydnone. Nous avons donc choisi cette réaction pour fonctionnaliser l'azoture avec une iminosydnone alcyne **98** (**Figure 242**). Cet alcyne est obtenu par couplage entre l'iminosydnone amine et l'ester activé correspondant avec un rendement de 47%.

²⁹⁶ K. Michael, H. Wang, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1361–1371.

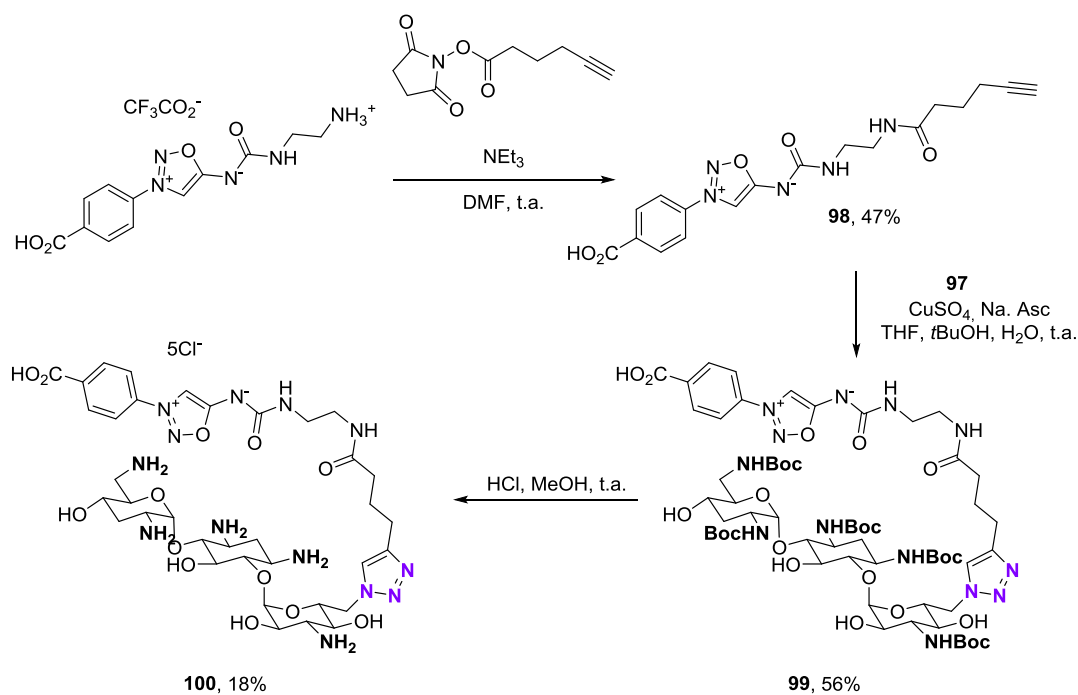


Figure 242 : Synthèse de l'iminosynone **100**.

La réaction de CuAAC se fait ensuite en conditions organo-aqueuses en présence de cuivre I généré *in situ* sans ligand. On obtient l'iminosynone-tobramycine **99** avec un rendement de 56% dont les groupements Boc sont ensuite déprotégés dans des conditions acides classiques pour obtenir le composé **100**.

b. Greffage en C₅

Historiquement, les dérivés de tobramycine substitués en position C₅ ont été obtenus par protection successive des amines par des groupements Cbz puis des alcools par des acétates.^{293a} L'alcool de la position C₅ est le plus encombré et réagit en dernier. La protection des alcools est alors sélective et permet de réaliser les transformations chimiques voulues sur la position C₅. Dans notre cas, le noyau iminosynone n'est pas stable dans les conditions d'hydrogénolyse ce qui exclut cette voie de synthèse.

Nous nous sommes plutôt basés sur des groupements protecteurs clivables en conditions acides (**Figure 243**).²⁹⁷ Ainsi, les amines sont protégées par des groupements Boc et les alcools par des groupements silylés, ce qui permet d'obtenir le produit **101** avec un rendement de 71% sur deux étapes. Un premier essai d'alkylation de l'alcool libre par un bromo-acide est resté infructueux. Nous avons alors continué à suivre la stratégie de synthèse décrite en alkylant cet alcool avec le 1,4-dibromo butane et avons obtenu le produit **102** avec un rendement de 54%. La substitution du brome par un azoture permet alors d'obtenir le dérivé de tobramycine **103** avec un rendement de 94%.

²⁹⁷ Y. Lyu, X. Yang, S. Goswami, B. K. Gorityala, T. Idowu, R. Domalaon, G. G. Zhanel, A. Shan, F. Schweizer, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3684–3702.

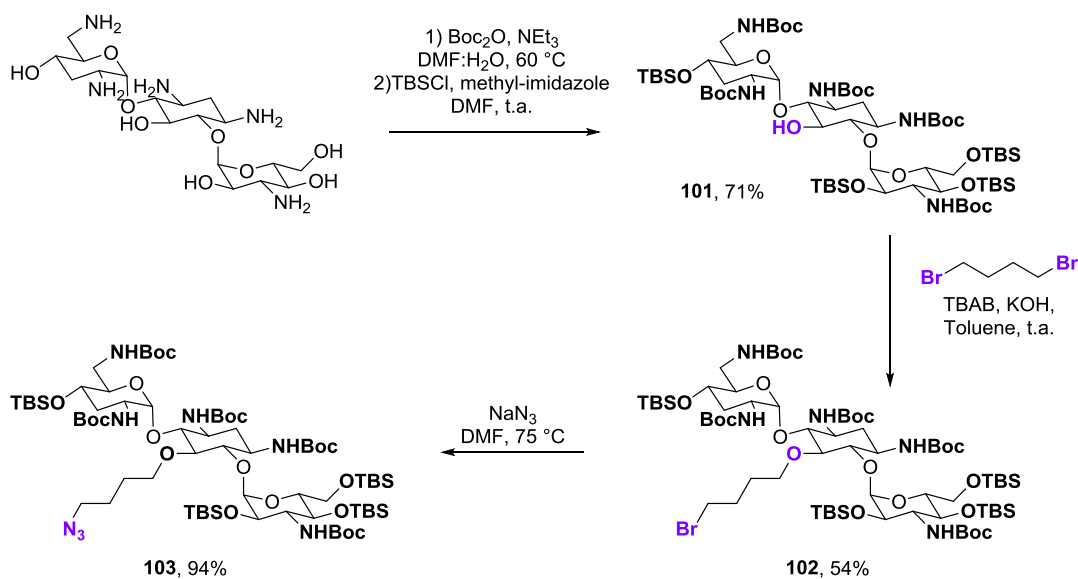


Figure 243 : Synthèse du produit **103**.

Les conditions de CuAAC entre **103** et l'iminosydnone **98** ont été délicates à optimiser. Le criblage des conditions réactionnelles s'est fait sur très petite échelle par suivi LC-MS (Figure 244).

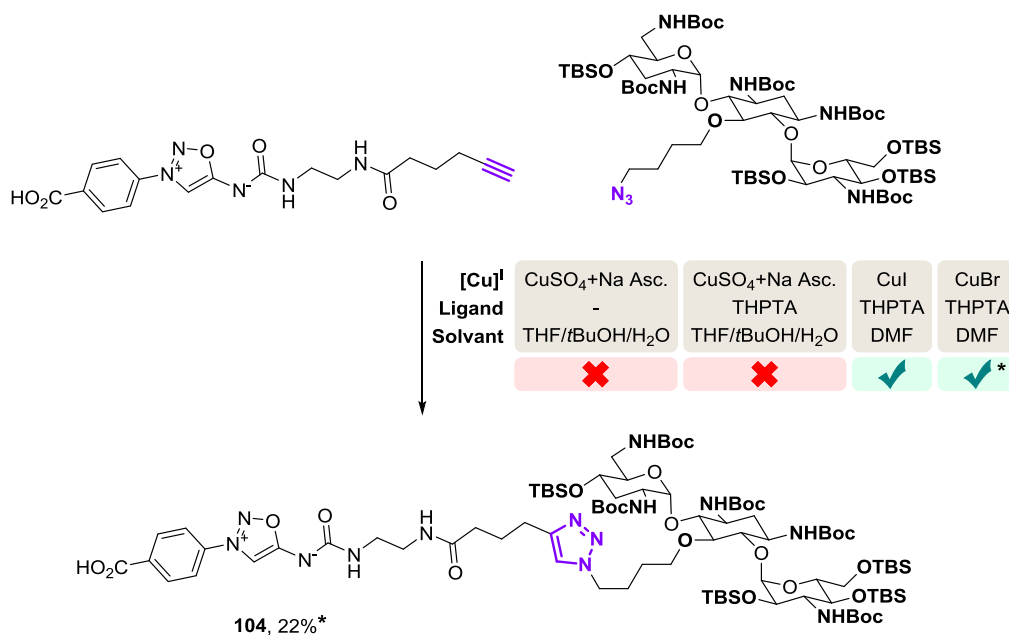


Figure 244 : Synthèse de l'iminosydnone-tobramycine **104** ;
 THPTA = tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine ; Na Asc. = ascorbate de sodium.

Le système catalytique utilisé précédemment ($\text{CuSO}_4/\text{Na Asc.}$) n'a pas été efficace pour cette réaction de CuAAC, en absence ou en présence de ligand stabilisant les espèces de cuivre I. En revanche, l'emploi de cuivre à l'état d'oxydation I (CuI ou CuBr) dans un solvant organique en présence de THPTA a permis d'obtenir le produit désiré. Nous avons sélectionné CuBr et réalisé la réaction sur une plus large échelle. L'iminosydnone-tobramycine **104** désirée a ainsi pu être obtenue avec un rendement de 22%.

L'étape de déprotection des groupements silylés et Boc par du HCl méthanolique nous fournit le produit désiré, mais malheureusement la purification de ce dernier s'est avérée infructueuse dans nos mains et nous n'avons pas pu poursuivre les études sur ce produit.

F. Activités inhibitrices des analogues d'antibiotiques synthétisés

La détermination des concentrations inhibitrices des analogues d'antibiotiques a été réalisée en collaboration avec Saoussen Oueslati et le Dr. Thierry Naas au Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques au CHU de Bicêtre.

Pour récapituler, nous avons synthétisé directement un analogue du chloramphénicol **92**, ainsi que deux iminosydones portant un antibiotique **95** et **100** (**Figure 245**).

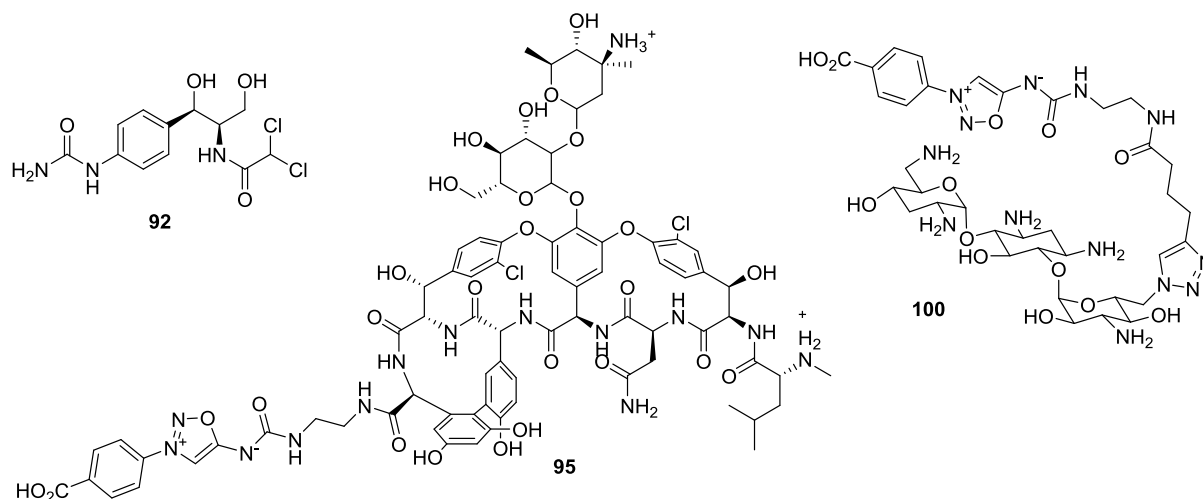


Figure 245 : Résumé des composés synthétisés précédemment.

Concernant les produits **95** et **100**, la complexité des molécules et de leur purification ne nous permet pas d'isoler le produit relargué seul. Pour étudier l'activité des analogues, nous préparons le mélange de la réaction avec les cycloalcyne qui contient donc l'analogue, ainsi que le pyrazole associé. Des témoins contenant uniquement le DBCO ainsi que le pyrazole ont été testés sur les souches bactériennes.

La grandeur permettant de mesurer l'activité d'un antibiotique sur une souche bactérienne est la concentration minimale inhibitrice (CMI). Elle correspond à la plus faible concentration d'antibiotique (donnée en $\mu\text{g/mL}$) inhibant la croissance d'une souche bactérienne dans des conditions standardisées.

La CMI est déterminée de la façon suivante (**Figure 246**) :

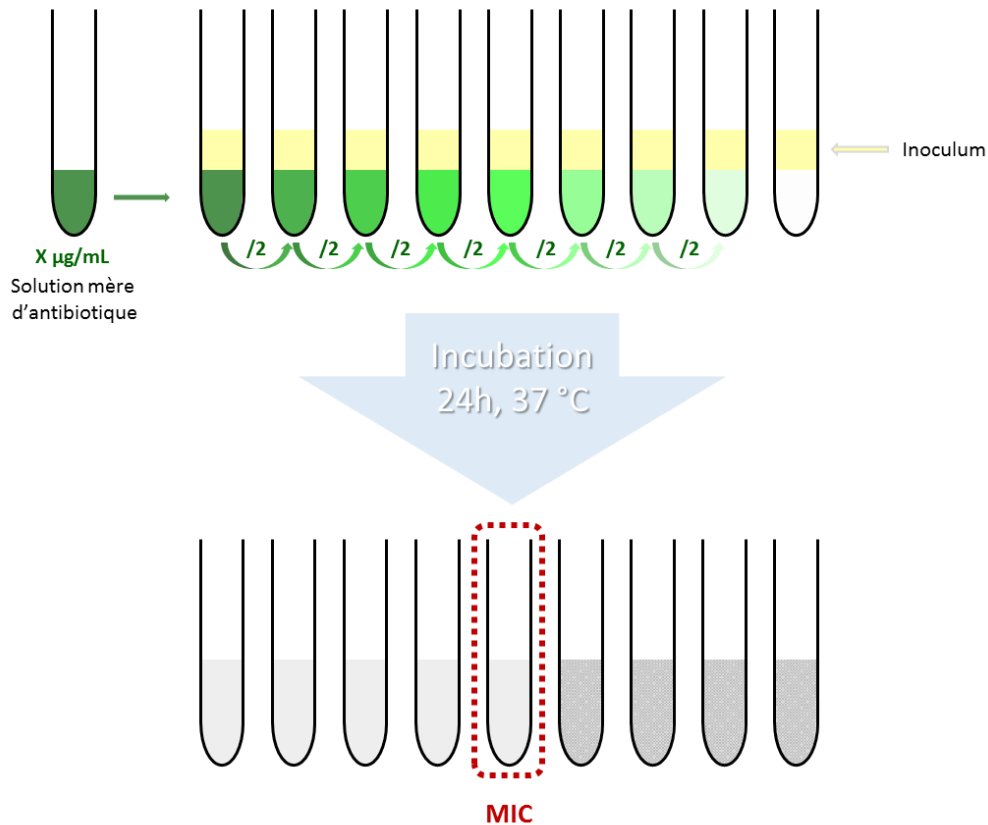


Figure 246 : Détermination d'une CMI en phase liquide.

Un inoculum dilué d'une souche bactérienne est incubé avec l'antibiotique dans plusieurs échantillons pendant 24h à 37°C . La concentration en bactérie est la même pour tous les échantillons et standardisée. L'antibiotique est quant à lui dilué d'un facteur deux d'échantillon en échantillon. Après l'incubation, la pousse bactérienne est observée. La concentration minimale inhibitrice correspond à l'échantillon limpide de plus faible concentration.

Les analogues d'antibiotiques que nous avons possèdent une masse molaire différente de celle du vrai médicament. Pour déterminer leur CMI, nous avons travaillé à la même molarité que l'antibiotique vrai, et les valeurs de CMI que nous donnons sont en réalité en "masse équivalente de médicament" par millilitre. Cela permet la comparaison directe des valeurs de CMI pour un médicament et son analogue.

Les différentes molécules ont été incubées avec 4 souches bactériennes Gram – (*Klebsiella pneumoniae*, 2 souches de *Escherichia coli* et une souche génétiquement modifiée) et 2 souches Gram + (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 14**.

	Gram –				Gram +	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> Sensible	Top 10	<i>E. coli</i> Résistante	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Chloramphenicol	64	16	8	256	16	2
Chloramphenicol-Release (92)	>512	>512	>512	>512	>512	>512
Vancomycine	>512	>512	128	512	0.5	1
Vancomycine-Release (95+DBCO)	>512	512	128	512	1	2
Tobramycine	0.5	1	0.5	0.5	0.25	16
Tobramycine-Release (100+DBCO)	>4	>4	>4	>4	>4	>64
Pyrazole	>512	>512	>512	>512	>4	>64
DMSO 5%	+	+	+	+	+	+

Tableau 14 : Valeurs de CMI en $\mu\text{g/mL}$; Le composé pyrazole a été obtenu par réaction de la sydnone correspondante avec le DBCO ; Le signe + indique aucune inhibition ; chaque expérience a été réalisée en triplicat.

Les résultats obtenus indiquent que les modifications apportées au chloramphénicol ainsi qu'à la tobramycine sont complètement délétères pour leur activité. En revanche, la vancomycine libérée conserve des CMI du même ordre de grandeur que le médicament ; c'est-à-dire une activité inhibitrice sur les bactéries Gram + pour des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/mL}$.

Nous constatons également que le pyrazole formé ainsi que la quantité de DMSO utilisée n'ont aucune influence sur la pousse des bactéries.

G. Perspectives

L'étape suivante du projet consiste à réaliser l'étape de bioconjugaison entre l'iminosydnone et l'anticorps, essentiellement un couplage peptidique avec les lysines accessibles. Il est donc nécessaire de sélectionner un anticorps ciblant la bactérie sur laquelle l'antibiotique est actif. Dans notre cas, seule la vancomycine maintient son activité, **95** est donc le seul composé qu'il est envisageable de conjuguer à un anticorps.

Le staphylocoque doré possède dans sa membrane une protéine, la protéine A, qui possède une très grande affinité pour les chaînes lourdes de la partie constante des anticorps. Cette interaction nous permettrait d'utiliser dans un premier temps un anticorps monoclonal sans se soucier de sa cible.

Des travaux dans cette optique sont actuellement en cours au laboratoire en collaboration avec le Dr. Christophe Créminon et en partenariat avec le Dr. Stéphanie Simon au Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, CEA Saclay.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse ont porté sur des composés mésoioniques appelés iminosydnones et leur réactivité avec les cycloalcyne. Nous avons étudié la synthèse et la fonctionnalisation des iminosydnones et montré l'intérêt de la réaction de click & release (**Figure 247**) pour différentes applications en chimie bioorthogonale.

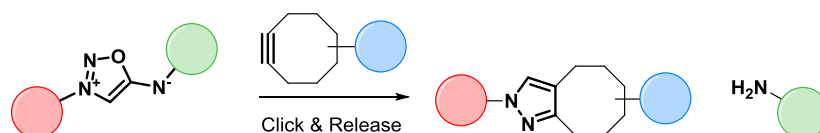
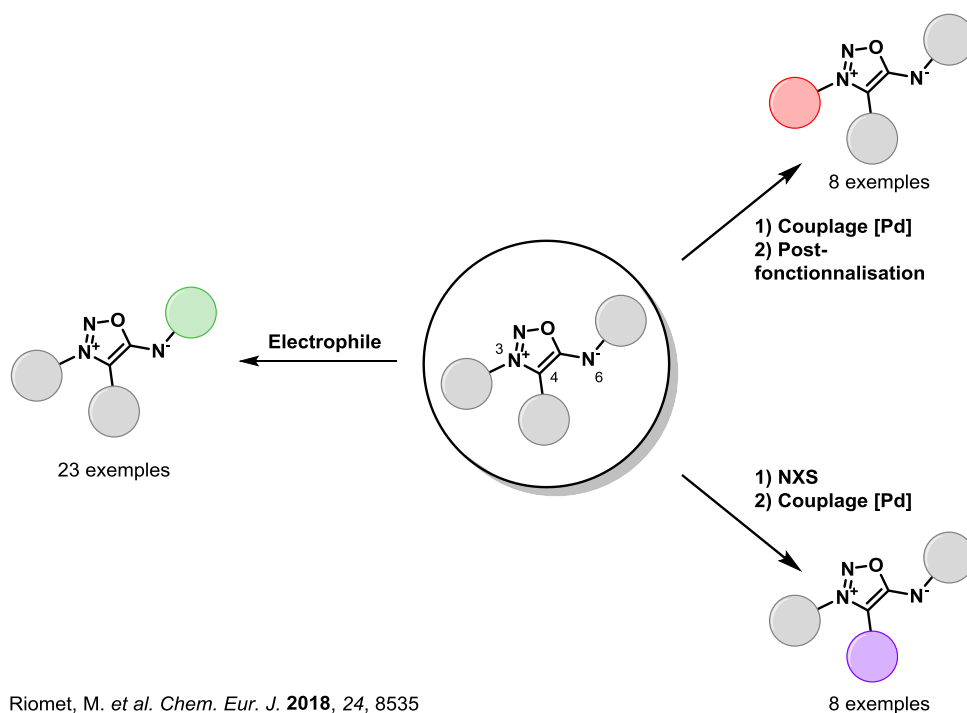


Figure 247 : Réaction de click & release entre les iminosydnones et les cycloalcyne.

Avec pour objectif de déterminer les effets influant sur la réaction de click & release, nous avons dans un premier temps travaillé sur les différentes réactions permettant d'introduire de nouveaux groupements sur le squelette iminosydnone (**Figure 248**). En mettant à jour la chimie des iminosydnones, nous avons pu constituer une large librairie de composés substitués en 3 positions : l'aromatique porté par l'azote N₃, le carbone C₄ et l'azote N₆.



Riomet, M. et al. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8535

Figure 248 : Voies d'accès développées pour l'obtention d'iminosydnones trifonctionnalisées.

Nous avons déterminé les constantes de cinétique pour la réaction entre ces iminosydnones et différents cycloalcyne et avons ainsi pu établir une relation entre la structure et la réactivité des iminosydnones dans la réaction de click & release (**Figure 249**).

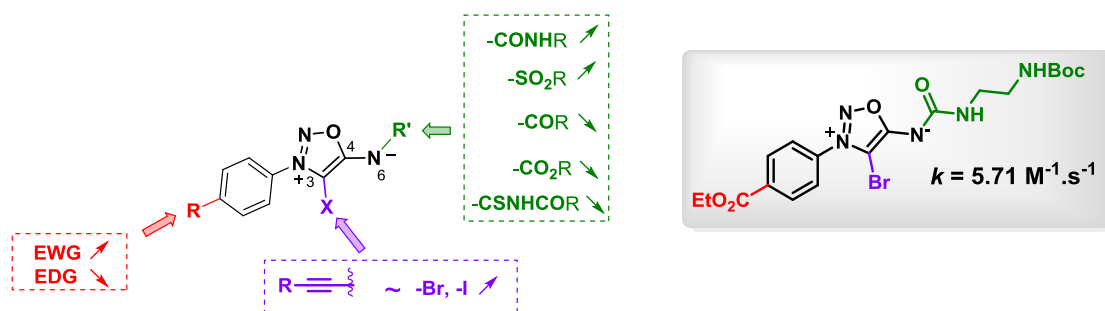


Figure 249 : Impact des différents paramètres structuraux des iminosydnones sur leur réactivité. Iminosydone présentant la meilleure combinaison de substitutions pour la réaction de click & release. Valeur de cinétique obtenue avec le DBCO comme cycloalcyne dans un milieu PBS/DMSO 99/01.

S'appuyant sur les facteurs accélérant la réaction, nous avons conçu un bras espaceur réagissant avec le DBCO avec une vitesse équivalente à celle des réactions de SPAAC les plus rapides.

Toujours dans le but d'étendre le panel de réactions permettant de fonctionnaliser les iminosydnones, nous avons dans un second temps évalué une autre approche pour la fonctionnalisation de l'azote exocyclique. Cette stratégie repose sur l'introduction d'un groupement fonctionnel nucléophile sur un iminosydone-carbonyl-imidazolium activée (**Figure 250**).

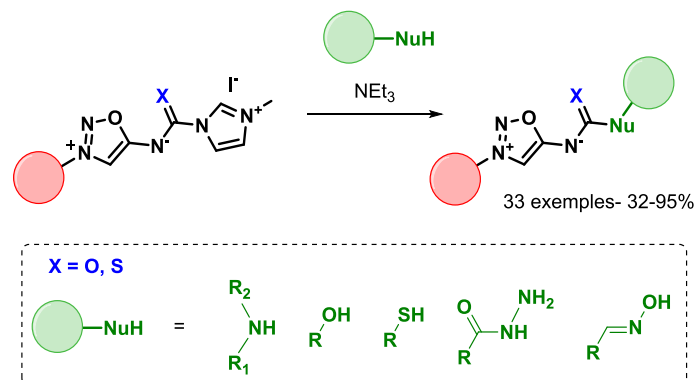


Figure 250 : Fonctionnalisation des iminosydnones-carbonyl-imidazoliums par des nucléophiles.

Cette méthode s'est révélée très chimio-sélective et a donné accès à des substrats pour lesquels la méthode classique utilisant des électrophiles sur des iminosydnones n'était pas efficace. Ainsi nous avons pu obtenir des iminosydnones portant sur l'azote exocyclique des fonctions jamais décrites auparavant.

L'expansion de la réaction à des iminosydnones de type guanidine (X = NH) est une opportunité attirante que nous souhaiterions développer dans le laboratoire.

La réactivité que nous avons observé avec une hydrazine et une hydroxylamine est assez intrigante. Nous souhaiterions explorer plus amplement la réaction entre les iminosydnones-carbonyl-imidazoliums et ces nucléophiles (**Figure 251**).

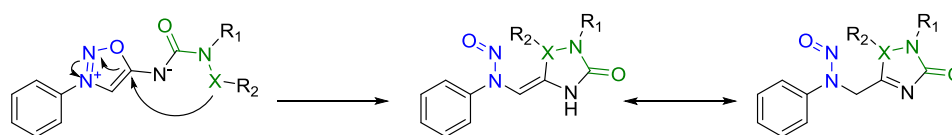


Figure 251 : Réactivité observée suite à l'addition d'hydroxylamines et d'hydrazines. X = O, N.

Une hydrazine portant un groupement désactivant le second azote (tel un carbamate) serait un substrat intéressant à essayer. L'iminosydone résultante ne devrait se réarranger qu'en clivant le

carbamate. En plus d'étayer nos investigations mécanistiques, un tel composé possède un intérêt en tant que pro-drogue de donneur de radical nitroso.

Après avoir développé les outils réactionnels donnant accès à des iminosydrones hautement fonctionnalisées, nous avons étudié leurs propriétés au travers de diverses applications en chimie bioorthogonale. La première d'entre elle est le marquage fluorescent au sein de cellules. Durant cette thèse, nous avons synthétisé des bibliothèques d'iminosydrones à exaltation de fluorescence, l'une portant le groupement pro-fluorescent sur l'azote N₃, l'autre sur l'azote N₆. Après avoir déterminé leurs propriétés optiques ainsi que celles des produits obtenus à l'issue de la réaction de click & release, nous avons synthétisé 4 nouvelles iminosydrones combinant les deux catégories. Parmi celles-ci, nous avons identifié une iminosydnone particulièrement intéressante portant un styryl-pyridinium en N₃ et un naphthalimide en N₆ (**Figure 252**). Celle-ci présente des valeurs de turn-on respectifs de 18 et 22 vis-à-vis du pyrazole et du naphthalimide relargués respectivement. Le grand intérêt de cette sonde réside également dans la possibilité de distinguer les deux fluorophores relargués ainsi que leurs longueur d'onde d'absorbance et d'émission compatibles avec la microscopie à fluorescence.

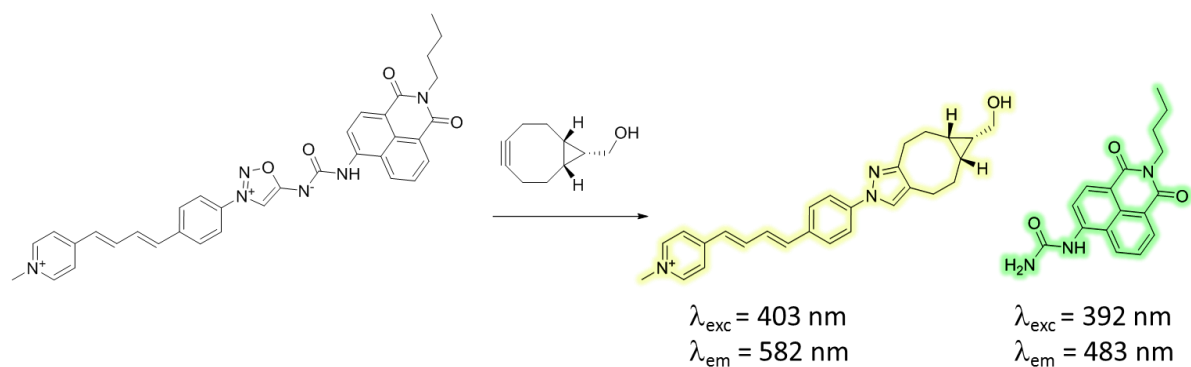


Figure 252 : Iminosydnone à double turn-on développée au cours de cette thèse.

Cette iminosydnone a été utilisée avec succès pour la libération de deux fluorophores au sein de cellules CHO vivantes et fixées. Cette preuve de concept ouvre la porte à de nouvelles applications comme le marquage fluorescent d'organelles ciblées. Pour cela, il faudrait ajouter des groupements ciblant sur les deux parties de la sonde, ce qui n'est pas le cas pour notre sonde actuelle.

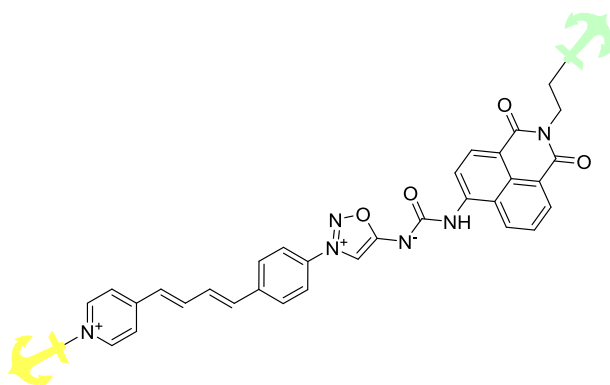


Figure 253 : Principe d'une sonde ciblant deux organelles différentes dans la cellule.

Nous avons également exploité la réaction de click & release pour la conception d'espaces clivable. Notre choix s'est d'abord porté vers le target-fishing comme domaine d'utilisation des iminosydrones. Nous avons ainsi conçu 4 "cannes à pêches" portant un azoture et une biotine pour immobiliser une protéine-alcyne, la purifier, et lui apposer un marquage lors du clivage. Parmi elles, 2 ont été particulièrement efficaces (**Figure 254**). Elles possèdent un azoture chélatant de type

benzimidazole permettant une réaction de CuAAC rapide avec la protéine, ceci même à basse concentration.

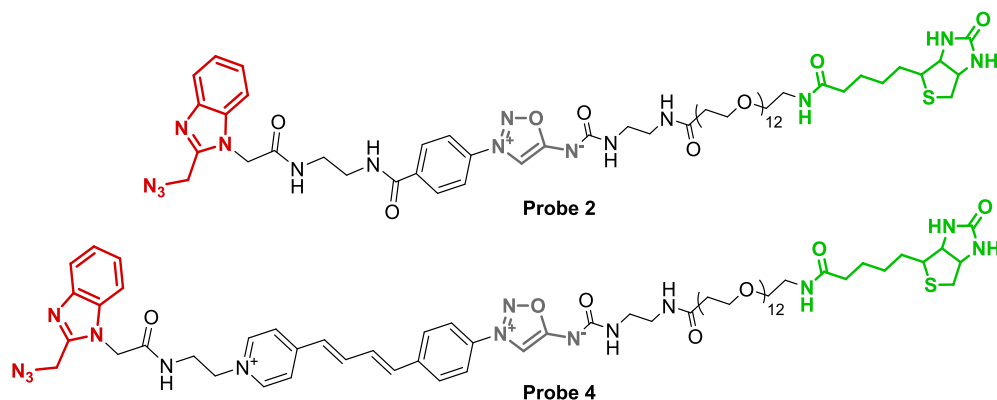


Figure 254 : Sondes de target-fishing synthétisées au cours de cette thèse.

Grace à ces outils, nous avons été capables de pêcher, libérer et marquer des concentrations de protéine de l'ordre du μM . Deux voies d'amélioration de cet outil sont actuellement à l'étude au laboratoire. Tout d'abord, le greffage à la sonde d'un azoture développé dans le laboratoire chélatant plus fortement le cuivre a été réalisé. Cette nouvelle sonde va être bientôt étudiée sur notre protéine modèle (**Figure 255-a**). De plus, nous souhaitons montrer que l'introduction du marquage par le cycloalcyne peut être étendue à d'autres types d'étiquettes (**Figure 255-b**), tel un marqueur radioactif ou un amplificateur pour l'analyse en spectrométrie de masse.

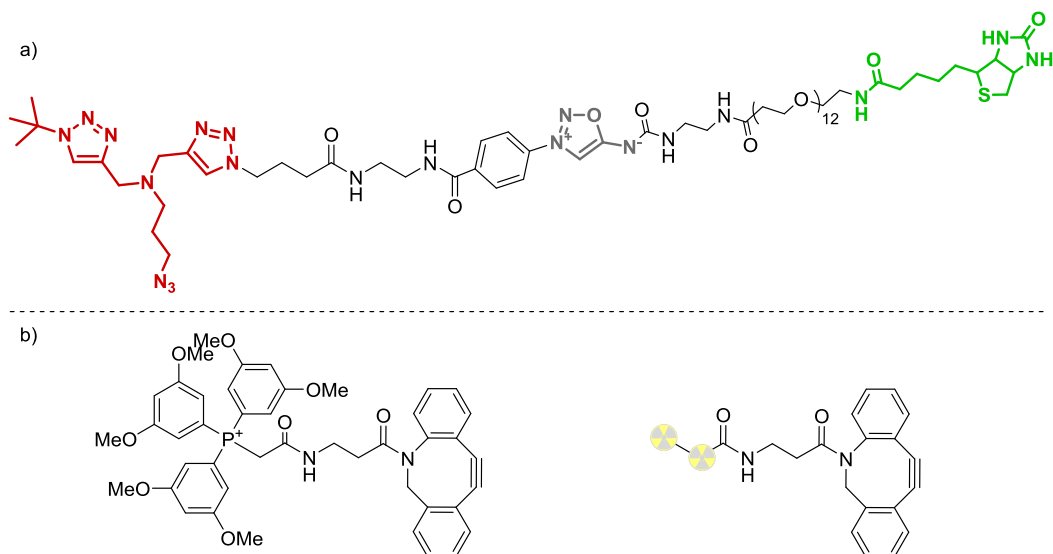


Figure 255 : Voies d'amélioration envisagées pour de nouveaux outils de target-fishing.

Enfin, nous avons initié des travaux visant à concevoir un conjugué anticorps-antibiotique avec une iminosydnone en tant qu'espaceur entre l'anticorps et le médicament. Après sélection des antibiotiques, nous avons initié un travail de synthèse conséquent pour obtenir les analogues d'antibiotiques relargués après la réaction de click & release qui a abouti à 3 composés (**Figure 256**). Ceux-ci ont été testés sur 6 souches bactériennes. La seule molécule conservant une activité antibactérienne équivalente au médicament est la Vancomycine provenant de l'iminosydnone **95**.

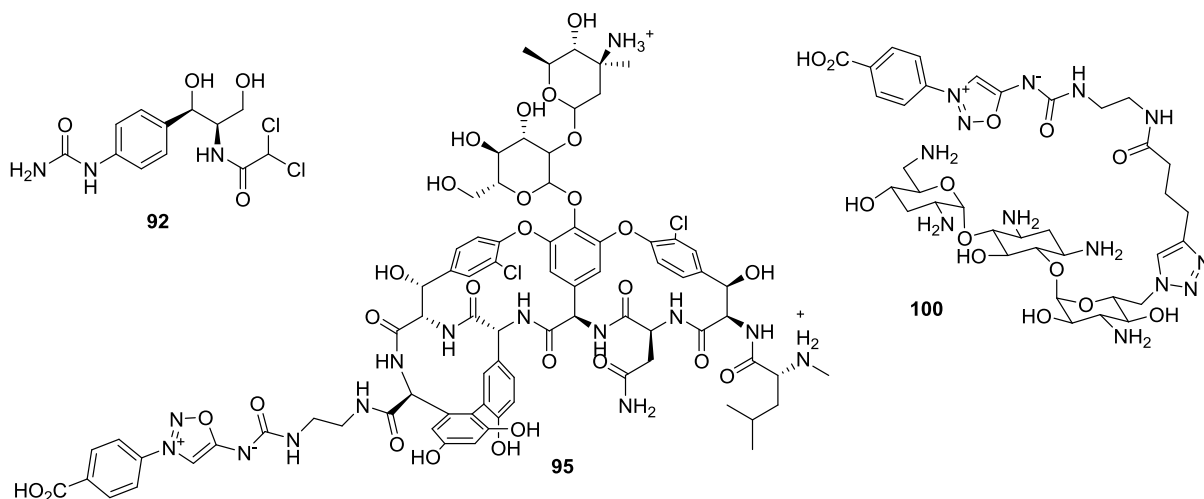


Figure 256 : Iminosynones-antibiotiques et analogues obtenus durant ces travaux de thèse.

Les travaux visant à effectuer la bioconjugaison avec l'anticorps sont en cours au laboratoire. L'immuno-conjugué obtenu sera alors caractérisé pour déterminer son DAR, puis sera testé sur les souches bactériennes sensibles.

La nouvelle voie de synthèse employant les iminosynones-carbonyl-imidazoliums est envisagée pour obtenir greffer la novobiocine (**Figure 257**).

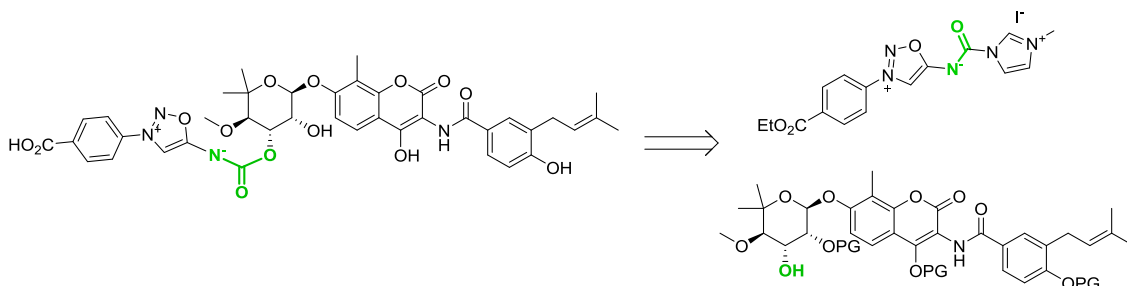


Figure 257 : Nouvelle voie envisagée pour obtenir un conjugué iminosynone-novobiocine.

Cette thèse a été dédiée à l'étude du squelette iminosynone et de l'exploitation de ses propriétés dans diverses applications. Décrite pour la première fois en 2017 par notre groupe, la réaction de click & release entre ces mésoioniques et les cycloalcyne s'est révélée être bioorthogonale et pouvant atteindre des cinétiques de réaction compétitives avec la plupart des réactions de bioconjugaison employées à l'heure actuelle. Les réactions de click & release représentent une famille de transformations peu décrites dans la littérature. Par ces travaux, nous avons souhaité mettre en valeur leur potentiel pour répondre à des problématiques modernes en biologie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Materials and equipment

All reactions sensitive to air and moisture were carried out under argon in oven-dried glassware.

Reactants and solvents: All chemical products commercially available were purchased from Sigma-Aldrich, Acros and Fluka and used without further purification. Anhydrous solvents: 1,4-dioxane, acetonitrile, DMF, DMSO were purchased in anhydrous form and used without further purification. THF was dried from sodium/benzophenone under nitrogen. Dichloromethane was distilled from calcium hydride under nitrogen. Chloroform was purchased stabilized with amylene.

Purifications: Flash chromatography were performed on silica gel (Merck Kieselgel 60, grading 40-63 μm) or using automate Combiflash[®] Rf Teledyne ISCO with pre-packed column RediSep[®] Rf (grading 35-70 μm).

Analysis:

Reactions were monitored by TLC carried out on silica 0,25 mm (60 F254, Merck) using UV light as visualizing agent and basic aqueous permanganate as developing agent.

¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (100 MHz) were measured on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) downfield from residual solvents peaks and coupling constants are reported as Hertz (Hz). Splitting patterns are designated as singlet (s), broad singlet (br. s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (quint), multiplet (m). Splitting patterns that could not be interpreted or easily visualized are designated as multiplet (m).

Electrospray mass spectra were obtained using an ESI-Quadripole autopurify, Waters (pump: 2545, mass: ZQ2000) mass Spectrometer.

Infrared spectra (IR) were obtained on a Perkin Elmer system 2000 FT-IR spectrophotometer or a Perkin Elmer UATR TWO FTIR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers (cm^{-1}).

Melting points (Mp) were obtained on a BÜCHI Melting Point B-545 and are reported in °C.

Absorbances were measured on a Varian Cary[®] 50 UV-Vis spectrophotometer.

Fluorescence spectra were obtained on a HORIBA FluoroMax[®]-4 fluorimeter.

Fluorescence analyses for kinetic studies were recorded on a Molecular Device SpectraMax[®] M5e.

S7–10 were obtained from the corresponding sydnones.²¹²

Cell labeling:

Microscopy was performed using a Leica DM 6000 upright microscope using a 63X/1.4 PLAN APO objective. A 50mW diode (405 nm), a 458 nm argon laser and a 633 nm HeNe laser linked to the microscope microscope by an optical fiber assured shuttering and illumination. Image were acquired in different sequences with the following parameters:

-Excitation 633 nm (HeNe laser), Emission 665–700 nm (GaAsP hybrid detector, Hamamatsu), false-colored in red;

- Excitation 458 nm (Argon laser), Emission 540–650 nm (PMT detector, Hamamatsu), false-colored in green;

-Excitation 405 nm (Diode), Emission 415–470 nm (GaAsP hybrid detector, Hamamatsu), false-colored in blue.

Images were acquired and processed using LAS-X and are shown as a single z-plane.

Fluoromount[™] Aqueous Mounting Medium was used for preparing the cell samples.

II. Experimental Part: Part I

A. Synthetic Procedure and Analytical Data

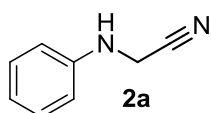
General procedure A for the addition of nucleophiles on iminosydnone-carbonyl-imidazoliums

To a solution of iminosydnone-carbonyl-imidazolium (0.20 mmol) in DCM (2 mL) were added the nucleophile (0.20 mmol) and triethylamine (0.20–0.40 mmol). The mixture was stirred at room temperature. Once the reaction has reached completion, the solvent was evaporated under reduced pressure.

General procedure B for the addition of nucleophiles on iminosydnone-carbonyl-imidazoliums

To a solution of iminosydnone-carbonyl-imidazolium (0.20 mmol) in chloroform (2 mL) were added the nucleophile (0.20 mmol) and triethylamine (0.20–0.40 mmol). The mixture was stirred at reflux. Once the reaction has reached completion, the solvent was evaporated under reduced pressure.

2-(phenylamino)acetonitrile (2a)



$C_8H_8N_2$
MW: 132 g.mol⁻¹
Yield: 88%
Yellow oil

To a mixture of aniline (19 g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) was added triethylamine (200 mmol), K₂CO₃ (33 g, 240 mmol) and chloroacetonitrile (30 g, 400 mmol). The mixture was refluxed for 3 hours. The reaction mixture was filtered and partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was separated and washed with brine. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 70/30) to give the desired product as a yellow oil (23.2 g, 88%).

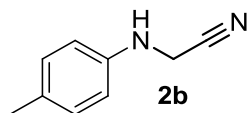
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.19–7.15 (m, 2H), 6.72–6.68 (m, 3H), 4.22 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 146.6, 129.0 (2C), 118.6, 117.9, 113.0 (2C), 31.4.

IR (cm⁻¹) 3383, 3054, 3022, 2243, 1727, 1602, 1505, 1439, 1424, 1315, 1258, 1182, 1101, 1074, 1044, 979, 874, 750, 691.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 133.

2-(*p*-tolylamino)acetonitrile (2b)



$C_9H_{10}N_2$
MW: 146 g.mol⁻¹
Yield: 82%
Yellow oil

To a mixture of *p*-toluidine (1.00 g, 9.33 mmol) in MeCN (20 mL) was added triethylamine (9.33 mmol, 4.66 mmol), K₂CO₃ (1.48 g, 11.2 mmol) and bromoacetonitrile (690 μL, 9.89 mmol). The mixture was refluxed for 3 hours. The reaction mixture was filtered and partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was separated and washed with brine. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 80/20) to give the desired product as a yellow oil (1.12 g, 82%).

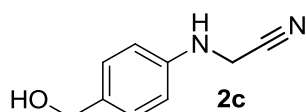
The spectral data (¹H-NMR) was consistent with reported one.²⁹⁸

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 2.28 (s, 3H).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 147.

²⁹⁸ Dai, L.-L.; Zhang, H.-Z.; Nagarajan, S.; Rasheed, S.; Zhou, C.-H. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6*, 147.

2-((4-(hydroxymethyl)phenyl)amino)acetonitrile (2c)

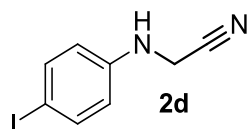


$C_9H_{10}N_2O$
MW: 162 g.mol⁻¹
Yield: 87%
Brown oil

Chloroacetonitrile (0.545 mL, 8.60 mmol) was added to a suspension of 4-aminobenzyl alcohol (1.00 g, 8.11 mmol), NaI (1.21 g, 8.11 mmol), K₂CO₃ (1.34 g, 9.74 mmol) in MeCN (20 mL) and the mixture was refluxed for 3h. The mixture was allowed to cool at room temperature and was filtered through a Celite pad with EtOAc. The solution was then washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford 1.15 g (87%) of the desired product which was used without any further purification.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.12 (m, 2H), 6.67 (m, 2H), 6.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.90 (br.s, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H).

2-((4-iodophenyl)amino)acetonitrile (2d)



$C_8H_7N_2I$
MW: 258 g.mol⁻¹
Yield: 80%
Yellow powder

To a suspension of 4-iodoaniline (28 g, 0.13 mol) in MeCN (300 mL), K₂CO₃ (21 g, 0.15 mol) and NaI (19 g, 0.13 mmol) were added. Chloroacetonitrile (16 mL, 0.26 mol) was added dropwise and the mixture was stirred and was refluxed for 65 hours, under argon atmosphere. The dark mixture was allowed to cool down at room temperature and was filtered on a pad of Celite (rinsing with EtOAc). The filtrate was washed with brine. The combined organic layers were dried over MgSO₄ before concentration under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, from 8/2 to 7/3 heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow powder (90%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H).

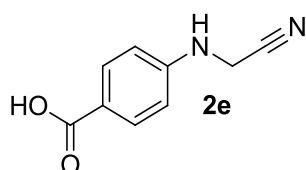
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 144.8, 138.3 (2C), 116.7, 115.8 (2C), 81.7, 32.6.

IR (cm⁻¹) 3375 (NH), 2256 (CN).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 259.

Mp. 113 °C.

4-((cyanomethyl)amino)benzoic acid (2e)



$C_9H_8N_2O_2$
MW: 176 g.mol⁻¹
Yield: 38%
White solid

To a flask containing *p*-aminobenzoic acid (2.5 g, 18.2 mmol) were added subsequently paraformaldehyde (0.702 mL, 9.12 mmol), KCN (1.66 g, 25.5 mmol), ZnCl₂ (9.94 g, 72.9 mmol) and AcOH (350 mL) containing 5 drops of H₂SO₄ (0.143 g, 1.46 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into ice-water, and the solid product was filtered and washed several times with H₂O. The precipitate was then dried under high *vacuum* to afford 1.22 g (38%) of the desired product.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.24 (br.s, 1H), 7.77 (m, 2H), 6.94 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 6.75 (m, 2H), 4.35 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H).

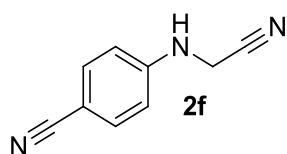
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 167.3, 150.4, 131.1 (2C), 119.6, 228.1, 112.0 (2C), 31.0.

IR (cm⁻¹) 3384, 1668, 1598, 1323, 1274, 1172, 835, 770, 545.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 177.

Mp. 237 °C.

4-((cyanomethyl)amino)benzonitrile (2f)



C₉H₇N₃
MW: 157 g.mol⁻¹
Yield: 30%
White solid

To a flask containing 4-aminobenzonitrile (2.00 g, 16.9 mmol) were added subsequently paraformaldehyde (762 mg, 8.46 mmol), KCN (1.54 g, 23.7 mmol), ZnCl₂ (9.21 g, 67.6 mmol) and AcOH (100 mL) containing 5 drops of concentrated H₂SO₄. The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into ice-water and stirred 15 min. The white solid product was filtered and washed several times with H₂O. The precipitate was then dried under high *vacuum* to give the desired product as a white solid (808 mg, 30%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.60 (m, 2H), 7.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 6.81 (m, 2H), 4.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H).

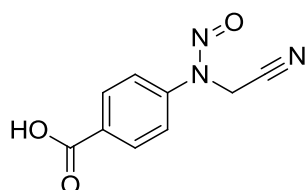
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 150.2, 133.5 (2C), 119.9, 117.8, 112.8 (2C), 98.5, 30.6.

IR (cm⁻¹): 3361, 2216, 1606, 1523, 1324, 1277, 1177, 825, 544.

LMCS (ESI) *m/z* : [M+H]⁺ 158.

Mp: 118 °C.

4-((cyanomethyl)(nitroso)amino)benzoic acid (3e)-



C₉H₇N₃O₃
MW: 205 g.mol⁻¹
Yield: 77%
White solid

2e (200 mg, 1.13 mmol) was solubilized in 10 mL of THF and isopentyl nitrite (307 μL, 2.84 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was diluted with 50 mL of cyclohexane. A white precipitate was formed and, after stirring 10 min, was filtered and washed with cyclohexane to obtain the desired product as a white solid (179 mg, 77%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13.20 (br.s, 1H), 8.13 (m, 2H), 7.82 (m, 2H), 8.23 (s, 2H).

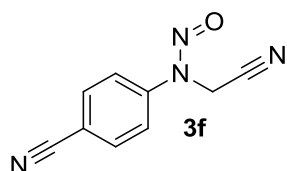
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 166.4, 142.9, 130.9 (2C), 130.1, 119.5 (2C), 113.7, 31.4.

IR (cm⁻¹): 2972, 1682, 1606, 1467, 1322, 1293, 1100, 939, 903, 769.

LCMS (ESI) *m/z* : [M-H]⁻ 204.1.

Mp. 184 °C – decomp.

N-(cyanomethyl)-N-(4-cyanophenyl)nitrous amide (3f)-



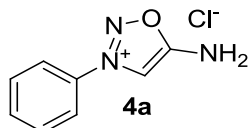
C₉H₆N₄O
MW: 186 g.mol⁻¹
Yield: 90%
Yellow solid

2f (400 mg, 2.54 mmol) was solubilized in 15 mL of THF and isopentyl nitrite (1.02 mL, 7.62 mmol) was added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The mixture was diluted with 50 mL of cyclohexane. A precipitate was formed and, after stirring 10 min, was separated by decantation to give the desired product as a yellow solid (428 mg, 90%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.10 (m, 2H), 7.91 (m, 2H), 5.29 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 143.0, 134.0 (2C), 119.9 (2C), 118.2, 113.6, 110.4, 31.1.
IR (cm⁻¹): 2228, 1605, 1485, 1352, 1288, 1236, 1089, 923, 900, 833, 551.
Mp. 154 °C.

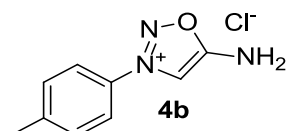
5-amino-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (4a)



C₈H₈ClN₃O
MW: 198 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Beige powder

To a solution of 2-(phenylamino)acetonitrile **2a** (23.2 g, 176 mmol) in THF (63 mL, 528 mmol). The mixture was stirred for 2 hours at room temperature. Then a solution of HCl 4M in dioxane (125 mL) was added to the mixture and the reaction was stirred over the day. The precipitate was collected by filtration. The desired product was obtained as a beige powder (30 g, 86%).
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.41 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 8.05–8.03 (m, 2H), 7.82–7.71 (m, 3H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.4, 133.5, 132.8, 130.4 (2C), 122.7 (2C), 102.2.
IR (cm⁻¹) 3374, 3009, 1681, 1479, 1430, 1292, 1226, 1114, 983, 943, 767, 678.
LCMS (ESI) *m/z* [M-Cl]⁺ 163.

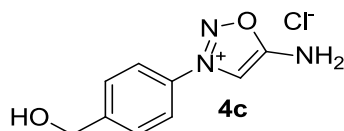
5-amino-3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (4b)



C₉H₁₀ClN₃O
MW: 212 g.mol⁻¹
Yield: 25%
Beige powder

To a solution of 2-(*p*-tolylamino)acetonitrile **2b** (1.12 g, 7.66 mmol) in Et₂O (10 mL), isopentyl nitrite (2.06 mL, 15.3 mmol). The mixture was stirred for 20 hours at room temperature. Then a solution of HCl 4M in dioxane (19 mL) was added to the mixture and the reaction was stirred over the day. The precipitate was collected by filtration. The desired product was obtained as a beige powder (370 mg, 25%).
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.81 (s, 2H), 8.58 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 2.44 (s, 3H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.7, 144.5, 131.1 (2C), 130.8, 122.7 (2C), 102.2, 21.3.
IR (cm⁻¹) 2941, 1676, 1591, 1504, 1431, 1407, 1389, 1282, 1223, 1187, 1126, 1109, 979, 943, 827, 770.
LCMS (ESI) *m/z* [M-Cl]⁺ 176.
Mp. 202–204 °C.

4-(hydroxymethyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (4c)-

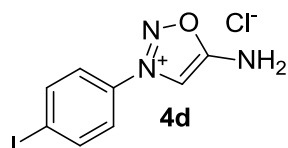


C₉H₁₀ClN₃O₂
MW: 227 g.mol⁻¹
Yield: 79%
Beige powder

2c (800 mg, 4.93 mmol) was solubilized in 3 mL of THF and isopentyl nitrite added. The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 hours. HCl in dioxane (4M, 17.7 mL, 70.9 mmol) was added to the reaction mixture. The reaction was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with 50 mL of Et₂O, stirred 10 min and filtered. The solid was washed several times with Et₂O and finally dried under vacuum to give the desired product as a beige solid (887 mg, 79%).
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.95 (br.s, 2H), 8.63 (s, 1H), 8.01 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 4.64 (s, 2H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.4, 148.9, 131.2, 127.7 (2C), 122.3 (2C), 102.0, 61.9.
IR (cm⁻¹): 3200, 1677, 1452, 982.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_9H_{10}N_3O_2$ $[M-Cl]^+$: 192.0768; found: 192.0768.
Mp. 210 °C –decomp.

5-amino-3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (4d)



$C_8H_7IClN_3O$
MW: 323 g.mol⁻¹
Yield: 90%
Beige powder

To a solution of **2e** (30 g, 0.116 mol) in dry THF (50 mL), *tert*-butyl nitrite (42 mL, 0.35 mol) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 1 hour. After full conversion, the solvent was evaporated under reduce pressure. The residue was used without further purification. A solution of crude **3e** (0.116 mol) in HCl 4M in dioxane (freshly opened bottle) (125 mL) was stirred overnight at room temperature under argon. Et₂O was added and the precipitate was collected by filtration, washed with Et₂O to afford the product as a beige powder (32 g, 85%).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.96 (s, 2H), 8.67 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8.8 Hz, 2H).

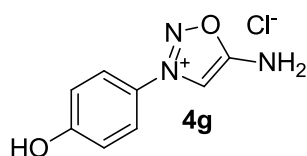
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.4, 139.1 (2C), 132.4, 124.4 (2C), 102.4, 101.6.

IR (cm⁻¹) 1675, 829.

LCMS (ESI) m/z $[M-Cl]^+$ 288.

Mp. 209 °C.

5-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride (4g)



$C_8H_8ClN_3O_2$
MW: 214 g.mol⁻¹
Yield: 40%
Beige powder

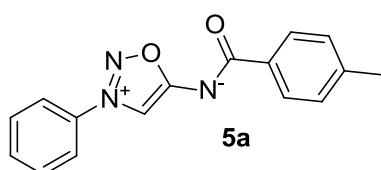
To a stirring solution of 4-aminophenol (3.27 g, 30 mmol), formaldehyde (4.5 mL, 60 mmol), and KCN (3.91 g, 60 mmol) in H₂O, was added AcOH (40 mL) containing 10 drops of 1M HCl. The mixture was stirred at 60 °C for 3 hours before being cooled to room temperature. HCl (2M, 40 mL) was added. The mixture was cooled to 0 °C. NaNO₂ (2.07 g, 30 mmol) was added dropwise in 30 mL of H₂O. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 hour. The mixture was extracted with 3x50 mL of Et₂O. The organic layers were washed with brine and dried over Na₂SO₄. 20 mL of HCl 4M in dioxane was added to the mixture. The desired product was filtered (2.56 g, 40%) and used without any further purification.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.05 (br.s, 1H), 9.83 (br.s, 2H), 8.50 (s, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.11 (m, 2H).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.1, 162.1, 124.1 (2C), 124.0, 116.6 (2C), 101.0.

LCMS (ESI) m/z $[M-Cl]^+$ 178.

(4-methylbenzoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5a)



$C_{16}H_{13}N_3O_2$
MW: 279 g.mol⁻¹
Yield: 22%
Beige powder

To a solution of **4a** (98.8 mg, 0.5 mmol) in a mixture of DCM/MeCN (4/1, 5 mL) was added successively *p*-tolyl acid (64.4 mg, 0.5 mmol), EDCI (153.4 mg, 0.8 mmol) and DMAP (12.2 mg, 0.1 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with brine and

extracted with DCM. The combined organic layers were washed with a solution of Na₂CO₃, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 95/5). The product was obtained as a beige powder (31 mg, 22%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.88–7.83 (m, 2H), 7.75–7.64 (m, 3H), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H).

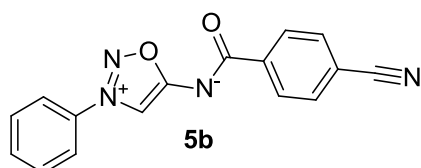
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 174.5, 142.2, 134.4, 134.1, 133.3, 130.7 (2C), 129.7 (2C), 128.9 (2C), 121.7 (2C), 104.5, 21.7.

IR (cm⁻¹) 2922, 1626, 1545, 1471, 1357, 1295, 1315, 1168, 1097, 1021, 965, 861, 759, 725, 687, 677.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₄N₃O₂ [M+H]⁺: 280.1080; found: 280.1081.

Mp. 155–159 °C.

(4-cyanobenzoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5b)



C₁₆H₁₀N₄O₂
MW: 290 g.mol⁻¹
Yield: 57%
Yellow solid

To a solution of compound **4a** (98.8 mg, 0.50 mmol) in a mixture of DCM and MeCN 4/1 (5 mL) was added successively 4-cyanobenzoic acid (73.6 mg, 0.50 mmol), EDCI (153 mg, 0.80 mmol) and DMAP (12.2 mg, 0.10 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with brine and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with a solution of Na₂CO₃, dried over MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc 85/15) to give the desired product as a yellow solid (83.5 mg, 57%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.62 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.87–7.85 (m, 2H), 7.77–7.66 (m, 5H).

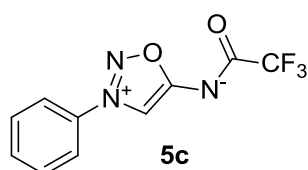
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.8, 172.5, 141.1, 133.9, 133.5, 132.0 (2C), 130.8 (2C), 130.0 (2C), 121.7 (2C), 118.9, 114.8, 104.9.

IR (cm⁻¹) 3202, 3067, 2226, 1625, 1567, 1538, 1470, 1404, 1357, 1317, 1298, 1221, 1168, 1099, 1022, 1019, 970, 863, 765, 747, 689.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₁N₄O₂ [M+H]⁺: 291.0876; found: 291.0876.

Mp. 213–215 °C.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(2,2,2-trifluoroacetyl)amide (5c)



C₁₀H₆F₃N₃O₂
MW: 257 g.mol⁻¹
Yield: 40%
Beige solid

To a solution of compound **4a** (98.8 mg, 0.50 mmol) in a mixture of DCM and MeCN 3/1 (10 mL) was added successively TFA (46 μL, 0.60 mmol), EDCI (134 mg, 0.70 mmol) and DMAP (12.2 mg, 0.10 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with brine and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with a solution of Na₂CO₃, dried over MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography in (SiO₂, heptane/ethyl acetate) to give the desired product as a beige solid (51 mg, 40%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.89 (m, 2H), 7.75 (m, 1H), 7.68 (m, 2H).

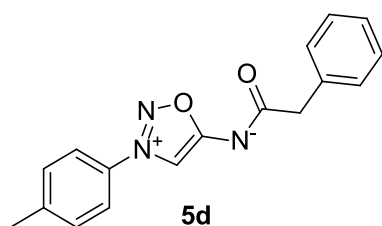
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.0, 164.6 (q, *J* = 36.6 Hz), 134.0, 133.5, 131.0 (2C), 121.9 (2C), 117.1 (q, *J* = 285.1 Hz), 106.5.

IR (cm⁻¹) 3145, 1645, 1547, 1469, 1356, 1195, 1131, 981, 871, 762, 718.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₀H₇F₃N₃O₂ [M+H]⁺: 258.0485; found: 258.0484.

Mp. 130–131 °C.

(2-phenylacetyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5d)



C₁₇H₁₅N₃O₂
MW: 293 g.mol⁻¹
Yield: 49%
Light yellow solid

Phenylacetic acid (0.12 mL, 0.95 mmol), EDCI (235 mg, 1.23 mmol) and DMAP (23.1 mg, 0.189 mmol) were added to a solution of **4b** (200 mg, 0.95 mmol) in DCM (8 mL) and MeCN (2 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was quenched with brine (3*10 mL) and extracted with DCM. The combined organic phases were washed with Na₂CO₃ (15 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 20/80). The desired product was obtained as a light yellow solid (136 mg, 49%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.32 (s, 1H), 7.58 (m, 2H), 7.31–7.37 (m, 4H), 7.25 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 2.42 (s, 3H).

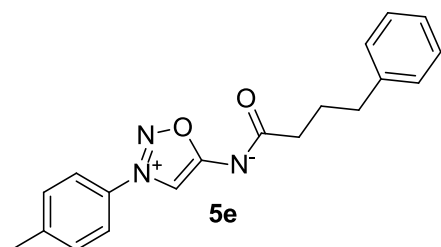
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 180.7, 173.9, 144.2, 136.8, 131.4, 131.1 (2C), 129.5 (2C), 128.3 (2C), 126.4, 121.2 (2C), 104.3, 47.1, 21.5.

IR (cm⁻¹): 1621, 1539, 1353, 1309, 976, 709.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₆N₃O₂ [M+H]⁺: 294.1237; found: 294.1237.

Mp. 145–146 °C

(4-phenylbutanoyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5e)



C₁₉H₁₉N₃O₂
MW: 321 g.mol⁻¹
Yield: 76%
Brownish paste

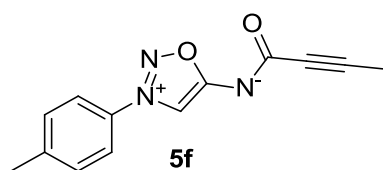
4-phenylbutyric acid (372 mg, 2.27 mmol), EDCI (470 mg, 2.46 mmol) and DMAP (46.2 mg, 0.378 mmol) were added to a solution of **4b** (400 mg, 1.89 mmol) in DCM (16 mL) and MeCN (4 mL). The mixture was stirred at room temperature for 15 hours. The mixture was quenched with brine (3*10 mL) and extracted with DCM. The combined organic phases were washed with Na₂CO₃ (15 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 100/0 to 85/15) to afford the desired product as a brownish pasty solid (462 mg, 76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.17–7.30 (m, 5H), 2.72 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 2.50 (s, 3H), 2.05 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 183.1, 173.8, 144.3, 142.5, 131.7, 131.2 (2C), 128.7 (2C), 128.4 (2C), 125.8, 121.5 (2C), 104.3, 39.9, 35.8, 27.8, 21.7.

IR (cm⁻¹): 1688, 1619, 1546, 1350, 1175, 965, 819, 747, 699.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₂₀N₃O₂ [M+H]⁺: 322.1550; found: 322.1550.

but-2-ynoyl(3-(p-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5f)

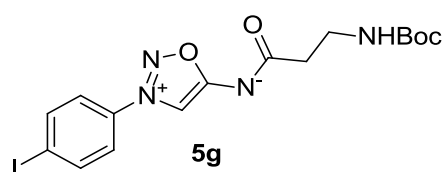
$C_{13}H_{11}N_3O_2$
MW: 241 g.mol⁻¹
Yield: 41%
Pale yellow solid

2-butynoic acid (47 mg, 0.56 mmol), EDCI (99 mg, 0.64 mmol) and DMAP (12 mg, 0.094 mmol) were added to a suspension of **4b** (100 mg, 0.47 mmol) in DCM/MeCN. The mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The mixture was quenched with NH₄Cl (15 mL) then extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in 1 mL of DCM with a drop of MeOH, then an excess of cyclohexane was added. The pale yellow precipitate formed was collected by filtration to give the desired product (47 mg, 41%).
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.38 (s, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.43 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.5, 161.2, 144.6, 131.5, 131.3 (2C), 121.5 (2C), 105.4, 83.2, 79.7, 21.7, 4.3.

IR (cm⁻¹): 1604, 1592, 1543, 1351, 1313, 1197, 974, 846, 772.

LCMS (ESI) m/z : [M+H]⁺ 242.

Mp. 205 °C –decomp.

(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)propanoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (5g)

$C_{16}H_{19}IN_4O_4$
MW: 458 g.mol⁻¹
Yield: 89%
Pale yellow solid

To a heterogeneous solution of **4d** (100 mg, 0.31 mmol) in DMF (3 mL) were added HATU (152 mg, 0.40 mmol) and Boc-Ala-OH (76 mg, 0.40 mmol). The mixture was stirred under argon for 10 minutes. DIPEA (161 μL, 0.93 mmol) was added over 5 minutes. The reaction was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with a saturated solution of NH₄Cl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO₃. The combine organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 96/4) to afford 126 mg (0.28 mmol, 89%) of the desired product as a pale yellow solid.

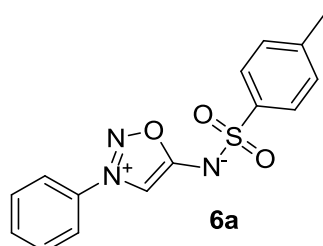
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.37 (s, 1H), 7.98 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 5.30 (br.s, 1H), 3.41 (m, 2H), 2.65 (m, 2H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 181.4, 173.7, 156.0, 139.9 (2C), 133.4, 122.9 (2C), 104.3, 99.9, 78.9, 40.0, 37.0, 28.5 (3C).

IR (cm⁻¹): 3283, 2976, 1691, 1599, 1632, 1515, 1430, 1365, 1274, 1220, 1007, 959.

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₆H₂₀IN₄O₄ [M+H]⁺: 459.0524; found: 459.0526.

Mp. 127 °C.

3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tosyl)amide (6a)

$C_{15}H_{13}N_3O_3S$
MW: 315 g.mol⁻¹
Yield: 43%
White solid

To a solution of **4a** (39.5 mg, 0.20 mmol) in anhydrous pyridine (180 μ L) at 0 °C was added tosyl chloride (41.9 mg, 0.22 mmol) portion wise. The mixture was stirred at room temperature overnight. Afterward, H₂O was added and the mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified through flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to afford 21 mg (0.067 mmol, 43% yield) of analytically pure white solid.

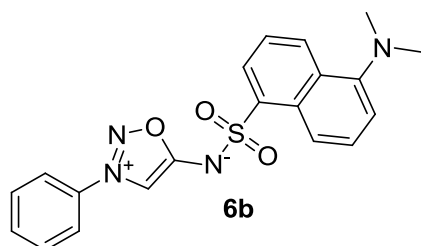
¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 170.5, 142.9, 139.8, 133.7, 133.6, 130.8 (2C), 129.6 (2C), 126.5 (2C), 121.8 (2C), 100.9, 21.7.

IR (cm⁻¹) 1584, 1472, 1284, 1144, 1090, 905, 733, 667, 580, 551.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 316.

Mp. 185–186 °C.

((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (6b)

$C_{20}H_{18}N_4O_3S$
MW: 394 g.mol⁻¹
Yield: 28%
White solid

To a solution of **4a** (198 mg, 1.0 mmol) in DMF (2 mL) at -20 °C was added dansyl chloride (297 mg, 0.22 mmol). DIPEA (262 μ L; 1.5 mmol) was added for 30 minutes at -20 °C. The mixture was stirred while warming up to room temperature for 1 hour. Afterward, NH₄Cl was added and the mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The resulting material was purified through flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to afford 110 mg (0.28 mmol, 28% yield) of analytically pure white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.56 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 7.2 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.55 (dd, J = 8.6 Hz, 7.9 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.6 Hz, 7.2 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 2.84 (s, 6H).

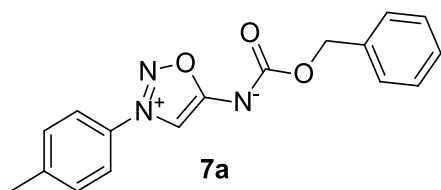
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 151.5, 137.9, 133.7, 133.5, 130.8 (2C), 130.2, 130.1, 129.8, 128.1, 127.3, 123.2, 121.8 (2C), 121.1, 115.3, 101.0, 45.7 (2C).

IR (cm⁻¹): 3136, 2943, 1603, 1584, 1471, 1363, 1296, 1135, 904, 791, 728, 677, 630, 586, 571.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 395.

Mp. 202–203 °C.

((benzyloxy)carbonyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (7a)



$C_{17}H_{15}N_3O_3$
MW: 309 g.mol⁻¹
Yield: 74%
Light yellow solid

NEt₃ (0.76 mL, 5.4 mmol) was added to a stirring solution of **4b** (0.50 g, 2.4 mmol) and benzyl chloroformate (0.51 mL, 3.5 mmol) at -20 °C. The solution was slowly allowed to warm at room temperature and stirred overnight. The mixture was diluted with DCM and washed with brine (50 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography: (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, from 80/20 to 50/50) to afford the desired product as a light yellow solid (539 mg, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (s, 1H), 7.57 (m, 2H), 7.33 (m, 4H), 7.24 (m, 2H), 7.18 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 2.39 (s, 3H).

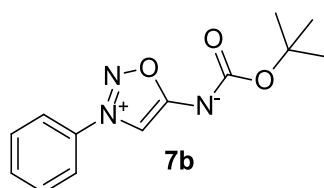
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 175.4, 161.7, 144.3, 137.3, 131.6, 131.2 (2C), 128.5 (2C), 127.9 (2C), 127.8, 121.4 (2C), 102.8, 67.4, 21.6.

IR (cm⁻¹): 1658, 1582, 1377, 1273, 1196, 1052, 820.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺: 310.1186; found: 310.1186.

Mp. 125 °C.

(*tert*-butoxycarbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (7b)



$C_{13}H_{15}N_3O_3$
MW: 261 g.mol⁻¹
Yield: 61%
Orange solid

To a stirred solution of **4a** (2.29 g, 11.6 mmol), NaHCO₃ (1.46 g, 17.4 mmol) and DMAP (142 mg, 1.16 mmol) in THF (97 mL) at room temperature was added portionwise Boc₂O (4.0 mL, 17.4 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 days. The reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl. The aqueous layer was extracted with EtOAc, and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was then purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc from 85/15 to 60/40). The title compound was obtained as an orange solid (1.84 g, 61%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 7.81–7.77 (m, 2H), 7.72–7.62 (m, 3H), 1.52 (s, 9H).

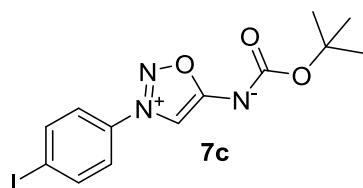
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.8, 161.0, 134.0, 133.1, 130.6 (2C), 121.6 (2C), 102.6, 79.1, 28.4 (3C).

IR (cm⁻¹) 3193, 2976, 1754, 1662, 1591, 1472, 1364, 1292, 1255, 1217, 1159, 1049, 1007, 964.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₃H₁₆N₃O₃ [M+H]⁺: 262.1186; found: 262.1186.

Mp. 127–128 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (7c)



C₁₃H₁₄IN₃O₃
MW: 387 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Brown solid

To a solution of **4e** (1.32 g, 4.08 mmol), NaHCO₃ (514 mg, 6.12 mmol) and DMAP (50 mg, 0.41 mmol) in THF (30 mL) was added dropwise Boc₂O (1.33 g, 6.12 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 48 hours. The mixture was quenched with NH₄Cl (35 mL) and extracted with EtOAc (3*30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified through flash chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc from 100/0 to 80/20) to afford 1.36 g (3.51 mmol, 86%) of analytically pure compound.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 8.7, 2H) 1.51 (s, 9H).

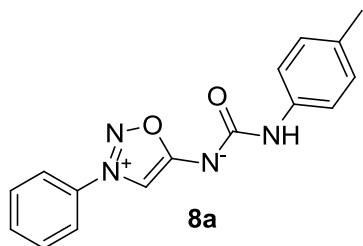
¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 174.3, 160.2, 139.7 (2C), 133.3, 122.7 (2C), 102.3, 99.48, 79.4, 28.1 (3C).

IR (cm⁻¹) 3170, 3092, 2973, 1783, 1752, 1660, 1596, 1580, 1488, 1364, 1291, 1048, 1005, 964, 826, 728.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 388.

Mp. 134–136 °C.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(*p*-tolylcarbamoyl)amide (8a)



C₁₆H₁₄N₄O₂
MW: 294 g.mol⁻¹
Yield: 35%
Orange solid

To a solution of compound **4a** (98.8 mg, 0.50 mmol) and *p*-tolyl isocyanate (79.9 mg, 0.60 mmol) in THF (1 mL) was added a solution of NaHCO₃ (63.0 mg, 0.75 mmol) in H₂O (1 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. EtOAc and H₂O were added and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography in (SiO₂, heptane/EtOAc 7/3) to give the desired product as an orange solid (52 mg, 35%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (s, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.74–7.64 (m, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H).

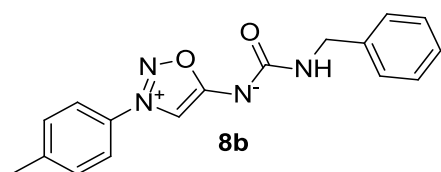
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 158.5, 136.2, 133.4, 132.3, 131.6, 129.9 (2C), 128.9 (2C), 120.9 (2C), 118.2 (2C), 101.7, 20.2.

IR (cm⁻¹) 3278, 3187, 3029, 2921, 1731, 1642, 1584, 1511, 1469, 1360, 1310, 1292, 1238, 1193, 1085, 1018, 956, 908, 818, 761, 728, 685, 675.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺: 295.1189; found: 295.1190.

Mp. 155–157 °C.

(benzylcarbamoyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8b)



$C_{17}H_{16}N_4O_2$
MW: 308 g.mol⁻¹
Yield: 56%
Yellow solid

To a solution of compound **4b** (500 mg, 2.36 mmol) and benzyl isocyanate (0.353 mL, 2.83 mmol) in THF (5 mL), was added a solution of NaHCO₃ (297 mg, 3.54 mmol) in H₂O (5 mL). The reaction was stirred overnight at room temperature. Then, MgSO₄ (10 g) was added to the reaction mixture and subsequently was filtered with EtOAc (50 mL) and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified through flash chromatography (SiO₂, DCM 100%) to give the desired product in 56% yield (405 mg, 1.36 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.31 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29-7.24 (m, 4H), 7.20-7.17 (m, 1H), 4.24 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H).

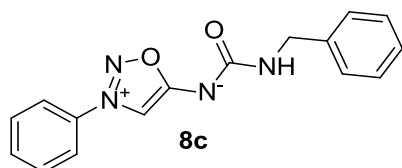
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.4, 161.3, 143.3, 141.3, 131.9, 130.9 (2C), 128.5 (2C), 127.4 (2C), 126.7, 122.2 (2C), 102.4, 43.6, 21.2.

IR (cm⁻¹): 1636, 1609, 1552, 1432, 1278, 1225, 1201, 963, 814, 751, 705, 676, 502.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺: 309.1346; found: 309.1347.

Mp. 196–198 °C.

(benzylcarbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8c)



$C_{16}H_{14}N_4O_2$
MW: 294 g.mol⁻¹
Yield: 74%
Yellow powder

To a solution of compound **4a** (98.8 mg, 0.50 mmol) and benzyl isocyanate (79.9 mg, 0.60 mmol) in THF (1 mL) was added a solution of NaHCO₃ (63.0 mg, 0.75 mmol) in H₂O (1 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. EtOAc and H₂O were added and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 70/30) to give the desired product as a yellow powder (110 mg, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 7.79–7.77 (m, 2H), 7.71–7.61 (m, 3H), 7.35–7.29 (m, 4H), 7.25–7.21 (m, 1H), 5.94 (br. t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H).

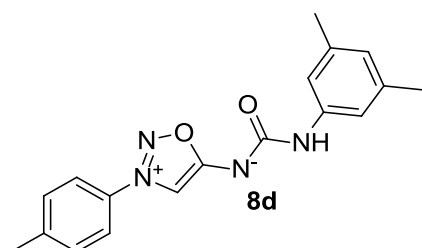
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.0, 161.8, 139.6, 134.2, 132.9, 130.5 (2C), 128.6 (2C), 127.4 (2C), 127.1, 121.6 (2C), 102.2, 44.7.

IR (cm⁻¹) 3261, 3190, 3061, 2922, 1728, 1630, 1594, 1537, 1495, 1470, 1454, 1362, 1281, 1219, 1082, 1028, 957, 932, 763, 719, 698.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₅N₄O₂ [M+H]⁺: 295.1189; found: 295.1190.

Mp. 158–160 °C.

((3,5-dimethylphenyl)carbamoyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8d)



$C_{18}H_{18}N_4O_2$
MW: 322 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Yellow solid

To a solution of **4b** (370 mg, 1.40 mmol) and 1-isocyanato-3,5-dimethylbenzene (249 mg, 1.68 mmol) in THF (5 mL), was added a solution of NaHCO₃ (176 mg, 2.10 mmol) in H₂O (5 mL). The mixture was stirred overnight. The mixture was partitioned between brine (20 mL) and DCM. The aqueous phase was extracted with DCM (15 mL *3). The organic phase was dried over MgSO₄, filtered and the solvent removed under *vacuum*. The material was purified by column chromatography (SiO₂, DCM) to afford the desired product as a yellow solid (386 mg, 86%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.30 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.30 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.19 (s, 6H).

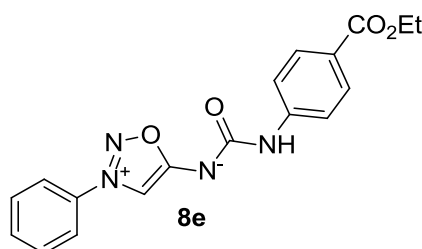
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.4, 158.7, 143.1, 140.9, 137.2 (2C), 131.5, 130.6 (2C), 122.9, 121.9 (2C), 115.7 (2C), 102.7, 21.3 (2C), 20.9.

IR (cm⁻¹) 1642, 1592, 1536, 1421, 1280, 1201, 965.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₉N₄O₂ [M+H]⁺: 323.1503; found: 323.1502.

Mp. 160 °C.

((4-(ethoxycarbonyl)phenyl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8e)



$C_{18}H_{16}N_4O_4$
MW: 352 g.mol⁻¹
Yield: 80%
Yellow solid

To a solution of **4a** (70 mg, 0.35 mmol) and ethyl 4-isocyanatobenzoate (67 mg, 0.35 mmol) in THF (3.5 mL), was added a solution of NaHCO₃ (29.8 mg, 0.35 mmol) in H₂O (0.5 mL). The reaction was stirred overnight at room temperature. Then, MgSO₄ was added to the reaction mixture and subsequently was filtered with EtOAc (50 mL) and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified through flash chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 50/50) to give the desired urea in 80% yield.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.82 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.7 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.74-7.69 (m, 3H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

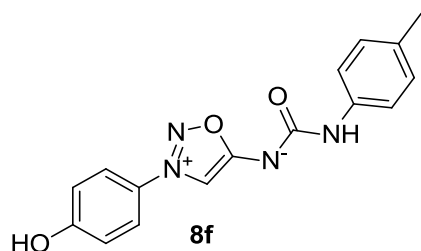
¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 173.1, 165.9, 159.1, 146.0, 134.2, 133.2, 130.6 (2C), 130.5 (2C), 122.7 (2C), 122.5, 117.5 (2C), 103.9, 60.5, 14.7.

IR (cm⁻¹): 1707, 1650, 1576, 1515, 1503, 1470, 1265, 1234, 1172, 1102, 765, 681.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₇N₄O₄ [M+H]⁺: 353.1244; found: 353.1246.

Mp. 170–172 °C.

(3-(4-hydroxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (8f)



$C_{16}H_{14}N_4O_3$
MW: 310 g.mol⁻¹
Yield: 38%
Yellow solid

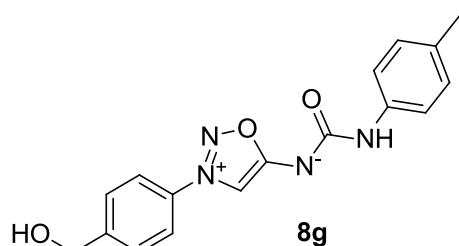
4d (75 mg, 0.35 mmol), *p*-tolyl isocyanate (44 μ L, 0.35 mmol) were dissolved in THF (3.5 mL). NaHCO₃ (29 mg, 0.35 mmol) in H₂O (0.4 mL) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. Then, MgSO₄ was added to the reaction mixture and subsequently was filtered with EtOAc (50 mL) and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash chromatography. To obtain the desired product as a yellow solid (18%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.29 (br.s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.53 (m, 2H), 7.01 (m, 4H), 2.22 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.2, 161.1, 158.7, 138.5, 129.8, 128.8 (2C), 125.3, 123.7 (2C), 117.9 (2C), 116.4 (2C), 102.1, 20.4.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 311.

(3-(4-(hydroxymethyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (8g)



$C_{17}H_{16}N_4O_3$
MW: 324 g.mol⁻¹
Yield: 64%
Yellow solid

To a solution of **4c** (150 mg, 0.66 mmol) and *p*-tolyl isocyanate (99.7 μ L, 0.79 mmol) in DMF (6.5 mL) was added at -20 °C, with a really slow dropwise, NEt₃ (138 μ L, 0.99 mmol) during 45 min. The mixture was stirred for an additional 45 min. DMF was evaporated. The residue was suspended in DCM and washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. The product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 0/100 to 2/98) to afford the product as a yellow powder (137 mg, 64%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): δ 8.32 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 4.75 (s, 2H), 2.29 (s, 3H).

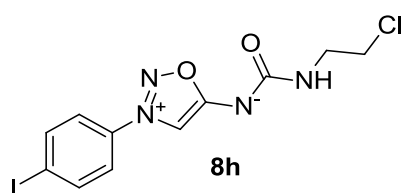
¹³C NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): δ 174.7, 161.5, 149.0, 138.6, 134.4, 133.5, 130.3 (2C), 129.4 (2C), 123.2 (2C), 120.7 (2C), 104.2, 64.1, 21.0.

IR (cm⁻¹): 3300, 1732, 1643, 1587, 1514, 1443, 1403, 1359, 1314, 1296, 1241, 1197, 965, 818, 728.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₇N₄O₃ [M+H]⁺: 325.1295, found: 325.1295.

Mp. 164–166 °C.

((2-chloroethyl)carbamoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8h)



$C_{11}H_{10}ClIN_4O_2$
MW: 391 g.mol⁻¹
Yield: 45%
Yellow solid

To a suspension of **4d** and NaHCO₃ in DMF (3 mL) was added the 1-chloro-2-isocyanatoethane (14.3 μL, 0.17 mmol). The reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature. The yellow heterogeneous mixture was quenched with NH₄Cl (15 mL) then extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified through flash chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, from 80/20 to 40/60) to give the desired urea in 45% yield.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.13 (s, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.83 (br.s, 1H), 6.64–6.61 (m, 4H).

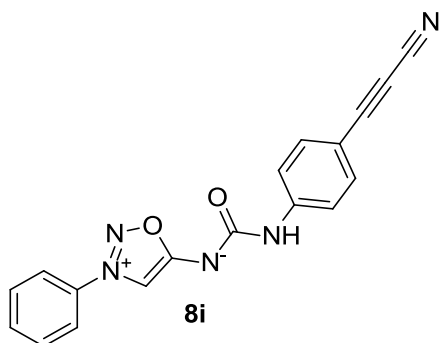
¹³C NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 172.8, 161.1, 139.8 (2C), 133.5, 122.8 (2C), 102.0, 99.4, 44.1, 42.4.

IR (cm⁻¹): 3411, 3246, 3120, 3050, 2921, 1732, 1626, 1597, 1543, 1483, 1423, 1354, 1313, 1277, 1225, 1190, 1024, 1007, 959, 937, 814, 743, 720.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₁H₁₁ClIN₄O₂ [M+H]⁺: 392.9610; found: 392.9609.

Mp. >310 °C.

((4-(cyanoethyl)phenyl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8i)



$C_{18}H_{11}N_5O_2$
MW: 329 g.mol⁻¹
Yield: 74%
Yellow solid

To an heterogeneous solution of triphosgene (59.5 mg, 0.167 mmol), and 3-(4-aminophenyl) prop-2-ynenitrile (72 mg, 0.51 mmol) in DCM (2 mL) was added, dropwise at 0 °C, an aqueous solution of NaHCO₃ (127 mg, 1.52 mmol) in H₂O (1.5 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min, then **4a** (100 mg, 0.506 mmol) was added. After 5 hours, the yellow heterogeneous mixture was quenched with brine (40 mL) then extracted with DCM (60 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated in a mixture DCM/MeOH/Heptane and filtered to afford the desired product as a yellow solid (124 mg, 74%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9.97 (br.s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.07 (m, 2H), 7.67–7.80 (m, 7H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆): δ 172.8, 158.6, 145.2, 134.9 (2C), 133.8, 132.9, 130.3 (2C), 122.4 (2C), 117.7 (2C), 107.2, 105.9, 103.7, 85.3, 61.6.

IR (cm⁻¹) 3295, 2260, 1666, 1569, 1513, 1469, 1361, 1311, 1230, 1192, 964, 839, 764.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₂N₅O₂ [M+H]⁺: 330.0986; found: 330.0985.

Mp. 224 °C.

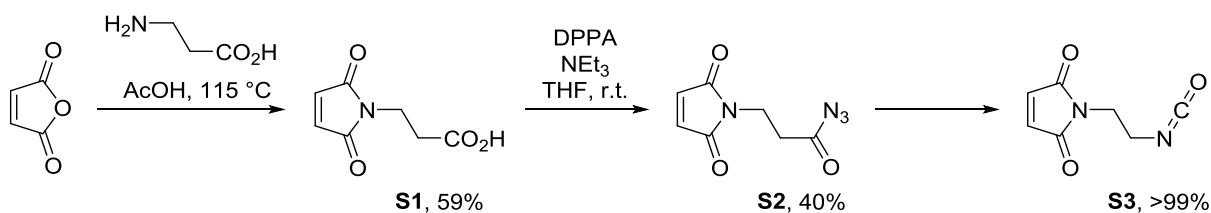
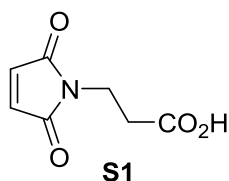


Figure S258 : Synthesis of intermediate **S3**.

3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoic acid (**S1**)

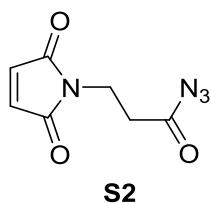


$C_7H_7NO_4$
MW: 169 $g \cdot mol^{-1}$
Yield: 59%
White solid

A solution of maleic anhydride (5.50 g, 56.1 mmol) in acetic acid (70 mL) was added dropwise to a solution of β -alanine (5.00 g, 56.1 mmol) in acetic acid (25 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 3 hours. 50 mL of acetic acid were added to the white suspension and the mixture was heated up to 115 °C and stirred at this temperature overnight. After cooling down to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and co-evaporated three times with toluene. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/EtOAc, 90/10) to obtain the desired product as a white solid (5.6 g, 59%). The spectral data (1H -NMR) was consistent with reported one.²⁹⁹

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 12.40 (br.s, 1H), 7.02 (s, 2H) 3.61 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.50 (m, 2H).

3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoyl azide (**S2**)



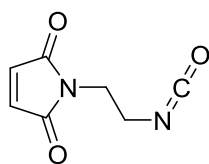
$C_7H_6N_4O_3$
MW: 194 $g \cdot mol^{-1}$
Yield: 40%
White solid

Compound **S2** was obtained following a reported procedure.³⁰⁰ A solution of **S1** (500 mg, 2.95 mmol), NEt_3 (823 μL , 5.90 mmol) and diphenylphosphoryl azide (667 μL , 3.10 mmol) in THF (10 mL) was stirred at room temperature for 1.5 h. The solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to obtain the desired product as a white solid (233 mg, 40%).

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.69 (s, 2H), 3.80 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H).

²⁹⁹ A. J. Sinclair, V. del Amo, D. Philp, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3308–3318.

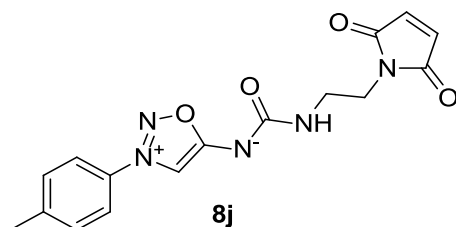
³⁰⁰ PCT/EP2003/008483

1-(2-isocyanatoethyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (S3)**S3**C₇H₆N₂O₃**MW:** 166 g.mol⁻¹**Yield:** Quantitative

Light brown solid

Compound **S3** was obtained following a reported procedure.³⁰⁰ A solution of **S2** (230 mg, 1.18 mmol), in toluene (5 mL) was refluxed for 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure to afford the desired product as a light brown solid (196 mg, 100%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.74 (s, 2H), 3.72 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.53 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H).

((2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)ethyl)carbamoyl)(3-(*p*-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8j)**8j**C₁₆H₁₅N₅O₄**MW:** 341 g.mol⁻¹**Yield:** 91%

Pale yellow solid

To a suspension of **4b** and NaHCO₃ (30 mg, 0.35 mmol) in DCM/H₂O (2 mL/2 mL) was added **S3** (50 mg, 0.24 mmol). After 1.5 hour, the yellow mixture was quenched with brine (15 mL) then extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 0/100) to afford the desired product as a pale yellow solid (74 mg, 91%).

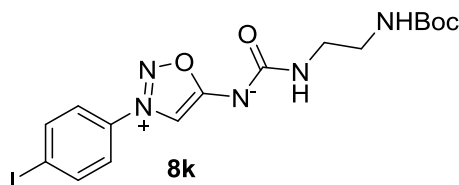
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.66 (s, 2H), 5.87 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H), 3.72 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.45 (m, 2H), 2.45 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.9, 171.0 (2C), 161.8, 143.8, 134.3 (2C), 131.8, 131.0 (2C), 121.4 (2C), 102.1, 39.2, 37.8, 21.6.

IR (cm⁻¹) 1705, 1632, 1538, 1290, 1221, 823, 696.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 342.

Mp. 273–274 °C.

((2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (8k)**8k**C₁₆H₂₀IN₅O₄**MW:** 473 g.mol⁻¹**Yield:** 70%

Yellow powder

To a mixture of triphosgene (837 mg, 2.82 mmol) and *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (1.37 g, 8.56 mmol) in DCM (60 mL) at 0 °C was slowly added a solution of NaHCO₃ (2.16 g, 25.7 mmol) in H₂O (60 mL). The mixture was stirred for 30 min at 0 °C before the addition of compound **4e** (2.77 g, 8.56 mmol). The mixture was stirred for 5 hours at room temperature. The reaction was quenched with brine and the DCM was evaporated under reduced pressure. The solid was filtered and washed

with water. The crude product was then purified by trituration in Et₂O to afford the desired product as a yellow solid (2.82 g, 70%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.37 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.78 (t, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.09–3.06 (m, 2H), 3.01–2.98 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.6, 161.2, 155.9, 139.3 (2C), 133.9, 124.3 (2C), 101.7, 100.2, 77.9, 28.6 (3C).

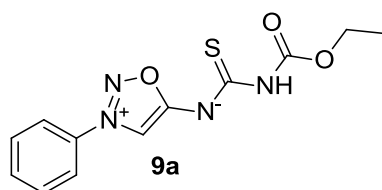
Two signals of the aliphatic chain hidden behind the solvent peak.

IR (cm⁻¹) 3283, 2976, 1691, 1599, 1632, 1515, 1430, 1365, 1274, 1220, 1007, 959.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₂₁N₅O₄ [M+H]⁺: 474.0633; found: 474.0632.

Mp. 182–184 °C.

((ethoxycarbonyl)carbamoithioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (9a)



C₁₂H₁₂N₄O₃S
MW: 292 g.mol⁻¹
Yield: 87%
Yellow solid

To a suspension of **4a** (39.5 mg, 0.20 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) under argon, was added ethoxycarbonyl isothiocyanate (26 μL, 0.22 mmol). The solution was stirred vigorously while NEt₃ (56 μL, 0.40 mmol) was added dropwise during 20 min at 0 °C. The solution was stirred for 3 hours while warming up to room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 1/1) to afford the desired product as a yellow solid (51 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.36 (s, 1H), 8.21 (br.s, 1H), 7.84 (m, 2H), 7.66–7.74 (m, 3H), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

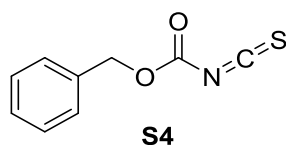
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 186.2, 175.1, 150.3, 133.9, 133.8, 130.94 (2C), 122.0 (2C), 104.8, 61.8, 14.6.

IR (cm⁻¹) 3441, 3192, 2987, 2927, 1759, 1579, 1490, 1470, 1412, 1361, 1196, 1137, 1033, 987, 763, 732, 674.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₂H₁₃N₄O₃S [M+H]⁺: 293.0703; found: 293.0702.

Mp. 185 °C - decomp.

O-benzyl carbonisothiocyanatidate (S4)



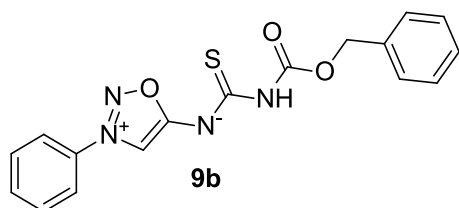
C₉H₇NO₂S
MW: 193 g.mol⁻¹
Yield: 43%
Colourless oil

Compound **S4** was obtained following a reported procedure.³⁰¹ Quinoline (45 μL, 0.033 mmol) and KOAc (52 mg, 0.046 mmol) were added to a solution of KSCN (3 g, 30.87 mmol) in H₂O (3 mL), and the resulting emulsion was cooled to 0 °C. Benzylchloroformate (1.63 mL, 11.49 mmol) was then added dropwise over the course of 30 min, and the resulting yellow emulsion was stirred at 5–10 °C for 4.5 h. The viscous, yellow emulsion was then partitioned between H₂O and CH₂Cl₂, and the organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/DCM, 17/3) to provide 961 mg (43%) of isothiocyanate **S4** as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (m, 5H), 5.20 (s, 2H).

³⁰¹ B. A. Lanman, L. E. Overman, R. Paulini, N. S. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12896–12900.

(((benzyloxy)carbonyl)carbamothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (9b)

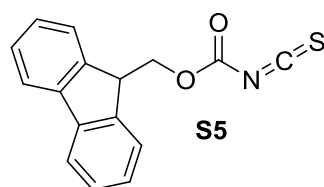


$C_{17}H_{14}N_4O_3S$
MW: 354 g.mol⁻¹
Yield: 91%
Yellow solid

To a suspension of **4a** (39.5 mg, 0.20 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) under argon, was added **S4** (46.4 mg, 0.24 mmol). The solution was stirred vigorously while NEt₃ (56 μL, 0.40 mmol) was added dropwise during 20 min at 0 °C. The solution was stirred for 3 hours while warming up to room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 7/3 to 1/1) to afford the desired product as a yellow solid (64 mg, 91%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.39 (s, 1H), 8.29 (br.s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.70–7.77 (m, 3H), 7.33–7.42 (m, 5H), 5.21 (s, 2H).

O-((9H-fluoren-9-yl)methyl) carbonisothiocyanatidate (S5)



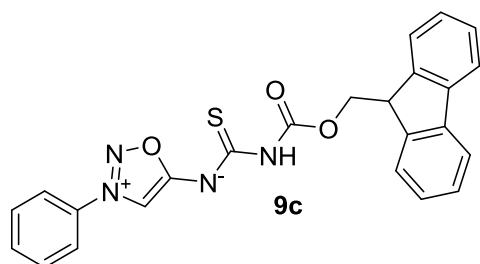
$C_{16}H_{11}NO_2S$
MW: 281 g.mol⁻¹
Yield: 75%
Off-white solid

Compound **S5** was obtained following a reported procedure.³⁰² Fluorenylmethylloxycarbonyl chloride (2.60 g, 10 mmol) was dissolved in 10 mL of anhydrous EtOAc. This solution was added dropwise to a suspension of dry potassium thiocyanate (1.07 g, 11 mmol) in 10 mL of anhydrous EtOAc at 0 °C under a nitrogen atmosphere. The solution was allowed to warm to room temperature over several hours, and the reaction was monitored by thin-layer chromatography. After the reaction with the Fmoc-chloride, the reaction mixture was passed through a Celite pad to remove residual salts, and the ethyl acetate was removed under reduced pressure. The crude product was purified via flash chromatography (SiO₂, DCM/Heptane, 2/3) to give 2.12 g of the Fmoc-isothiocyanate as an off-white solid (75% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 2H), 7.32 (ddd, *J* = 7.5, 7.5, 1.0 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 4.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H).

³⁰² P. C. Kearney, M. Fernandez, J. A. Flygare, *J. Or. Chem.* **1998**, *63*, 196–200

(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)carbamothioyl(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (9c)



$C_{24}H_{18}N_4O_3S$
MW: 442 g.mol⁻¹
Yield: 77%
Yellow solid

To a suspension of **4a** (333 mg, 1.69 mmol) in anhydrous DMF (8 mL) under argon, was added **S5** (522 mg, 1.86 mmol). The solution was stirred vigorously while diisopropylethylamine (440 μ L, 2.54 mmol) was added dropwise during 20 min at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. The solution was stirred for 3 h while warming up to room temperature. A solution of NH_4Cl was added to the reaction and the mixture was extracted with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, from 8/2 to 5/5) to afford the desired compound as a yellow solid (573 mg, 77%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9.0 (s, 1H), 8.21 (br.s, 1H), 7.37–7.43 (m, 4H), 7.32 (m, 1H), 7.24–7.28 (m, 4H), 7.02 (m, 2H), 6.94 (m, 2H), 4.09 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 185.8, 174.9, 150.3, 143.7 (2C), 141.3 (2C), 133.6, 130.8 (2C), 127.9 (2C), 127.3 (2C), 125.2 (2C), 121.8 (2C), 120.1 (2C), 104.8, 67.5, 46.9.

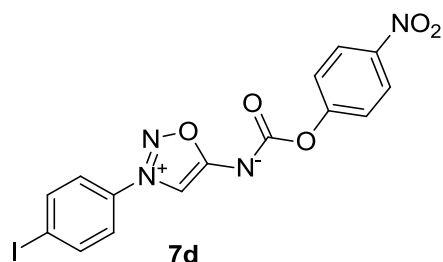
One carbon is missing.

IR (cm^{-1}) 1755, 1576, 1491, 1365, 1198, 1154, 760, 739.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{24}H_{19}N_4O_3S$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 443.1172; found: 443.1172.

Mp. 99–100 $^\circ\text{C}$.

(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4-nitrophenoxy)carbonyl)amide (7d)



$C_{15}H_9IN_4O_5$
MW: 452 g.mol⁻¹
Yield: 97%
White solid

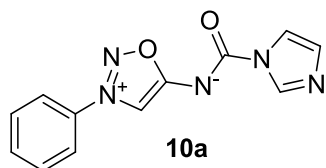
To a suspension of **4d** (100 mg, 0.309 mmol) in dry dichloromethane (1 mL), 4-nitrophenyl chloroformate (93 mg, 0.464 mmol) was added. The mixture was cooled at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ and triethylamine was added dropwise (71 μ L, 0.711 mmol). The solution was allowed to warm at room temperature and was stirred overnight. After addition of 10 mL of dichloromethane and 10 mL of water, the layers were separated. The organic layer was washed with water (3 x 10 mL), brine (3 x 10 mL) and was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under *vacuum* to afford the desired product as a white solid (136 mg, 97%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.96 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H).

^{13}C -NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 175.03, 157.51, 157.25, 143.98, 139.00 (2C), 133.17, 125.06 (2C), 124.25 (2C), 122.69 (2C), 105.46, 100.70.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 453.

(1H-imidazole-1-carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (10a)



$C_{12}H_9N_5O_2$
MW: 255 g.mol⁻¹
Yield: 78%
White solid

To a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (357 mg, 2.20 mmol) in a mixture DMF/MeCN (3 mL/1 mL) was added **4a** (395 mg, 2.00 mmol). The solution was stirred at room temperature for 1 hour before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, 98/2) to afford the desired product as a white solid (401 mg, 78%).
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.40 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 6.95 (s, 1H).

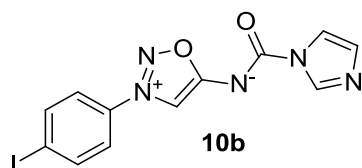
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.9, 154.6, 137.5, 133.5, 133.5, 130.6 (2C), 129.6, 121.5 (2C), 117.2, 104.4.

IR (cm⁻¹) 1660, 1567, 1466, 1291, 1206, 974, 846, 766.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 256.

Mp. 167–169 °C.

(1H-imidazole-1-carbonyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (10b)



$C_{12}H_8IN_5O_2$
MW: 381 g.mol⁻¹
Yield: 78%
Beige solid

To a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (1.78 g, 11.0 mmol) in a mixture DMF/MeCN (15 mL/5 mL) was added **4d** (3.24 g, 10.0 mmol). The solution was stirred at room temperature for 2 hours before being concentrated under reduced pressure. The resulting solid was washed with water and Et₂O to afford the desired product as a beige solid (2.97 g, 78%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.03 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.13(m, 2H), 7.91 (m, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.01 (s, 1H).

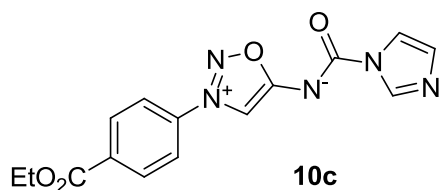
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 174.3, 153.1, 139.0 (2C), 136.8, 133.2, 129.4, 124.3 (2C), 117.3, 106.5, 100.8.

IR (cm⁻¹) 1671, 1570, 1374, 1296, 1008, 976.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 382.

Mp. 221–223°C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(1H-imidazole-1-carbonyl)amide (10c)



$C_{15}H_{13}N_5O_4$
MW: 327 g.mol⁻¹
Yield: 61%
Beige solid

Compound **10b** (1.40 g, 3.67 mmol) was dissolved in a mixture of absolute EtOH (15 mL) and NEt₃ (15 mL). PdCl₂(PPh₃)₂ (258 mg, 0.367 mmol) was added and the reaction mixture was kept under a CO atmosphere for 5 hours and heated at 80 °C. CO was added to the reaction every 30 min. The solvent was evaporated and the crude mixture was charged on a plug of silica. Impurities were removed by

first filtrating with DCM, and then the desired product was obtained by flushing the plug with EtOAc. After evaporation of this filtrate, the product was obtained as a beige solid (729 mg, 61%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.45 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.35 (m, 2H), 7.94 (m, 2H), 7.63 (m, 1H), 7.04 (s, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

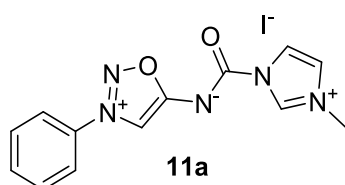
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.1, 164.3, 154.7, 137.6, 136.3, 135.3, 132.0 (2C), 129.8, 121.7 (2C), 117.3, 104.6, 62.2, 14.3.

IR (cm⁻¹) 1718, 1666, 1575, 1371, 1278, 846, 769.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 328.

Mp. 159–161 °C.

(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide (11a)



C₁₃H₁₂IN₅O₂
MW: 397 g.mol⁻¹
Yield: 98%
Orange solid

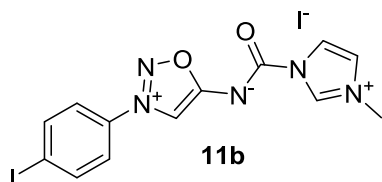
To a solution of **10a** (1.98 g, 7.64 mmol) in anhydrous acetonitrile (20 mL) was added MeI (1.90 mL, 30.6 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at room temperature before being concentrated under reduced pressure. The product was obtained as an orange solid (2.98 g, 98%) and was used without any purification.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.80 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.14 (m, 3H), 7.76–7.84 (m, 4H), 3.93 (s, 3H).
The product is not stable enough in DMSO to afford a ¹³C NMR spectrum.

LCMS (ESI) *m/z* [M-Me-I⁻]⁺ 188, fragmentation, [M+H]⁺ 220, reaction with MeOH used as solvent.

Mp. 145 °C–decomp.

(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonyl)amide iodide (11b)



C₁₃H₁₁I₂N₅O₂
MW: 523 g.mol⁻¹
Yield: 98%
Orange solid

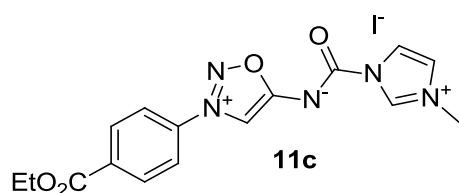
To a solution of **10b** (1.52 g, 4.00 mmol) in anhydrous acetonitrile (15 mL) was added MeI (996 μL, 16.0 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at 40 °C before being concentrated under reduced pressure. The product was obtained as an orange solid (2.05 g, 98%) and was used without any purification.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.79 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.16 (m, 2H), 8.13 (m, 1H), 7.94 (m, 2H) 7.80 (m, 1H), 3.93 (s, 3H).

The product is not stable enough in DMSO to afford a ¹³C NMR spectrum.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 346, reaction with MeOH used as solvent.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonyl)amide iodide (11c)



$C_{16}H_{16}IN_5O_4$
MW: 469 g.mol⁻¹
Yield: 91%
Orange solid

To a solution of **10c** (562 mg, 1.72 mmol) in anhydrous acetonitrile (15 mL) was added MeI (430 μ L, 6.87 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at 40 °C before being concentrated under reduced pressure. The product was obtained as an orange solid (736 mg, 91%) and was used without any purification.

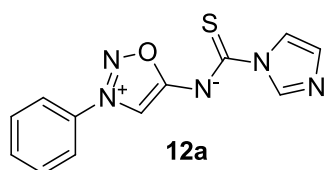
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.80 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 8.27–8.34 (m, 4H), 8.14 (m, 1H), 7.80 (m, 1H), 4.40 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

The product is not stable enough in DMSO to afford a ¹³C NMR spectrum.

LCMS (ESI) m/z [M-I]⁺ 342.

Mp. 165 °C–decomp.

(1H-imidazole-1-carbonothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (12a)



$C_{12}H_9N_5OS$
MW: 271 g.mol⁻¹
Yield: 81%
Orange solid

To a solution of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (1.96 g, 11.0 mmol) in anhydrous DCM (10 mL) was added **4d** (1.98 g, 10.0 mmol). The solution was stirred at room temperature overnight before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂ DCM/MeOH, 98/2) to afford the desired product as an orange solid (2.97 g, 78%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.50 (s, 1H), 8.63 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.78 (m, 1H), 7.71 (m, 2H), 6.98 (s, 1H).

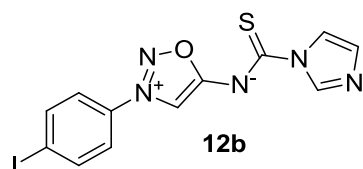
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.5, 174.6, 137.0, 134.0, 133.5, 130.9 (2C), 129.9, 121.8 (2C), 118.4, 105.3.

IR (cm⁻¹) 1577, 1461, 1376, 1265, 1222, 1023, 735, 657.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 272.

Mp. 167–169 °C.

(1H-imidazole-1-carbonothioyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (12b)



$C_{12}H_9N_5OS$
MW: 397 g.mol⁻¹
Yield: 65%
Dark yellow solid

To a solution of 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (196 mg, 1.10 mmol) in a mixture DMF/MeCN (1.5 mL/0.5 mL) was added **4d** (324 mg, 1.00 mmol). The solution was stirred at room temperature for 1.5 days before being concentrated under reduced pressure. The resulting solid was washed with water and Et₂O to afford the desired product as a dark yellow solid (257 mg, 65%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.82 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.15 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.93 (m, 2H), 7.01 (s, 1H).

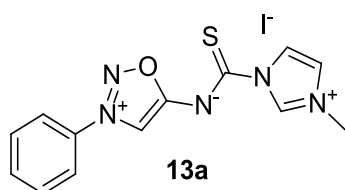
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.7, 139.0 (2C), 136.2, 133.1, 129.6, 124.7 (2C), 118.1, 107.7, 101.2.
One carbon is missing.

IR (cm⁻¹) 1597, 1574, 1462, 1412, 1373, 1230, 979.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 398.

Mp. 211–213 °C.

(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide (13a)



C₁₃H₁₂IN₅OS
MW: 413 g.mol⁻¹
Yield: 98%
Orange solid

To a solution of **12b** (2.20 g, 8.10 mmol) in anhydrous acetonitrile (20 mL) was added MeI (2.00 mL, 32.4 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at 40 °C before being concentrated under reduced pressure. The product was obtained as an orange solid (3.28 g, 98%) and was used without any purification.

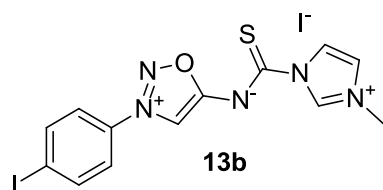
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.98 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.18 (m, 2H), 7.77–7.87 (m, 4H), 3.95 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 175.3, 173.0, 136.1, 133.7, 133.4, 130.4 (2C), 124.2, 123.1 (2C), 119.3, 109.2, 36.5.

LCMS (ESI) *m/z* [M-Me-Im-I]⁺ 204, fragmentation

Mp. 184–186 °C.

(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonothioyl)amide iodide (13b)



C₁₃H₁₁I₂N₅OS
MW: 539 g.mol⁻¹
Yield: 94%
Brown solid

To a solution of **12b** (257 mg, 0.65 mmol) in anhydrous acetonitrile (2 mL) was added MeI (161 μL, 2.60 mmol). The mixture was stirred for 16 hours at 40 °C before being concentrated under reduced pressure. The product was obtained as a brown solid (331 mg, 94%) and was used without any purification.

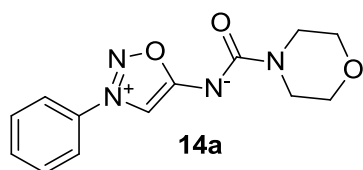
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.00 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 8.37 (m, 1H), 8.19 (m, 2H), 7.96 (m, 2H), 7.80 (m, 1H), 3.93 (s, 3H).

The product is not stable enough in DMSO to afford a ¹³C NMR spectrum.

LCMS (ESI) *m/z* [M-I]⁺ 412.

Mp. 208–209 °C.

(morpholine-4-carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14a)



$C_{13}H_{14}N_4O_3$
MW: 274 g.mol⁻¹
Yield: 95%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), morpholine (18 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 30/70 to 0/100) to afford the desired product as a yellow solid (52 mg, 95%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.59–7.68 (m, 3H), 3.79 (m, 2H), 3.66 (m, 4H), 3.60 (m, 2H).

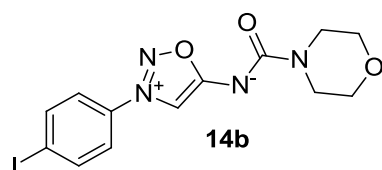
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.6, 160.8, 134.2, 132.9, 130.5 (2C), 121.5 (2C), 102.0, 67.1 (2C), 45.5, 43.2.

IR (cm⁻¹) 1612, 1415, 1254, 1204, 1110, 965, 766.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 275.

Mp. 168–170 °C.

(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(morpholine-4-carbonyl)amide (14b)



$C_{13}H_{13}IN_4O_3$
MW: 400 g.mol⁻¹
Yield: 75%
Dark yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11b** (105 mg), morpholine (18 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 50/50 to 10/90) to afford the desired product as a dark yellow solid (60 mg, 75%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.13 (s, 1H), 7.97 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 3.80 (m, 2H), 3.67 (m, 4H), 3.60 (m, 2H).

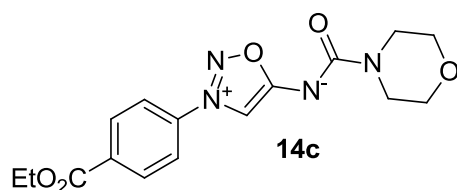
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.5, 160.7, 139.7 (2C), 133.7, 122.8 (2C), 101.8, 99.3, 67.1 (2C), 45.6, 43.2.

IR (cm⁻¹) 1626, 1567, 1275, 1110.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 401.

Mp. 210–212 °C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(morpholine-4-carbonyl)amide (14c)



$C_{16}H_{18}N_4O_5$
MW: 346 g.mol⁻¹
Yield: 79%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11c** (94 mg), morpholine (18 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 30/70 to 0/100) to afford the desired product as a yellow solid (55 mg, 79%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.29 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 4.41 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.79 (m, 2H), 3.66 (m, 4H), 3.59 (m, 2H), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

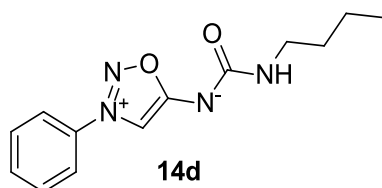
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 173.5, 164.5, 160.7, 137.0, 134.6, 131.7 (2C), 121.5 (2C), 102.1, 67.1 (2C), 62.1, 45.5, 43.2, 14.3.

IR (cm^{-1}) 1724, 1629, 1423, 1276, 1258, 1106, 987, 767.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 347.

Mp. 192–194 °C.

(butylcarbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14d)



$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$
MW: 260 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 85%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure A from **11a** (79 mg), *n*-butylamine (20 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, from 50/50 to 30/70) to afford the desired product as a yellow solid (44 mg, 85%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (s, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.59–7.77 (m, 3H), 5.58 (br.s, 1H), 3.25 (m, 2H), 1.51 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 0.91 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

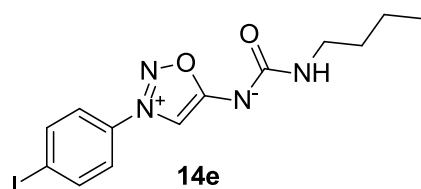
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.7, 161.6, 134.2, 132.8, 130.5 (2C), 121.6 (2C), 102.0, 40.3, 32.3, 20.2, 13.9.

IR (cm^{-1}) 3252, 3063, 2927, 1625, 1555, 1299, 965, 737.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 261.

Mp. 107–109 °C.

(butylcarbamoyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14e)



$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{IN}_4\text{O}_2$
MW: 386 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 80%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure A from **11b** (105 mg), *n*-butylamine (20 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (62 mg, 80%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 5.68 (br.s, 1H), 3.23 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.33 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

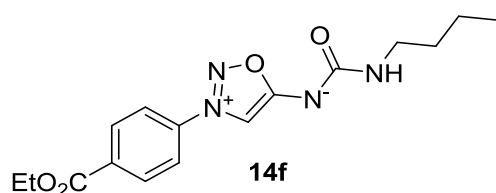
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 161.7, 139.7 (2C), 133.7, 122.8 (2C), 101.7, 99.1, 40.3, 32.2, 20.2, 13.9.

IR (cm^{-1}) 3277, 1629, 1279, 1216, 955.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.

Mp. 124–126 °C.

(butylcarbamoyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14f)



$C_{16}H_{20}N_4O_4$
MW: 332 g.mol⁻¹
Yield: 86%
Yellow paste

The product was obtained using general procedure **A** from **11c** (94 mg), *n*-butylamine (20 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, 50/50) to afford the desired product as a yellow paste (57 mg, 86%).

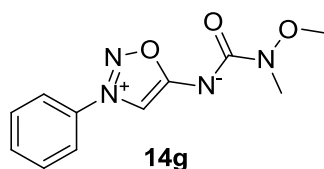
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (m, 2H), 8.24 (s, 1H), 7.86 (m, 2H), 5.71 (br.t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.24 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.36 (m, 2H), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 164.6, 161.5, 137.0, 134.6, 131.7 (2C), 121.6 (2C), 102.1, 62.1, 40.3, 32.2, 20.2, 14.3, 13.9.

IR (cm⁻¹) 3279, 1719, 1633, 1533, 1274, 1107, 954, 770.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 333.

(methoxy(methyl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14g)



$C_{11}H_{12}N_4O_3$
MW: 248 g.mol⁻¹
Yield: 78%
Orange oil

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), *N,O*-dimethylhydroxylamine.HCl (19 mg) and triethylamine (56 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a orange oil (39 mg, 78%).

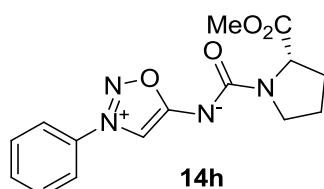
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.61–7.70 (m, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.30 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.9, 162.6, 134.1, 133.0, 130.6 (2C), 121.6 (2C), 102.4, 61.4, 35.5.

IR (cm⁻¹) 1628, 1583, 1358, 958, 765.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 249.

(S)-(2-(methoxycarbonyl)pyrrolidine-1-carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14h)



$C_{15}H_{16}N_4O_4$
MW: 316 g.mol⁻¹
Yield: 88%
Orange oil

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), L-proline methyl ester.HCl (33 mg) and triethylamine (56 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as an orange oil (56 mg, 88%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 {8.11} (s, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.56–7.67 (m, 3H), 4.43 {4.60} (dd, *J* = 8.5, 3.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.52–3.80 (m, 2H), 2.17–2.28 (m, 1H), 1.86–2.05 (m, 3H).

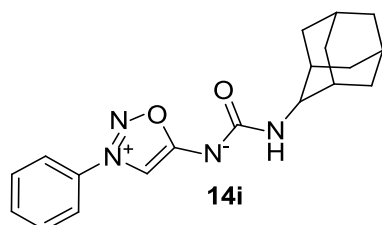
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.1 {174.6}, 173.1 {172.5}, 160.3 {160.3}, 134.1, 132.8 {132.8}, 130.4 (2C), 121.4 {121.5} (2C), 102.3 {102.1}, 58.9 {59.8}, 52.2 {52.1}, 47.5 {46.2}, 30.2 {30.8}, 24.7 {23.8}.

NMR spectra show the presence of 2 rotamers, minor rotamer signals are reported into brackets when they are distinguishable.

IR (cm⁻¹) 1740, 1623, 1395, 1199, 957.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 317.

((1*r*,3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-2-ylcarbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (14i)



C₁₉H₂₂N₄O₂
MW: 338 g.mol⁻¹
Yield: 93%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), 2-adamantylamine.HCl (38 mg) and triethylamine (56 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, 50/50) to afford the desired product as a yellow solid (93%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.58–7.67 (m, 3H), 5.87 (br.d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 1.95 (m, 2H), 1.75–1.87 (m, 8H), 1.70 (m, 2H), 1.59 (m, 1H), 1.56 (m, 1H).

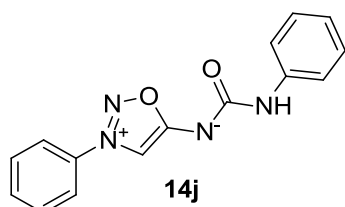
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 160.4, 134.1, 132.9, 130.5 (2C), 121.5 (2C), 102.0, 54.4, 37.7, 37.4 (2C), 32.4 (2C), 31.9 (2C), 27.3, 27.3.

IR (cm⁻¹) 2904, 1635, 1601, 1495, 1468, 1364.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 339.

Mp. 70–72 °C.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(phenylcarbamoyl)amide (14j)



C₁₅H₁₂N₄O₂
MW: 280 g.mol⁻¹
Yield: 87%
Orange solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), aniline (18 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as an orange solid (49 mg, 87%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (s, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.61–7.67 (m, 4H), 7.53 (m, 2H), 7.28 (m, 2H), 7.00 (m, 1H).

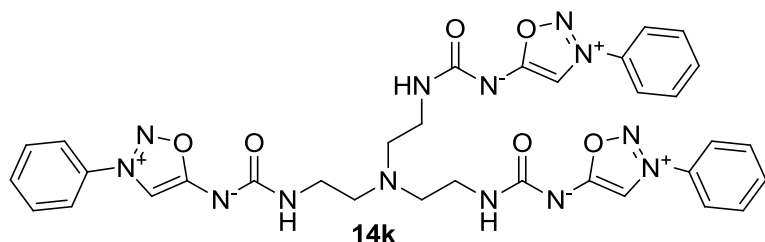
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 159.5, 139.6, 134.1, 133.0, 130.5 (2C), 128.9 (2C), 122.7, 121.6 (2C), 118.8 (2C), 102.5.

IR (cm⁻¹) 1643, 1589, 1436, 1310, 962, 756, 680.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 281.

Mp. 119–121 °C.

(((nitriлотris(ethane-2,1-diyl))tris(azanediyl))tris(carbonyl))tris((3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide) (14k)



$C_{33}H_{33}N_{13}O_6$
MW: 708 g.mol⁻¹
Yield: 66%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (314 mg), tris(2-aminoethyl)amine (30 μ L) and triethylamine (84 μ L). The crude product was diluted in DCM and washed with a saturated solution of NH_4Cl . The organic layers were combined, dried over $MgSO_4$ and evaporated. The resulted product purified was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH, 95/5 then NEt_3 /MeOH/DCM 1/2/97) to afford the desired product as a yellow solid (93 mg, 66%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.35 (s, 3H), 7.76 (m, 6H), 7.52–7.1 (m, 9H), 6.58 (br.s, 3H), 3.32 (m, 6H), 2.61 (m, 6H).

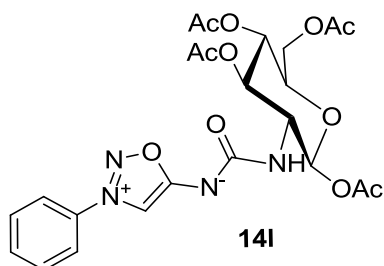
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 172.8 (3C), 162.4 (3C), 134.4 (3C), 132.4 (3C), 130.1 (6C), 121.9 (6C), 102.8 (3C), 54.7 (3C), 38.6 (3C).

IR (cm^{-1}) 3266, 1629, 1594, 1470, 1281, 1215, 958, 764.

LCMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 709; $[M+2H]^{2+}$ 355.

Mp. 179–181 $^{\circ}C$.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(((2S,3R,4R,5S,6R)-2,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)carbamoyl)amide (14l)



$C_{23}H_{26}N_4O_{11}$
MW: 534 g.mol⁻¹
Yield: 60%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), 1,3,4,6-Tetra-O-acetyl-2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranose hydrochloride (77 mg) and triethylamine (56 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (64 mg, 60%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.15 (s, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.60–7.70 (m, 3H), 5.95 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 5.92 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 5.47 (dd, J = 10.3, 9.5 Hz, 1H), 5.09 (dd, J = 17.8, 8.2 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 12.4, 2.1 Hz, 1H), 3.97 (dd, J = 19.4, 9.1 Hz, 1H), 3.89 (ddd, J = 10.0, 4.5, 2.1 Hz, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

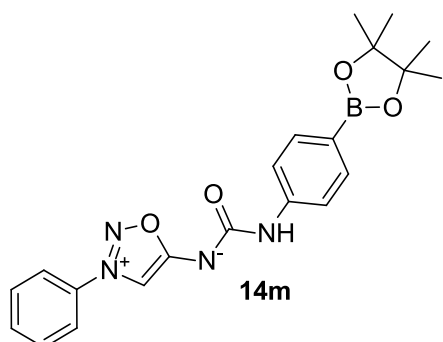
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 173.2, 170.8, 170.5, 169.7, 169.5, 161.4, 134.1, 133.0, 130.5 (2C), 121.6 (2C), 102.5, 92.5, 72.6, 72.4, 68.6, 61.9, 54.5, 21.1, 20.9, 20.8, 20.8.

IR (cm^{-1}) 1744, 1630, 1507, 1366, 1224, 1041.

LCMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 535.

Mp. 196–198 $^{\circ}C$.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)carbamoyl)amide (14m)



$C_{21}H_{23}BN_4O_4$
MW: 406 g.mol⁻¹
Yield: 63%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), 4-aminophenyl boronic acid pinacol ester (44 mg) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (51 mg, 63%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.73 (m, 2H), 7.60–7.70 (m, 4H), 7.54 (m, 2H), 1.32 (s, 12H).

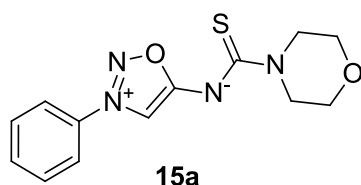
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 173.2, 159.3, 142.5, 135.9 (2C), 134.0, 133.1, 130.6 (2C), 121.6 (2C), 117.5 (2C), 102.5, 83.6 (2C), 25.0 (4C).

IR (cm⁻¹) 2976, 1603, 1578, 1497, 1470, 1355, 1311, 1271, 1237, 1142, 1088, 961.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 407.

Mp. 190–192 °C.

(morpholine-4-carbonothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (15a)



$C_{13}H_{14}N_4O_2S$
MW: 290 g.mol⁻¹
Yield: 79%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **13a** (83 mg), morpholine (18 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (46 mg, 79%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.15 (s, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.60–7.70 (m, 3H), 4.25 (m, 2H), 4.10 (m, 2H), 3.72 (m, 2H), 3.66 (m, 2H).

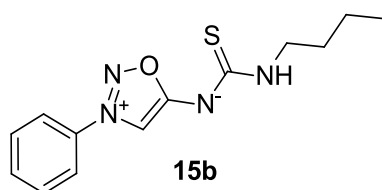
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 184.5, 173.6, 134.1, 133.0, 130.5 (2C), 121.7 (2C), 102.4, 66.8, 66.8, 49.0, 47.0.

IR (cm⁻¹) 1592, 1428, 1217, 1114, 963.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 291.

Mp. 209–211 °C.

(butylcarbamothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (15b)



C₁₃H₁₆N₄OS
MW: 276 g.mol⁻¹
Yield: 69%
Orange solid

The product was obtained using general procedure **A** from **13a** (79 mg), *n*-butylamine (20 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a orange solid (38 mg, 69%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.22 {9.23} (s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.63–7.73 (m, 3H), 6.98 {6.74} (br.s, 1H), 3.65 {3.52} (m, 2H), 1.63 {1.54} (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 0.94 {0.93} (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 187.2 {185.6}, 172.8 {174.4}, 134.1 {134.0}, 133.0 {133.1}, 130.5 {130.6} (2C), 121.8 (2C), 102.4 {103.0}, 44.8 {43.9}, 31.0 {31.5}, 20.3 {20.2}, 13.9 {13.9}.

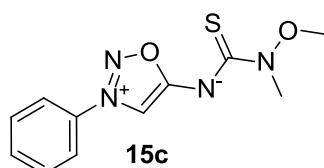
NMR spectra show the presence of 2 rotamers, minor rotamer signals are reported into brackets when they are distinguishable.

IR (cm⁻¹) 3229, 1605, 1594, 1468, 1358, 953, 763.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 277.

Mp. 121–123 °C.

(methoxy(methyl)carbamothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (15c)



C₁₁H₁₂N₄O₂S
MW: 264 g.mol⁻¹
Yield: 66%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **13a** (82 mg), *N,O*-diméthylhydroxylamine.HCl (19 mg) and triethylamine (56 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (35 mg, 66%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.21 (s, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.62–7.72 (m, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.65 (s, 3H).

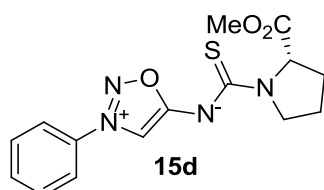
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 183.4, 173.8, 134.1, 133.1, 130.6 (2C), 121.8 (2C), 102.5, 60.7, 38.1.

IR (cm⁻¹) 1603, 1590, 1359, 131, 955.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 265.

Mp. 117–120 °C.

(S)-(2-(methoxycarbonyl)pyrrolidine-1-carbonothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (15d)



C₁₅H₁₆N₄O₃S
MW: 332 g.mol⁻¹
Yield: 81%
Orange oil

The product was obtained using general procedure **B** from **13a** (82 mg), L-proline methyl ester.HCl (33 mg) and triethylamine (56 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a orange oil (54 mg, 81%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.14 {9.15} (s, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.59–7.69 (m, 3H), 4.79 {4.96} (dd, *J* = 8.5, 3.8 Hz, 1H), 3.83–4.01 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.24–2.31 (m, 1H), 1.92–2.11 (m, 3H).

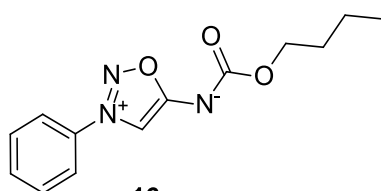
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 183.5 {182.9}, 172.9 {173.2}, 172.3 {173.1}, 134.1, 133.0 {133.0}, 130.5 {130.5} (2C), 121.7 {121.7} (2C), 102.3 {102.5}, 61.6 {63.7}, 52.2, 51.7 {49.9}, 30.6 {30.0}, 23.7 {24.3}.

NMR spectra show the presence of 2 rotamers, minor rotamer signals are reported into brackets when they are distinguishable.

IR (cm⁻¹) 1738, 1603, 1590, 1403, 1359, 1337, 1201, 957, 764.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 333.

(butoxycarbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (16a)



16a

C₁₃H₁₅N₃O₃
MW: 261 g.mol⁻¹
Yield: 73%
Beige solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), *n*-butanol (18 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a beige solid (38 mg, 75%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.58–7.68 (m, 3H), 4.06 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

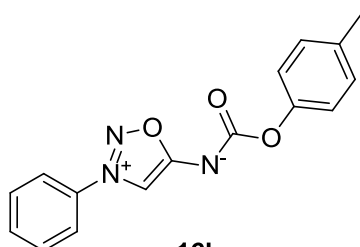
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.2, 161.9, 133.9, 133.2, 130.7 (2C), 121.6 (2C), 102.8, 65.5, 31.1, 19.3, 13.9.

IR (cm⁻¹) 1645, 1547, 1469, 1356, 1194, 1130, 981, 870, 718.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 262.

Mp. 83–85 °C.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((*p*-tolyl)oxy)carbonyl)amide (16b)



16b

C₁₆H₁₃N₃O₃
MW: 295 g.mol⁻¹
Yield: 65%
Beige solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), cresol (22 mg) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a beige solid (39 mg, 65%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.12 (m, 2H), 7.04 (m, 2H) 2.30 (s, 3H).

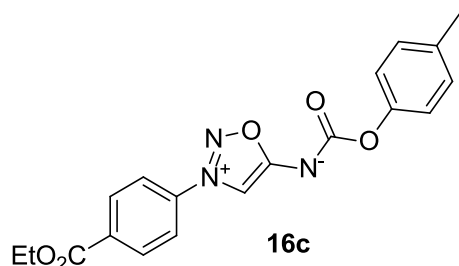
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 160.8, 149.9, 134.8, 133.9, 133.4, 130.8 (2C), 129.8 (2C), 121.7 (4C), 103.5, 21.0.

IR (cm⁻¹) 1671, 1577, 1507, 1365, 1277, 1181, 967, 764.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 296.

Mp. 144–146 °C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((p-tolyloxy)carbonyl)amide (16c)



$C_{19}H_{17}N_3O_5$
MW: 367 g.mol⁻¹
Yield: 60%
Pale yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11c** (94 mg), cresol (22 mg) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a pale yellow solid (44 mg, 60%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.21 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.42 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.41 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

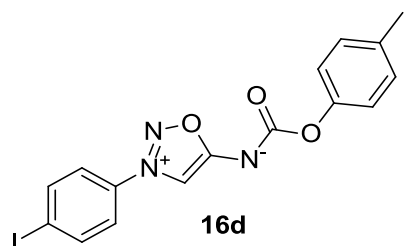
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 164.5, 160.8, 149.9, 136.6, 135.1, 134.9, 132.0 (2C), 129.9 (2C), 121.8 (2C), 121.6 (2C), 103.7, 62.3, 21.1, 14.5.

IR (cm⁻¹) 1717, 1664, 1578, 1276, 1190, 1108, 971, 770.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 368.

Mp. 151–153 °C.

(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((p-tolyloxy)carbonyl)amide (16d)



$C_{16}H_{12}IN_3O_3$
MW: 421 g.mol⁻¹
Yield: 63%
Beige solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11b** (105 mg), cresol (22 mg) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 80/20 to 60/40) to afford the desired product as a beige solid (53 mg, 63%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 7.98 (m, 2H), 7.50 (m, 2H), 7.12 (m, 2H), 7.03 (m, 2H), 2.30 (s, 3H).

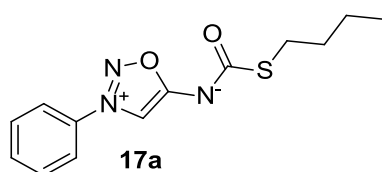
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 160.8, 149.9, 140.0 (2C), 134.9, 133.4, 129.9 (2C), 122.9 (2C), 121.6 (2C), 103.3, 100.0, 21.1.

IR (cm⁻¹) 1664, 1576, 1507, 1283, 1190, 972.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 422.

Mp. 200–202 °C.

((butylthio)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (17a)



$C_{13}H_{15}N_3O_2S$
MW: 277 g.mol⁻¹
Yield: 32%
Yellow paste

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), *n*-butanethiol (21 μ L) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow paste (18 mg, 32%).

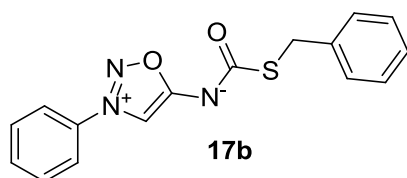
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (s, 1H), 7.78 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 2.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.41 (m, 2H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 178.2, 171.6, 133.9, 133.5, 130.8 (2C), 121.7 (2C), 104.1, 32.5, 30.6, 22.3, 13.9.

IR (cm^{-1}) 1621, 1556, 1359, 1242, 1148, 964, 848, 760.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 278.

((benzylthio)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (17b)



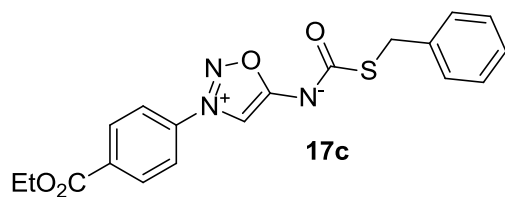
$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$
MW: 311 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 51%
Yellow paste

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), benzyl mercaptan (24 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow paste (32 mg, 51%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (s, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 4.12 (s, 2H).

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.

((benzylthio)carbonyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (17c)



$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$
MW: 383 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Yield: 47%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11c** (94 mg), benzyl mercaptan (24 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, 50/50) to afford the desired product as a yellow solid (36 mg, 47%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 8.30 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.35 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 7.19 (m, 1H), 4.43 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.12 (s, 2H), 1.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

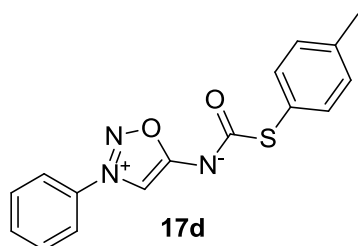
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 177.4, 171.7, 164.5, 138.8, 136.6, 135.2, 132.0 (2C), 129.0 (2C), 128.6 (2C), 127.1, 121.8 (2C), 104.4, 62.3, 35.4, 14.5.

IR (cm^{-1}) 1719, 1560, 1276, 1150, 845, 768.

LCMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 384.

Mp. 129–131 $^{\circ}\text{C}$.

(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((p-tolylthio)carbonyl)amide (17d)



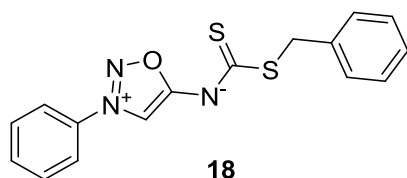
C₁₆H₁₃N₃O₂S
MW: 311 g.mol⁻¹
Yield: 53%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), *p*-thiocrésol (21 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (33 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (s, 1H), 7.72 (m, 3H), 7.62 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.34 (s, 3H).

The product was not stable enough to afford a ¹³C NMR spectrum.

((benzylthio)carbonothioyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (18)



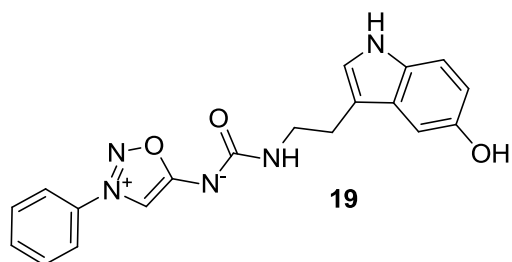
C₁₆H₁₃N₃OS₂
MW: 327 g.mol⁻¹
Yield: 56%
Brown paste

The product was obtained using general procedure **B** from **13a** (82 mg), benzyl mercaptan (24 μL) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a brown paste (36 mg, 56%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.43 (s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.65–7.74 (m, 3H), 7.39 (m, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.22 (m, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 209.8, 171.5, 137.6, 133.9, 133.8, 130.9 (2C), 129.4 (2C), 128.6 (2C), 127.1, 122.0 (2C), 104.7, 40.7.

((2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)ethyl)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (19)



C₁₉H₁₇N₅O₃
MW: 363 g.mol⁻¹
Yield: 53%
Red solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), serotonin.HCl (40 mg) and triethylamine (56 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 95/5) and then (C18-grefted silica, H₂O/MeCN + TFA 1%, from 95/5 to 0/100, gradient 2% MeCN/min) to afford the desired product as a red solid (36 mg, 53%).

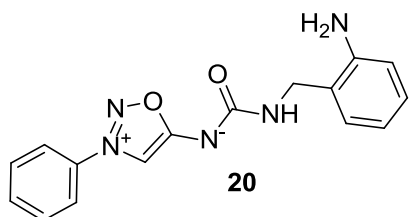
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.54 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.11 (m, 2H), 7.81 (m, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.67 (br.s 1H), 7.13 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.6 (dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 3.41 (m, 2H), 2.82 (br.t, *J* = 6.6 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 167.9, 154.0, 150.2, 133.5, 133.1, 130.8, 130.4 (2C), 127.9, 123.2, 122.6 (2C), 111.7, 111.3, 110.5, 105.8, 102.2, 40.5, 25.5.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 364.

Mp. 189–191 °C.

((2-aminobenzyl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (20)



C₁₆H₁₅N₅O₂
MW: 309 g.mol⁻¹
Yield: 68%
Yellow solid

The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), 2-aminobenzylamine (27 mg) and triethylamine (31 μL). After completion, methanol was added to the reaction. Water was then added and the mixture was filtered to afford the desired product as a yellow solid (42 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.37 (s, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.66–7.76 (m, 3H), 7.43 (br.t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.93 (dd, *J* = 7.9, 7.2 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.47 (dd, *J* = 7.9, 7.2 Hz, 1H), 5.18 (br.s, 2H), 4.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H).

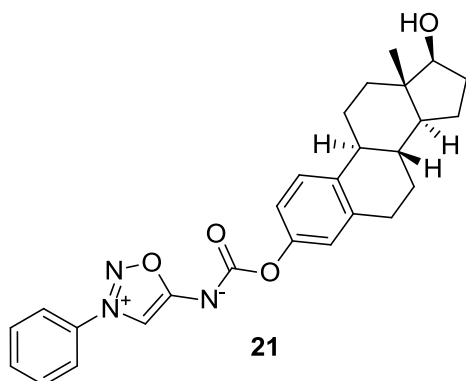
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 172.0, 161.2, 146.3, 133.9, 132.6, 130.2 (2C), 129.4, 127.6, 123.4, 122.2 (2C), 115.5, 114.4, 102.4, 40.5.

IR (cm⁻¹) 3266, 1632, 1552, 1285, 967, 761.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 310.

Mp. 187–189 °C.

(((8*R*,9*S*,13*S*,14*S*,17*S*)-17-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6*H*-cyclopenta[*a*]phenanthren-3-yl)oxy)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (21)



C₂₇H₂₉N₃O₄
MW: 459 g.mol⁻¹
Yield: 53%
Beige solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), β-estradiol (60 mg) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a beige solid (38 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 7.77 (m, 2H), 7.70 (m, 1H), 7.64 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.94 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.7 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.84 (m, 2H), 2.30 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.09 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.64–1.72 (m, 1H), 1.13–1.51 (m, 8H), 0.74 (s, 3H).

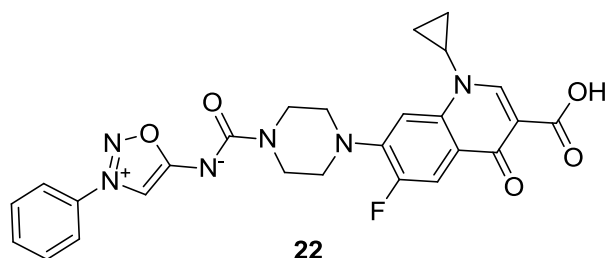
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.9, 161.0, 149.9, 138.1, 137.4, 133.9, 133.5, 130.8 (2C), 126.3, 121.9, 121.7 (2C), 119.1, 103.5, 82.1, 50.2, 44.4, 43.4, 38.7, 36.9, 30.7, 29.8, 27.3, 26.4, 23.3, 11.2.

IR (cm⁻¹) 3387, 2924, 1670, 1586, 1493, 1290, 1224, 1192, 973.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 460.

Mp. 179–181 °C.

(4-(3-carboxy-1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinolin-7-yl)piperazine-1-carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (22)



$C_{26}H_{23}FN_6O_5$
MW: 518 g.mol⁻¹
Yield: 68%
Yellow solid

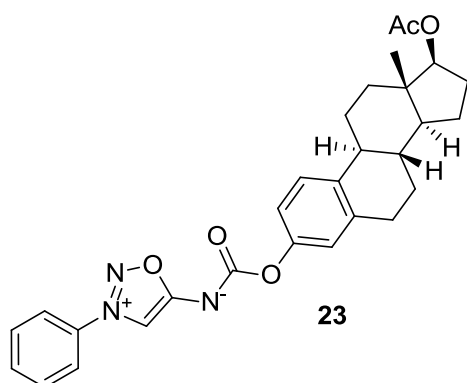
The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), ciprofloxacin (66 mg) and triethylamine (28 μ L). After completion, methanol was added to the reaction. Water was then added and the mixture was filtered to afford the desired product as a yellow solid (71 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 11.71 (br.s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.91–8.00 (m, 3H), 7.85 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.47 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.92 (m, 4H), 3.65 (tt, J = 7.1, 4.1 Hz, 1H), 3.46 (m, 4H), 1.45 (m, 2H), 1.19 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.3, 169.6, 167.6, 160.0 (q, J = 40 Hz), 155.3, 152.8, 150.4, 148.3, 146.0 (q, J = 10 Hz), 139.6, 135.3, 132.6, 131.5 (2C), 122.2 (2C), 115.3 (q, J = 285 Hz), 112.5 (q, J = 22 Hz), 107.0, 105.7, 49.3 (2C), 44.7 (2C), 36.4, 8.4.

LCMS (ESI) m/z [M+H]⁺ 519.

(((8R,9S,13S,14S,17S)-17-acetoxy-13-methyl-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-3-yl)oxy)carbonyl(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (23)



$C_{29}H_{31}N_3O_5$
MW: 501 g.mol⁻¹
Yield: 62%
Beige solid

The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), β -estradiol-17-acetate (63 mg) and triethylamine (28 μ L). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a beige solid (62%).

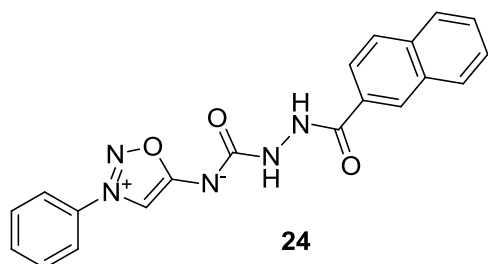
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H), 7.75 (m, 2H), 7.69 (m, 1H), 7.62 (m, 2H), 7.22 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.65 (t, J = 8.6 Hz, 1H), 2.82 (m, 2H), 2.18 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.85 (m, 2H), 1.23–1.55 (m, 7H), 0.79 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.8, 171.3, 160.9, 149.9, 137.9, 137.2, 133.9, 133.4, 130.7 (2C), 126.3, 121.9, 121.6 (2C), 119.1, 103.5, 82.8, 49.9, 44.1, 43.0, 38.4, 37.0, 29.7, 27.7, 27.2, 26.2, 23.4, 21.4, 12.2.

IR (cm⁻¹) 2928, 1731, 1674, 1589, 1227, 1192, 989, 970.

Mp. 97–99 °C.

(2-(2-naphthoyl)hydrazinecarbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (24)



C₂₀H₁₅N₅O₃
MW: 373 g.mol⁻¹
Yield: 83%
Beige solid

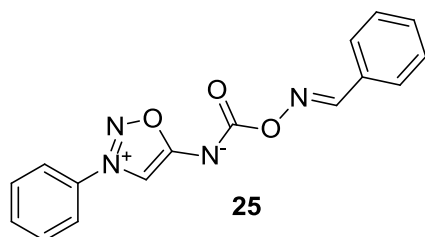
The product was obtained using general procedure **A** from **11a** (79 mg), naphthoic hydrazide (37 mg) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a beige solid (62 mg, 83%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃+MeOD-d₄) δ 8.40 (s, 1H), 8.13 (br.s, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.67–7.65 (m, 4H), 7.53–7.65 (m, 3H), 7.34–7.49 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃+MeOD-d₄) δ 173.5, 167.2, 161.7, 134.9, 133.7, 133.1, 132.5, 10.5 (2C), 129.5, 129.2, 128.4, 128.3, 127.8, 127.6, 126.7, 123.9, 121.6 (2C), 103.0.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 374.

(E)-(((benzylideneamino)oxy)carbonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (25)



C₁₆H₁₂N₄O₃
MW: 308 g.mol⁻¹
Yield: 66%
White solid

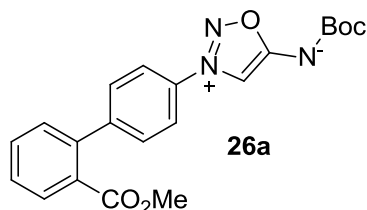
The product was obtained using general procedure **B** from **11a** (79 mg), benzaldehyde oxime (24 mg) and triethylamine (28 μL). The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (41 mg, 66%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.39 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.81 (m, 2H), 7.61–7.72 (m, 5H), 7.34–7.42 (m, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 175.6, 160.3, 154.4, 133.9, 133.4, 131.2, 131.0, 130.8 (2C), 128.9 (2C), 128.4 (2C), 121.8 (2C), 103.6.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 309.

(tert-butoxycarbonyl)(3-(2'-(methoxycarbonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26a)



C₂₁H₂₁N₃O₅
MW: 395 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 51%

A schlenk tube under nitrogen atmosphere was charged with Pd(PPh₃)₄ (4.0 mg, 0.0032 mmol), **7c** (25 mg, 0.064 mmol), 2-methoxycarbonylphenylboronic acid (14 mg, 0.077 mmol.), K₂CO₃ (18 mg, 0.13 mmol) and DMF (1 mL). The tube was sealed and the mixture was heated at 100 °C overnight. The mixture was filtered through a Celite pad, then quenched with NH₄Cl (15 mL) then extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure.

The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc, from 80/20 to 60/40) to afford the desired product as a yellow solid (13 mg, 51%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (s, 1H), 7.99 (dd, *J* = 7.8 Hz, 1.4 Hz), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz), 7.47–7.61 (m, 4H), 7.36 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 1.52 (s, 9H).

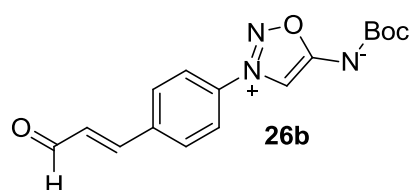
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.8, 167.9, 160.8, 147.0, 140.6, 132.9, 132.1, 130.8 (2C), 130.6 (2C), 130.1, 128.7, 121.1 (2C), 102.5, 79.3, 52.4, 28.4 (3C).

IR (cm⁻¹) 1721, 1660, 1582, 1288, 1155, 1005, 762, 730.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 396.

Mp. 186–187 °C.

(E)-(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26b)



C₁₆H₁₇N₃O₄
MW: 315 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 96%

A solution of **7c** (387 mg, 1.0 mmol), Pd(OAc)₂ (22 mg, 0.10 mmol), Ethylenebis(diphenylphosphine) (40 mg, 0.10 mmol) and K₂CO₃ (415 mg, 3.0 mmol) in MeCN/H₂O (1/1.5 mL) was stirred during 15 minutes at room temperature. Then (E)-2-(3,3-diethoxyprop-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (282 mg, 1.1 mmol) was added and the reaction was stirred at 60 °C overnight. After cooling to room temperature, HCl 1M was added to reach pH 2 and the mixture was stirred for another 15 minutes. The mixture was extracted with DCM and the organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/NEt₃ 100/0 to 99/1) to afford the desired product as an orange solid (302 mg, 96%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.74 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 16.1 Hz, 7.4 Hz, 1H), 1.47 (s, 9H).

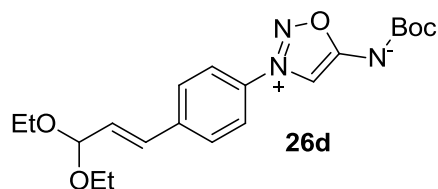
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.9, 174.8, 160.9, 148.7, 138.8, 135.1, 131.6, 130.3 (2C), 122.3 (2C), 102.4, 79.3, 28.3 (3C).

IR (cm⁻¹) 1662, 1593, 1580, 1441, 1364, 1288, 1216, 1153, 1121, 1048, 1005, 963, 728.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₈N₃O₄ [M+H]⁺: 316.1292; found: 316.1288.

Mp. 74 °C – decomp.

(E)-(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(3,3-diethoxyprop-1-en-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26d)

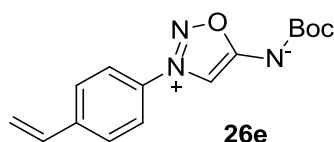


C₂₀H₂₇N₃O₅
MW: 389 g.mol⁻¹
Orange oil
Yield: 7%

To a stirred solution of acrolein diacetal (229 μL, 1.50 mmol) in DMF (2 mL), were added *n*Bu₄NOAc (302 mg, 1.00 mmol), K₂CO₃ (104 mg, 0.75 mmol), KCl (37 mg, 0.50 mmol) and Pd(OAc)₂ (11 mg, 0.05 mmol). **7c** was added to the reaction mixture during 2 hours. The mixture was stirred for 8 hours at 90 °C. After cooling down, it was diluted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, separated and dried of MgSO₄ before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/EtOAc, from 100/0 to 0/100) to afford the desired product as an orange oil (14 mg, 7%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (s, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.36 (dd, *J* = 16.1 Hz, 4.8 Hz, 1H), 5.10 (dd, *J* = 4.7, 0.8 Hz, 1H), 3.71 (dq, *J* = 9.4, 6.9 Hz, 2H), 3.57 (dq, *J* = 9.4, 6.9 Hz, 2H), 1.52 (s, 9H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).
LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 390.

(*tert*-butoxycarbonyl)(3-(4-vinylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26e)



C₁₅H₁₇N₃O₃
MW: 287 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 82%

To a solution of **7c** (1.16 g, 3.00 mmol) in DMF (60 mL), were added successively tributylvinyl tin (960 μL, 3.30 mmol) and Pd(PPh₃)₂Cl₂ (105 mg, 0.15 mmol). The solution was stirred at 60 °C for 2 hours. After cooling down, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in DCM and a solution of NaOH (1M) was added. The mixture was vigorously stirred for 1 hour and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layers were combined, dried over MgSO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 100/0 to 70/30) to afford the desired product as an orange solid (703 mg, 82%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.07 (s, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.61 (m, 2H), 6.76 (dd, *J* = 17.6 Hz, 10.9 Hz, 1H), 5.91 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 1.51 (s, 9H).

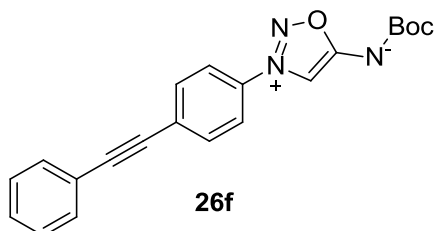
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.6, 160.8, 142.3, 134.6, 132.7, 127.9 (2C), 121.5 (2C), 118.2, 102.1, 79.0, 28 (3C).

IR (cm⁻¹) 1659, 1581, 1363, 1288, 1216, 1156, 1048, 1005, 962, 846, 791, 724.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 288.

Mp. 121 °C.

(*tert*-butoxycarbonyl)(3-(4-(phenylethynyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26f)



C₂₁H₁₉N₃O₃
MW: 361.39 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 67%

To a solution of **7c** (387 mg, 1.00 mmol), CuI (19 mg, 0.1 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (70 mg, 0.1 mmol) and NEt₃ (280 μL, 2.00 mmol) in DMF (10 mL) was added phenyl acetylene (132 μL, 1.2 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 5 hours before being filtered over a Celite plug, washed with EtOAc and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 90/10 to 70/30). The compound was obtained in 67% yield (242 mg, 0.67 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.48–7.44 (m, 2H), 7.33–7.28 (m, 3H), 1.46 (s, 9H).

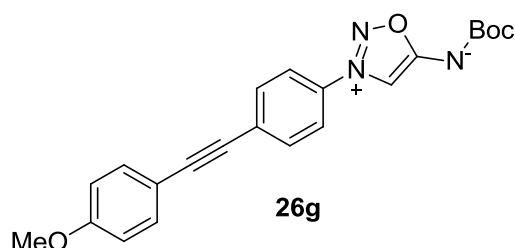
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.5, 160.5, 133.2 (2C), 132.6, 131.7 (2C), 129.2, 128.5, 128.4 (2C), 121.8, 121.2 (2C), 102.1, 93.8, 87.0, 78.9, 28.1 (3C).

IR (cm⁻¹): 1658, 1596, 1512, 1295, 1219, 1161, 904, 839.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₁H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺: 362.1499; found: 362.1496.

Mp. 143–145 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(phenylethynyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26g)



$C_{22}H_{21}N_3O_4$
MW: 391.42 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 96%

To a solution of **7c** (77 mg, 0.20 mmol), CuI (3.8 mg, 0.02 mmol), Pd(PPh₃)Cl₂ (14 mg, 0.02 mmol) and NEt₃ (56 μL, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) was added 4-ethynyl anisole (32 mg, 0.24 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours before being filtered over a Celite plug, washed with EtOAc and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc from 90/10 to 70/30). The compound was obtained in 96% yield (75 mg).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (s, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 1.47 (s, 9H).

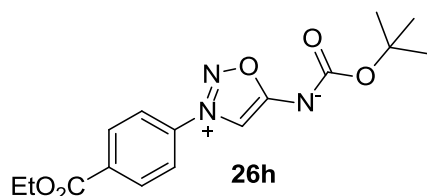
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.6, 160.7, 160.3, 133.3 (2C), 133.0 (2C), 132.3, 129.0, 121.2 (2C), 114.2 (2C), 113.9, 102.0, 94.3, 86.1, 78.9, 55.3, 28.2 (3C).

IR (cm⁻¹): 1657, 1596, 1517, 1292, 1220, 1162, 904, 833.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₂₂N₃O₄ [M+H]⁺: 392.1605; found: 392.1606.

Mp. 165–167 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26h)



$C_{16}H_{19}N_3O_5$
MW: 333 g.mol⁻¹
Yield: 71%
Brownish powder

7c (300 mg, 0.774 mmol) was dissolved in a mixture of absolute EtOH (2.5 mL) and NEt₃ (2.5 mL). PdCl₂(PPh₃)₂ (81 mg, 0.116 mmol) was added and the reaction mixture was kept under a CO atmosphere for 2.5 hours and heated at 60 °C. The resulting suspension was cooled to room temperature and filtered through Celite eluting with EtOAc, and the inorganic salts were removed. The filtrate was concentrated and the resulting residue was purified by flash chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 70/30) to afford 183 mg (0.550 mmol, 71% yield) of analytically pure compound.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.16 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.43 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.51 (s, 9H), 1.42 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

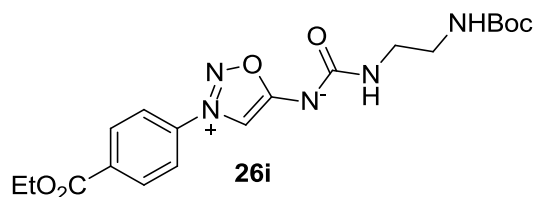
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 164.3, 160.6, 136.6, 134.7, 131.6 (2C), 121.4 (2C), 102.5, 79.2, 62.0, 28.1 (3C), 14.2.

IR (cm⁻¹) 3159, 2979, 1784, 1716, 1662, 1586, 1366, 1271, 1152, 1106, 1048, 1007, 963, 855, 769, 728, 689.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₂₀N₃O₅ [M+H]⁺: 334.1397; found: 334.1397.

Mp. 151–153 °C.

((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26i)



$C_{19}H_{25}N_5O_6$
MW: 419 g.mol⁻¹
Yield: 99%
Yellow powder

Compound **8k** (1.89 g, 4.00 mmol) was dissolved in a mixture of absolute EtOH (20 mL) and NEt₃ (20 mL). PdCl₂(PPh₃)₂ (281 mg, 0.40 mmol) was added and the reaction mixture was kept under a CO atmosphere for 5 hours and heated at 60 °C. CO was added to the reaction every 30 min. The solvent was evaporated and the crude mixture was charged on a plug of silica. Impurities were removed by first filtrating with DCM, and then the desired product was obtained by flushing the plug with EtOAc. After evaporation of this filtrate, the product was obtained as a yellow powder (1.70 g, 99%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.31 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.20 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.76 (br.s, 1H), 5.03 (br.s, 1H), 4.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.40–3.36 (m, 2H), 3.30–3.25 (m, 2H), 1.45–1.41 (m, 12H).

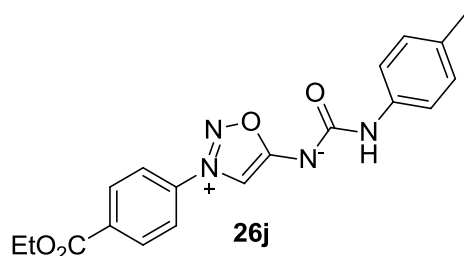
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 164.4, 161.7, 156.1, 136.7, 134.5, 131.5 (2C), 121.4 (2C), 102.1, 79.1, 61.9, 41.0, 40.4, 28.3 (3C), 14.2.

IR (cm⁻¹) 3288, 1978, 1713, 1635, 1604, 1512, 1441, 1366, 1274, 1173, 1108, 958, 770.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₂₆N₅O₆ [M+H]⁺: 420.1878; found: 420.1879.

Mp. 139–141 °C.

(3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(*p*-tolylcarbamoyl)amide (26j)



$C_{19}H_{18}N_4O_4$
MW: 366 g.mol⁻¹
Yield: 63%
Yellow solid

To a solution of 26h (100 mg, 0.30 mmol) in DCM (5 mL) was added dropwise TFA (0.5 mL). The resulting solution was stirred at room temperature. After 4h, the solvent was evaporated under reduced pressure (with re-solubilisation in MeOH and re-evaporation 2 times in order to achieve full elimination of TFA). To the residue was added water (1 mL), THF (1 mL), NaHCO₃ (63 mg, 0.75 mmol) and *p*-tolyl isocyanate (38 μL, 0.30 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature. After 18 hours, the orange heterogeneous mixture was quenched with NH₄Cl (15 mL) then extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 70/30) to afford 70 mg (0.191 mmol, 63% yield) of analytically pure compound as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.44 (br.s, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.42 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.41 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

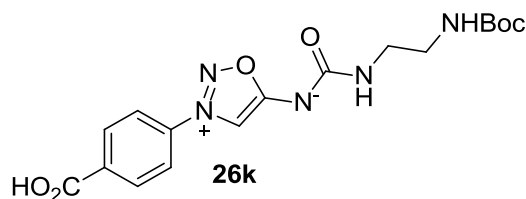
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.9, 164.6, 159.0, 136.9, 136.8, 134.8, 132.5, 131.9 (2C), 129.6 (2C), 121.7 (2C), 119.0 (2C), 102.7, 62.2, 20.9, 14.4.

IR (cm⁻¹) 3285, 2982, 1715, 1645, 1588, 1514, 1440, 1403, 1312, 1273, 1237, 1193, 1107, 1017, 959, 768, 731.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₉H₁₉N₄O₄ [M+H]⁺: 367.1401; found: 367.1401.

Mp. 169–170 °C.

((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26k)



$C_{17}H_{21}N_5O_6$
MW: 391 g.mol⁻¹
Yield: quantitative
Yellow solid

To a solution of compound **26i** (65 mg, 0.155 mmol) in EtOH (1 mL) /THF (1 mL) was added NaOH (5 eq). The resulting suspension was stirred at room temperature. After 2h, the mixture was diluted with water then extracted with AcOEt (3 times). The aqueous phase was acidified with 2M HCl until pH=2. Then it was extracted with AcOEt (3 times). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give the desired product **26k** as a yellow solid in a quantitative yield.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.33 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.30 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 1.45 (s, 9H).

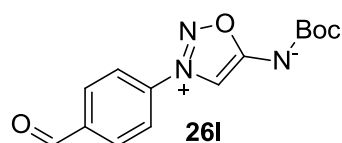
¹³C NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 172.2, 167.7, 161.3, 156.0, 141.3, 135.2, 131.0 (2C), 121.9 (2C), 102.6, 78.0, 40.5, 39.2, 9.6 (3C).

IR (cm⁻¹) 1685, 1616, 1555, 1522, 1248, 1168, 973, 860, 771, 684.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₂₂N₅O₆ [M+H]⁺ : 392.1564; found: 392.1565.

Mp. 200–202 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-formylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (26l)



$C_{14}H_{15}N_3O_4$
MW: 289 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 23%

To a solution of compound **26e** (690 mg, 2.40 mmol) in a mixture acetone/H₂O (7.5 mL/2.5 mL) was added NMO (422 mg, 3.60 mmol) and OsO₄ (2.5wt% in *t*BuOH, 1.5 mL, 0.12 mmol). The mixture was stirred at room temperature during 4 hours. A 25% solution of Na₂S₂O₃ was added and the aqueous layer was extracted six times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The residue was solubilized in a mixture acetone/H₂O (3/1) and NaIO₄ was added. The mixture was stirred at room temperature during 6 hours. The suspension was filtered through a plug of Celite and washed with EtOAc. The aqueous layer was extracted three times with EtOAc. The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 7/3 to 5/5) to afford the desired product as an orange solid (157 mg, 23%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.14 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 8.16 (m, 2H), 8.00 (m, 2H), 1.51 (s, 9H).

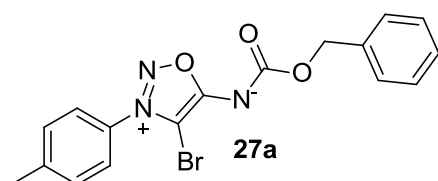
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 189.7, 174.4, 160.2, 139.2, 137.4, 131.5 (2C), 122.3 (2C), 102.7, 79.6, 28.1 (3C).

IR (cm⁻¹) 1703, 1662, 1587, 1366, 1291, 1215, 1156, 1008, 964, 834.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 316.

Mp. 111 °C – decomp.

((benzyloxy)carbonyl)(4-bromo-3-(p-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (27a)



$C_{17}H_{14}BrN_3O_3$
MW: 388 g.mol⁻¹
Yield: 75%
White powder

NBS (126 mg, 0.710 mmol) was added to a solution of **7a** (169 mg, 0.546 mmol.) in DCM (10 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The mixture was diluted with DCM and washed with NaOH 15 % (10 mL) then NaHCO₃ (50 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc, from 100/0 to 60/40) to afford the desired product as a white powder (160 mg, 75%).

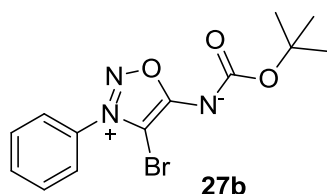
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42–7.49 (m, 6H), 7.26–7.33 (m, 3H), 5.21 (s, 2H), 2.48 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.9, 159.2, 144.2, 137.0, 130.9 (2C), 130.4, 128.6 (2C), 128.5 (2C), 128.0, 124.8 (2C), 91.3, 67.6, 21.7. IR (cm⁻¹) 1669, 1616, 1379, 1352, 1274, 1199, 1158, 1054.

HRMS (ESI) *m/z* calcd C₁₇H₁₅BrN₃O₃ [M+H]⁺: 388.0291; found: 388.0291.

Mp. 154 °C.

(4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tert-butoxycarbonyl)amide (27b)



$C_{13}H_{14}BrN_3O_3$
MW: 340.17 g.mol⁻¹
Brown solid
Yield: 99%

A solution of **7b** (1.00 g, 3.80 mmol) and NBS (820 mg, 4.60 mmol) in DCM (3 mL) was stirred at room temperature for 7 hours. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, 70/30), to obtain the desired product (1.30 g, 99%) as a pure compound.

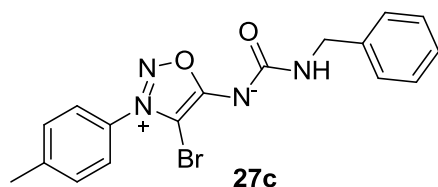
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77–7.72 (m, 1H), 7.71–7.60 (m, 4H), 1.56 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 165.1, 158.7, 133.2, 133.0, 130.4 (2C), 125.2 (2C), 90.9, 80.0, 28.3 (3C).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₃H₁₅BrN₃O₃ [M+H]⁺: 340.0291; found: 340.0290.

Mp. 51 °C.

(benzylcarbamoyl)(4-bromo-3-(p-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (27c)



$C_{17}H_{15}BrN_4O_2$
MW: 387g.mol⁻¹
White solid
Yield: 57%

In a 25 mL round bottom flask, compound **8c** (50 mg, 0.162 mmol) and NBS (34.6 mg, 0.195 mmol) were stirred at room temperature in DCM (10 mL). The reaction mixture was stirred for 26 hours at room temperature, and then the solvent was evaporated. The crude material was purified by flash chromatography (SiO₂, cyclohexane/EtOAc from 100/0 to 40/60) to give the desire urea in 57 % yield (36 mg, 0.093 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.36–7.29 (m, 4H), 7.26–7.21 (m, 1H), 4.50 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.49 (s, 3H).

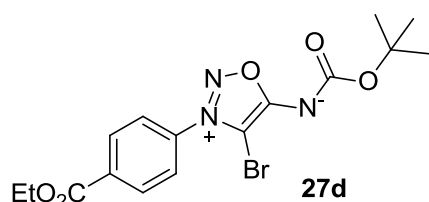
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.3, 158.7, 143.9, 138.9, 130.6 (2C), 130.2, 128.4 (2C), 127.7 (2C), 127.1, 124.6 (2C), 89.8, 44.5, 21.5.

IR (cm⁻¹): 1621, 1614, 1504, 1494, 1270, 1207, 1197, 1181, 1012, 817, 697, 478.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₇H₁₆BrN₄O₂ [M+H]⁺: 387.0451; found: 387.0451.

Mp. 60–62 °C.

(4-bromo-3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tert-butoxycarbonyl)amide (27d)



C₁₆H₁₈BrN₃O₅
MW: 412 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 45%

A solution of **26h** (66 mg, 0.20 mmol) and NBS (71 mg, 0.40 mmol) in DCM (2 mL) was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc 70/30 to 50/50). The product was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of Na₂CO₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to afford the desired product as a yellow solid.

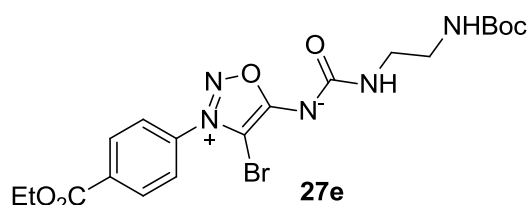
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (m, 2H), 7.70 (m, 2H), 4.42 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.52 (s, 9H), 1.40 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.9, 164.6, 158.5, 135.9, 135.0, 131.6 (2C), 125.3 (2C), 90.8, 80.2, 62.3, 28.3 (3C), 14.4.

LCMS (ESI) *m/z* C₁₇H₁₅BrN₄O₂ [M+H]⁺ 414.2 (⁸¹Br).

Mp. 167–168 °C.

(4-bromo-3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl) carbamoyl)amide (27e)



C₁₉H₂₄BrN₅O₆
MW: 498 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 74%

A solution of **26i** (419 mg, 1.0 mmol) and NBS (356 mg, 2.0 mmol) in DCM (2 mL) was stirred at room temperature for 2 hours. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc 70/30 to 50/50). The product was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of Na₂CO₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated to afford the desired product as a yellow solid (370 mg, 74%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (m, 2H), 7.69 (m, 2H), 5.63 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.09 (br.s, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.38 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 1.41 (m, 12H).

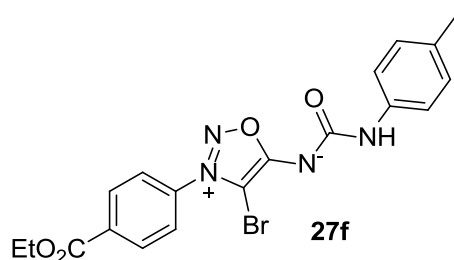
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.6, 163.0, 160.4, 156.4, 136.1, 134.9, 131.5 (2C), 125.3 (2C), 89.6, 79.4, 62.2, 41.3, 40.6, 28.6 (3C), 14.4.

IR (cm⁻¹): 3326, 2978, 1712, 1642, 1505, 1275, 1211, 1107, 1017, 771.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H] 500.3 (⁸¹Br).

Mp. 70 °C–decomp.

(4-bromo-3-(4-(ethoxycarbonyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (27f)



$C_{19}H_{17}BrN_4O_4$
MW: 445 $g \cdot mol^{-1}$
Orange solid
Yield: 32%

TFA (0.5 mL) was added to a solution of **27d** (37 mg, 0.09 mmol) in DCM (2 mL). The mixture was stirred for 1 hour before being evaporated several times with MeOH. The crude was dried under *vacuum* before being dissolved in anhydrous DMF (1 mL). *p*-tolyl isocyanate (17 μ L, 0.135 mmol) was added and the solution was cooled at -20 °C. Diisopropylethylamine (24 μ L, 0.135 mmol) was added during 30 minutes at -20 °C and the mixture was stirred 1 hour at room temperature. A saturated solution of NH_4Cl was added and the product was extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , heptane/ EtOAc, 5/5) to afford the desired product as an orange solid (13 mg, 32%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.31 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 7.21 (br.s, 1H), 7.09 (m, 2H), 4.44 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.28 (s, 3H), 1.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

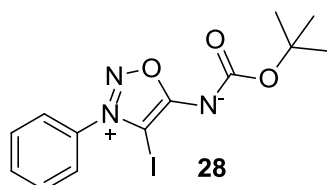
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 165.9, 164.5, 163.5, 136.5, 135.8, 134.9, 132.5, 131.4 (2C), 129.7, 129.4 (2C), 125.2 (2C), 118.7, 62.1, 31.0, 20.8, 14.3.

IR (cm^{-1}) 1717, 1605, 1513, 1275, 1194, 1107, 1010, 768.

LCMS (ESI) m/z [$M+H$] $^+$ 445 (^{79}Br)-447 (^{81}Br).

Mp. 156 °C.

(4-iodo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tert-butoxycarbonyl)amide (28)



$C_{13}H_{14}IN_3O_3$
MW: 387.17 $g \cdot mol^{-1}$
Brown solid
Yield: 45%

A solution of **7b** (523 mg, 2.00 mmol) and NIS (1.35 g, 6.00 mmol) in AcOH (4 ml) was stirred at room temperature for 2 days. The solvent was evaporated and the crude product was purified by flash chromatography (SiO_2 , heptane/EtOAc 70/30) to obtain the desired product (347 mg, 45%) as a pure compound.

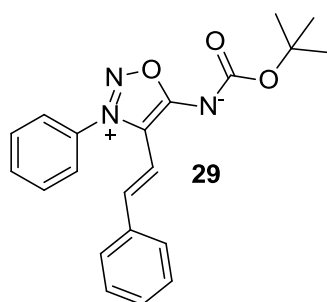
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.76–7.71 (m, 1H), 7.70–7.62 (m, 2H), 7.62–7.55 (m, 2H), 1.57 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 168.3, 158.9, 134.3, 133.0, 130.3 (2C), 125.5 (2C), 79.9, 59.0, 28.3 (3C).

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{13}H_{15}IN_3O_3$ [$M+H$] $^+$: 388.0153; found: 388.0153.

Mp. 64°C.

(E)-(tert-butoxycarbonyl)(3-phenyl-4-styryl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (29)



$C_{21}H_{21}N_3O_3$
MW: 363.41 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 39%

To a stirred solution of *t*-2-phenylvinyl boronic acid (30.8 mg, 0.20 mmol), Pd(OAc)₂ (4.5 mg, 0.02 mmol), ethylenebis(diphenylphosphine) (8.0 mg, 0.02 mmol), CsF (91.1 mg, 0.60 mmol) in a mixture MeCN/H₂O (1/1/1.1 mL) at 60 °C was added **27b** (68.0 mg, 0.20 mmol). The mixture was stirred overnight. After cooling at room temperature, the mixture was filtered over a Celite plug and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 90/10 to 80/20) then by preparative TLC (SiO₂, heptane/EtOAc 70/30) to obtain the desired product (28.0 mg, 39%) as a pure compound.

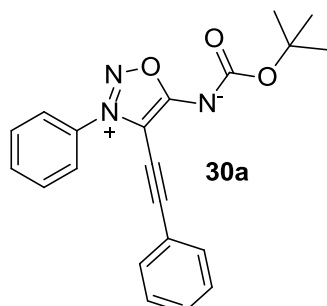
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.97 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.77–7.67 (m, 3H), 7.62–7.57 (m, 2H), 7.39–7.36 (m, 2H), 7.32–7.24 (m, 3H), 6.54 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 1.61 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.6, 159.2, 136.4, 134.8, 132.7 (2C), 130.5 (2C), 128.9, 128.8 (2C), 127.1 (2C), 125.6 (2C), 115.0, 108.8, 79.9, 28.4 (3C).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 364.

Mp. 179–180 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(3-phenyl-4-(phenylethynyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (30a)



$C_{21}H_{19}N_3O_3$
MW: 361.39 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 45%

To a solution of **28** (77.8 mg, 0.20 mmol), CuI (3.8 mg, 0.02 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (14 mg, 0.02 mmol) and NEt₃ (56 μL, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) was added phenylacetylene (26 μL, 0.24 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours before being filtered over a Celite plug, washed with EtOAc and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 85/15 to 80/20) to afford the desired product as a yellow solid (33 mg; 45%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (m, 2H), 7.73–7.64 (m, 3H), 7.39–7.29 (m, 5H), 1.56 (s, 9H).

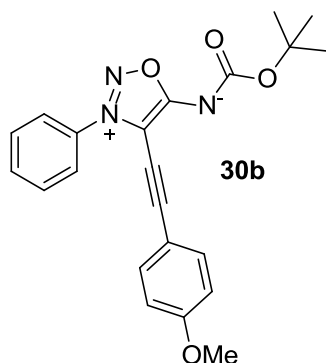
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.6, 158.5, 133.4, 132.9, 131.6 (2C), 130.0 (2C), 129.8, 128.6 (2C), 124.2 (2C), 121.2, 104.1, 102.0, 79.9, 72.8, 28.3 (3C).

IR (cm⁻¹): 2975, 1675, 1620, 1473, 1365, 1271, 1143, 1072, 1046, 916.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₁H₂₀N₃O₃ [M+H]⁺: 362.1499; found: 362.1498.

Mp. 99–101 °C.

(tert-butoxycarbonyl)(4-((4-methoxyphenyl)ethynyl)-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (30b)



$C_{22}H_{21}N_3O_4$
MW: 391.42 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 67%

To a solution of **28** (125 mg, 0.32 mmol), CuI (6.1 mg, 0.032 mmol), Pd(PPh₃)Cl₂ (23 mg, 0.032 mmol) and NEt₃ (89 μ L, 0.64 mmol) in DMF (3 mL) was added 4-ethynyl anisole (50 mg, 0.38 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 hours before being filtered over a Celite plug, washed with EtOAc and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc from 85/15 to 80/20) to afford the desired product as a yellow solid (84 mg, 67%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (m, 2H), 7.72–7.61 (m, 3H), 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 1.56 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 166.7, 160.8, 158.5, 133.5, 133.4 (2C), 132.8, 130.0 (2C), 124.2 (2C), 114.3 (2C), 113.2, 104.4, 102.4, 79.8, 71.7, 55.5, 28.3 (3C).

IR (cm⁻¹): 2930, 2205, 1674, 1617, 1519, 1478, 1365, 1271, 1250, 1143, 1072, 1029, 832.

HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₂H₂₂N₃O₄ [M+H]⁺: 392.1605; found: 392.1606.

Mp. 97–99 °C.

B. Kinetic data for Iminosydnone/Cyclooctyne cycloaddition

Reactions of iminosydnone **5a**, **5b**, **7a**, **8e**, **30a** with BCN were carried out in PBS/DMSO (2:8) mixtures at 200 μM concentration of iminosydnone and 300 μM concentration of BCN using the following procedure.

To 200 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) was added 791 μL of DMSO, 2 μL of the solution of internal standard (3-fluoro-4-nitrophenol, 100 mM in DMSO), 4 μL of the solution of iminosydnone (50 mM in DMSO) and 3 μL of the solution of BCN (100 mM in DMSO). The reaction mixture was injected in HPLC every 30 min and the conversion was followed by measuring the normalized iminosydnone peak area.

Reactions of iminosydnone **5c**, **6a**, **7b**, **8f**, **8g**, **8i**, **10d**, **27b**, **28**, with BCN were carried out in PBS/DMSO (2:8) mixtures at 100 μM concentration of iminosydnone and 150 μM concentration of BCN using the following procedure.

To 200 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) was added 788 μL of DMSO, 1 μL of the solution of internal standard (3-fluoro-4-nitrophenol, 100 mM in DMSO), 10 μL of the solution of iminosydnone (10 mM in DMSO) and 1 μL of the solution of BCN (150 mM in DMSO). The reaction mixture was injected in HPLC every 30 min and the conversion was followed by measuring the normalized iminosydnone peak area.

Reactions of iminosydnone **6b**, **8a**, **8c**, **26h**, **26j** with BCN were carried out in PBS/DMSO (2:8) mixtures at 100 μM concentration of iminosydnone and 150 μM concentration of BCN using the following procedure.

To 200 μL of phosphate buffered saline (PBS, 10 mM) was added 795.5 μL of DMSO, 1 μL of the solution of internal standard (3-fluoro-4-nitrophenol, 100 mM in DMSO), 2 μL of the solution of iminosydnone (50 mM in DMSO) and 1.5 μL of the solution of BCN (100 mM in DMSO). The reaction mixture was injected in HPLC every 15 min and the conversion was followed by measuring the normalized iminosydnone peak area.

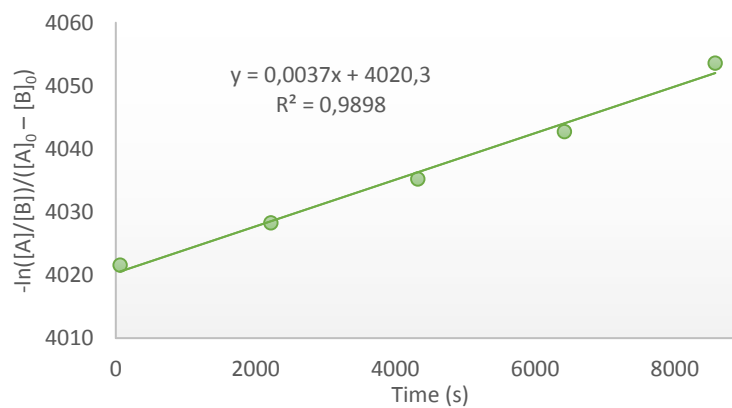
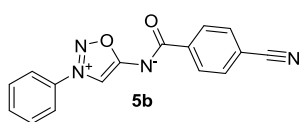
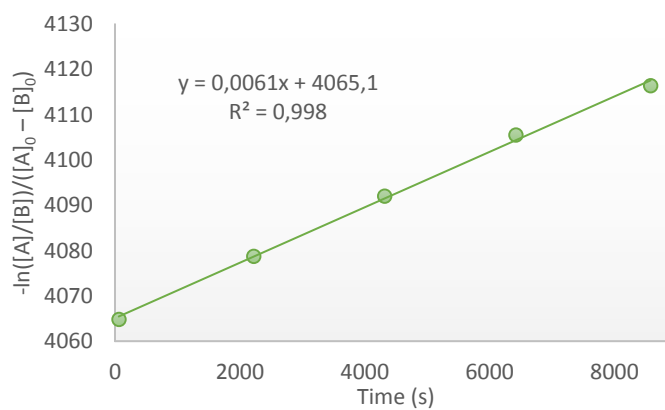
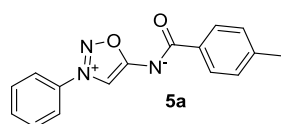
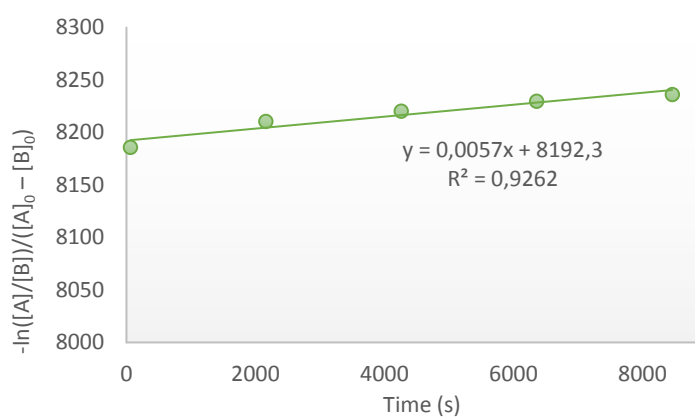
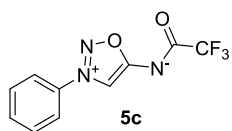
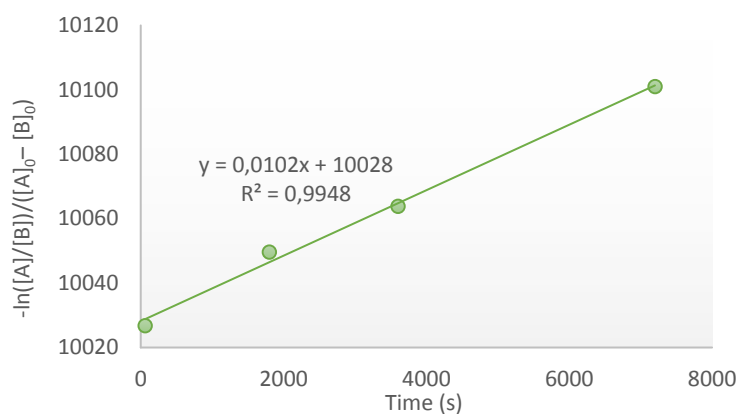
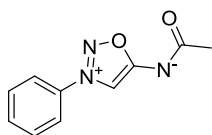
Second order reaction rate was determined by plotting $-\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)/([A]_0 - [B]_0)$ versus time and analyzing by linear regression (**Equation S7**). Second order rate constant corresponds to the determined slope.

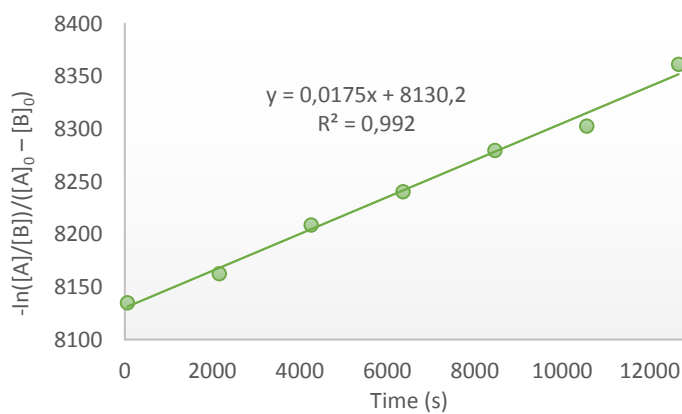
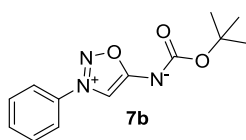
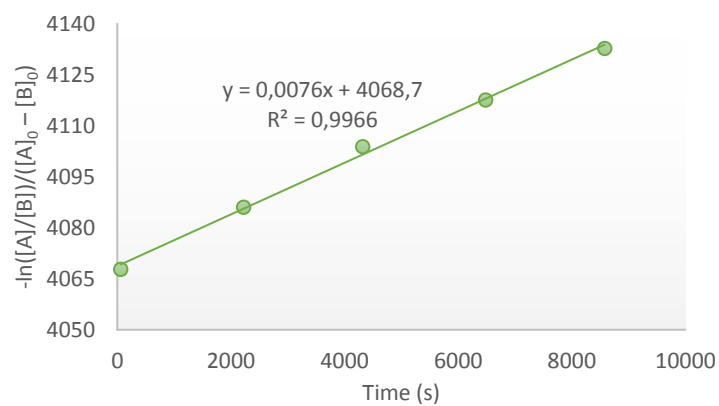
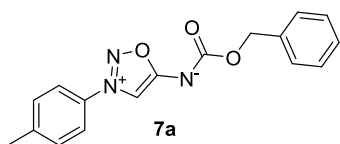
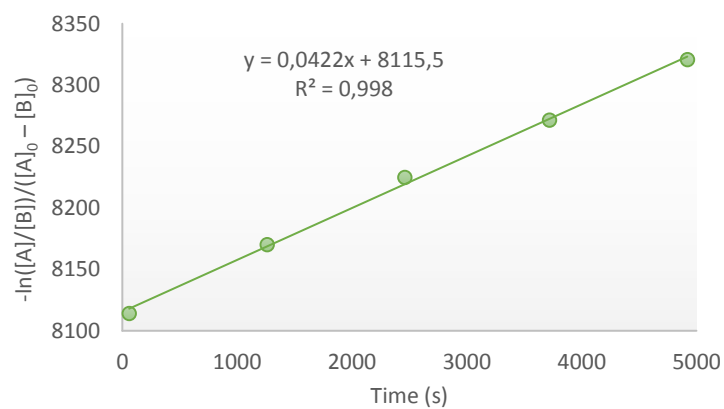
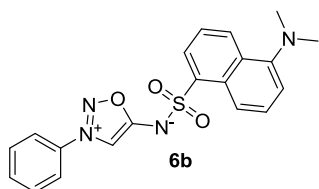
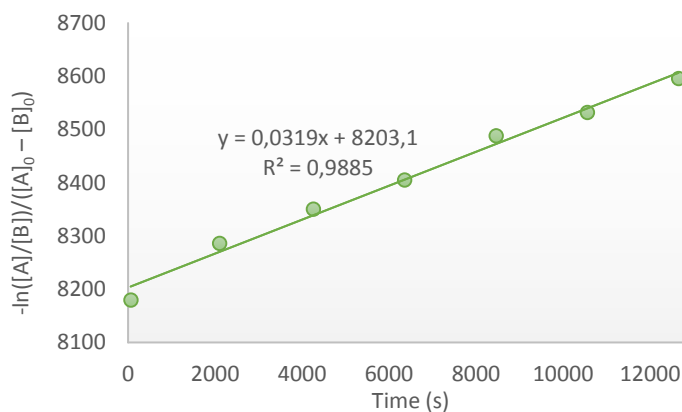
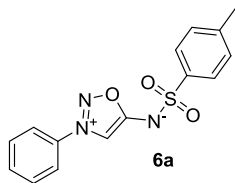
$$\frac{-\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + \text{const}$$

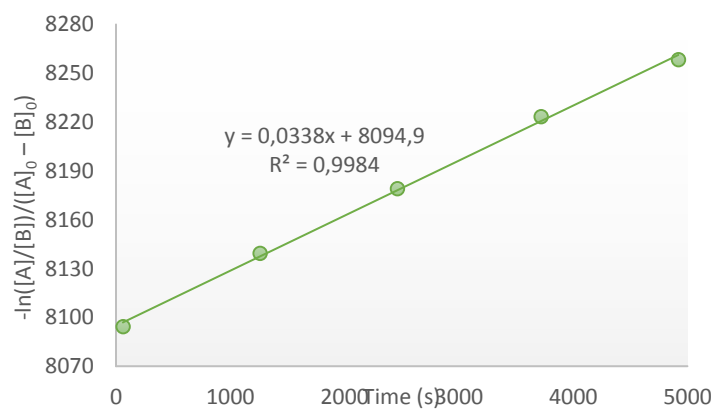
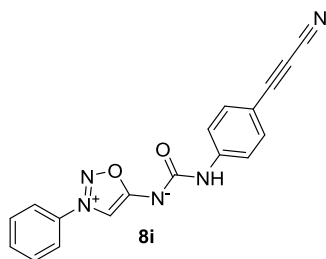
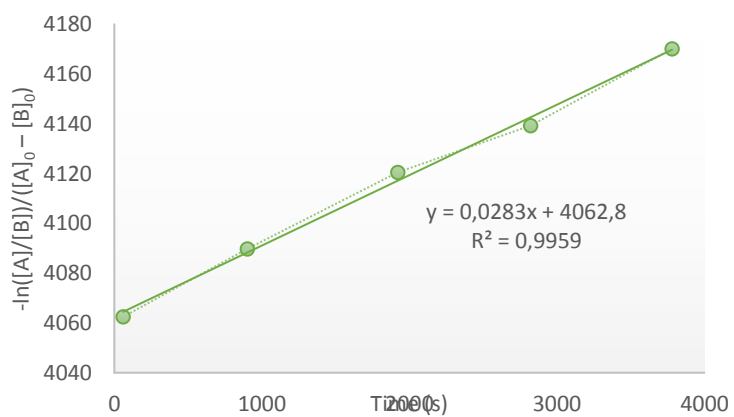
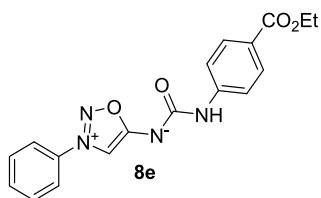
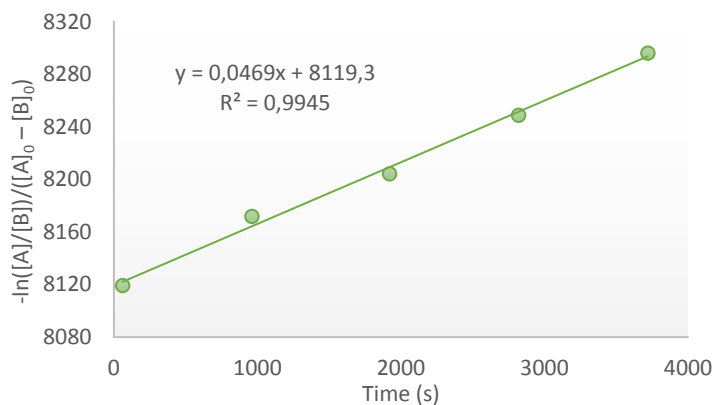
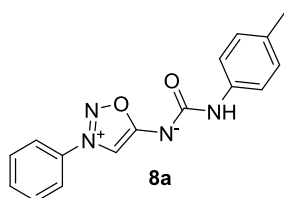
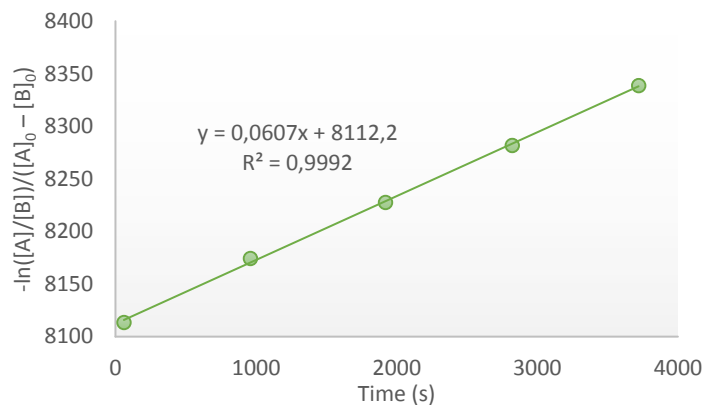
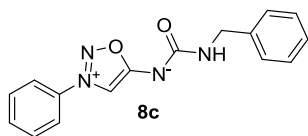
Equation S7 : [A]—concentration of iminosydnone (M); [B]—concentration of BCN (M); t—reaction time (s);
k—reaction rate ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

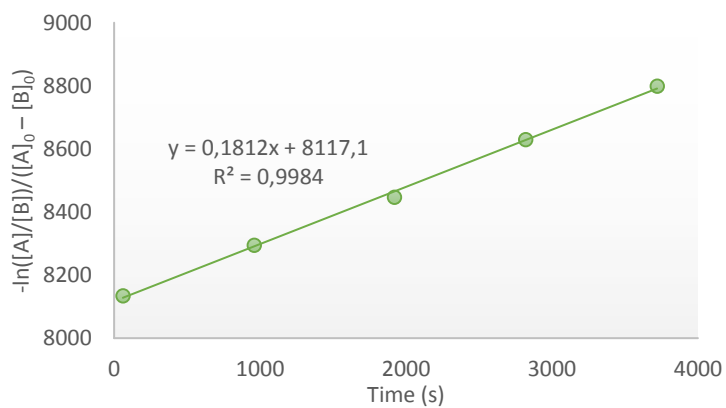
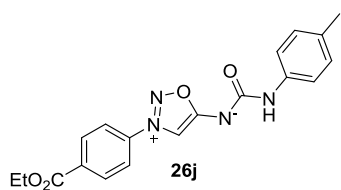
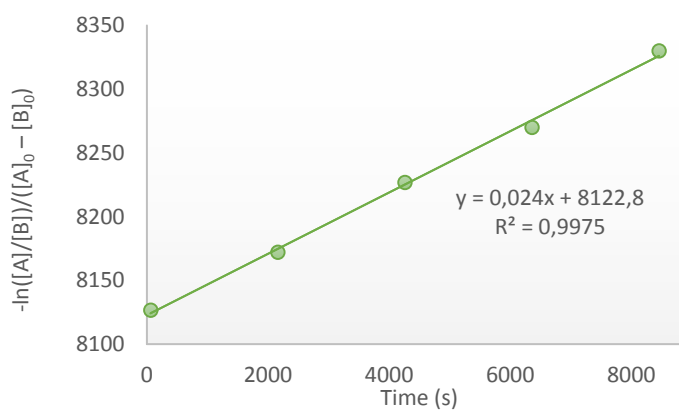
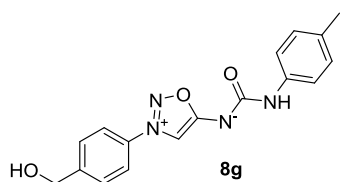
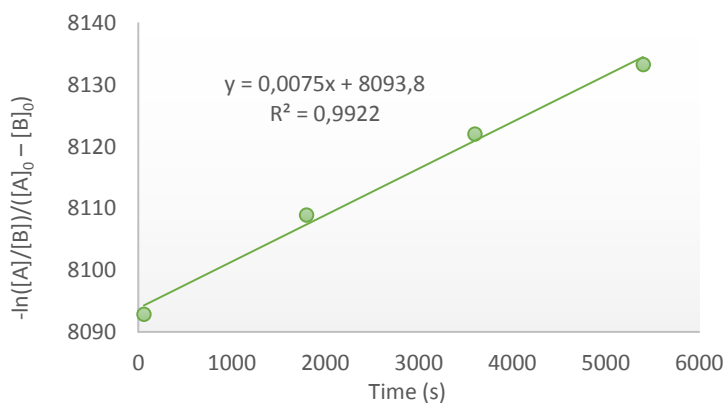
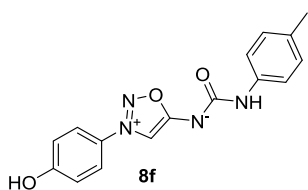
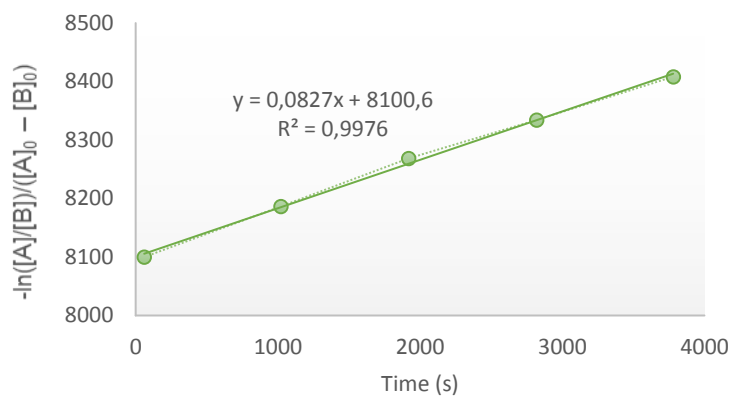
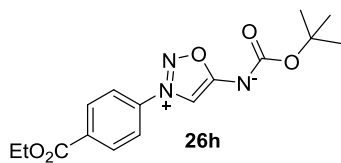
Linear regression curves for the reactive iminosydnone are illustrated in **Table S15**.

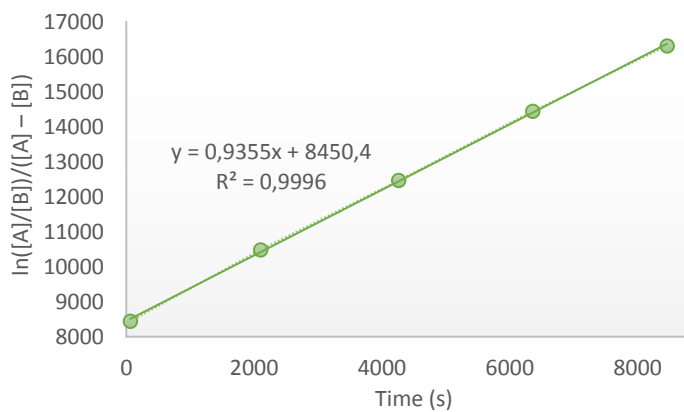
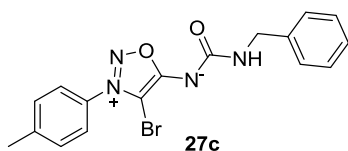
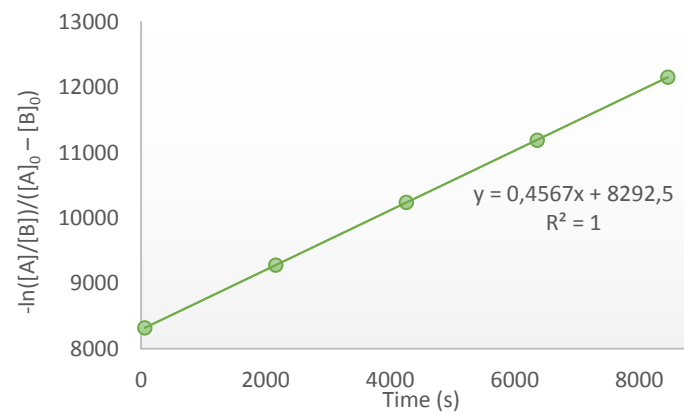
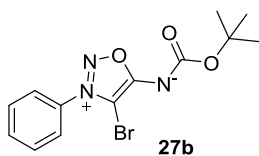
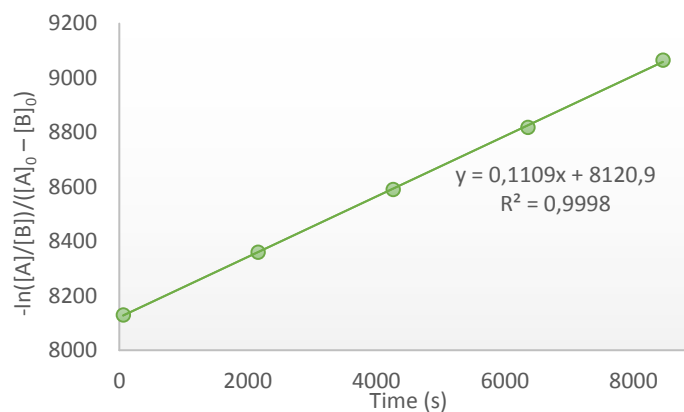
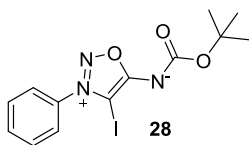
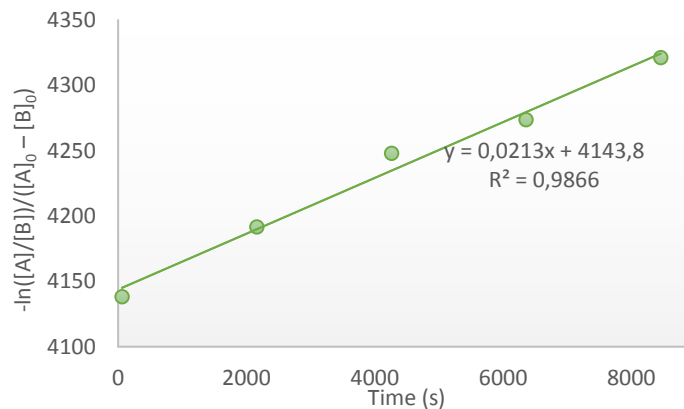
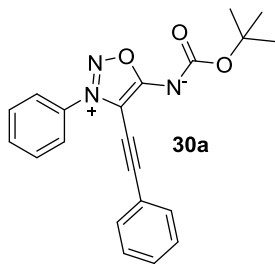
Table S15 : Linear regression curves showing $-\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ plotted versus time

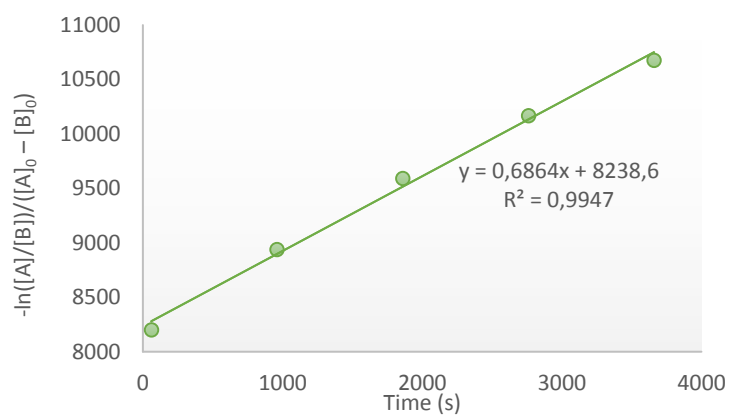
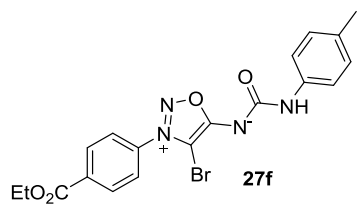








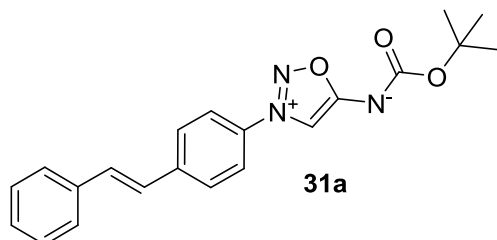




III. Experimental Part: Part II

A. Synthetic Procedure and Analytical Data

(E)-(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (31a)



$C_{21}H_{21}N_3O_3$
MW: 363 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 77%

To a stirred solution of styrene (115 μ L, 1.0 mmol), Pd(OAc)₂ (4.5 mg, 0.02 mmol), dppe (8.0 mg, 0.02 mmol) and NEt₃ (56 μ L, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) at 80 °C was added **7c** (78 mg, 0.20 mmol) in DMF (2 mL) over a period of 2 hours. The mixture was stirred overnight. After cooling at room temperature, the mixture was filtered over a celite plug and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 80/20 to 70/30) to afford the desired product as a yellow solid (56 mg, 77%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.72 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.39 (m, 2H), 7.33 (m, 1H), 7.25 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 1.53 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.8, 161.1, 142.4, 136.2, 133.0, 132.3, 129.0 (2C), 129.0, 128.0 (2C), 127.1 (2C), 126.0, 121.7 (2C), 102.1, 79.1, 28.4 (3C).

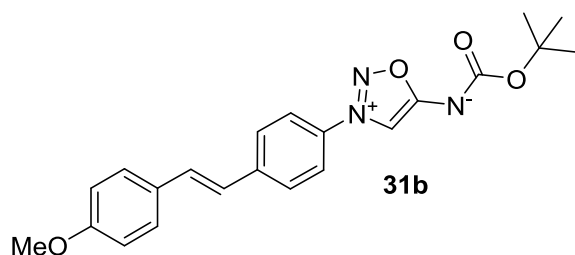
IR (cm⁻¹): 2976, 1655, 1600, 1450, 1366, 1295, 1221, 1163, 1051, 1009, 966, 881, 814.

HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₂N₃O₃ [M+H]⁺ : 364.1656; found: 364.1656;

calcd. for C₂₁H₂₁N₃NaO₃. [M+Na]⁺ : 386.1475; found: 386.1473.

Mp.: 179–180 °C.

(E)-(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(4-methoxystyryl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (31b)



$C_{22}H_{23}N_3O_4$
MW: 393 g.mol⁻¹
Light orange solid
Yield: 30%

To a stirred solution of *p*-vinylanisole (133 μ L, 1.0 mmol), Pd(OAc)₂ (4.5 mg, 0.02 mmol), dppe (8.0 mg, 0.02 mmol) and NEt₃ (56 μ L, 0.40 mmol) in DMF (2 mL) at 80 °C was added **7c** (78 mg, 0.20 mmol) in DMF (2 mL) over a period of 2 hours. The mixture was stirred overnight. After cooling at room temperature, the mixture was filtered over a celite plug and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, heptane/EtOAc, from 85/15 to 75/25) to afford the desired product as a yellow solid (24 mg, 30%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.47 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.52 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.8, 161.0, 160.3, 142.8, 132.5, 132.0, 129.0, 128.4 (2C), 127.7 (2C), 123.8, 121.6 (2C), 114.4 (2C), 102.0, 79.1, 55.4, 28.4 (3C).

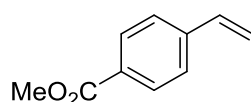
IR (cm⁻¹): 2931, 1658, 1579, 1440, 1364, 1289, 1251, 1156, 1049, 1006, 963, 833.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₂₄N₃O₄ [M+H]⁺ : 394.1761; found: 394.1762;

calcd. for C₂₂H₂₃N₃NaO₄. [M+Na]⁺ : 416.1581; found: 416.1581.

Mp.: 153–154 °C.

methyl 4-formylbenzoate (**S6**)



S6

C₁₀H₁₀O₂

MW: 162 g·mol⁻¹

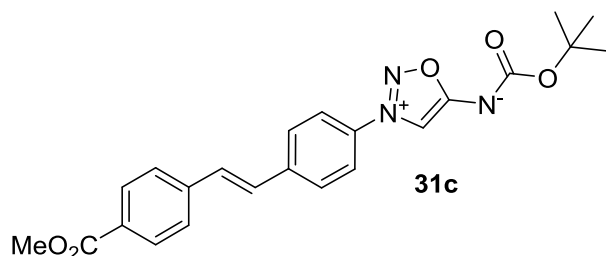
White solid

Yield: 62%

To an anhydrous solution of Ph₃PMeBr (1.19 g, 3.34 mmol) in THF (10 mL) at -78 °C was added a solution of *n*BuLi in hexanes (2.5M, 1.4 mL, 3.34 mmol), and the mixture was stirred at 0 °C for 30 min. The mixture was cooled down at -78 °C and a solution of methyl 4-formylbenzoate (498 mg, 3.03 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 1 hour at room temperature. A saturated solution of ammonium carbonate was added and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, 95/5) to afford the desired product as a white solid (306 mg, 62%). The spectral data (¹H-NMR) was consistent with reported one.³⁰³

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.73 (dd, *J* = 17.6 Hz, *J* = 10.9 Hz, 1H), 5.85 (d, *J* = 17.6 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H).

(*E*)-(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-(4-(methoxycarbonyl)styryl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (**31c**)



31c

C₂₃H₂₃N₃O₅

MW: 421 g·mol⁻¹

Yellow solid

Yield: 41%

To a stirred solution of **S6** (264 mg, 1.63 mmol), Pd(OAc)₂ (18 mg, 0.08 mmol), dppe (32 mg, 0.08 mmol) and NEt₃ (230 μL, 1.63 mmol) in DMF (8 mL) at 80 °C was added **7c** (315 mg, 0.81 mmol) in DMF (8 mL) over a period of 12 hours. The mixture was stirred overnight. After cooling at room temperature, the mixture was filtered over a celite plug and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, DCM/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to afford the desired product as a yellow solid (140 mg, 41%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 1.53 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.8, 166.7, 161.0, 141.8, 140.5, 132.7, 131.8, 130.3 (2C), 130.1, 128.4 (3C), 126.9 (2C), 121.8 (2C), 102.1, 79.1, 52.3, 28.4 (3C).

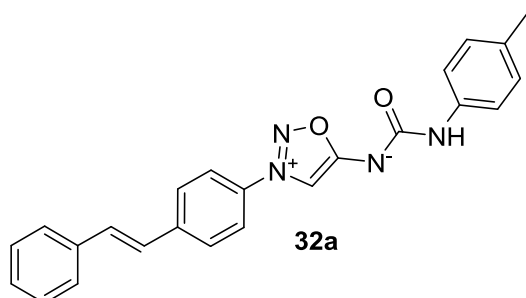
IR (cm⁻¹): 2977, 1709, 1663, 1606, 1439, 1364, 1306, 1222, 1171, 1110, 972.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₂₄N₃O₅ [M+H]⁺ : 422.1710; found: 422.1709;

³⁰³ A. Yokoyama, T. Maruyama, K. Tagami, H. Masu, K. Katagiri, I. Azumaya, T. Yokozawa, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3207–3210.

calcd. for $C_{23}H_{24}N_3NaO_5$. $[M+Na]^+$: 444.1530; found: 444.1531.
Mp.: 201–202 °C

(E)-(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (32a)



$C_{24}H_{20}N_4O_2$
MW: 396 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 52%

To a solution of **31a** (36 mg, 0.10 mmol) in DCM (5 mL) was added TFA (115 μ L, 1.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces. The crude product was suspended in DCM (2 mL) and *p*-tolyl isocyanate (14 μ L, 0.11 mmol) was added at room temperature. A solution of NaHCO₃ (12 mg, 0.15 mmol) in water (2 mL) was then added dropwise and the resulting biphasic mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was then extracted with DCM. The organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by preparative TLC (SiO₂, Heptane/EtOAc 1/1) to afford the desired product as a yellow solid (20.6 mg, 52 %)

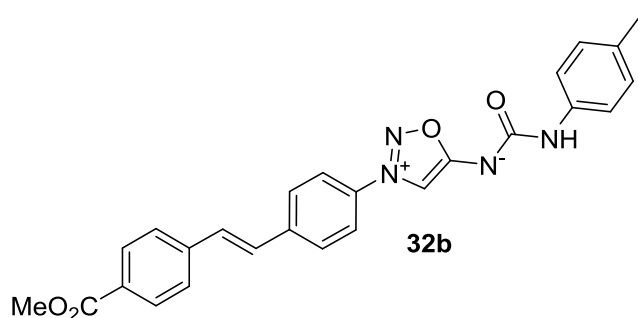
¹H NMR (400 MHz, DMSO *d*₆): δ 9.35 (br.s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.57–7.47 (m, 3H), 7.45–7.29 (m, 4H), 7.03 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 2.22 (s, 3H).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO *d*₆): δ 172.3, 158.7, 141.4, 138.5, 136.5, 132.4, 131.8, 129.9, 128.9 (2C), 128.8 (2C), 128.4, 127.8 (2C), 126.9 (2C), 126.5, 122.4 (2C), 117.9 (2C), 102.5, 20.4.

IR (cm⁻¹): 2923, 1641, 1597, 1515, 1403, 1356, 1313, 1241, 1197, 963, 819.

LCMS (ESI) *m/z*: $[M+H]^+$ 397.

Mp.: 189–191 °C.

(E)-(3-(4-(4-(methoxycarbonyl)styryl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (32b)



$C_{26}H_{22}N_4O_4$
MW: 454 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 34%

To a solution of **31c** (42 mg, 0.10 mmol) in DCM (5 mL) was added TFA (115 μ L, 1.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces. The crude product was suspended in DCM (2 mL) and *p*-tolyl isocyanate (14 μ L, 0.11 mmol) was added at room temperature. A solution of NaHCO₃ (12 mg, 0.15 mmol) in water (2 mL) was then added dropwise and the resulting biphasic mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was then extracted with DCM. The organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was purified by preparative TLC (SiO₂, heptane/EtOAc 1/1) to afford the desired product as a yellow solid (15.3 mg, 34 %).

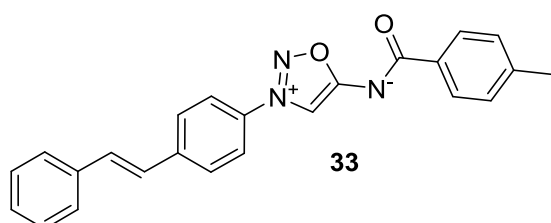
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): δ 9.34 (br. s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.22 (s, 3H).

The compound was not soluble enough to afford a ¹³C NMR spectrum

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺ 455.

Mp.: 181–182 °C.

(E)-(4-methylbenzoyl)(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (33)



C₂₄H₁₉N₃O₂
MW: 381 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 28%

To a solution of **31a** (36 mg, 0.10 mmol) in DCM (2 mL) was added a solution of HCl in dioxane (4M, 1.75 mL, 70 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight before being evaporated under *vacuum*.

A solution of *p*-toluic acid (19 mg, 0.15 mmol), DMAP (2.4 mg, 0.02 mmol), and EDCI (29 mg, 0.15 mmol) in a mixture MeCN/DCM (1/4, 1 mL) was stirred for 1 hour at room temperature. The crude deprotected iminosydnone salt (0.10 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 days. The reaction was quenched with brine and the aqueous layer was extracted with DCM. The organic layers were combined, washed with a saturated solution of Na₂CO₃, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by preparative TLC (SiO₂, heptane/EtOAc 80/20) to obtain **3** (11.0 mg, 28%) as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (s, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.44–7.31 (m, 3H), 7.27 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H).

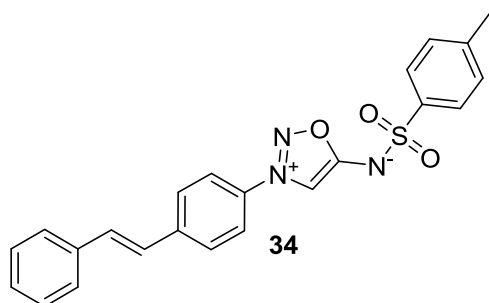
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 174.6, 174.5, 142.6, 142.2, 136.3, 134.5, 133.1, 132.5, 129.7 (2C), 129.1 (2C), 129.0, 128.9 (2C), 128.2 (2C), 127.1 (2C), 126.1, 121.8 (2C), 104.0, 21.8.

IR (cm⁻¹): 3185, 2628, 1574, 1550, 1437, 1324, 976, 816.

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺ 382.

Mp.: 222–223 °C.

(E)-(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(tosyl)amide (34)



C₂₃H₁₉N₃O₃S
MW: 417 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 33%

To a solution of **1a** (36 mg, 0.10 mmol) in DCM (5 mL) was added TFA (115 μL, 1.5 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces. The crude product was suspended in DCM (2 mL) and tosyl chloride (21 mg, 0.11 mmol) was added at room temperature. A solution of NaHCO₃ (12 mg, 0.15 mmol) in water (2 mL) was then added dropwise and the resulting biphasic mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was then

extracted with DCM. The organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , heptane/EtOAc, from 80/20 to 50/50) to afford the desired product as an orange solid (14 mg, 33%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.50 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 16.5$ Hz, 1H), 7.45–7.32 (m, 6H), 2.36 (s, 3H).

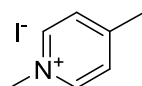
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 170.2, 142.6, 142.3, 140.5, 136.9, 132.5, 132.4, 129.8 (2C), 129.3 (2C), 128.9, 128.1 (2C), 127.4 (2C), 126.9, 126.5 (2C), 123.2 (2C), 102.5, 21.4.

IR (cm^{-1}): 2924, 2854, 1599, 1584, 1451, 1361, 1283, 1147, 1091, 909, 819.

LCMS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 418.

Mp.: >236 °C decomp.

1,4-dimethylpyridin-1-ium iodide (35)



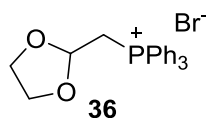
35

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{IN}$
MW: 235 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Light pink solid
Yield: 95%

Compound **35** was synthesized according to a reported procedure.²¹⁵ To a solution of picoline (1.00 g, 10.7 mmol) in dichloromethane (4.0 mL) was added iodomethane (1.0 mL, 16.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature during 2 h. Heptane was added and the precipitate formed was filtered. 2.39 g (10.2 mmol, 95%) of compound **35** were isolated.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.81 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.26 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

(1,3-dioxolan-2-ylmethyl)triphenylphosphonium bromide (36)



36

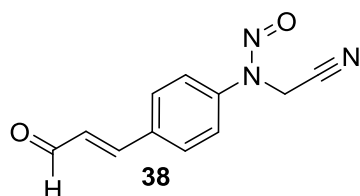
$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{BrO}_2\text{P}$
MW: 426 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
White solid
Yield: 44%

Compound **36** was synthesized according to reported procedure.³⁰⁴ 2-bromo-1,3-dioxolane (1.00 g, 6.00 mmol) and triphenylphosphine (1.57 g, 6.00 mmol) were heated at 100 °C overnight. The cooled product was filtered and washed with Et₂O. The crude product was purified by recrystallization from H₂O/EtOH 2/8. 1.14 g (2.65 mmol, 44%) of compound **36** were isolated.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.91–7.71 (m, 15H), 5.19 (m, 1H), 4.22 (dd, $J = 14.3$ Hz, $J = 4.7$ Hz, 2H), 3.72 (m, 4H).

LCMS (ESI): m/z : $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 349.

(E)-N-(cyanomethyl)-N-(4-(3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)nitrous amide (38)



38

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$
MW: 215 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Brown oil
Yield: 28%

To a solution of compound **26I** (14 mg, 0.05 mmol) in dichloromethane (2 mL) was added TDA-1 (16 μL , 0.05 mmol), a saturated solution of K_2CO_3 (2 mL) and compound **36** (21 mg, 0.05 mmol). The solution was refluxed overnight. The aqueous layer was extracted three times with dichloromethane. The

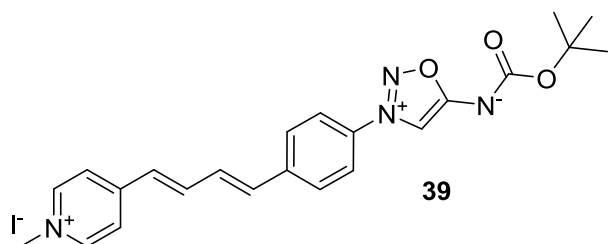
³⁰⁴ Cresp, T. M.; Sargent, M. V.; Vogel, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 37–41.

organic layers were combined, washed with H₂O, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure to obtain compound **37** as a ratio Z/E of 1/0.7 with triphenylphosphine oxide.

The crude product was then dissolved in a THF/water mixture (0.5 mL/0.5 mL). Acetic acid (0.25 mL) was added and the mixture was stirred at 60 °C for 6 hours. The product was then extracted with DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃. The organic layers were separated, dried over MgSO₄ and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 70/30 to 50/50) to afford product **38** (3 mg, 28%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.52 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 15.4 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H).

(tert-butoxycarbonyl)(3-(4-((1E,3E)-4-(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)buta-1,3-dien-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide (39)



C₂₃H₂₅N₄O₃
MW: 532 g.mol⁻¹
Brown solid
Yield: 39%

3 drops of piperidine were added to a solution of **26b** (152 mg, 0.39 mmol) and **35** (82 mg, 0.35 mmol) in MeOH (8 mL). The mixture was stirred at 60 °C for 2h. Most of the MeOH was evaporated and cold Et₂O was added. The product was collected by filtration and purified by preparative TLC (Alumina, DCM/MeOH, 90/10), to afford 72 mg (39%) of the desired product as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.72 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.38 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.79 (dd, *J* = 15.6 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 15.6 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 3H), 1.51 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄): δ 163.2, 159.9, 153.1, 144.7 (2C), 141.0, 137.8, 133.5, 130.9, 128.6 (2C), 128.1, 123.6 (2C), 122.2 (2C), 78.6, 46.4, 27.1 (3C).

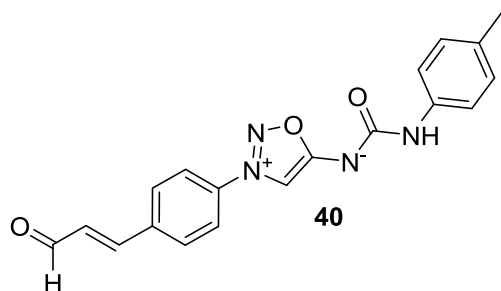
2 carbons are missing.

IR (cm⁻¹): 1643, 1605, 1293, 1158, 1007.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₂₅N₄O₃ [M]⁺ : 405.1921; found: 405.1922;

Mp. 194–196 °C.

(E)-(3-(4-(3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)(p-tolylcarbamoyl)amide (40)



C₁₉H₁₆N₄O₃
MW: 348 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 32%

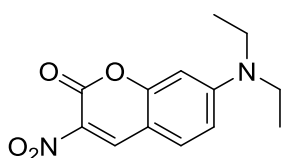
To a solution of **26b** (63 mg, 0.20 mmol) in DCM (2 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The solvent was evaporated under *vacuum* and co-evaporated several times with methanol.

The crude product was dissolved in DMF (2 mL) and *p*-tolyl isocyanate (38 μL, 0.30 mmol) was added. The mixture was stirred at -20 °C and DIPEA (105 μL, 0.60 mmol) was added. The resulting solution was stirred overnight warming up to room temperature. The product was extracted with DCM and was washed with a saturated solution of ammonium chloride. the organic layers were separated, dried

over MgSO₄ and evaporated under reduce pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, 30/70) to afford the desired product as a yellow solid (22 mg, 32%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.77 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.22 (br.s, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.80 (dd, *J* = 16.1 Hz, *J* = 7.4 Hz, 1H).

7-(diethylamino)-3-nitro-2H-chromen-2-one (41)



41

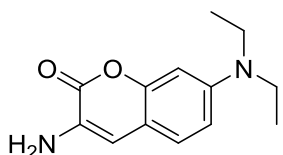
C₁₃H₁₄N₂O₄
MW: 262 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 68%

The product was synthesized according to a reported procedure.¹⁸¹ A mixture containing *n*-butanol (2.8 mL), 4-diethylamino salicylaldehyde (193 mg, 1.0 mmol), ethyl nitroacetate (111 μL, 1.0 mmol), piperidine (14 μL) and acetic acid (29 μL) was refluxed for a period of 24 hours. The crude product was evaporated and then purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as a yellow solid (180 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.71 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 9.1 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.48 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺263.

3-amino-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-one (42)



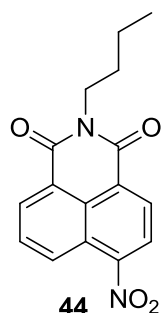
42

C₁₃H₁₆N₂O₂
MW: 232 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 68%

The product was synthesized according to a reported procedure.¹⁸¹ In a round bottomed flask equipped with a magnetic stirrer, were placed in order, 37.4% HCl (3 mL), stannous chloride dihydrate (1.03 g, 4.58 mmol). To this suspension **41** (160 mg, 0.61 mmol) was added at room temperature in small portions, over a period of thirty minutes. Stirring was continued for 4 h before the solution was poured onto ice and made alkaline using sodium hydroxide solution (5 M). The resulting suspension was then extracted with diethyl ether (2 X 25 mL). The organic layer was washed with water, dried over MgSO₄ and concentrated to a pasty residue which upon triturating using heptane gave the desired product as a yellow solid (107 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.85 (br.s, 2H), 3.35 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺.233.

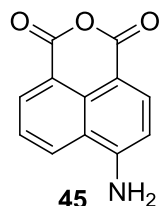
2-butyl-6-nitro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (44)

$C_{16}H_{14}N_2O_4$
MW: 298 g.mol⁻¹
Brown solid
Yield: 46%

The product was synthesized according to a reported procedure.²²⁰ *n*-butylamine (110 μ L, 1.1 mmol) was quickly added to a cloudy solution of 4-nitro-1,8-naphthalic anhydride (243 mg, 1.0 mmol) in ethanol (7 mL). After being refluxed for 6 hours under N_2 , the reaction was cooled down to 0 °C. The precipitate was collected to afford the desired product (63 mg). The filtrate was concentrated and purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc) to obtain another 75 mg of the desired product.

¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.81 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.71 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (dd, J = 8.8 Hz, J = 7.5 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺ 299.

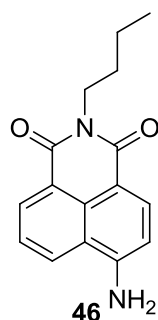
6-aminobenzo[de]isochromene-1,3-dione (45)

$C_{12}H_7NO_3$
MW: 213 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 65%

The product was synthesized according to a reported procedure.²²¹ To a stirred cloudy solution of compound 1,8-naphthalic anhydride (1.0 g, 4.1 mmol) in ethanol (2 mL) was added dropwise the solution of $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (4.6 mg, 20.5 mmol) in concentrated hydrochloric acid (3.5 mL) at room temperature. The reaction was heated to reflux for 2 h. After cooling down to room temperature, aqueous solution of Na_2CO_3 (10%) was added to quench the reaction. The precipitate was collected by filtration, washed with water (3×10 mL), EtOH and Et₂O and dried in vacuo to afford the product **45** as an orange solid (568 mg, 65%), which was directly used without further purification.

¹H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (br.s, 2H), 7.68 (dd, J = 7.9 Hz, J = 7.3 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H).

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺ 214.

6-amino-2-butyl-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (46)

$C_{12}H_{17}NO_3$
MW: 268 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 88-99%

Method A:

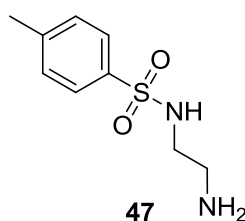
The product was synthesized according to a reported procedure.²²⁰ A stirred cloudy solution of **44** (138 mg, 0.46 mmol) in ethanol (5 mL) was added dropwise to the solution of SnCl₂·2H₂O (679 mg, 3 mmol) in concentrated hydrochloric acid (1 mL) at room temperature for 15 min. The reaction was quenched with aqueous 10% Na₂CO₃ and filtered. After being washed with water (3 × 10 mL), the residue was dried in vacuo. The residue was suspended in a mixture of DCM and MeOH was filtered. The solid was washed with DCM and MeOH until the solvent remain colourless. The filtrate was evaporated to afford the desired compound as an orange solid (99%).

Method B:

The product was synthesized according to a reported procedure.²²¹ *n*-butylamine (200 μL, 2.0 mmol) was quickly added to a cloudy solution of **45** (213 mg, 1.0 mmol) in ethanol (20 mL). After refluxing for 16 hours, the reaction was allowed to cool to room temperature. The solvent was removed in vacuo, and the crude product was purified by silica gel column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 95/5) to give 235 mg of compound **46** (88%)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.56 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.99 (br.s, 2H), 4.13 (m, 2H), 1.67 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ 269.

***N*-(2-aminoethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (47)**

$C_9H_{14}N_2O_2S$
MW: 214 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 84%

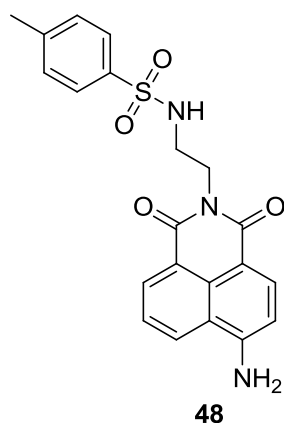
The product was synthesized according to a reported procedure.³⁰⁵ A mixture of *p*-toluenesulfonyl chloride (1.91 g, 10 mmol) in dichloromethane (25 mL) was slowly added to a stirred solution of ethylenediamine (6.7 mL, 100 mmol) in dichloromethane (25 mL). The resulting mixture was stirred overnight and washed twice with distilled water (25 mL) and dried over CaH₂. The solvent was removed in vacuo to give a fine white powder (1.79 g, 84%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.93 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 2.41 (s, 3H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ 215.

³⁰⁵ R. Pedrosa, J. M. Andrés, R. Manzano, C. Pérez-López, *Tetrahedron Letters* **2013**, *54*, 3101–3104.

***N*-(2-(6-amino-1,3-dioxo-1*H*-benzo[de]isoquinolin-2(3*H*)-yl)ethyl)-4-methylbenzenesulfonamide (48)**



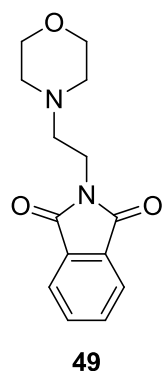
$C_{21}H_{19}N_3O_4S$
MW: 409 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 41%

47 (106 mg, 0.50 mmol) was quickly added to a cloudy solution of **45** (107 mg, 0.5 mmol) in ethanol (5 mL). After being refluxed for 24 hours under N₂, the reaction was cooled down and evaporated. The crude was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 95/5) to obtain the desired product as an orange solid (84 mg, 41%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.37, (m, 1H), 5.09 (br.s, 2H), 4.24 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 1.96 (s, 3H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺.410.

***2*-(2-morpholinoethyl)isoindoline-1,3-dione (49)**

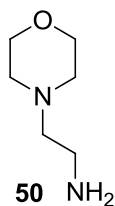


$C_{14}H_{16}N_2O_3$
MW: 260 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 53%

The product was synthesized according to a reported procedure.²²⁷ N-bromoethylphthalimide (2.03 g, 8.0 mmol) was stirred with morpholine (700 μL, 8 mmol) in DMF (50 mL) in the presence of DIPEA (1.7 mL, 9.6 mmol) at 100 °C for 24 h. The reaction mixture was concentrated and purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 100/0 to 90/10) to afford the desired product as a white solid (1.95 g, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.83 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.70 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 3.80 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.62 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H), 2.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.50 (m, 4H).

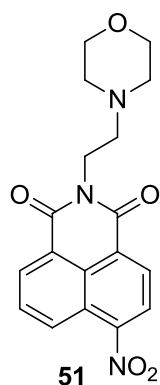
LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺261.

2-morpholinoethanamine (50)

C₆H₁₄N₂O
MW: 130 g.mol⁻¹
Incolor oil
Yield: 65%

The product was synthesized according to a reported procedure.²²⁷ A solution of **49** (385 mg, 1.48 mmol) was held at reflux with excess NH₂NH₂.H₂O (232 μ L) in EtOH (12 mL) at 80 °C for 24 hours. The precipitate was filtered off and triturated with Et₂O. The filtrate was collected and evaporated to dryness to obtain the desired product as an incolor oil (84 mg, 65%).

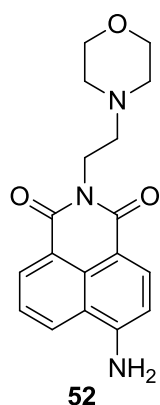
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.67 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 2.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.32–2.46 (m, 6H), 1.53 (br.s, 2H).

2-(2-morpholinoethyl)-6-nitro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (51)

C₁₈H₁₇N₃O₅
MW: 355 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 67%

50 (84 mg, 0.65 mmol) was quickly added to a cloudy solution of 4-nitro-1,8-naphthalic anhydride (105 mg, 0.43 mmol) in ethanol (1 mL). After being refluxed for 6 h under N₂, the reaction was allowed to cool down at room temperature and the solvent was evaporated. The crude was recrystallized in EtOH the desired product as a yellow solid (103 mg, 67%).

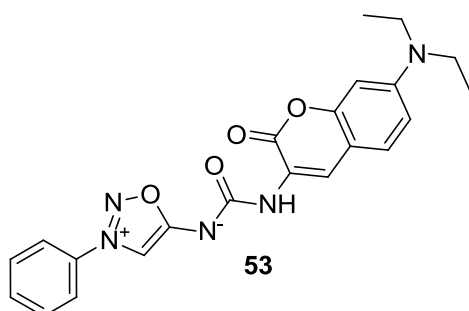
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.67 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.34 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.64 (m, 4H), 2.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.56 (m, 4H).

6-amino-2-(2-morpholinoethyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione (52)

$C_{18}H_{19}N_3O_3$
MW: 325 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 53%

To a solution of **51** (108 mg, 0.30 mmol) in EtOH (3 mL) was added dropwise a solution of SnCl₂·2H₂O (446 mg, 1.98 mmol) in concentrated HCl (0.6 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. A solution of Na₂CO₃ 10% was added to quench the reaction. The precipitate was filtered and washed with water to afford the desired product as an orange solid (52 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.92 (s, 2H), 4.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 2.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.58 (m, 4H).

((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (53)

$C_{22}H_{21}N_5O_4$
MW: 419 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 68%

A solution of 7-(Diethylamino)coumarin-3-carbonyl azide (8.6 mg, 0.030 mmol) in toluene (2 mL) was stirred at 100 °C for 30 minutes. The solvent was evaporated and the crude isocyanate was used without further purification.

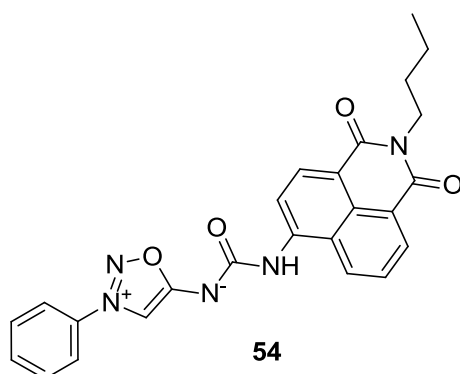
The crude mixture was dissolved in DMF (2.5 mL) and the mixture was stirred at -20 °C under argon atmosphere. **4a** (18 mg, 0.090 mmol) was added followed by the slow addition of DIPEA (16 μL, 0.090 mmol) during 30 min. After completion, the mixture was evaporated under *vacuum*. The crude product was purified by column chromatography (Heptane/EtOAc, 60/40) to afford the desired product as an orange solid (8.6 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.78–7.81 (m, 3H), 7.62–7.72 (m, 3H), 7.24 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.57 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 159.9, 159.7, 152.4, 148.9, 134.2, 133.2, 130.8 (2C), 128.3, 122.4, 121.7 (2C), 121.0, 109.6, 109.2, 102.4, 97.8, 44.9 (2C), 12.7 (2C).

IR (cm⁻¹): 1699, 1649, 1605, 1493, 1354, 1241, 1187, 961, 764.

((2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (54)



$C_{25}H_{21}N_5O_4$
MW: 455 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 45%

Triphosgene (20 mg, 0.066 mmol) was suspended in DCM (2 mL) and **46** (52 mg, 0.20 mmol) was added. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of NaHCO₃ (67 mg, 0.80 mmol) in H₂O (2 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 °C and **4a** was added. The mixture was stirred from 0 °C to room temperature overnight. The reaction was quenched with brine and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The product was purified preparative TLC (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the product as a yellow solid (41 mg, 45%).

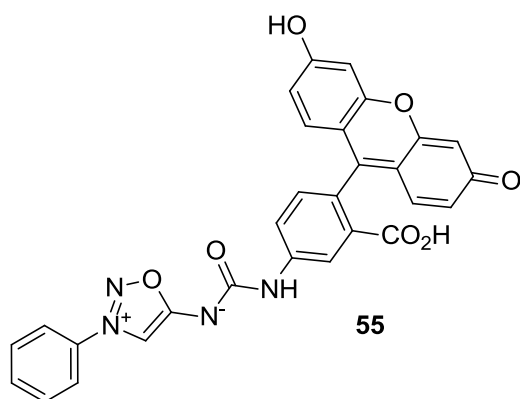
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.56–8.64 (m, 3H), 8.32 (s, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.11 (br.s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.65–7.74 (m, 4H), 4.15 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.8, 164.6, 164.1, 159.3, 141.2, 134.0, 133.5, 133.0, 131.3, 130.8 (2C), 129.3, 126.4, 126.4, 123.5, 122.8, 121.7 (2C), 116.7, 115.8, 103.1, 40.4, 30.5, 20.6, 14.1.

IR (cm⁻¹): 2958, 1650, 1582, 1527, 1494, 1352, 1239, 1191, 1090, 965, 775.

LCMS (ESI) m/z: [M+H]⁺ 456.

((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)carbamoyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (55)



$C_{29}H_{18}N_4O_7$
MW: 534 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 13%

6-amino-fluorescein (69 mg, 0.20 mmol) and triphosgene (20 mg, 0.066 mmol) were dissolved in freshly distilled acetone (4 mL). NaHCO₃ (50 mg, 0.60 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C. **4a** (59 mg, 0.30 mmol) was added and the suspension was stirred for 8h from 0 °C to room temperature. The reaction was degassed through a basic trap (pH=14). The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude was purified by preparative TLC (SiO₂, MeOH/DCM, 10/90) to afford the desired product as an orange solid (13 mg, 13%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.46 (s, 1H), 8.36 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.85 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.72–7.81 (m, 3H), 7.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.57 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz, 2H).

Product was not soluble enough to perform ¹³C NMR.

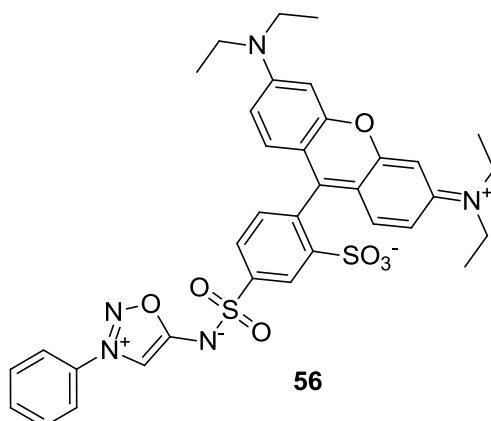
IR (cm⁻¹) 3374, 1580, 1468, 1328, 1111.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₉H₁₉N₄O₇ [M+H]⁺ : 535.1248; found: 535.1252;

calcd. for C₂₉H₂₀N₄O₇. [M+2H]²⁺ : 268.0661; found: 268.0664.

Mp. >300 °C.

((4-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl)sulfonyl)(3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (56)



C₃₅H₃₅N₅O₇S₂
MW: 701 g.mol⁻¹
Dark purple solid
Yield: 28%

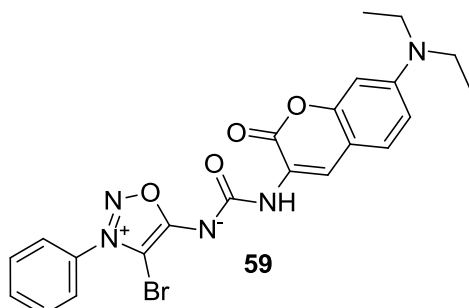
To a solution of **4a** (39 mg, 0.20 mmol) and sulforhodamine B sulfonyl chloride (58 mg, 0.10 mmol) in DMF (2mL) at -20 °C was added dropwise DIPEA (38 μL, 0.22 mmol) during 30 minutes. The mixture was stirred during 5h from -20 °C to room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a dark purple solid (20 mg, 28%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₆): δ 8.75 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.21 (dd, *J* = 8.0 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.69–7.79 (m, 3H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 6.96 (dd, *J* = 9.5 Hz, *J* = 2.5 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 3.65 (q, *J* = 7.1 Hz, 8H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₆): δ 172.6, 159.5 (2C), 158.0, 157.3 (2C), 147.0, 145.8, 135.4, 135.3, 134.6 (2C), 133.8 (2C), 132.6, 131.7 (2C), 129.0, 127.1, 123.6 (2C), 115.4, 115.2 (2C), 104.0, 97.1 (2C), 46.9 (4C), 13.0 (4C).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₃₅H₃₆N₅O₇S₂ [M+H]⁺ : 702.2051; found: 702.2048; calcd. for C₃₅H₃₇N₅O₇S₂. [M+2H]²⁺ : 351.6062; found: 351.6066; calcd. for C₃₅H₃₅N₅NaO₇S₂. [M+Na]⁺ : 724.1870; found: 724.1871

(4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)carbamoyl)amide (59)



C₂₂H₂₀N₅O₄
MW: 498 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 29%

To a solution of **27b** (68 mg, 0.20 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces and obtain the product **57**.

In another flask, **42** (46 mg, 0.20 mmol) and triphosgene (20 mg, 0.066 mmol) were dissolved in freshly distilled acetone (4 mL). NaHCO₃ (50 mg, 0.60 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C.

The crude **57** was added and the suspension was stirred for 8h from 0 °C to room temperature. The reaction was degassed through a basic trap (pH=14). The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as an orange solid (29 mg, 29%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (s, 1H), 7.72 (br.s, 1H), 7.61–7.72 (m, 5H), 7.25 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.48 (m, 1H), 3.37 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H).

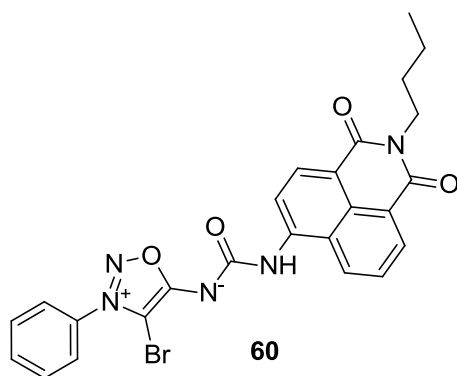
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.8, 159.8, 157.8, 152.3, 148.9, 133.1, 133.0, 130.3 (2C), 128.4, 125.1 (2C), 123.1, 120.6, 109.6, 109.2, 97.6, 90.8, 44.9 (2C), 12.6 (2C).

IR (cm⁻¹): 1691, 1609, 1479, 1404, 1356, 1243, 1190, 1161, 1128, 1045, 762, 730.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ 500.

Mp. 187–189 °C.

(4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)carbamoyl)amide (60)



C₂₅H₂₀BrN₅O₄
MW: 534 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 45%

To a solution of **27b** (68 mg, 0.20 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces and obtain the product **57**.

In another flask, **46** (11 mg, 0.040 mmol) and triphosgene (4.0 mg, 0.014 mmol) were dissolved in freshly distilled acetone (1 mL). NaHCO₃ (34 mg, 0.40 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C.

The crude **57** was added and the suspension was stirred for 8h from 0 °C to room temperature. The reaction was degassed through a basic trap (pH=14). The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to afford the desired product as an orange solid (10 mg, 45%).

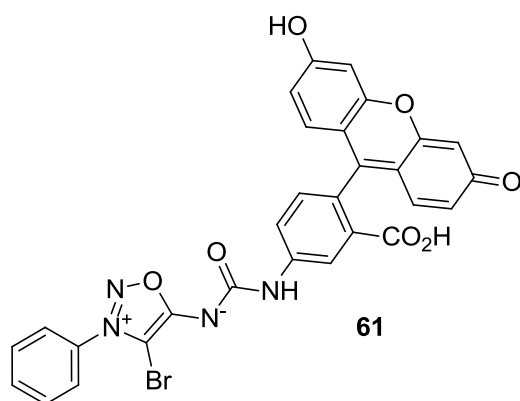
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.73 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.58–8.60 (m, 2H), 8.29 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.10 (br.s, 1H), 7.64–7.76 (m, 6H), 4.15 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 164.9, 164.4, 163.8, 151.0, 140.7, 133.2, 132.9, 132.6, 130.9, 130.3 (2C), 129.0, 126.2, 126.0, 124.9 (2C), 123.3, 122.4, 116.5, 115.9, 40.1, 30.2, 20.4, 13.8.

One carbon is missing.

IR (cm⁻¹): 1699, 1649, 1605, 1493, 1354, 1241, 1187, 961, 764.

(4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-5-yl)carbamoyl)amide (61)



C₂₉H₁₇BrN₄O₇
MW: 613 g.mol⁻¹
Orange solid
Yield: 11%

To a solution of **27b** (68 mg, 0.20 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces to obtain product **57**.

In another flask, 6-amino-fluorescein (69 mg, 0.20 mmol) and triphosgene (20 mg, 0.066 mmol) were dissolved in freshly distilled acetone (4 mL). NaHCO₃ (50 mg, 0.60 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C.

The crude **57** was added and the suspension was stirred for 8h from 0 °C to room temperature. The reaction was degassed through a basic trap (pH=14). The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude was purified by preparative TLC (SiO₂, AcOH/MeOH/DCM, 1/9/90) to afford the desired product as an orange solid (14 mg, 11%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.20 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.97 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.73–7.83 (m, 4H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.59–6.67 (m, 5H).

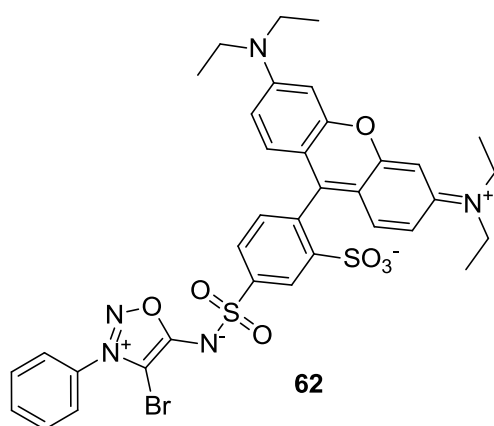
Product was not soluble enough to perform ¹³C NMR.

IR (cm⁻¹) 3384, 1588, 1465, 1384, 1208, 1111.

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺ 615.

Mp. 180 °C–decomp.

(4-bromo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl)sulfonyl)amide (62)



C₃₅H₃₄BrN₅O₇S₂
MW: 779 g.mol⁻¹
Dark purple solid
Yield: 6%

To a solution of **27b** (68 mg, 0.20 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces and obtain product **57**.

This residue was dissolved in DMF (2mL) and sulforhodamine B sulfonyl chloride (58 mg, 0.10 mmol) was added at -20 °C. DIPEA (38 μ L, 0.22 mmol) was added dropwise during 30 minutes. The mixture was stirred during 5 h from -20 °C to room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a dark purple solid (10 mg, 6%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_6): δ 8.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.30 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.9 Hz, 1H), 7.83 (m, 3H), 7.75 (m, 2H), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.00 (dd, J = 9.5 Hz, J = 2.5 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.67 (q, J = 7.2 Hz, 8H), 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 12H).

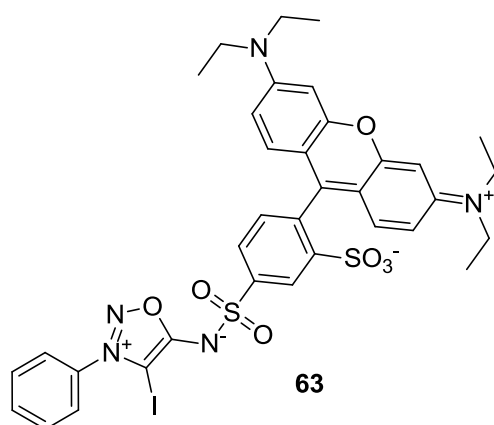
Product was not soluble enough to perform ^{13}C NMR.

IR (cm^{-1}) 1590, 1416, 1339, 1180, 1075, 683.

LCMS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 780.

Mp. 200 °C–decomp.

(4-iodo-3-phenyl-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-3-sulfonatophenyl)sulfonyl)amide (63)



$\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{IN}_5\text{O}_7\text{S}_2$
MW: 828 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Dark purple solid
Yield: 12%

To a solution of **28** (690 mg, 0.23 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces to obtain product **58**.

This residue was dissolved in DMF (2mL) and sulforhodamine B sulfonyl chloride (69 mg, 0.12 mmol) and DMAP (3.0 mg, 0.024 mmol) were added at -20 °C. DIPEA (46 μ L, 0.26 mmol) was added dropwise during 30 minutes. The mixture was stirred during 5h from -20 °C to room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude product was purified by preparative TLC to afford the desired product as a dark purple solid (23 mg, 12%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_6): δ 8.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.29 (dd, J = 8.0 Hz, J = 1.9 Hz, 1H), 7.71–7.83 (m, 5H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 6.99 (dd, J = 9.5 Hz, J = 2.5 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 2.5 Hz, 2H), 3.66 (q, J = 7.2 Hz, 8H), 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 12H).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_6): δ 169.3, 159.5 (2C), 158.1, 157.3 (2C), 147.1, 145.8, 135.8, 135.5, 134.4 (2C), 133.9 (2C), 132.4, 131.4 (2C), 129.4, 127.9, 127.2 (2C), 115.5, 115.2 (2C), 97.1 (2C), 47.0 (4C), 13.0 (4C).

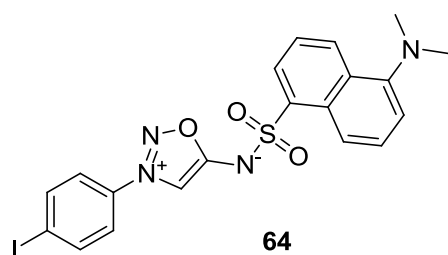
One carbon is missing.

IR (cm^{-1}) 1588, 1415, 1337, 1180, 1075, 683.

LCMS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$.828

Mp. 220 °C–decomp.

((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)(3-(4-iodophenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (64)



64

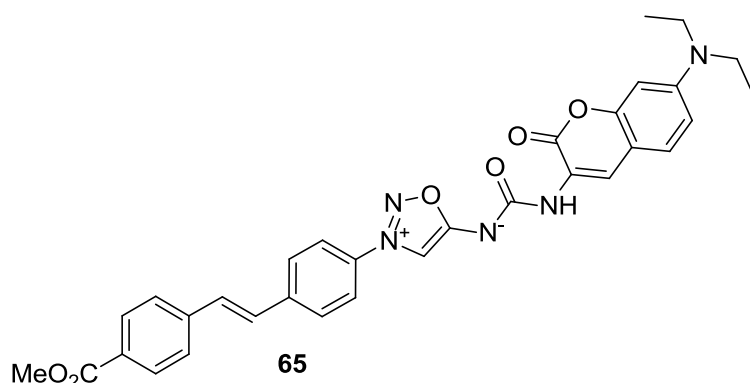
$C_{20}H_{17}IN_4O_3S$
MW: 520 g.mol⁻¹
Pale yellow solid
Yield: 14%

To a solution of **4d** (32 mg, 0.10 mmol) and DNS-Cl (30 mg, 0.11 mmol) in DMF (2 mL) was added DIPEA (39 μ L, 0.22 mmol) during 30 minutes at -20 °C. The mixture was stirred overnight warming up to room temperature. The reaction was extracted with DCM/ NH_4Cl_{sat} and the organic layers were separated, dried over $MgSO_4$ and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, 85/15) to afford the desired product as a pale yellow solid (7.4 mg, 14%).

¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.55 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 7.2 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.84 (s, 1H), 7.48–7.58 (m, 4H), 7.18 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 2.87 (s, 6H).

LCMS (ESI) m/z: $[M+H]^+$.521.

(E)-((7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)carbamoyl)(3-(4-(4-(methoxycarbonyl)styryl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (65)



65

$C_{32}H_{29}N_5O_6$
MW: 580 g.mol⁻¹
Red solid
Yield: 56%

To a solution of **31c** (81 mg, 0.19 mmol) in DCM (3 mL) was added TFA (770 μ L, 10 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces. In another flask triphosgene (19 mg, 0.064 mmol) was suspended in DCM (2 mL) and **42** (44 mg, 0.19 mmol) was added. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of $NaHCO_3$ (49 mg, 0.58 mmol) in H_2O (2 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 °C and the crude deprotected styryl-iminosydnone was added. The mixture was stirred from 0 °C to room temperature overnight. The reaction was quenched with brine and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over $MgSO_4$, filtered and evaporated under *vacuum*. The product was purified by column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc) to afford the product as a red solid (62 mg, 56%).

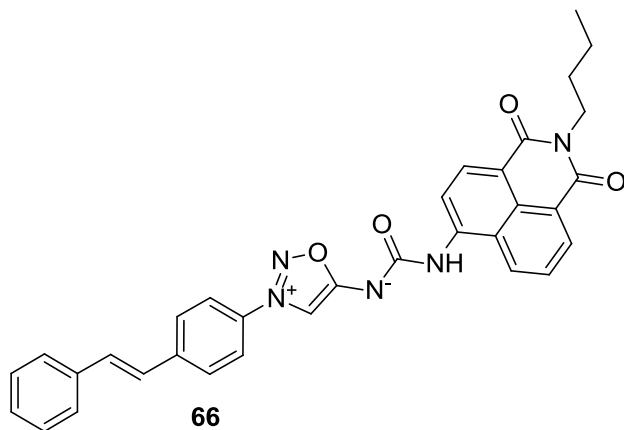
¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.29 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.70 (br.s, 1H), 7.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.10–7.19 (m, 3H), 6.53 (dd, J = 8.6 Hz, J = 2.5 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.30 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 173.0, 166.8, 159.5, 152.2, 148.8, 141.7, 140.6, 132.8, 131.5, 130.2 (2C), 130.0, 128.4 (3C), 128.1, 126.9 (2C), 122.1, 121.7 (2C), 120.8, 109.5, 109.1 (2C), 101.8, 97.6, 52.4, 44.8 (2C), 12.6 (2C).

IR (cm^{-1}): 3414, 2970, 1703, 1602, 1352, 1180, 1107, 961, 907, 764, 727.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{32}H_{30}N_5O_6$ $[M+H]^+$: 580.2191; found: 580.2190;
calcd. for $C_{32}H_{31}N_5O_6$. $[M+2H]^{2+}$: 290.6132; found: 290.6135.
Mp.: 140 °C –decomp.

(E)-((2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)carbamoyl)(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (66)



$C_{33}H_{27}N_5O_4$
MW: 558 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 7%

To a solution of **31a** (47 mg, 0.13 mmol) in DCM (1 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces.

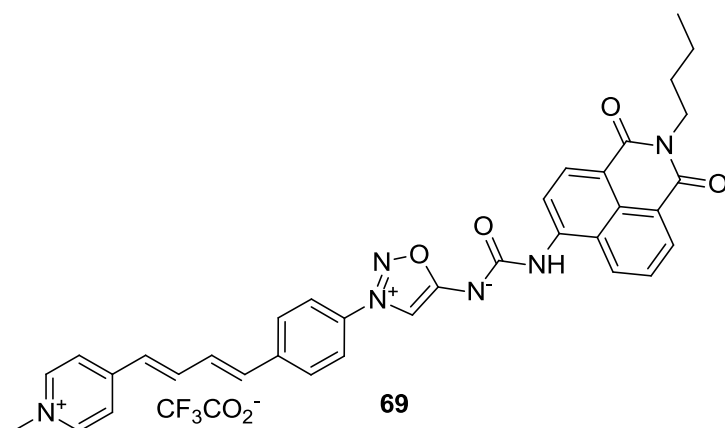
In another flask triphosgene (13 mg, 0.043 mmol) was suspended in DCM (1.5 mL) and **46** (34 mg, 0.13 mmol) was added. The suspension was cooled to 0 °C and a solution of NaHCO₃ (33 mg, 0.39 mmol) in H₂O (1.5 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 °C and the crude deprotected styryl-iminosydnone was added. The mixture was stirred from 0 °C to room temperature overnight. The reaction was quenched with brine and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The product was purified by preparative TLC (SiO₂, MeOH/DCM) to afford the product as a yellow solid (5 mg, 7%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.57–8.65 (m, 3H), 8.35 (s, 1H), 8.33 (m, 1H), 8.25 (br.s, 1H), 7.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.75 (m, 3H), 7.54 (m, 2H), 7.31–7.42 (m, 3H), 7.27 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 4.15 (m, 2H), 1.70 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

The small quantity of product did not permit to afford a ¹³C NMR spectra.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{33}H_{28}N_5O_4$ $[M+H]^+$: 558.2136; found: 558.2136;

((2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)carbonyl)(3-(4-((1E,3E)-4-(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)buta-1,3-dien-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide 2,2,2-trifluoroacetate (69)



$C_{37}H_{31}F_3N_6O_6$
MW: 713 g.mol⁻¹
Orange oil
Yield: 8%

To a solution of **39** (27 mg, 0.05 mmol) in DCM (2 mL) was added TFA (200 μ L). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times in order to get rid of TFA traces.

In another flask triphosgene (5 mg, 0.017 mmol) and **46** (13 mg, 0.05 mmol) were dissolved in freshly distilled acetone (1 mL). NaHCO₃ (14 mg, 0.17 mmol) was added and the resulting suspension was stirred for 30 min at 0 °C. and the crude deprotected pyridinium-iminosydnone was added. The suspension was stirred overnight from 0 °C to room temperature. The reaction was degassed through a basic trap (pH=14). The solvent was evaporated under *vacuum* and the crude was purified by preparative HPLC to afford the desired product as an orange oil (3 mg, 8%).

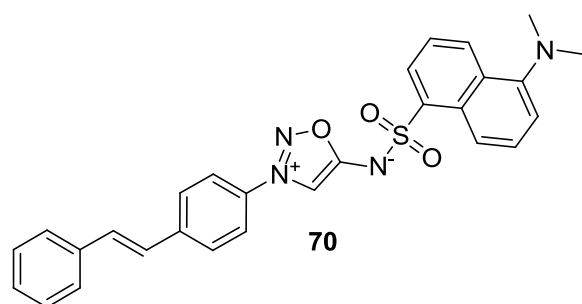
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₆): δ 8.72 (m, 2H), 8.50–8.60 (m, 6H), 8.09 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.84 (m, 3H), 7.75 (dd, J = 15.6 Hz, J = 10.5 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 15.6 Hz, J = 10.5 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 3H), 4.13 (m, 2H), 1.69 (m, 2H), 1.44 (m, 2H), 1.00 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

The small quantity of product did not permit to afford a ¹³C NMR spectra.

HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₅H₃₁N₆O₄ [M]⁺ : 599.2401; found: 599.2401;

calcd. for C₃₅H₃₂N₆O₄. [M+H]²⁺ : 300.1237; found: 300.1240

(E)-((5-(dimethylamino)naphthalen-1-yl)sulfonyl)(3-(4-styrylphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (70)



$C_{28}H_{24}N_4O_3S$
MW: 496 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 19%

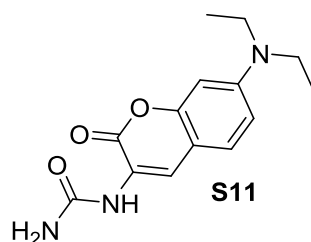
A solution of **31a** (27 mg, 0.074 mmol) in HCl/Dioxane (4 mL) was stirred at room temperature for 4 hours. The solvent was evaporated under *vacuum*. The crude product was solubilized in MeOH and evaporated again several times. The residue was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) and dansyl chloride (41 mg, 0.15 mmol) was added. The mixture was stirred at -20 °C and DIPEA (28 μ L, 0.16 mmol) was added dropwise during 30 minutes at -20 °C. The mixture was stirred from -20 °C to room temperature overnight. The reaction was quenched with a saturated solution of NH₄Cl and extracted with DCM. The combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and evaporated under *vacuum*. The product was purified by preparative TLC (SiO₂, DCM/MeOH) to afford the product as a yellow solid (7 mg, 17%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.46 (s, 1H), 8.41 (m, 2H), 8.34 (dd, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.60 (ddd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 7.4 Hz, *J* = 4.3 Hz, 2H), 7.50 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.31–7.44 (m, 4H), 7.23 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 2.81 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.7, 151.1, 141.8, 138.1, 136.4, 132.1, 131.9, 129.4, 129.0, 128.9 (3C), 128.5, 127.7 (2C), 127.5, 127.1, 127.0 (2C), 126.4, 123.5, 122.8 (2C), 120.4, 115.0, 102.1, 45.1 (2C).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₈H₂₅N₄O₃S [M+H]⁺ : 497.1641; found: 497.1640.

1-(7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)urea (S11)



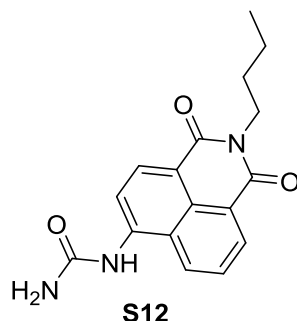
C₁₄H₁₇N₃O₃
MW: 275 g.mol⁻¹
Yellow solid

53 (8.6 mg, 20.5 μmol) and BCN (3.4 mg, 22.6 μmol) were solubilized in DMSO-*d*₆ (1 mL). The mixture was stirred at room temperature and the conversion was followed by NMR. Once completed, the reaction was diluted with DCM and HCl 1M was added. The aqueous layer was collected and NaOH 1M was added. The desired product precipitated and was obtained as a yellow solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): δ 8.21 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺276.

1-(2-butyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)urea (S12)



C₁₇H₁₇N₃O₃
MW: 311 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 40%

54 (16.7 mg, 37 μmol) and BCN (8.3 mg, 55 μmol) were solubilized in DMSO (1 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction was diluted with DCM and NH₄Cl_{sat}. The organic layer was collected, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude mixture was purified by preparative TLC (SiO₂, DCM/MeOH, 95/5) to afford the desired product as a yellow solid (4.6 mg, 40%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.30 (s, 1H), 8.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.57 (br.s, 2H), 4.03 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

LCMS (ESI) *m/z*: [M+H]⁺312.

B. Optical properties

Absorbances were measured on three solutions of compounds in dmsO except for compounds 69, 55, 61 and 69 (water/DMSO, 80/20). The molar extinction coefficients were determined by plotting absorbance values versus the concentrations and analyzing by linear regression (**Équation 3**). The molar extinction corresponds to the slope.

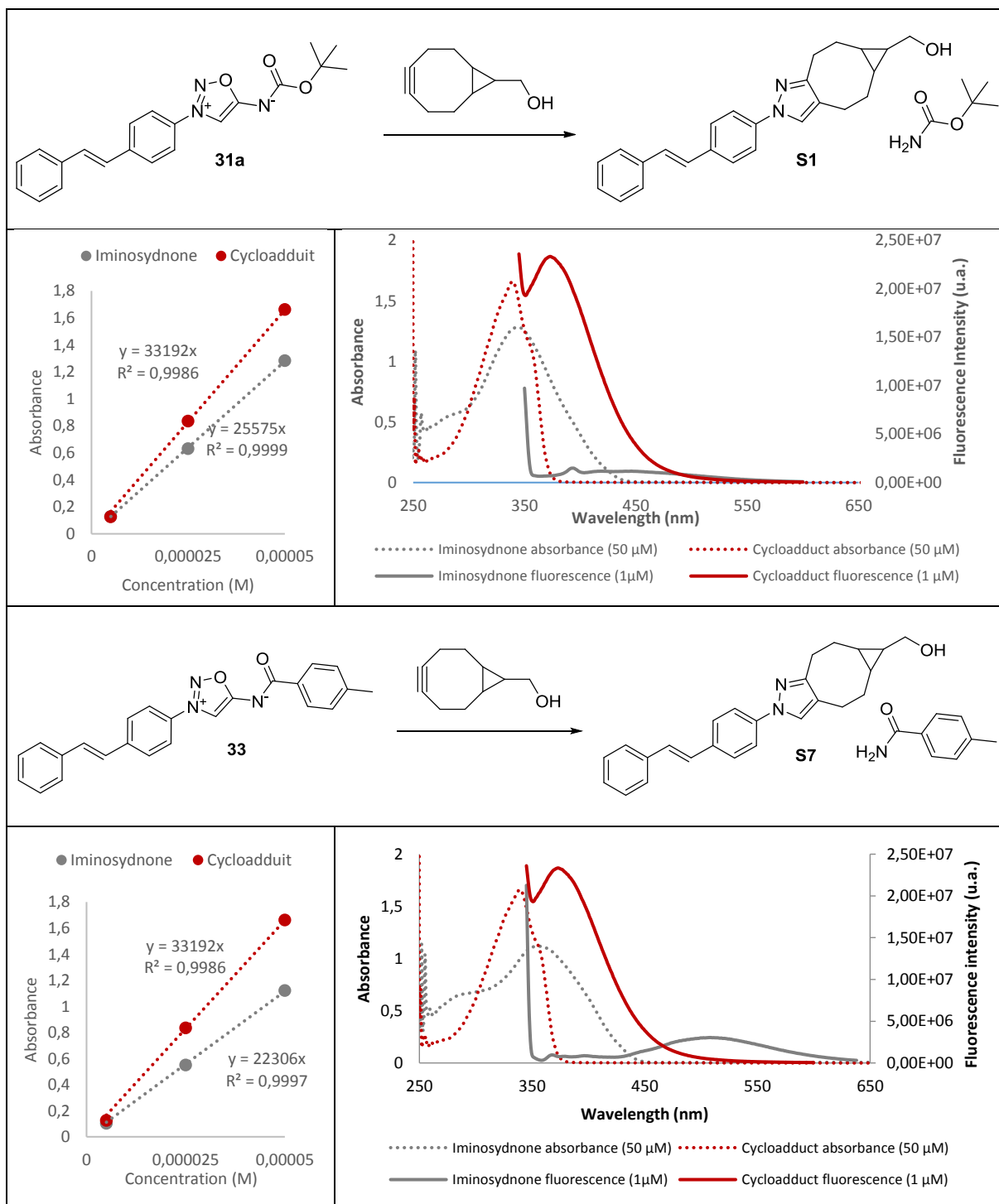
Fluorescences were measured on 1 μM (or 0.1 μM when specified) solutions of compounds in dmsO or water/DMSO (8:2) mixtures excited at a wavelength corresponding to the maximum of absorbance of the cycloadduct or released compound.

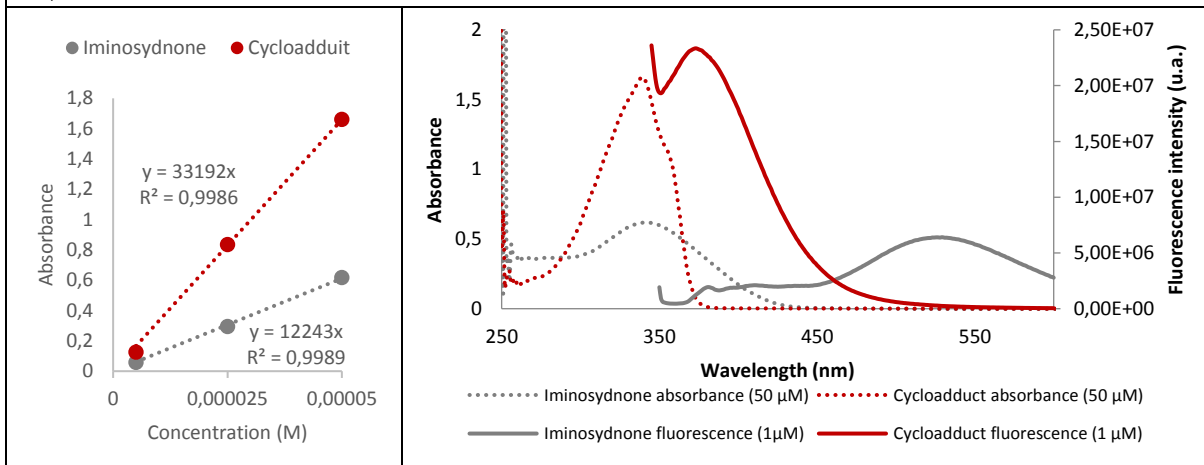
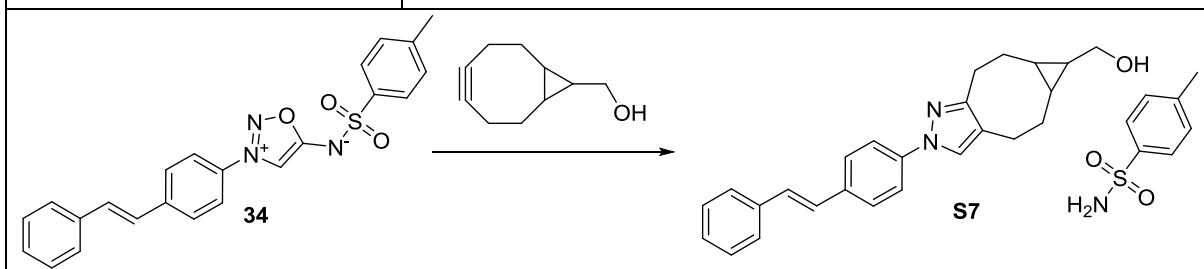
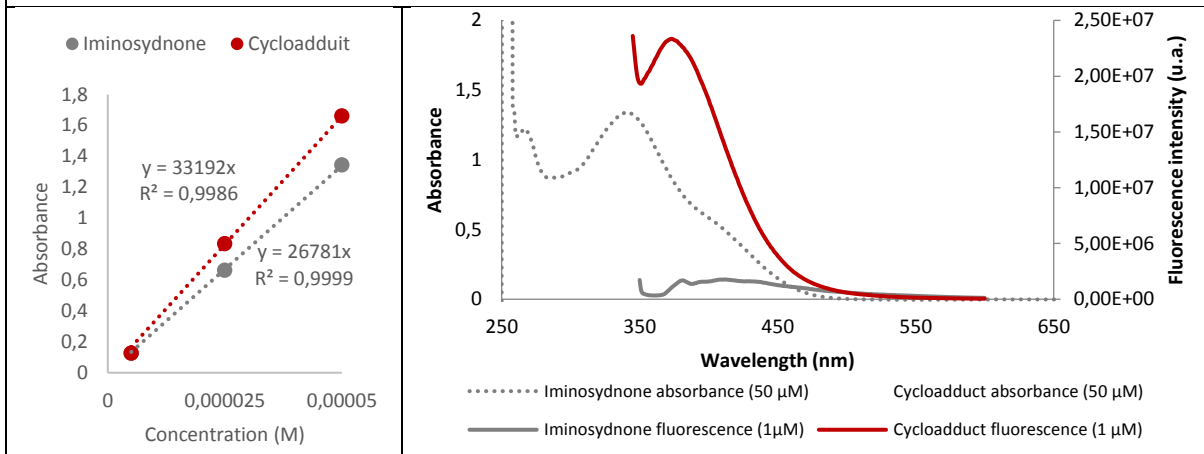
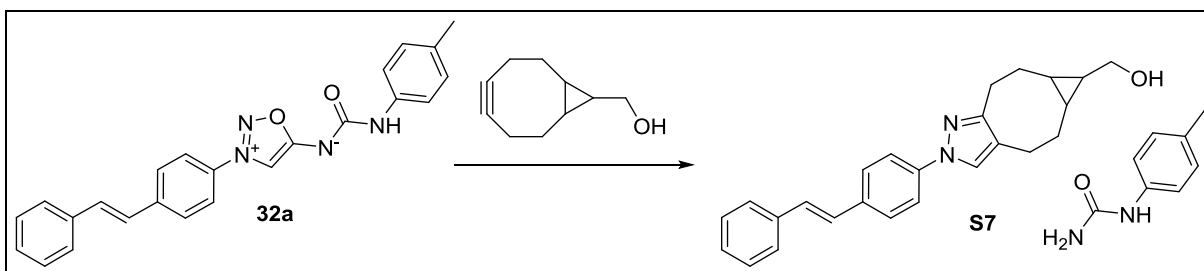
Absorbance and fluorescence spectra for each combination are reported in Table S16

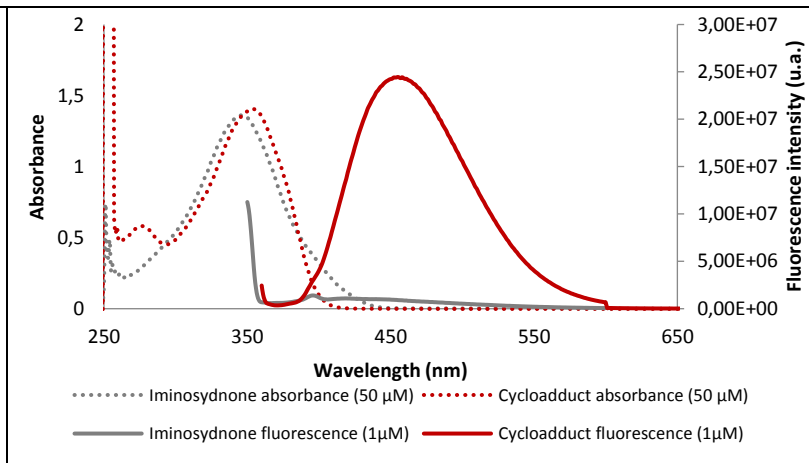
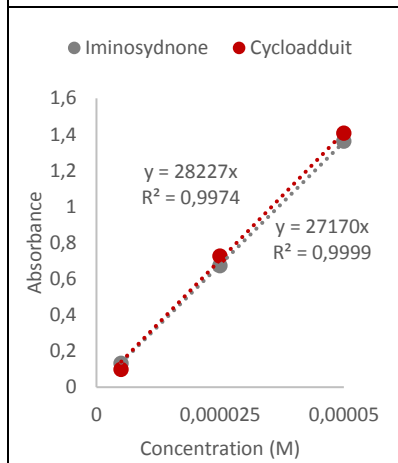
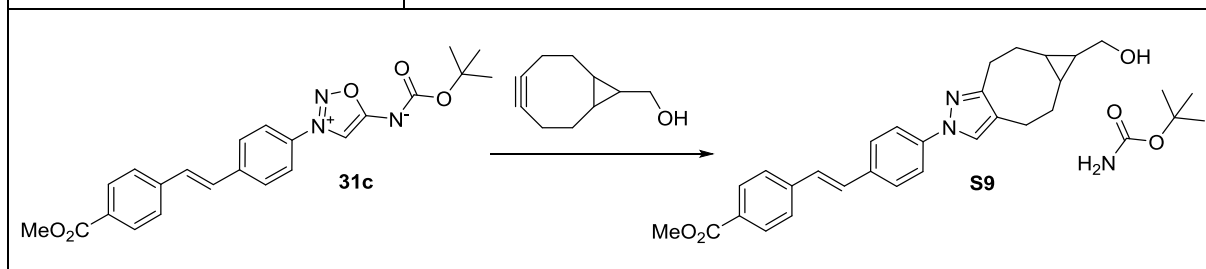
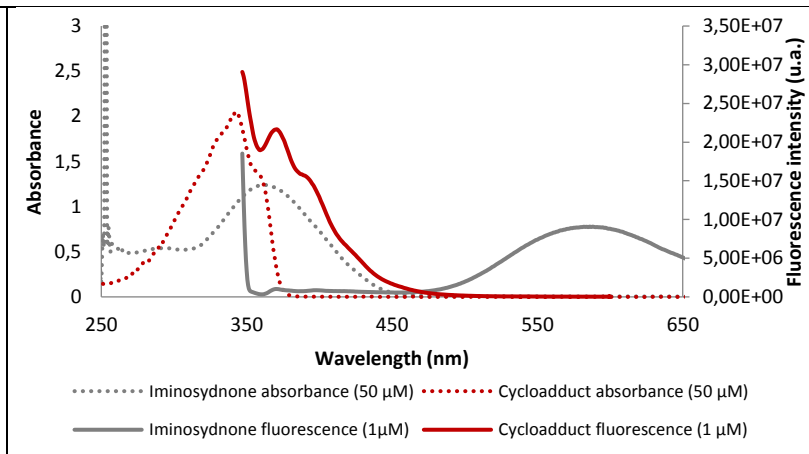
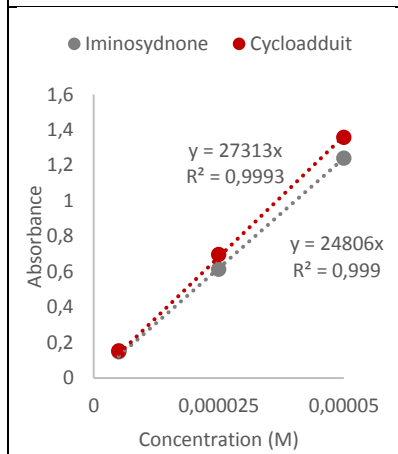
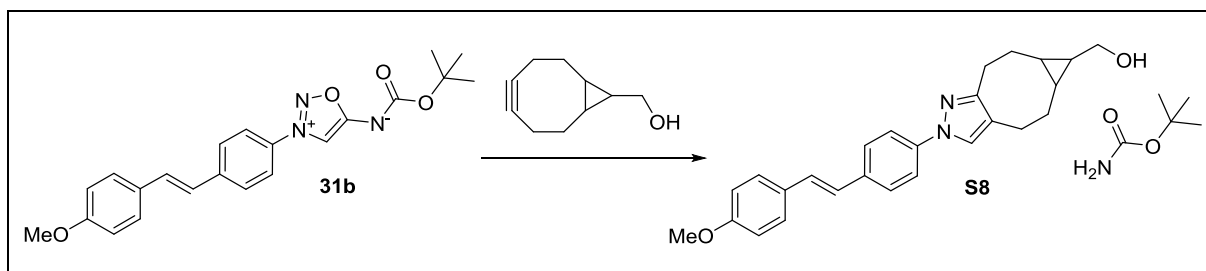
Quantum yields were calculated relatively to a standard according to **Équation 4**

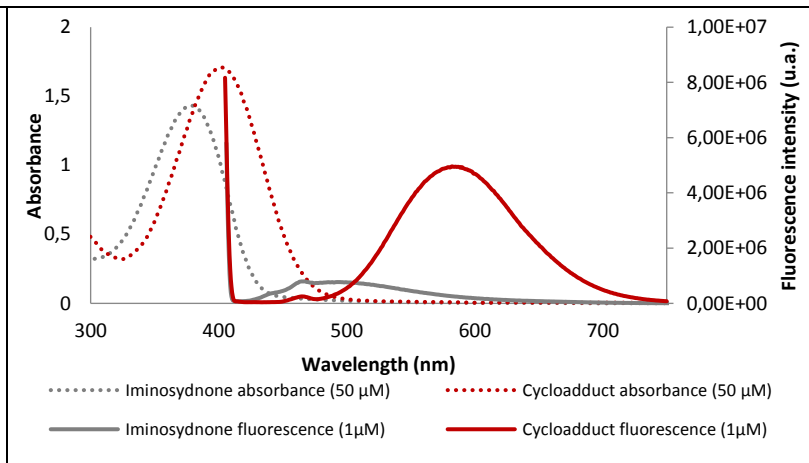
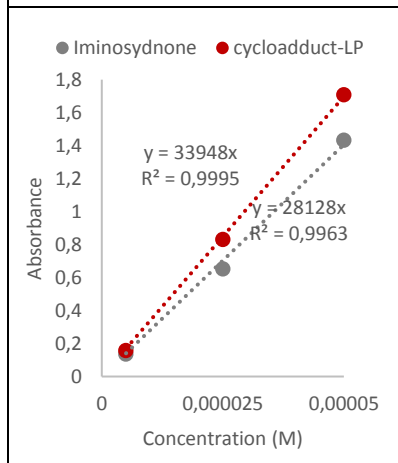
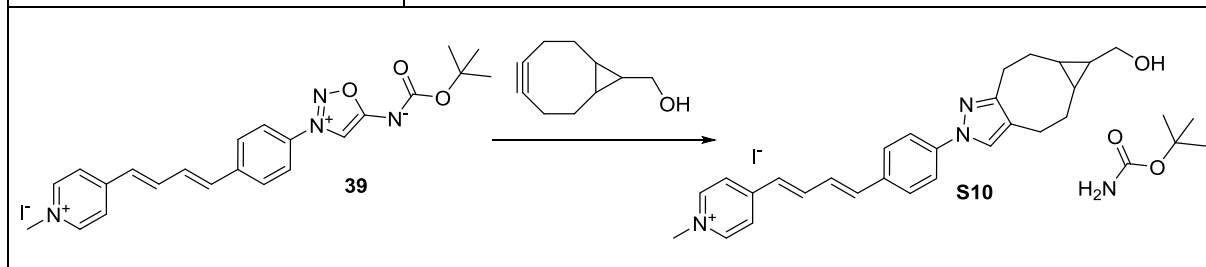
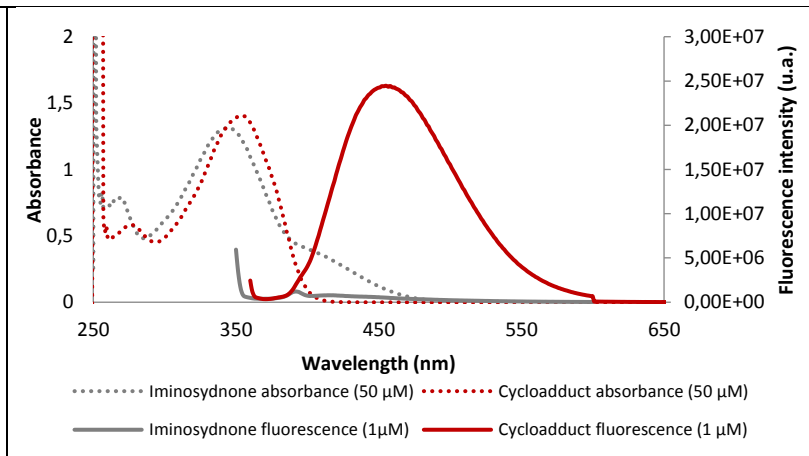
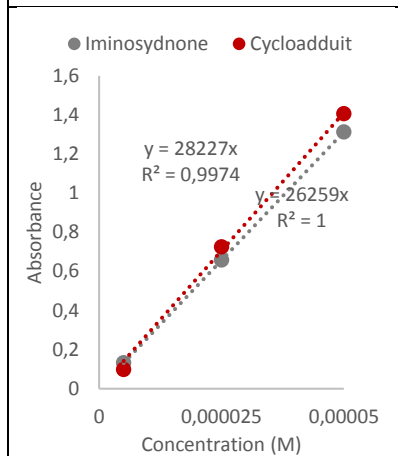
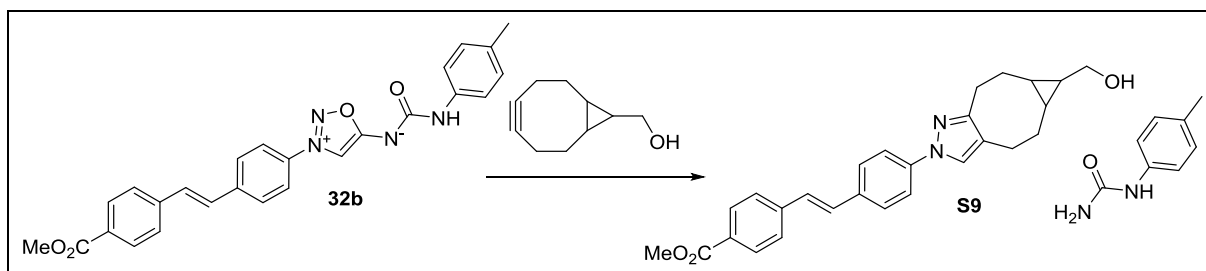
Quinine sulfate and coumarin153 were used as standard for this calculation.

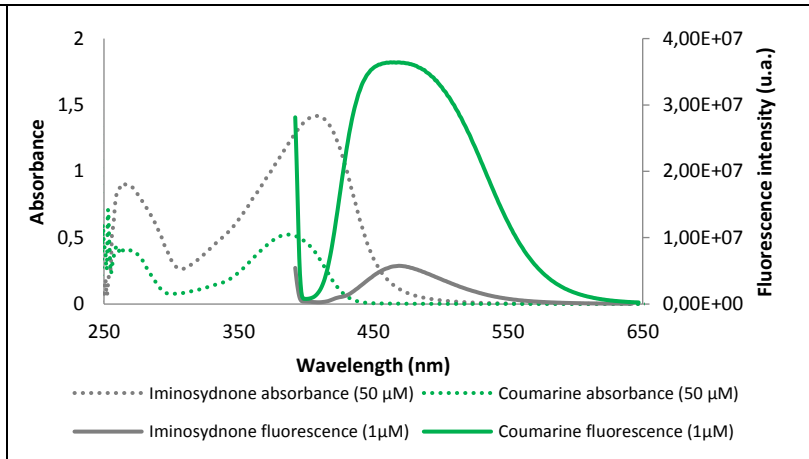
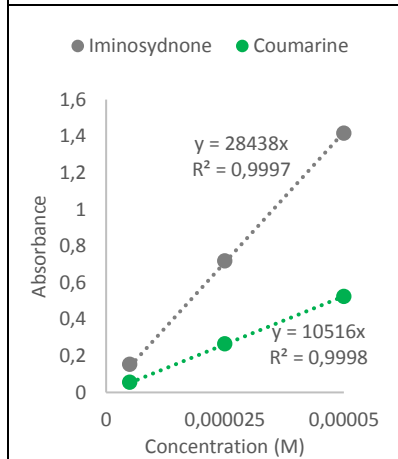
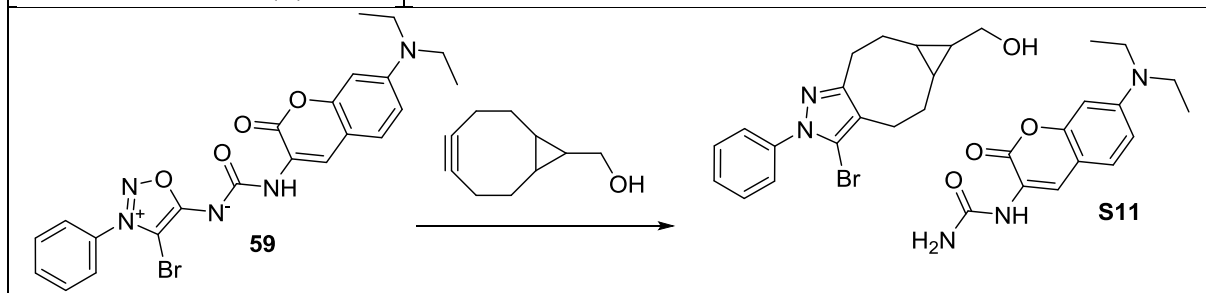
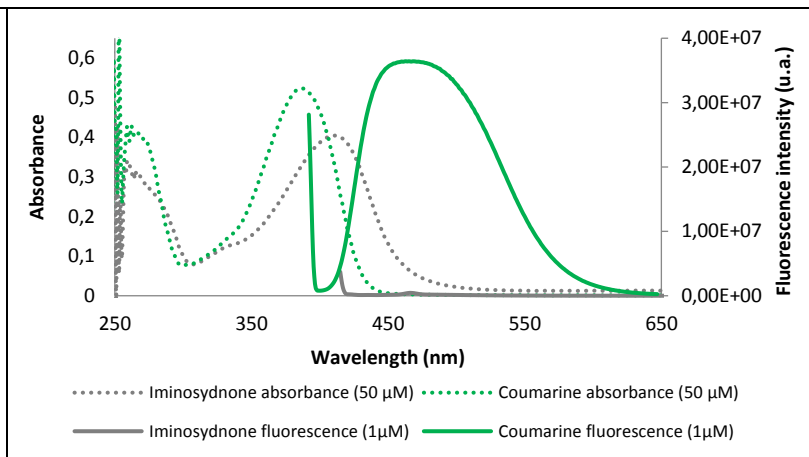
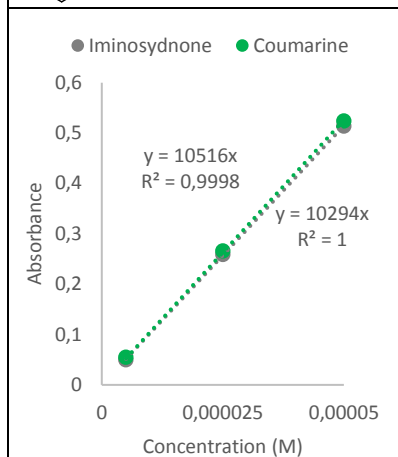
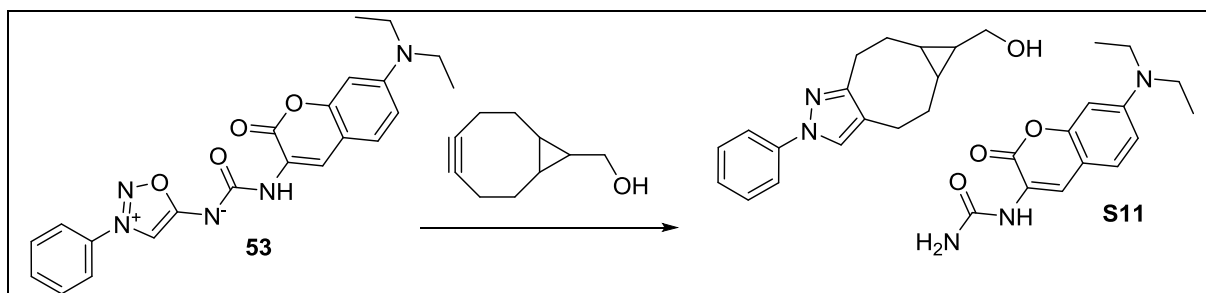
Table S16 : Superposition of absorbance and fluorescence spectra of iminosydnone and corresponding click products

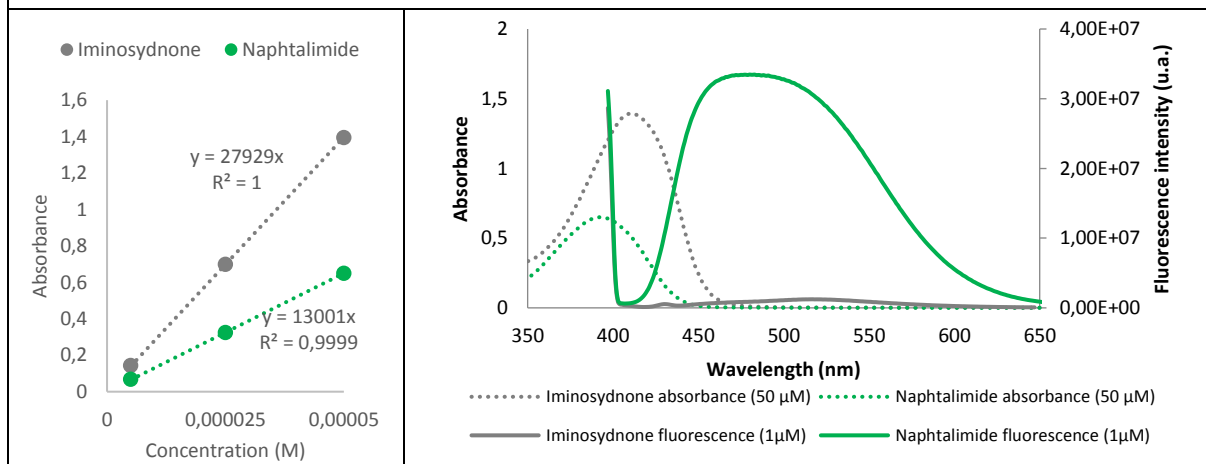
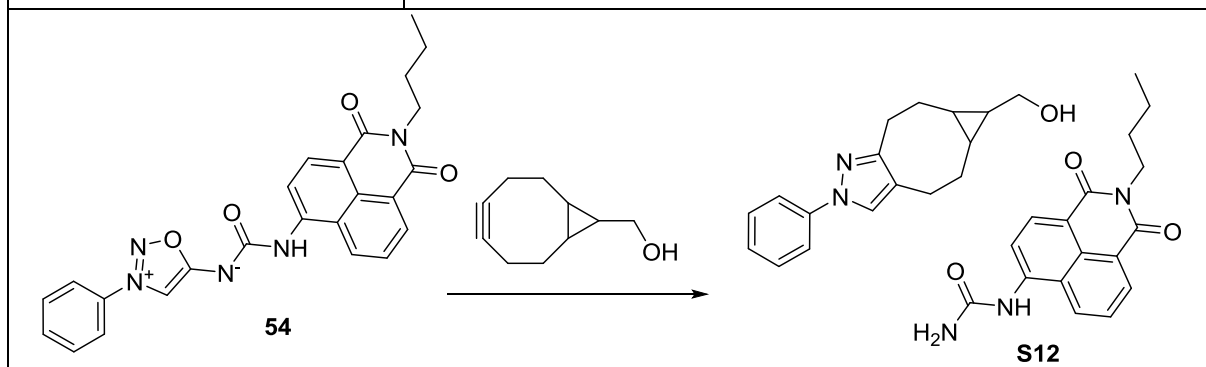
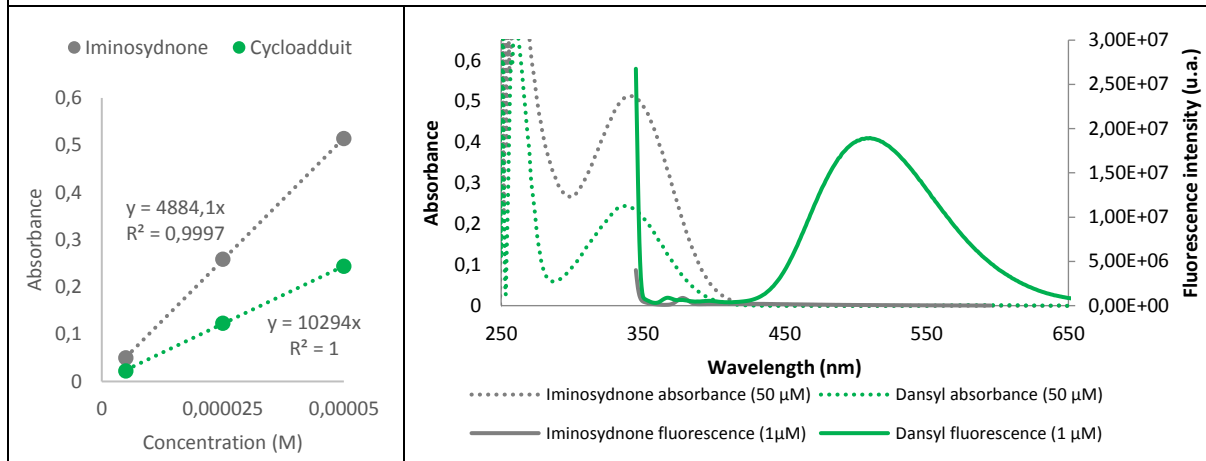
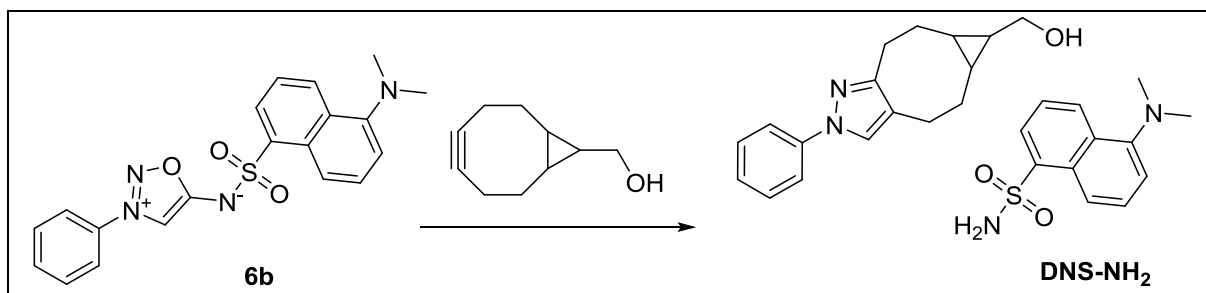


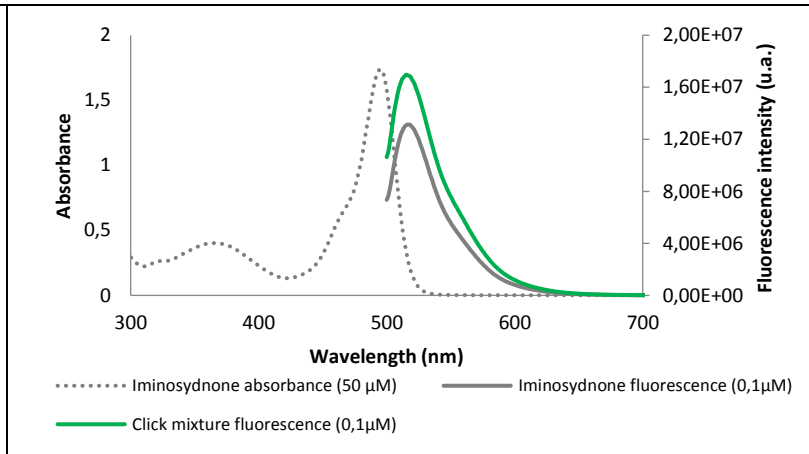
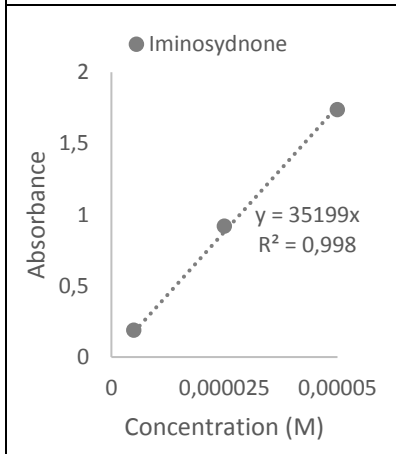
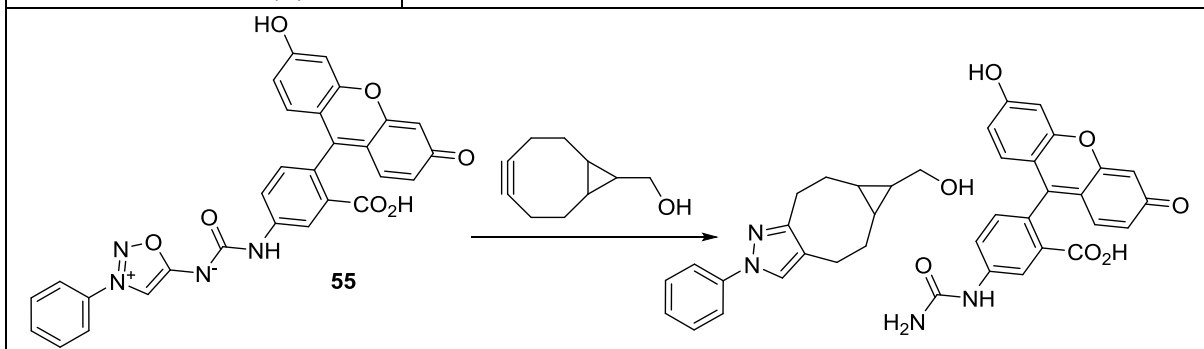
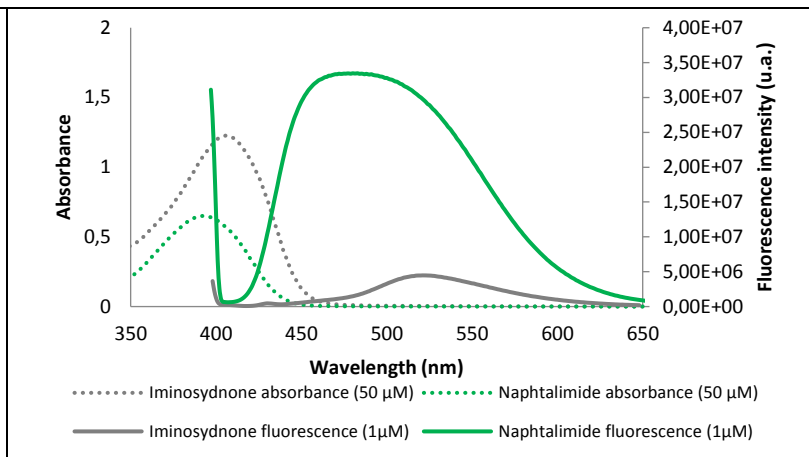
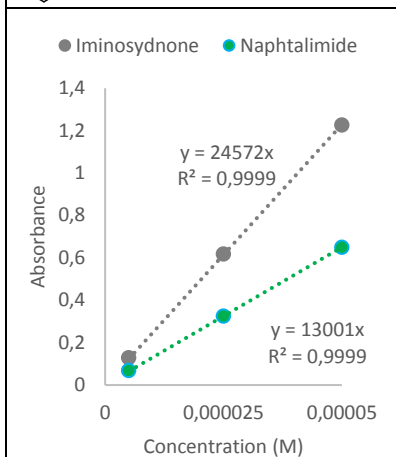
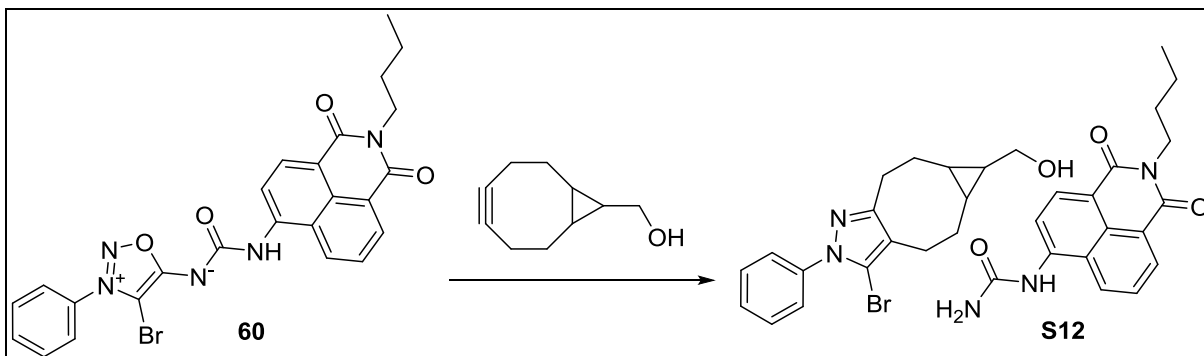


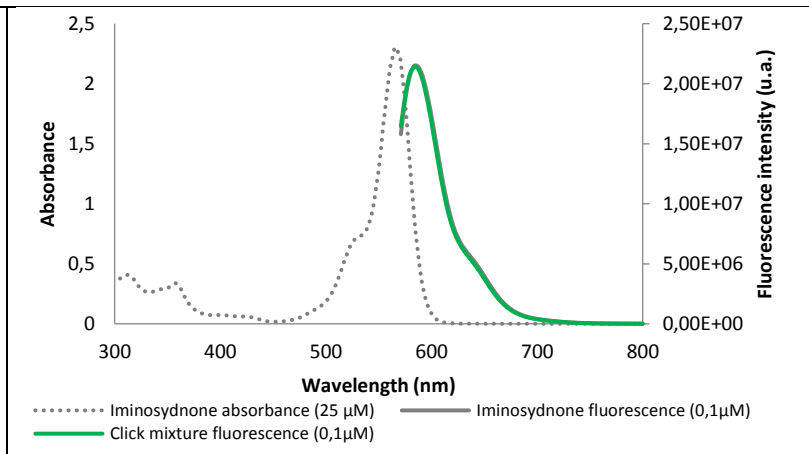
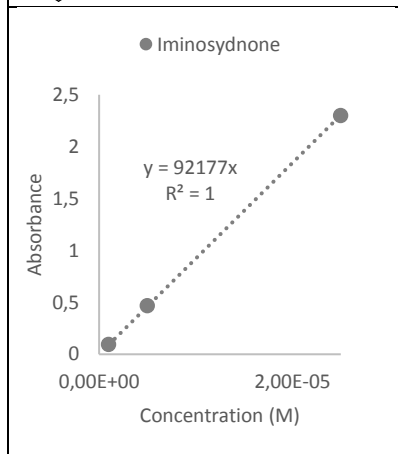
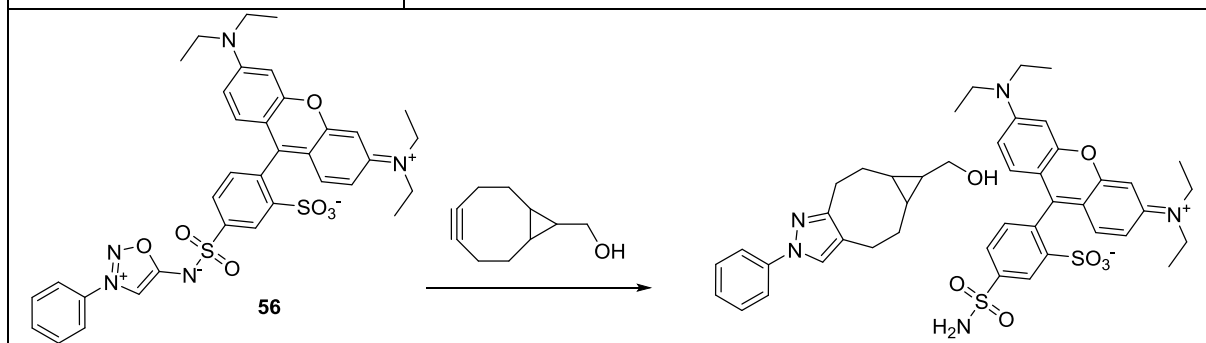
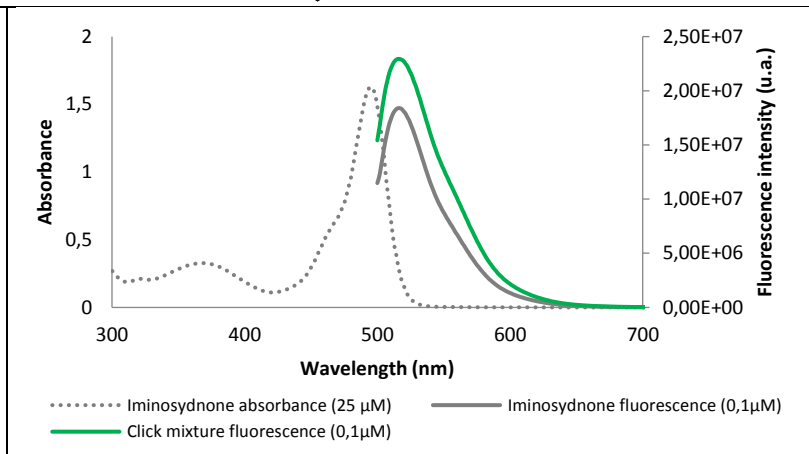
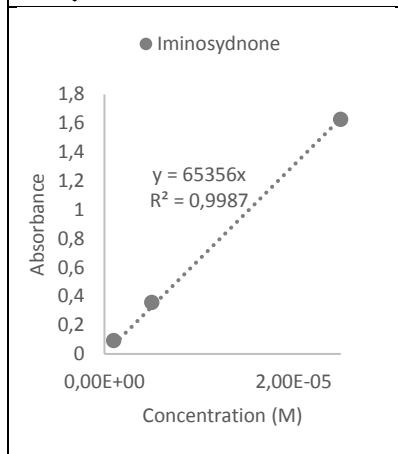
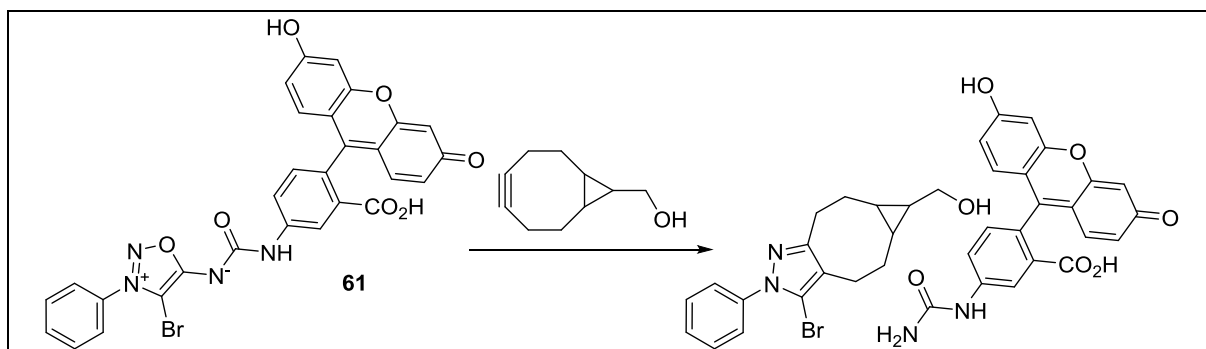


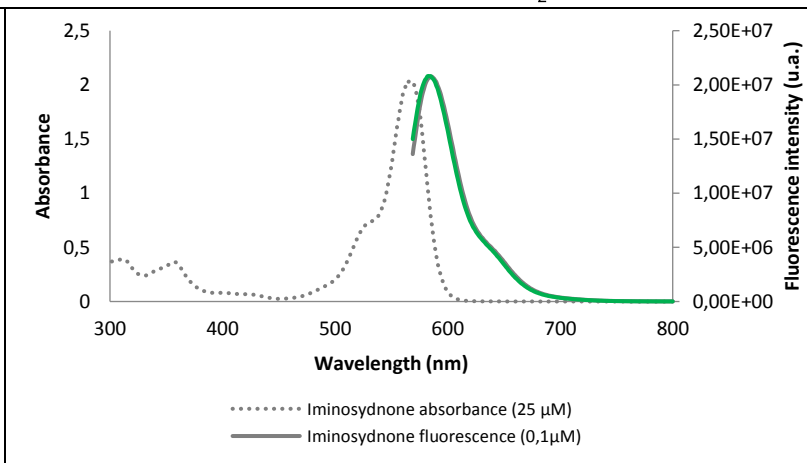
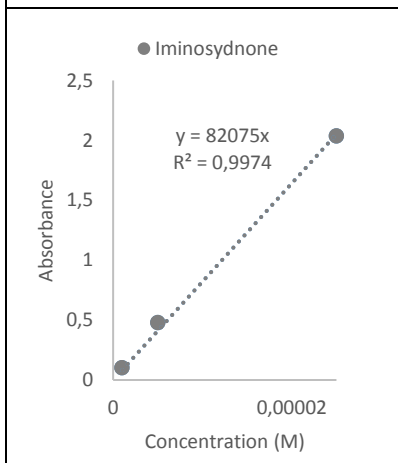
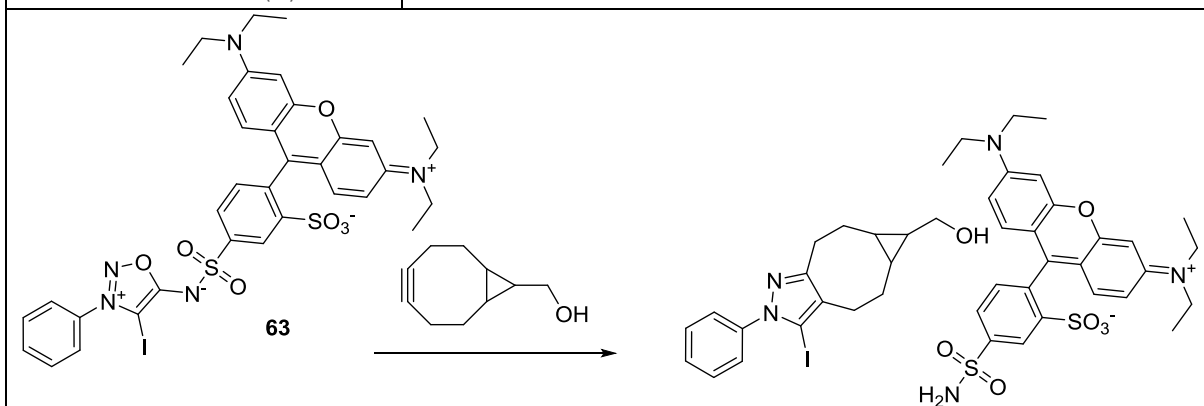
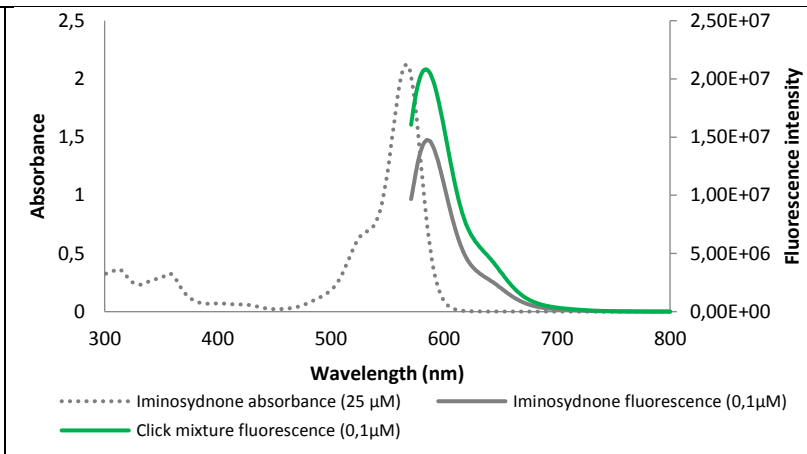
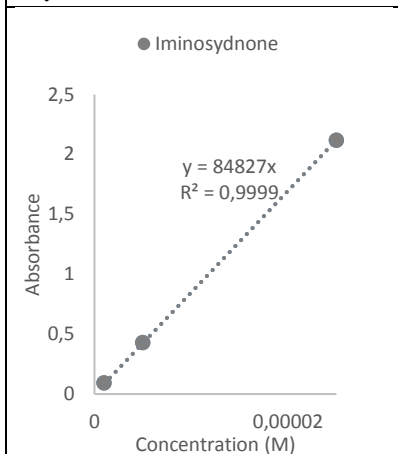
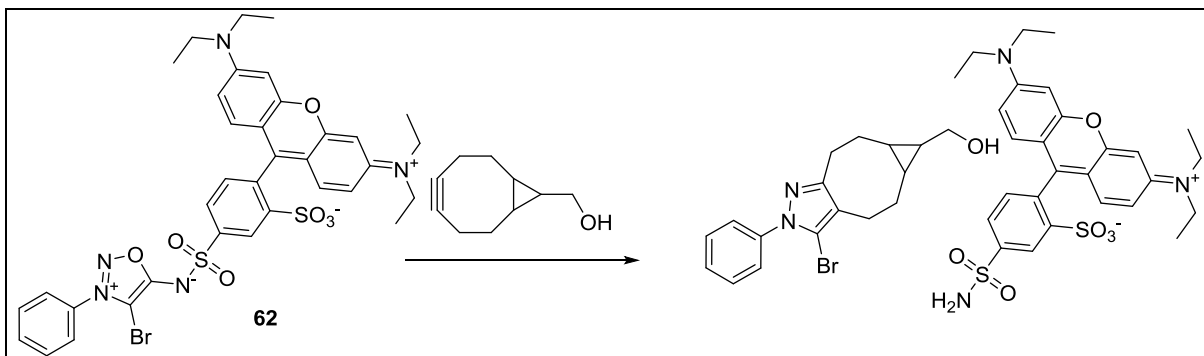


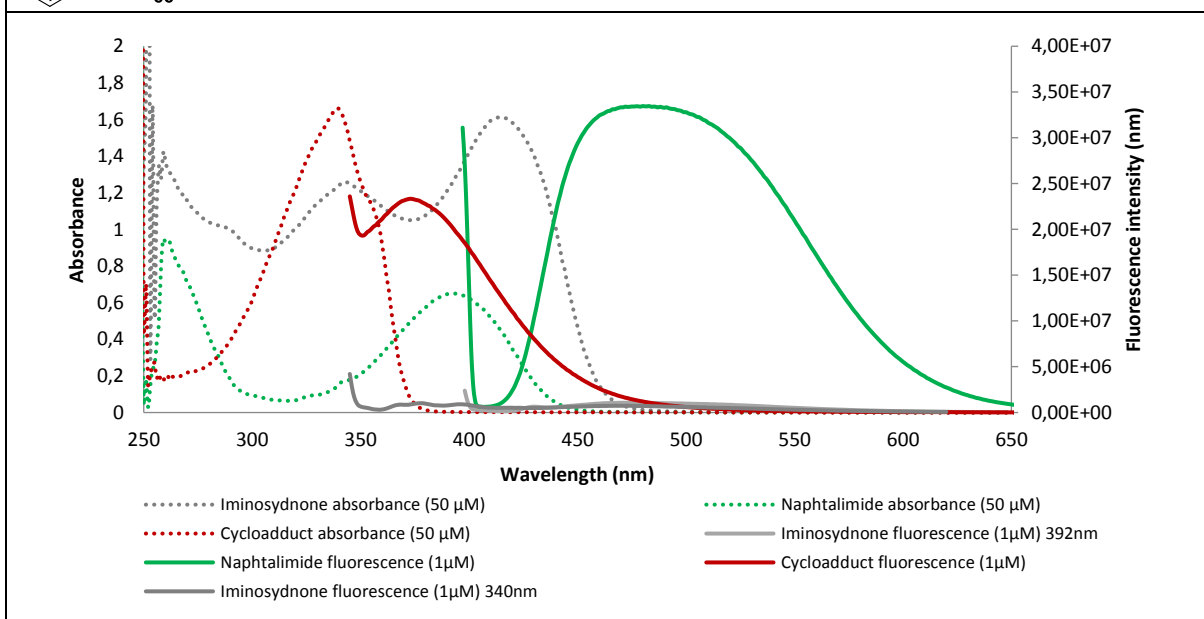
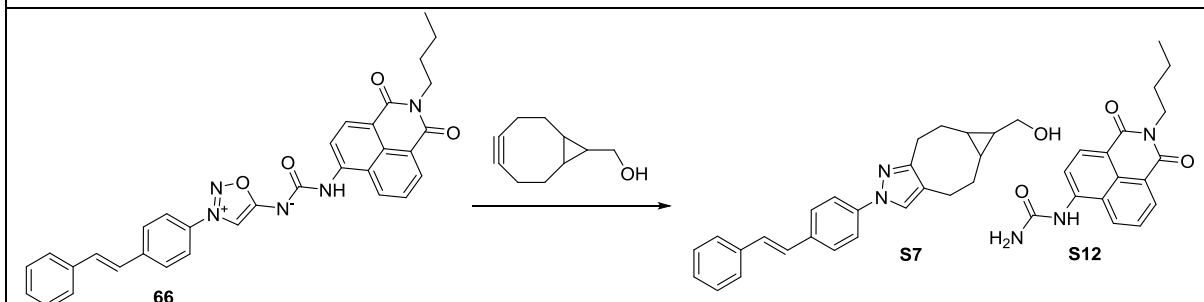
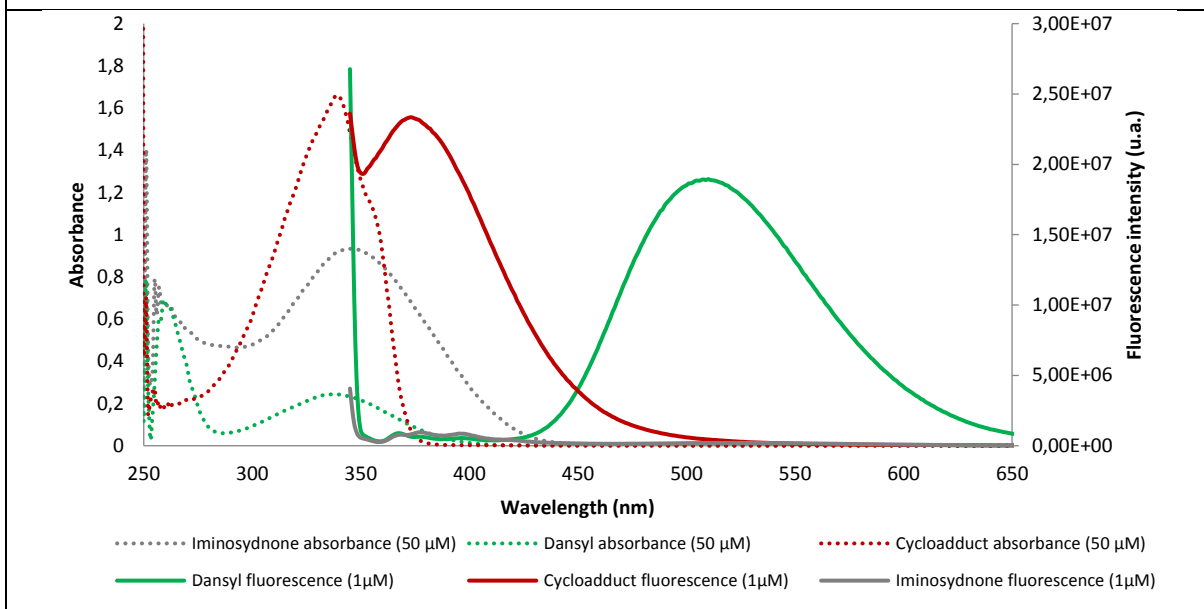
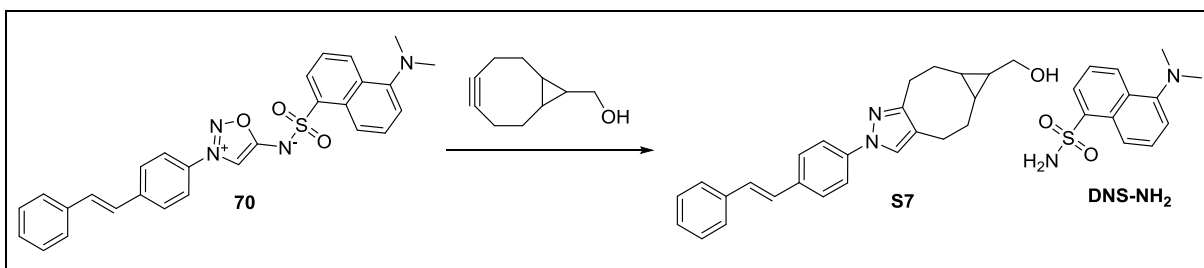


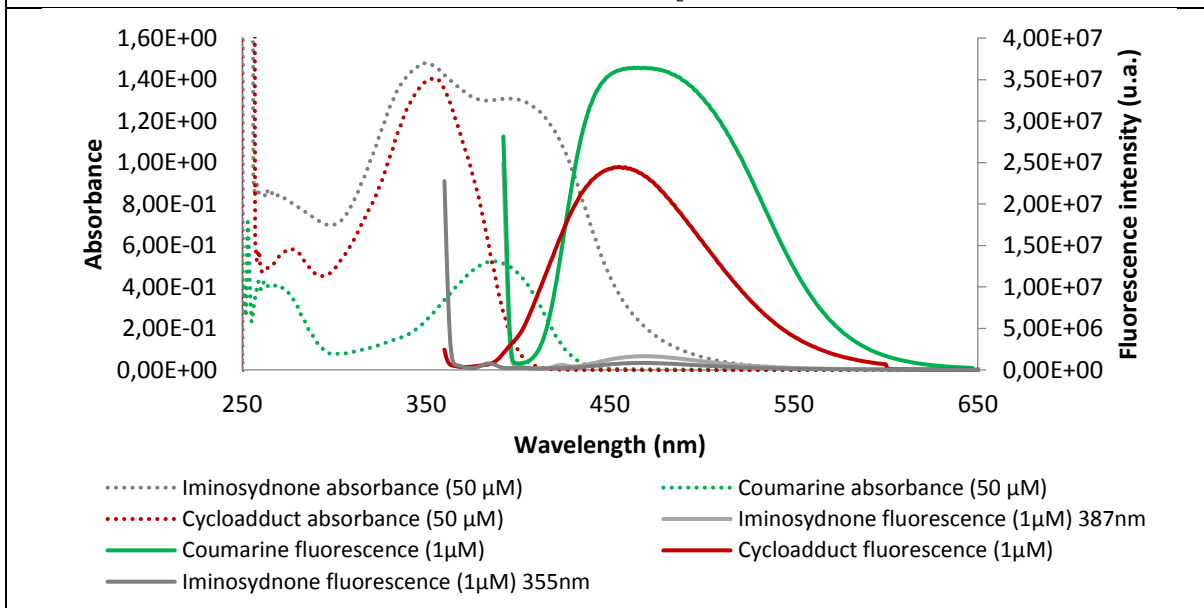
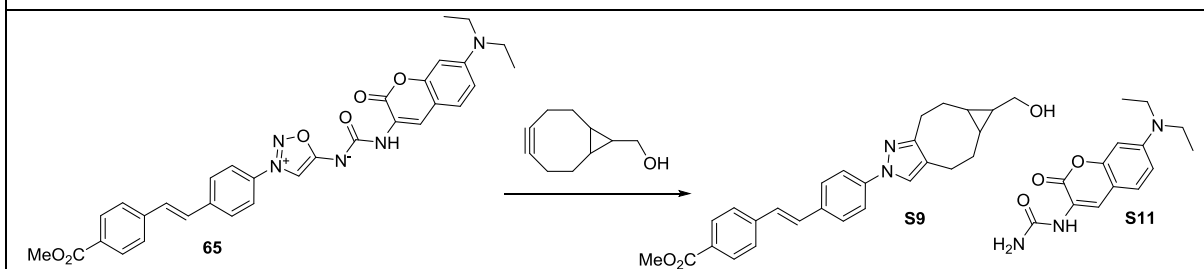
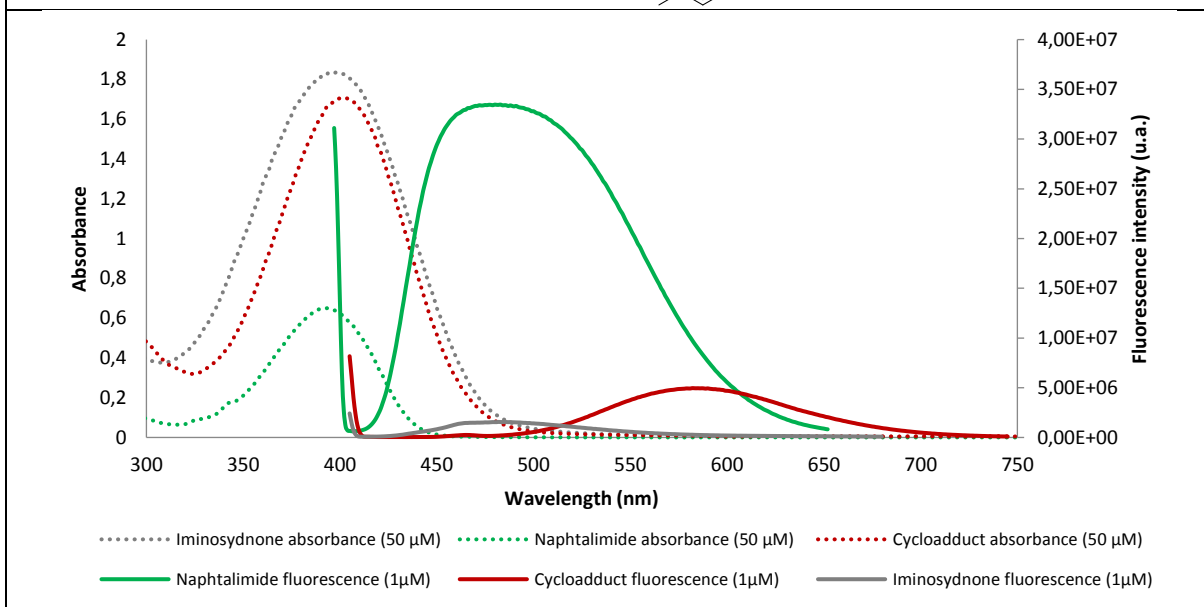
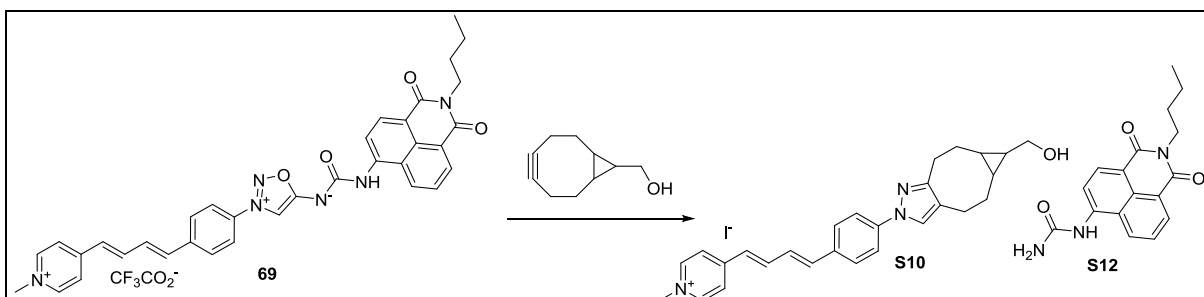












C. Cell culture

Labeling on fixed-cells

CHO cells were grown on Nunc™ Lab-Tek™ II slide in media (HAMF12) containing 10% fetal bovine serum, pyruvate 1mM, 1% non essential aminoacids, glutamine 2mM, penicillin/streptomycin. The cells were then washed with 500 μ L PBS, then incubated with 500 μ L of PFA 4% during 8 minutes at room temperature and washed three times with 300 μ L of PBS. The cells were incubated with 500 μ L of Triton 0.2% for 5 minutes at room temperature then washed 3 times with 500 μ L of Triton 0.05%-Tween 0.1% and twice with 500 μ L of PBS. The cells were then incubated with an solution of **69** (5-10 μ M) in HAMF12 for 30 minutes at room temperature and were washed twice with 300 μ L of HAMF12. The cells were then incubated with a cycloalkyne solution (200 μ M) in HAMF12 during the night at room temperature and were then washed twice with 300 μ L of HAMF12. 5 μ L of Draq5 solution in 495 μ L of HAMF12 were added and the cells were incubated 15 minutes at 37 °C before being washed twice with 500 μ L of PBS.

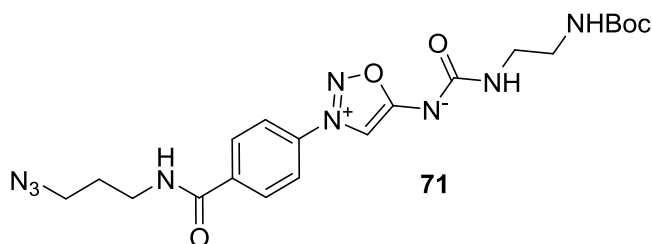
Labeling on living cells

CHO cells were grown on Nunc™ Lab-Tek™ II slide in media (HAMF12) containing 10% fetal bovine serum, pyruvate 1mM, 1% non essential aminoacids, glutamine 2mM, penicillin/streptomycin. The cells were then washed twice with 500 μ L HAMF12. The cells were then incubated with an solution of **69** (5-10 μ M) in HAMF12 for 30 minutes at 37 °C and were washed twice with 300 μ L of HAMF12. The cells were then incubated with a cycloalkyne solution (200 μ M) in HAMF12 for 5 hours at 37 °C and were then washed twice with 300 μ L of HAMF12. 5 μ L of Draq5 solution in 495 μ L of HAMF12 were added and the cells were incubated 15 minutes at 37 °C before being washed twice with 300 μ L of HAMF12. The cells were incubated with 500 μ L of PFA 4% during 8 minutes at room temperature and washed three times with 500 μ L of PBS.

IV. Experimental Part: Part III

A. Synthetic Procedure and Analytical Data

(3-(4-((3-azidopropyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (71)



$C_{20}H_{27}N_9O_5$
MW: 473 g.mol⁻¹
Yield: 76%
Yellow powder

To a DMF (3 mL) solution of 3-azidopropan-1-amine (16 mg, 0.158 mmol) were added successively compound **26k** (62 mg, 0.158 mmol) HATU (66 mg, 0.174 mmol) and diisopropylethylamine (41 μ L, 0.316 mmol) under argon atmosphere. The reaction was stirred 20h at room temperature. The solvent was evaporated under *vacuum* and the residue purified by silica gel chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂:MeOH 95:5) to afford the product as a yellow powder (57 mg, 0.12 mmol, yield 76%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 8.05 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.84 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.34 (s, 1H), 3.58 (dd, J = 12.4 Hz, J = 6.3 Hz, 2H), 3.47 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.35 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 3.26 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 1.94 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H).

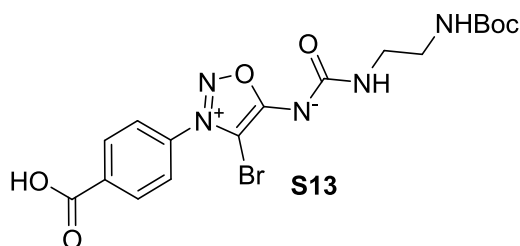
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 165.5, 161.7, 156.3, 138.7, 135.6, 129.3 (2C), 121.6 (2C), 102.1, 79.3, 49.5, 41.0, 40.5, 38.1, 28.6, 28.4 (3C).

IR (cm⁻¹) 3313, 2976, 2931, 2096, 1633, 1590, 1505, 1437, 1365, 1282, 1219, 1168, 960, 857, 729, 646.

LCMS (ESI), m/z [M+H]⁺475.1.

Mp. 75–77 °C.

(4-bromo-3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl) amide (S13)



$C_{17}H_{20}BrN_5O_6$
MW: 469 g.mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 76%

A solution of **27e** (248 mg, 0.50 mmol) and NaOH (100 mg, 2.5 mmol) in a mixture of H₂O/THF/EtOH (5 mL X3) was stirred at room temperature for 2h. The solution was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed several times with water. HCl 1N was added to the aqueous layer to reach pH = 2. The aqueous layer was extracted several times with EtOAc. This second organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated to afford the desired product as a yellow solid (178 mg, 76%). This product was used without any further purification.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.33 (m, 2H), 7.92 (m, 2H), 3.32 (m, 2H), 3.22 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄): δ 175.3, 167.6, 158.6, 137.3, 136.6, 132.6 (2C), 127.1 (2C), 93.6, 80.2, 41.4, 28.9 (3C), 20.9.

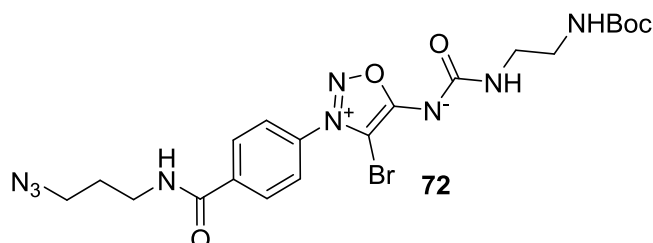
One carbon is missing.

IR (cm⁻¹) 3325, 2977, 1696, 1631, 1514, 1251, 1166, 1014.

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 470 (⁷⁹Br), 472 (⁸¹Br).

Mp. 80 °C – decomp.

(3-(4-((3-azidopropyl)carbamoyl)phenyl)-4-bromo-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (72)



C₂₀H₂₆BrN₉O₅
MW: 552 g·mol⁻¹
Yellow solid
Yield: 50%

To a solution of compound **S13** (41.3 mg, 0.09 mmol) in DMF (1 mL) was added HATU (36.7 mg, 0.1 mmol) and DIPEA (31 μL, 0.18 mmol). The mixture was heated at 40 °C for 10 minutes and then 3-azidopropane-1-amine was added (17.6 mg, 0.18 mmol). The reaction was stirred at 40 °C for 3 hours. The residue was dissolved in EtOAc (10 mL) and extracted with H₂O. The organic layer was washed with brine (2 times), dried over MgSO₄ and concentrated under *vacuum*. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂ DCM/MeOH, 90/10) to afford the desired product as a yellow solid (24.6 mg, 50%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.13 (m, 2H), 7.89 (m, 2H), 3.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.30 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

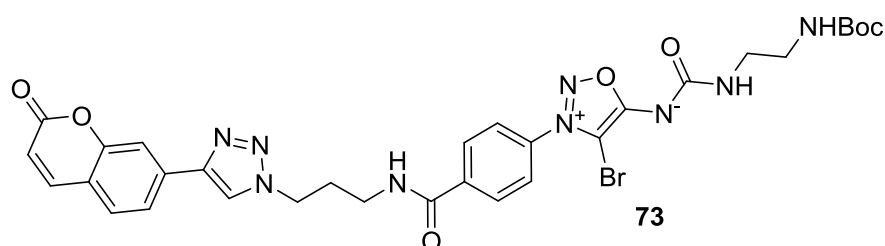
¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄): δ 168.3, 165.0, 163.0, 158.7, 140.2, 136.6, 130.3 (2C), 127.1 (2C), 92.6, 80.3, 50.4, 41.6, 41.5, 38.9, 29.8, 28.9 (3C).

IR (cm⁻¹) 2932, 2479, 2096, 1631, 1408, 1236, 1160.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₇BrN₉O₅ [M+H]⁺: 552.1313 ; found: 552.1317.

Mp. 108 °C.

(4-bromo-3-(4-((3-(4-(2-oxo-2H-chromen-7-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (73)



C₃₁H₃₂BrN₉O₇
MW: 721.2 g·mol⁻¹
Yield: 42%
Yellow powder

To a solution of compound **72** (24.6 mg, 0.045 mmol) in DMSO (880 μL) was added successively THPTA (42.4 mg, 0.089 mmol) and 7-ethynyl-2H-chromen-2-one (7.5 mg, 0.045 mmol). CuSO₄·6H₂O (2.3 mg, 9 μmol) was first solubilized in water (440 μL) and then added to the mixture. Subsequently, Na Asc. (8.8 mg, 0.045 mmol) was added and the mixture was stirred for 20 minutes at room temperature. The residue was dissolved in DCM (5 mL) and extracted with 0.1 M HEDTA (2 times). The organic layer was washed with brine (2 times), dried over MgSO₄ and concentrated under *vacuum*. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂ DCM/MeOH 92/8) to afford the desired product as a yellow powder (13.5 mg, 42%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.11–8.07 (m, 3H), 7.7–7.65 (m, 2H), 7.61–7.85 (m, 3H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 4.57 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.33 (m, 2H), 3.26 (m, 2H), 2.35 (m, 2H), 1.38 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.9, 162.9, 161.0, 160.4, 156.5, 154.5, 146.3, 143.5, 138.7, 134.8, 134.3, 129.4 (2C), 128.7, 125.3 (2C), 122.0, 121.9, 118.6, 116.5, 113.4, 79.6, 48.7, 41.1, 40.8, 37.8, 29.9, 28.6 (3C).

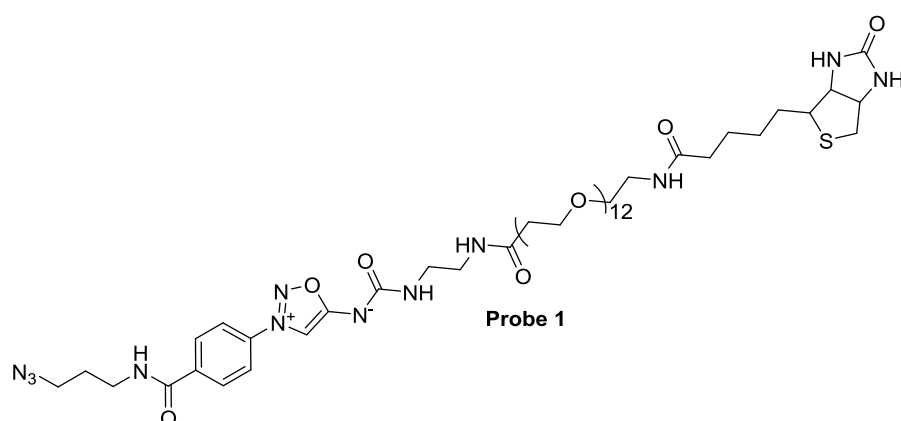
One carbon is missing.

IR (cm⁻¹) 3347, 2929, 2481, 1710, 1622, 1504, 1416, 1366, 1166, 730.

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 722.7.

Mp. 210 °C.

(3-(4-((3-azidopropyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-48-((3aR,4R,6aS)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide (Probe 1)



C₅₂H₈₆N₁₂O₁₈S
MW: 1199 g.mol⁻¹
Yield: 53%
Yellow oil

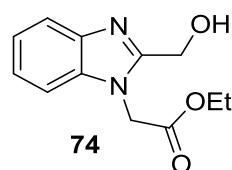
To a solution of **72** (30.3 mg, 0.064 mmol) in dichloromethane (1 mL) was added TFA (200 μL). The reaction was stirred at room temperature for 3h. It was then evaporated and the next step was performed on this crude without purification. The crude mixture was dissolved in DMF (2 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (100 mg/mL) in DMF was added (400 μL, 0.043 mmol). After addition of triethylamine (18 μL, 0.13 mmol) at 0 °C, the reaction was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the crude was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a yellow oil (27 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 9.22 (s, 1H), 8.28–8.25 (m, 4H), 4.50 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.74 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.61–3.64 (m, 44H), 3.50–3.55 (m, 4H), 3.45 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.41 (s, 4H), 3.35 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.21 (ddd, *J* = 8.9 Hz, 5.8 Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 5.0 Hz, 1H), 2.71 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.92 (m, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.55–1.76 (m, 4H), 1.41–1.48 (m, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ 176.2, 174.7, 168.7, 167.9, 166.2, 153.5, 141.1, 136.5, 130.8 (2C), 124.4 (2C), 108.7, 71.7 (20C), 71.4, 71.3, 70.7, 68.4, 63.5, 61.8, 57.2, 50.4, 41.5, 41.2, 40.5, 40.0, 38.9, 37.8, 36.9, 29.9, 29.8, 29.7, 27.0.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₅₂H₈₇N₁₂O₁₈S [M+H]⁺: 1199.5977; found: 1199.599.

Ethyl 2-(2-(hydroxymethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate (74)



C₁₂H₁₄N₂O₃
MW: 234 g.mol⁻¹
Yield: 62%
Orange solid

To compound 2-benzimidazolemethanol (3.6 mg, 24.0 mmol) was added Na₂CO₃ (5.1 g, 48.0 mmol) and ethylbromoacetate (2.7 ml, 24.0 mmol) in EtOH (250 mL). The mixture was stirred at 80 °C overnight. After this time, EtOH was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in ethyl acetate and a solution of NH₄Cl was added. After the extraction, the solvent was evaporated and

the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 60/40 to 0/100) to give the desired product as an orange solid (2.37 g, yield 42%).

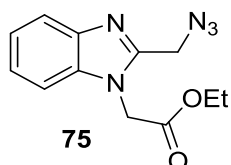
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75–7.66 (m, 1H), 7.33–7.18 (m, 3H), 5.01 (s, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.22 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.5, 153.8, 141.1, 135.2, 123.3, 122.6, 119.3, 109.0, 62.0, 57.1, 45.0, 14.0.

IR (cm⁻¹) 3200, 2985, 1741, 1617, 1522, 1468, 1438, 1353, 1206, 1164, 1030, 857, 768, 745.

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 235.

Ethyl 2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetate (75)



C₁₂H₁₃N₅O₂
MW: 59 g.mol⁻¹
Yield: 85%
White solid

To compound **74** (569 mg, 2.43 mmol) in dry DMF (12 mL) was added NEt₃ (339 μL, 2.43 mmol) and mesylchloride (188 μL, 2.43 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours. After this time, NaN₃ (474 mg, 7.29 mmol) was added and the mixture was stirred overnight. The solvent was evaporated and the crude product purified by column chromatography (SiO₂, EtOAc) to give the desired product as a white powder (535 mg, 85%).

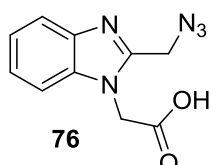
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.83–7.74 (m, 1H), 7.36–7.27 (m, 3H), 4.94 (s, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.24 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.1, 148.4, 141.9, 135.6, 123.9, 122.9, 120.4, 109.1, 62.3, 47.4, 45.2, 14.0.

IR (cm⁻¹) 3457, 3049, 3002, 2984, 2939, 2103, 1732, 1467, 1439, 1414, 1321, 1267, 1215, 1030, 862, 768, 738, 702, 498, 484.

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 260.08.

2-(2-(Azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetic acid (76)



C₁₀H₉N₅O₂
MW: 231 g.mol⁻¹
Yield: 64%
White solid

To compound **75** (535 mg, 2.06 mmol) was added a LiOH solution 2M (172 mg, 4.10 mmol, in 2 mL of water) in THF (6.7 mL). The mixture was stirred for 2h. After this time, water and HCl 1M were added to have a pH = 3. After the extraction with EtOAc (x3), organic layers were evaporated to obtain a white solid (302 mg, 64%).

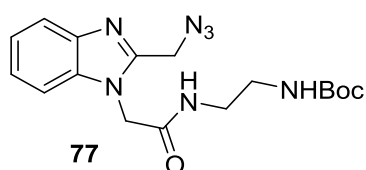
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.42–7.30 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.74 (s, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ 170.9, 151.0, 141.5, 136.9, 125.4, 124.6, 119.7, 111.6, 47.5, 46.2.

IR (cm⁻¹) 3969, 3530, 3384, 3096, 2980, 2483, 2441, 2132, 2075, 2101, 1911, 1657, 1601, 1528, 1486, 1453, 1383, 1336, 1295, 1245, 1202, 1159, 1141, 1106, 1006, 958, 910, 883, 850, 764, 700, 612.

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 232.88.

tert-butyl (2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamate 77



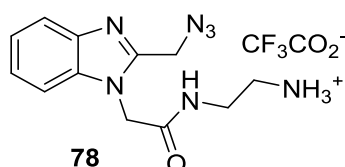
$C_{17}H_{23}N_7O_3$
MW: 373 g.mol⁻¹
Yield: 82%
Colourless oil

To a solution of **76** (115 mg, 0.50 mmol) in DMF (1 mL) and THF (3 mL), NHS (57 mg, 0.50 mmol) was added, followed by DCC (103 mg, 0.50 mmol). After 30 minute *t*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (130 mg, 0.50 mmol) was added. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc) to obtain the desired product as a colourless oil (155 mg, 82%).
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (m, 1H), 7.24–7.31 (m, 3H), 6.89 (br.s, 1H), 4.93 (br.s, 1H), 4.77 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 3.29 (m, 2H), 1.15 (m, 2H), 1.34 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166.9, 157.2, 148.8, 142.3, 135.6, 124.3, 123.4, 120.5, 109.6, 80.2, 47.4, 47.3, 41.4, 40.3, 28.5 (3C).

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺374.

2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethan-1-aminium 2,2,2-trifluoroacetate 78



$C_{14}H_{16}F_3N_7O_3$
MW: 387 g.mol⁻¹
Yield: Quantitative
Beige oil

77 (155 mg, 0.42 mmol) was dissolved in DCM (2 mL) and then TFA (500 μl) was added. After 1 hour the solvent was removed under *vacuum* to afford the product (166 mg, quantitative) as a beige oil. The product was used without any further purification.

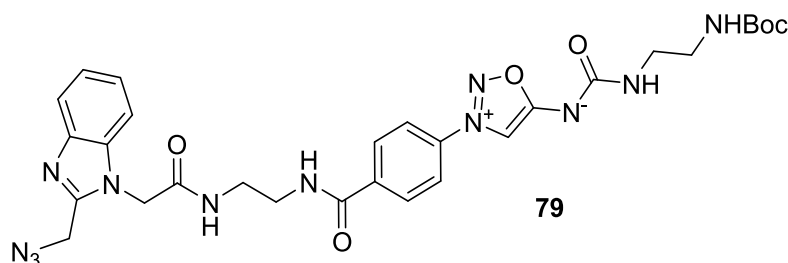
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 7.79 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 5.29 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 3.57 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 3.12 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ 168.1, 152.6, 134.7, 133.6, 127.5 (2C), 116.5, 113.3, 47.7, 46.4, 40.5, 38.6.

IR (cm⁻¹) 2116, 1661, 1427, 1180, 1125, 720.

LCMS (ESI), *m/z* [M-TFA]⁺ 274.

(3-(4-((2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide (79)



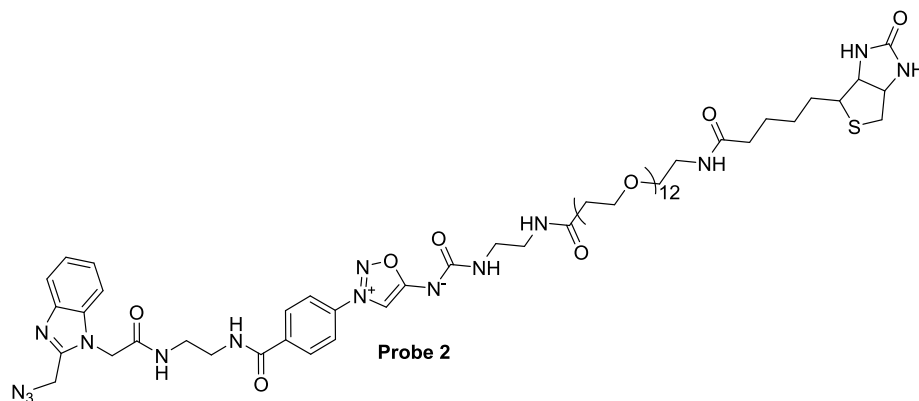
$C_{29}H_{34}N_{12}O_6$
MW: 647 g.mol⁻¹
Yield: 54%
Yellow solid

A mixture of **78** (54 mg, 0.14 mmol), **26k** (54 mg, 0.14 mmol), HATU (59 mg, 0.15 mg) and DIPEA (70 μL, 0.42 mmol) in DMF (2 mL) was stirred for 3 hours at room temperature. The mixture was evaporated under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 98/2 to 90/10). The product was dissolved in DCM and washed with brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to obtain the desired product as a yellow solid (49 mg, 54%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.25 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.61 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.20 (m, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.55 (m, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.28 (m, 2H), 3.20 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 648.

(3-(4-((2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)carbamoyl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-48-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide (Probe 2)



C₆₁H₉₃N₁₅O₁₉S
MW: 1373 g.mol⁻¹
Yield: 42%
Yellow oil

To a solution of **79** (48 mg, 74 μmol) in dichloromethane (2 mL) was added TFA (200 μL). The reaction was stirred at room temperature for 3h. It was then evaporated and the next step was performed on this crude without purification.

The crude mixture was dissolved in DMF (1 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (100 mg/mL) in DMF was added (630 μL, 67 μmol). After addition of triethylamine (41 μL, 0.30 mmol) at 0 °C, the reaction was stirred for 3h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a yellow oil (39 mg, 42%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.30 (s, 1H), 7.98 (m, 4H), 7.63 (m, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.48 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.50–3.61 (m, 50H), 3.32–3.36 (m, 6H), 3.19 (m, 1H), 2.91 (dd, *J* = 12.8 Hz, *J* = 4.9 Hz, 1H), 2.70 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H), 2.46 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.54–1.77 (m, 4H), 1.43 (m, 2H).

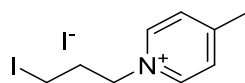
¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ 176.2, 174.4, 169.5, 166.3, 166.2, 163.6, 151.4, 142.7, 139.8, 137.4, 137.0, 130.6 (2C), 125.0, 124.2, 123.4 (2C), 120.2, 111.4, 104.2, 71.7 (20C), 71.5, 71.4, 70.7, 68.4, 63.5, 61.7, 57.2, 47.7, 47.2, 41.2, 41.1, 41.1, 40.8, 40.5 (2C), 37.9, 36.9, 29.9, 29.7, 27.0.

One aromatic carbon is missing.

IR (cm⁻¹) 3299, 2869, 2409, 2103, 1687, 1633, 1455, 1094, 749.

LCMS (ESI), *m/z* [M+H]⁺ 1374; [M+2H]²⁺ 687; [M+3H]³⁺ 459.

1-(3-iodopropyl)-4-methylpyridin-1-ium iodide (80)



80

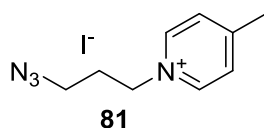
C₉H₁₃I₂N
MW: 389 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 94%

Compound **80** was synthesized according to a reported procedure.³⁰⁶ A solution of picoline (0.49 mL, 5.0 mmol) and 1,3-diiodopropane (2.3 mL, 20 mmol) in acetonitrile (10 mL) was refluxed for 4 hours. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure. Addition of EtOAc permitted to obtain the desired product as a white solid (1.82 g, 94%).

³⁰⁶ P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 344–347.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4): δ 8.83 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 4.67 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.26 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.52 (m, 2H).

1-(3-azidopropyl)-4-methylpyridin-1-ium iodide (81)

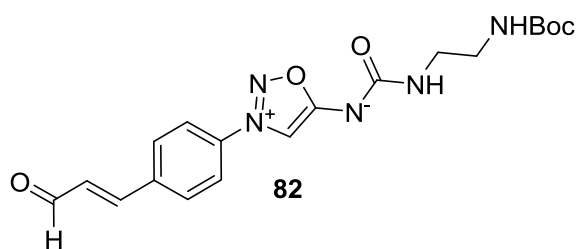


$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{IN}_4$
MW: 304 g.mol $^{-1}$
Brown oil
Yield: Quantitative

Compound **81** was synthesized according to a reported procedure.³⁰⁶ A solution of **80** (389 mg, 1.0 mmol) and NaN_3 (130 mg, 2.0 mmol) in acetonitrile (10 mL) was refluxed for 16 hours. After cooling to room temperature, the solution was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. DCM was added and the brown solution was filtered again. The filtrate was concentrated under *vacuum* to obtain the desired product a a brown oil (quantitative).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.19 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 4.88 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.47 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 2.23 (m, 2H).

(E)-((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbonyl)(3-(4-(3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (82)



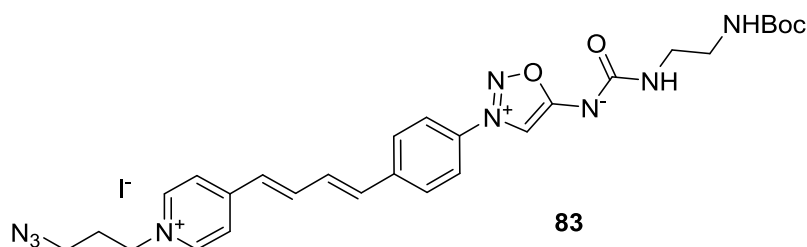
$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$
MW: 401 g.mol $^{-1}$
Yellow solid
Yield: 51%

A solution of **8k** (95 mg, 0.20 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (4.5 mg, 0.020 mmol), Ethylenebis(diphenylphosphine) (8.0 mg, 0.020 mmol) and K_2CO_3 (83 mg, 0.60 mmol) in ACN/ H_2O (1/1 mL) was stirred during 15 minutes at room temperature. Then (E)-2-(3,3-diethoxyprop-1-en-1-yl)-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolane (57 mg, 0.22 mmol) was added and the reaction was stirred at 60 °C for 4h. After cooling to room temperature, HCl 1M was added to reach pH = 2 and the mixture was stirred for another 15 minutes. The mixture was extracted with DCM and the organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH, from 100/0 to 90/10) to afford the desired product as a yellow solid (41 mg, 51%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.77 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (d, 16.1 Hz, 1H), 6.80 (dd, J = 16.1 Hz, J = 7.4 Hz, 1H), 5.63 (br.s, 1H), 5.03 (br.s, 1H), 3.36 (m, 2H), 3.22 (m, 2H), 1.12 (s, 9H).

LCMS (ESI), m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 402.

(3-(4-((1E,3E)-4-(1-(3-azidopropyl)pyridin-1-ium-4-yl)buta-1,3-dien-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamoyl)amide iodide (83**)**



$C_{28}H_{34}N_9O_4$
MW: 687 g.mol⁻¹
 Brown solid
 Yield: 48%

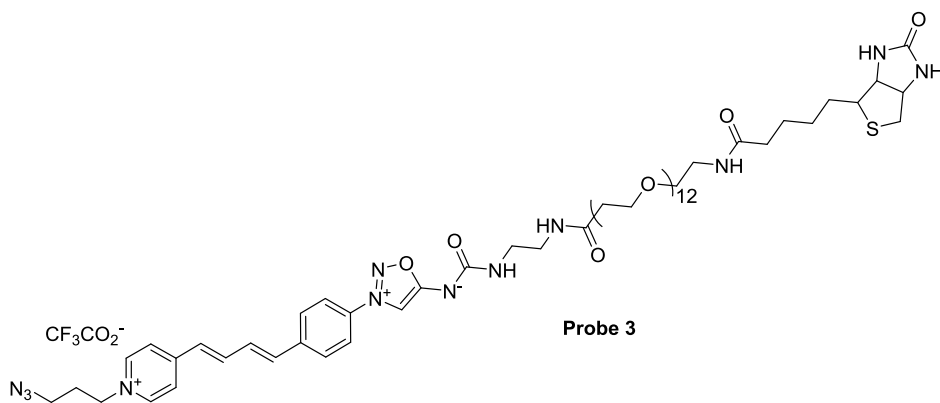
2 drops of piperidine were added to a solution of **82** (41 mg, 0.102 mmol) and **81** (31 mg, 0.102 mmol) in MeOH (2 mL). The mixture was stirred at 60 °C for 2h. Most of the MeOH was evaporated and cold Et₂O was added. The product was collected by filtration to afford 34 mg (48%) of the desired product as a brown solid.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 8.82 (m, 2H), 8.25 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.81 (dd, *J* = 15.7 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 15.7 Hz, *J* = 10.4 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 4.64 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 3.29 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 2.28 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄): δ 163.7, 158.7, 155.3, 145.6 (2C), 143.0, 142.4, 139.7, 132.4, 130.2 (2C), 130.1, 129.7, 129.6, 125.6 (2C), 123.9, 123.7 (2C), 113.5, 59.6, 41.7, 41.6, 31.3, 28.9 (3C).

One carbon signal is under solvent peak.

(3-(4-((1E,3E)-4-(1-(3-azidopropyl)pyridin-1-ium-4-yl)buta-1,3-dien-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4,4-dioxo-48-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide 2,2,2-trifluoroacetate (Probe 3**)**



$C_{62}H_{93}F_3N_{12}O_{19}S$
MW: 1399 g.mol⁻¹
 Yield: 41%
 Brown oil

To a solution of **83** (17 mg, 25 μmol) in dichloromethane (0.25 mL) was added TFA (100 μL). The reaction was stirred at room temperature for 3h. It was then evaporated and the next step was performed on this crude without purification.

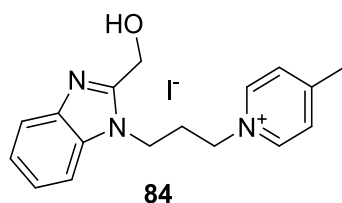
The crude mixture was dissolved in DMF (0.5 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (100 mg/mL) in DMF was added (216 μL, 23 μmol). After addition of triethylamine (11 μL, 75 μmol) at 0 °C, the reaction was stirred for 3h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a brown oil (12 mg, 41%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.28 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.81 (dd, *J* = 15.4 Hz, *J* = 10.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, *J* = 15.3 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.49 (dd, *J* = 7.7 Hz, *J* = 4.7 Hz, 1H), 4.31 (dd, *J* = 7.9 Hz, *J* = 4.5 Hz, 1H), 3.73 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.57–3.65 (m, 46H), 3.50–3.55 (m, 4H), 3.33–3.37 (m, 4H), 3.21 (m, 1H), 2.93 (dd, *J* = 12.8 Hz, 5.0 Hz, 1H), 2.71 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.46 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.27 (m, 1H), 2.22 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.54–1.77 (m, 5H), 1.44 (m, 2H).

The small amount of product obtained did not permit to obtain a ¹³C NMR spectrum.

LCMS (ESI), m/z $[M-TFA^-]^+$ 1287 ; $[M-TFA^-+H]^{2+}$ 644 ; $[M-TFA^-+2H]^{3+}$ 430.

1-(3-(2-(hydroxymethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propyl)-4-methylpyridin-1-ium iodide (84)



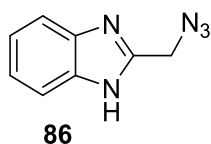
$C_{17}H_{20}IN_3O$
MW: 409 $g \cdot mol^{-1}$
Orange solid
Yield: 14%

A solution of **80** (389 mg, 1.0 mmol), Na_2CO_3 (212 mg, 2.0 mmol) and 2-benzimidazolemethanol (148 mg, 1.0 mmol) in acetonitrile (10 mL) was refluxed for 30 hours. After cooling to room temperature, the solution was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified par column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH) to afford the desired product as an orange solid (59 mg, 14%).

1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4): δ 8.82 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 7.75 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 7.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.23 (m, 1H), 4.91 (s, 2H), 4.82 (m, 2H), 4.57 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.67 (m, 2H), 2.58 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4): δ 161.1, 154.4, 144.7 (2C), 142.6, 136.1, 129.8 (2C), 124.7, 123.9, 120.0, 112.0, 59.6, 57.9, 42.5, 31.9, 22.6.

2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazole (86)



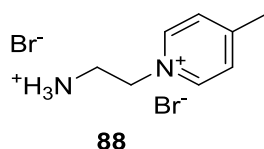
$C_8H_7N_5$
MW: 173 $g \cdot mol^{-1}$
Colourless foam
Yield: 62%

Compound **86** was synthesized according to a reported procedure.²⁷¹ To a stirring solution of 2-benzimidazolemethanol (148 mg, 1.0 mmol) in toluene (5 mL), diphenylphosphoryl azide (260 μ L, 1.2 mmol) and DBU (200 μ L, 1.3 mmol) were added. The reaction was stirred overnight at room temperature, diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 10 mL). The combined organic phases were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous sodium sulphate and the solvent evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, 80/20) to obtain the desired product as a colourless foam (108 mg, 62%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.49 (br.s, 1H), 7.63 (dd, J = 6.1 Hz, 3.2 Hz, 2H), 7.28 (dd, J = 6.1 Hz, J = 3.2 Hz, 2H), 4.74 (s, 2H).

LCMS (ESI), m/z $[M+H]^+$ 174.

1-(2-ammonioethyl)-4-methylpyridin-1-ium bromide (88)

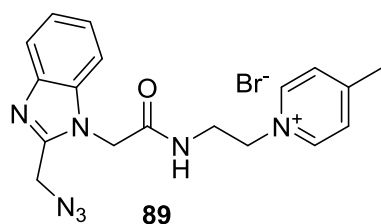


$C_8H_{14}Br_2N_2$
MW: 298 $g \cdot mol^{-1}$
Beige solid
Yield: 90%

Compound **88** was synthesized according to a reported procedure.²⁷² A mixture of 4-picoline (1.1 mL) and (2-bromoethyl)ammonium bromide (2.05 g, 10 mmol) in absolute EtOH (20 mL) was heated at 80 $^\circ C$ for 3 days. After the solution was cooled to room temperature, the solvent was evaporated under *vacuum*. The residue was triturated in EtOAc to afford the desired product as a beige solid (2.69 g, 90%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₆): δ 8.93 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.96 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H).

1-(2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)-4-methylpyridin-1-ium bromide (89)



C₁₈H₂₀BrN₇O
MW: 430 g.mol⁻¹
 White oil
Yield: 50%

A solution of **76** (115 mg, 0.50 mmol), NHS (57 mg, 0.50 mmol) and DCC (103 mg, 0.50 mmol) in a mixture of DMF (1 mL) and THF (3 mL) was stirred at room temperature for 30 minutes. **88** (149 mg, 0.50 mmol) and NEt₃ (70 μL, 0.50 mmol) were added and the reaction was stirred overnight at room temperature before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 95/5 to 85/15) to afford the desired product as a white oil (106 mg, 50%).

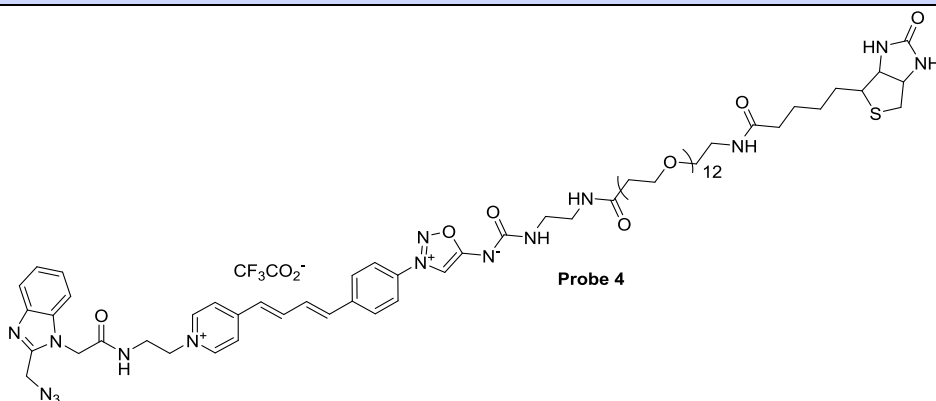
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₆): δ 8.76 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.60–7.65 (m, 3H), 7.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.38 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.31 (ddd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.69 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.82 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.46 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-d₄) δ 169.4, 161.3, 151.5, 145.3 (2C), 142.6, 136.6, 129.7 (2C), 125.0, 124.2, 120.2, 111.8, 61.5, 47.6, 47.1, 41.0, 22.1.

IR (cm⁻¹) 3402, 2106, 1682, 1641, 1467, 1247, 752.

LCMS (ESI) *m/z* [M-Br]⁺ 350.

(3-(4-((1E,3E)-4-(1-(2-(2-(2-(azidomethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)acetamido)ethyl)pyridin-1-ium-4-yl)buta-1,3-dien-1-yl)phenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((4,4-dioxo-48-(2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-7,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-dodecaoxa-3,43-diazaoctatetracontyl)carbamoyl)amide 2,2,2-trifluoroacetate (Probe 4)



C₇₁H₁₀₀F₃N₁₅O₂₀S
MW: 1571 g.mol⁻¹
Yield: 13%
 Brown oil

2 drops of piperidine were added to a solution of **82** (44 mg, 0.11 mmol) and **88** (73 mg, 0.16 mmol) in MeOH (2 mL). The mixture was stirred at 60 °C for 4h and MeOH was evaporated. The crude product was dissolved in dichloromethane (3 mL) was added TFA (200 μL). The reaction was stirred at room temperature for 1h. It was then evaporated and the next step was performed on this crude without purification.

The crude mixture was dissolved in DMF (1 mL) and a solution of Biotin-PEG₁₂-NHS (100 mg/mL) in DMF was added (687 μL, 73 μmol). After addition of triethylamine (31 μL, 0.22 mmol) at 0 °C, the reaction was stirred for overnight at room temperature. The solvent was evaporated and the crude was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a brown oil (15 mg, 13%).

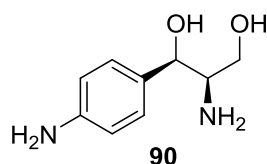
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄) δ 8.57 (m, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.79 (m, 2H), 7.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.60 (dd, *J* = 15.5 Hz, *J* = 10.1 Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.36 (m,

2H), 7.21 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.49 (dd, $J = 7.7$ Hz, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.30 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.73 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.55–3.69 (m, 50H), 3.53 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.33–3.37 (m, 5H), 3.20 (m, 1H), 2.92 (dd, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.1$ Hz, 1H), 2.70 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.52–1.80 (m, 5H), 1.43 (m, 2H).

The small amount of product obtained did not permit to obtain a ^{13}C NMR spectrum

LCMS (ESI), m/z [M-TFA $^-$ +H] $^{2+}$ 731 ; [M-TFA $^-$ +2H] $^{3+}$ 488.

(1R,2R)-2-amino-1-(4-aminophenyl)propane-1,3-diol (90)



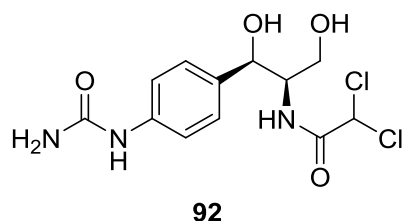
$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$
MW: 182 g.mol $^{-1}$
White solid
Yield: 92%

Compound **90** was synthesized according to a reported procedure.³⁰⁷ (1R,2R)-(-)-2-amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propanediol (500 mg, 2.4 mmol), 10% Pd/C (250 mg) were mixed in EtOAc (10 mL). The mixture was stirred under hydrogen gas at room temperature for 4 hours. The black slurry was then filtered with a DCM/MeOH mixture. The filtrate was evaporated under *vacuum* to afford the desired product as a white solid (403 mg, 92%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4): δ 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.38 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.41 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.8$ Hz, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.90 (ddd, $J = 7.5$ Hz, $J = 6.8$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H).

LCMS (ESI) m/z [M+H] $^+$ 328

2,2-dichloro-N-((1R,2R)-1,3-dihydroxy-1-(4-ureidophenyl)propan-2-yl)acetamide (92)



$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_4$
MW: 335 g.mol $^{-1}$
White solid
Yield: 8.5%

90 (182 mg, 1.00 mmol) was dissolved in anhydrous MeCN. DIPEA (243 μL , 1.30 mmol), DMAP (12 mg, 0.10 mmol) and Cl_2CHCOCl (125 μL , 1.30 mmol) were added and the mixture was stirred at room temperature over week-end. The solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography to obtain a mixture between the mono and bis-amide (1/1.6).

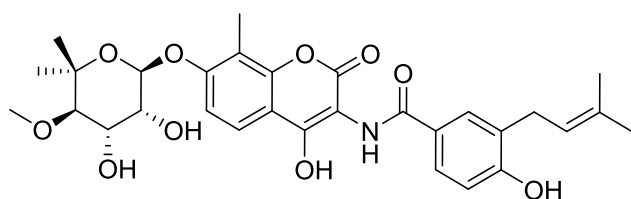
164 mg of this mixture (0.174 mmol of the mono amide) was dissolved in acetic acid (2.2 mL). KOCN (42 mg, 0.522 mmol) and water -200 μL) were added and the solution was stirred at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the crude material was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH, from 98/2 to 90/10) to obtain the desired product as a white solid (29 mg).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4): δ 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 4.93 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 4.05 (td, $J = 6.1$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 11.0$ Hz, $J = 6.3$ Hz, 1H), 3.51 (dd, $J = 10.9$ Hz, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.35 (s, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4) δ 166.8, 159.6, 140.2, 137.8, 128.0 (2C), 120.3 (2C), 72.1, 67.4, 62.3, 59.2.

³⁰⁷ H. Lu, E. Chanco, H. Zhao, *Tetrahedron* **2012**, 68, 7651–7654.

***N*-7-(((2*R*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-dihydroxy-5-methoxy-6,6-dimethyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-4-hydroxy-8-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-3-yl)-4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzamide (**93**)**



93

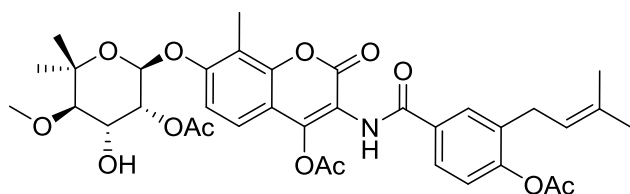
$C_{30}H_{35}NO_{10}$
MW: 570 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 80%

Compound **93** was synthesized according to a reported procedure.²⁹⁴ To a stirred suspension of novobiocin sodium salt (113 mg, 0.18 mmol) in MeOH (1.8 mL) was added NaCN (35 mg, 0.71 mmol). The reaction was stirred at reflux in a sealed tube overnight. Reaction mixture was diluted with brine, acidified with 2 M aq. HCl with a gas exit to a basic trap. It was and extracted with EtOAc and the organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 97/3 to 90/10) to afford the desired product as a white solid (82 mg, 80%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 7.62–7.70 (m, 3H), 7.17 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.33 (m, 1H), 4.15 (dd, *J* = 9.6 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1H), 4.08 (dd, *J* = 3.3 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.39 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.30 (s, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.73 (s, 3H), 1.33 (s, 3H), 1.09 (s, 3H).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 571.

***3*-(4-acetoxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzamido)-7-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-acetoxy-4-hydroxy-5-methoxy-6,6-dimethyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-8-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-4-yl acetate (**94**)**



94

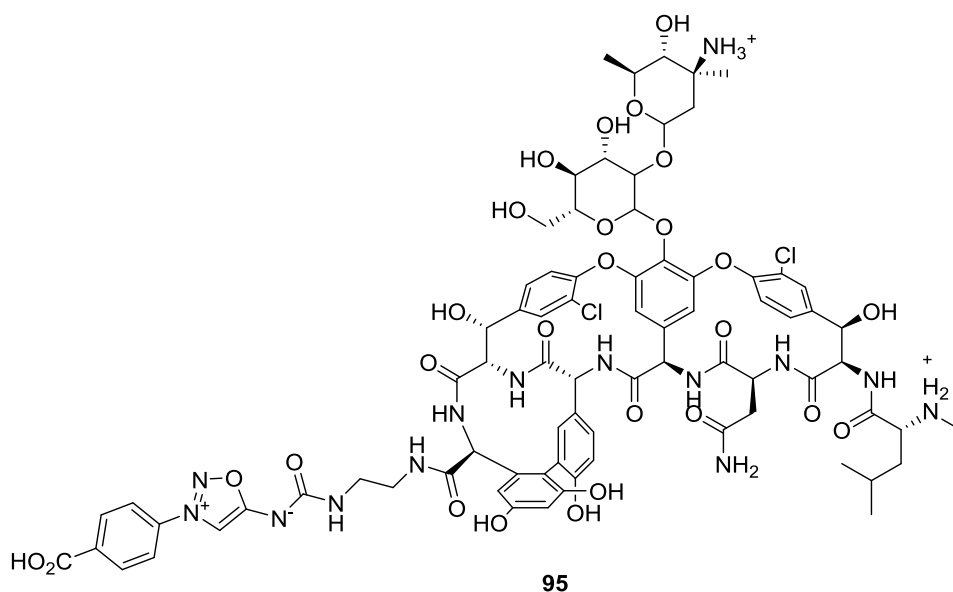
$C_{36}H_{41}NO_{13}$
MW: 696 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 23%

To a stirred solution of **93** (29 mg, 0.05 mmol) in pyridine (100 μL) was added Ac₂O (30 μL, 0.30 mmol). The reaction was stirred at room temperature during 3 days. The solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 80/20 to 70/30) to afford the desired product as a white solid (8 mg, 23%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 13.74 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 7.77–7.83 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.59 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 3.3 Hz, 1H), 5.53 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 5.48 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.47 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 3.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.17 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.18 (s, 3H).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 696.

((2-aminoethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide-Vancomycin conjugate (95)



To a commercial solution of vancomycin in DMSO (2.89 mL, 0.2 mmol, 100 mg/mL) was added NHS (27.6 mg, 0.24 mmol) and DCC (83 mg, 0.40 mmol). The mixture was stirred for 4 days.

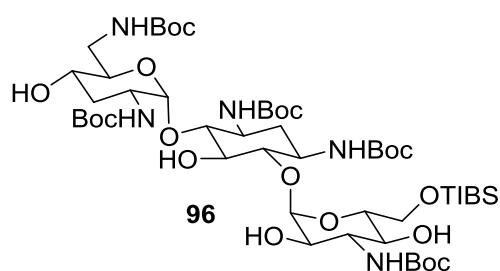
In another flask, as solution of **26k** (158 mg, 0.40 mmol) and TFA (2 mL) in DCM (2 mL) was stirred for 40 min. The solvents were evaporated and co-evaporated several time with MeOH.

89 mg (0.22 mmol) of the obtained solid was added to the activated vancomycin. NEt₃ (122 μL, 0.88 mmol) was added and the mixture was stirred for 3 more days. the crude product was purified by preparative HPLC to obtain the desired product as a pale yellow solid (35 mg, 10%).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₇₈H₈₈Cl₂N₁₄O₂₇ [M]²⁺:861.2655; found: 861.2663.

for C₇₈H₈₉Cl₂N₁₄O₂₇ [M+H]³⁺:574.5127; found: 574.5135.

((2R,3S,4S,5R,6S)-6-(((1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-bis((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-hydroxycyclohexyl)oxy)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonate (96)



C₅₈H₉₉N₅O₂₁S
MW: 1234 g.mol⁻¹
White solid
Yield: 58% (2 steps)

Compound **96** was obtained according to a reported procedure.²⁹⁶ A solution of tobramycin (935 mg, 2.00 mmol) in 28 mL aqueous DMSO (DMSO/water, 6/1) was treated with di-*tert*-butyldicarbonate (2.62 g, 12.0 mmol). The solution was heated at 60 °C overnight, then cooled to 23 °C. A solution of 30% aqueous ammonia (5 mL) was added dropwise to the mixture. The precipitated solid was filtered, washed with water and dried in a dessicator. The desired product was obtained as a white solid (1.58 g, 81%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 5.11 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 3.94 (m, 1H), 3.80 (m, 1H), 3.71 (m, 2H), 3.61 (m, 3H), 3.33–3.56 (m, 10H), 2.11 (m, 1H), 2.00 (m, 1H), 1.42–1.50 (m, 45H).

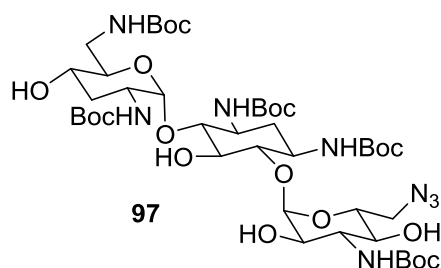
LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 969.

A solution of this product (267 mg, 0.30 mmol) in pyridine (5 mL) was treated with 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride (636 mg, 2.1 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 36 h. It was neutralized by adding hydrochloric acid (1.0 N), and partitioned between water and ethyl acetate. The aqueous layer was separated and extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. Flash column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 99/1 to 96/4) afforded the desired product as a white solid (267 mg, 72%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 7.27 (s, 2H), 5.05 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.15 (m, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.35–3.64 (m, 12H), 2.94 (sept., *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.94–2.12 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.45 (m, 27H), 1.40 (m, 18H), 1.26 (m, 18H).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 1235.

di-tert-butyl ((1S,3R,4S,5S,6R)-4-(((2R,3R,4S,5S,6R)-6-(azidomethyl)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxycyclohexane-1,3-diylo)dicarbamate (97)



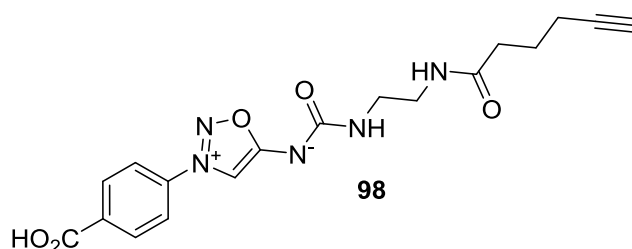
C₄₇H₇₆N₈O₁₈
MW: 993 g.mol⁻¹
 White solid
Yield: 84%

Compound **96** was obtained according to a reported procedure.²⁹² DMF (2.5 mL) was added **96** (247 mg, 0.20 mmol). Sodium azide (104 mg, 1.60 mmol) was added. The yellow solution was heated to 65 °C and stirred for 24 hours. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting solid was dissolved in DCM and washed with water. The organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The product was isolated by column chromatography (SiO₂, DCM/MeOH, from 97/3 to 95/5) as a white solid (167 mg, 84%).

¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄): δ 5.11 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.33–3.65 (m, 14H), 2.11 (m, 1H), 2.01 (m, 1H), 1.54–1.70 (m, 2H), 1.42–1.50 (m, 45H).

LCMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 994.

(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)((2-(hex-5-ynamido)ethyl)carbonyl)amide (98)



C₁₈H₁₉N₅O₅
MW: 385 g.mol⁻¹
 Dark yellow solid
Yield: 47%

To a solution of **26k** (277 mg, 0.71 mmol) in DCM (2 mL) was added TFA (1 mL). The mixture was stirred 1 hour at room temperature before being evaporated under *vacuum*. The residue was co-evaporated several times with MeOH.

It was dissolved in DMF (5 mL) and were added 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl hex-5-ynoate (186 mg, 0.88 mmol) and NEt₃ (300 μL, 2.13 mmol). The mixture was stirred overnight at room temperature before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated in water and DCM to afford the desired product as a dark yellow solid (160 mg, 47%).

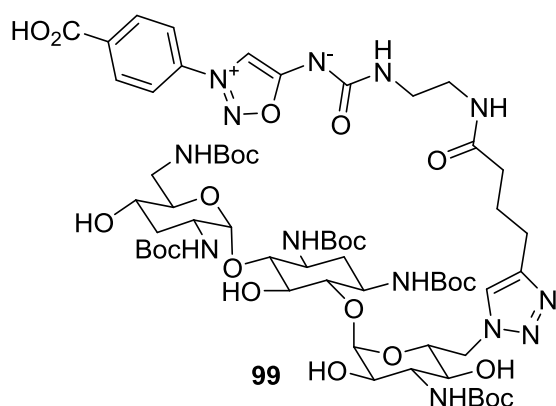
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.45 (s, 1H), 8.17 (m, 4H), 7.87 (br.s 1H), 7.01 (br.s, 1H), 3.11 (m, 4H), 2.77 (m, 1H), 2.15 (m, 4H), 1.65 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 171.8, 171.6, 166.0, 160.8, 136.7, 134.3, 131.0 (2C), 122.6 (2C), 102.6, 64.1, 84.1, 71.4, 34.2, 24.2, 17.4.

Two signals of the aliphatic chain hidden behind the solvent peak.

LCMS (ESI) m/z [M-H] $^-$ 384.

((2-(4-(1-(((2R,3S,4S,5R,6R)-6-(((1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-bis((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-hydroxycyclohexyl)oxy)-4-(((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanamido)ethyl)carbonyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (99)



$\text{C}_{61}\text{H}_{95}\text{N}_{13}\text{O}_{23}$
MW: 1379 g.mol $^{-1}$
Yellow solid
Yield: 56%

A freshly prepared solution of sodium ascorbate in water (1M, 27 μL) was added to a mixture of **97** (60 mg, 61 μmol), **98** (23 mg, 61 μmol), CuSO_4 in solution (7.5 g/L, 194 μL) in THF/ $t\text{BuOH}$ / H_2O (3/1/1, 2 mL). The resulting solution was stirred overnight and then was evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO_2 , DCM/MeOH/AcOH, from 90/10/0 to 89/10/1) to afford the desired product as a yellow solid (114 mg, 56%).

^1H NMR (400 MHz, MeOD- d_4) δ 8.6 (s, 1H), 8.33, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.86 (s, 1H), 6.877 (s, 1H), 5.15 (s, 1H), 5.10 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.33–3.66 (m, 14H), 3.01 (m, 1H), 2.70 (m, 2H), 2.17–2.36 (m, 3H), 1.90–2.09 (m, 4H), 1.61–1.73 (m, 2H), 1.33–1.54 (m, 45H).

Product was not soluble enough to afford a ^{13}C NMR spectrum.

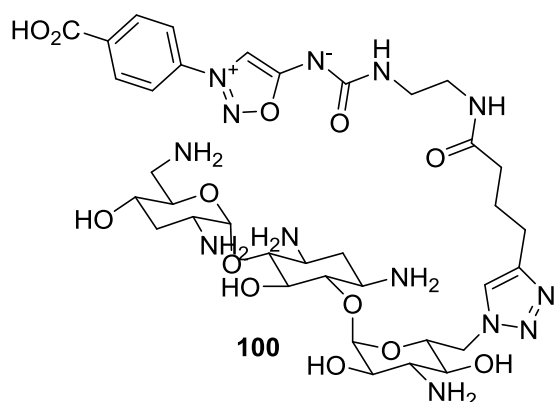
IR (cm^{-1}) 3363, 2927, 1682, 1422, 1366, 1164, 1034, 776.

HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{96}\text{N}_{13}\text{O}_{23}$ [M+H] $^+$: 1378.6737; found: 1378.6737;

calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{97}\text{N}_{13}\text{O}_{23}$ [M+2H] $^{2+}$: 689.8404; found: 689.8411.

Mp. >300 $^\circ\text{C}$.

((2-(4-(1-(((2R,3S,4S,5R,6R)-4-amino-6-(((1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-(((2R,3R,5S,6R)-3-amino-6-(aminomethyl)-5-hydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2-hydroxycyclohexyl)oxy)-3,5-dihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanamido)ethyl)carbonyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (100)

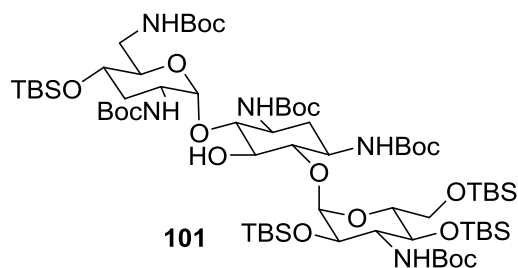


$C_{36}H_{55}N_{13}O_{13}$
MW: 878 g.mol⁻¹
 Yellow solid
Yield: 18%

A solution of **99** (44 mg, 32 μ mol) in a mixture of MeOH and concentrated HCl (6/4) was stirred for 2 hours. The solvent was evaporated under reduced pressure and the crude product was purified by preparative HPLC to afford the desired product as a yellow solid (2.8 mg, 18%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 9.00 (s, 1H), 8.35 (m, 2H), 8.12 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.51–4.65 (m, 2H), 4.30 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.85–3.94 (m, 2H), 3.71–3.82 (m, 4H), 3.36–3.64 (m, 9H), 3.26 (m, 1H), 2.67 (m, 2H), 2.52 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.30 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.07 (m, 1H), 1.85–1.99 (m, 3H).

di-tert-butyl ((1S,3R,4S,5S,6R)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-bis((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)-6-(((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxycyclohexane-1,3-diyl)dicarbamate (101)



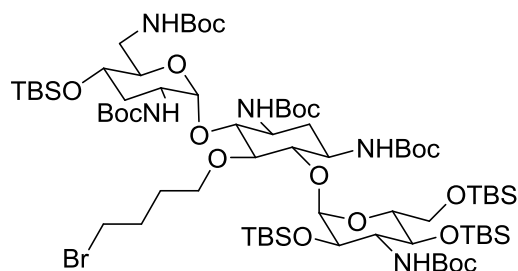
$C_{67}H_{133}N_5O_{19}Si_4$
MW: 1425 g.mol⁻¹
 White solid
Yield: 71% (2 steps)

Compound **101** was obtained according to a reported procedure.^{293b} A solution of tobramycin (2.34 g, 5.00 mmol) in H₂O/DMF (10 mL/40 mL) was treated with triethylamine (910 μ L, 6.50 mmol) and di(tert-butyl)dicarbonate (6.55 g, 30.0 mmol) and stirred at 60 °C for 5 h. Then, the solution was cooled to room temperature and was concentrated under reduced pressure. The product was precipitated with a few drops of a solution of 30% aqueous ammonia. The precipitate was collected via filtration, washed with water, and dried under *vacuum* overnight to obtain the Boc-protected as a white solid (3.97 g, 82%).

To a stirred solution of this product in anhydrous DMF (10 mL, TBSCl (5.90 g, 39.4 mmol) and 1-methylimidazole (3.3 mL, 41.0 mmol) were added subsequently. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 days. Water was added into the mixture and extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were washed with saturated brine, dried over MgSO₄ and purified by column chromatography (SiO₂, Heptane/EtOAc, from 95/5 to 75/25) to give the desired product as a white solid (5.01 g, 86%, 71% over 2 steps).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.18 (br.s, 1H), 5.35 (br.s, 1H), 5.21 (br.s, 1H), 4.99 (br.s, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.88 (s, 1H), 4.73 (br.s, 1H), 4.32 (br.s, 1H), 3.04–3.93 (m, 15H), 2.68 (m, 1H), 2.03 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.30–1.55 (m, 45H), 0.76–0.96 (m, 36H), 0.01–0.016 (m, 24H).

di-tert-butyl ((1S,3R,4S,5S,6R)-5-(4-bromobutoxy)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)cyclohexane-1,3-diyl)dicarbamate (102)



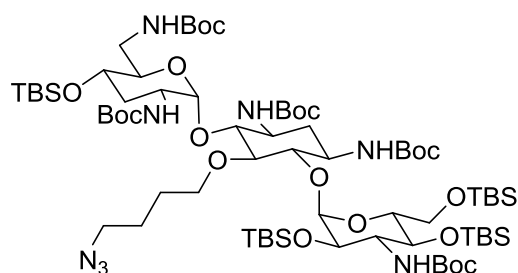
102

$\text{C}_{71}\text{H}_{140}\text{BrN}_5\text{O}_{19}\text{Si}_4$
MW: 1560 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 White solid
Yield: 54%

Compound **102** was obtained according to a reported procedure.²⁹⁷ **101** (1.43 g, 1.0 mmol) was alkylated with 1,4-dibromoalkane (600 μL , 5.0 mmol) in dry toluene (10 mL) under phase-transfer catalytic-assisted condition of KOH (168 mg, 3.0 mmol) and tetrabutyl ammonium bromide (34 mg, 0.10 mmol). The mixture was stirred at room temperature overnight. At the end, solvent was evaporated under reduced pressure and the crude compound purified by flash chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, from 100/0 to 90/10) to give desired product as white solid (850 mg, 54%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.50 (br.s, 1H), 5.16 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.99 (br.s, 2H), 4.73 (br.s, 1H), 4.50 (br.s, 1H), 4.11–4.20 (m, 3H), 3.12–3.81 (m, 18H), 2.44 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 1.80–1.91 (m, 3H), 1.54–1.63 (m, 2H), , 1.37–1.48 (m, 45H), 0.92 (s, 9H), 0.80–0.88 (m, 27H), 0.13 (s, 6H), 0.02–0.08 (m, 18H).

di-tert-butyl ((1S,3R,4S,5S,6R)-5-(4-azidobutoxy)-4-(((2S,3R,4S,5S,6R)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-6-(((tert-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)cyclohexane-1,3-diyl)dicarbamate (103)



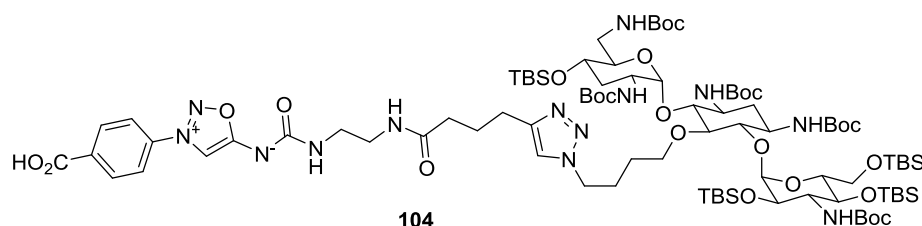
103

$\text{C}_{71}\text{H}_{140}\text{N}_8\text{O}_{19}\text{Si}_4$
MW: 1522 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 White solid
Yield: 94%

Compound **102** was obtained according to a reported procedure.²⁹⁷ **102** (139 mg, 0.089 mmol) dissolved in DMF (1.8 mL) was treated with NaN_3 (23 mg, 0.36 mmol) at 75 $^\circ\text{C}$ for 5 h. Water was added and the mixture was extracted thrice with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO_4 , and concentrated under reduced pressure to afford the desired compound. The crude compound was subsequently purified by flash column chromatography (SiO_2 , Heptane/EtOAc, from 100/0 to 85/15) to give desired product as white solid (127 mg, 94%)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.45 (br.s, 1H), 5.15 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.98 (br.s, 2H), 4.72 (br.s, 1H), 4.49 (br.s, 1H), 4.01–4.20 (m, 3H), 3.08–3.83 (m, 18H), 2.42 (m, 1H), 1.95 (m, 1H), 1.47–1.63 (m, 5H), 1.29–1.46 (m, 45H), 0.90 (s, 9H), 0.77–0.86 (m, 27H), 0.11 (s, 6H), -0.02–0.06 (m, 18H).
 IR (cm^{-1}) 2953, 2096, 1697, 1502, 1366, 1251, 1161, 1028, 834, 731.

((2-(4-(1-(4-(((1S,2S,3R,5S,6R)-3,5-bis((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-(((2S,3R,4S,5S,6R)-4-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3,5-bis((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-6-(((tert-butylidimethylsilyl)oxy)methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-6-(((2R,3R,5S,6R)-3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(((tert-butoxycarbonyl)amino)methyl)-5-((tert-butylidimethylsilyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)cyclohexyl)oxy)butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butanamido)ethyl)carbamoyl)(3-(4-carboxyphenyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide (104)



$\text{C}_{89}\text{H}_{159}\text{N}_{13}\text{O}_{24}\text{Si}_4$
MW: 1908 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Pale yellow solid
Yield: 22%

103 (50 mg, 33 μmol) was solubilized in DMF (1 mL) with **98** (13 mg, 33 μmol). The solution was degassed with argon for 30 minutes. CuBr (5.7 mg, 40 μmol) and THPTA (52 mg, 0.12 mmol) were added and the mixture was stirred for 3 days. The mixture was extracted with DCM and the organic layer was washed with a solution of EDTA, separated, dried over MgSO_4 and evaporated. The crude product was purified by column chromatography to afford the desired product as a pale yellow solid (13.7 mg, 22%).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD-d_4) δ 8.36 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.9 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5.35 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.18–4.42 (m, 3H), 3.98 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.36–3.92 (m, 16H), 2.72 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.93–2.07 (m, 6H), 1.89 (m, 1H), 1.55–1.74 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.44 (s, 18H), 1.42 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 1.19–1.35 (m, 4H), 0.94 (m, 18H), 0.89 (m, 18H).

The small amount of product obtained did not permit to obtain a $^{13}\text{C NMR}$ spectrum.

LCMS (ESI) m/z [M+H] $^+$ 1909.

B. Determination of kinetic constants

Reactions of iminosydnonones **26i**, **27e** with BCN and DBCO were carried out in PBS/DMSO (99:1) mixtures at 50 μM concentration of iminosydnonones and 75 μM concentration of BCN using the following procedure.

To 189 μL of PBS 10mM was added 1 μL of iminosydnone (10 mM in DMSO) and 10 μL of the solution of cycloalkyne (1.5 mM in DMSO/PBS 1/9) in a 96-well and the absorption was measured every second at 360 nm. This operation was repeated 3 times.

Correspondences between absorption and concentrations were established by plotting the calibration curve obtained by measuring the absorption at 360 nm of the starting material at different concentration (**Table S17**) (at this selected wavelength, the cycloalkyne and the final products do not absorb).

Second order reaction rate was determined by plotting $-\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ versus time and analyzing by linear regression (**Equation S7**). Second order rate constant corresponds to the determined slope.

$$\frac{-\ln\left(\frac{[A]}{[B]}\right)}{[A]_0 - [B]_0} = kt + \text{const}$$

Equation S7 : [A]—concentration of iminosydnonones (M); [B]—concentration of BCN (M); t—reaction time (s);
k—reaction rate (M⁻¹s⁻¹)

Linear regression curves for the reactive iminosydnonones are illustrated in **Table S18**

Figure S259: Absorption spectra of compounds **26i** and **27e** at 100 μ M in PBS 10 mM containing 1% of DMSO.

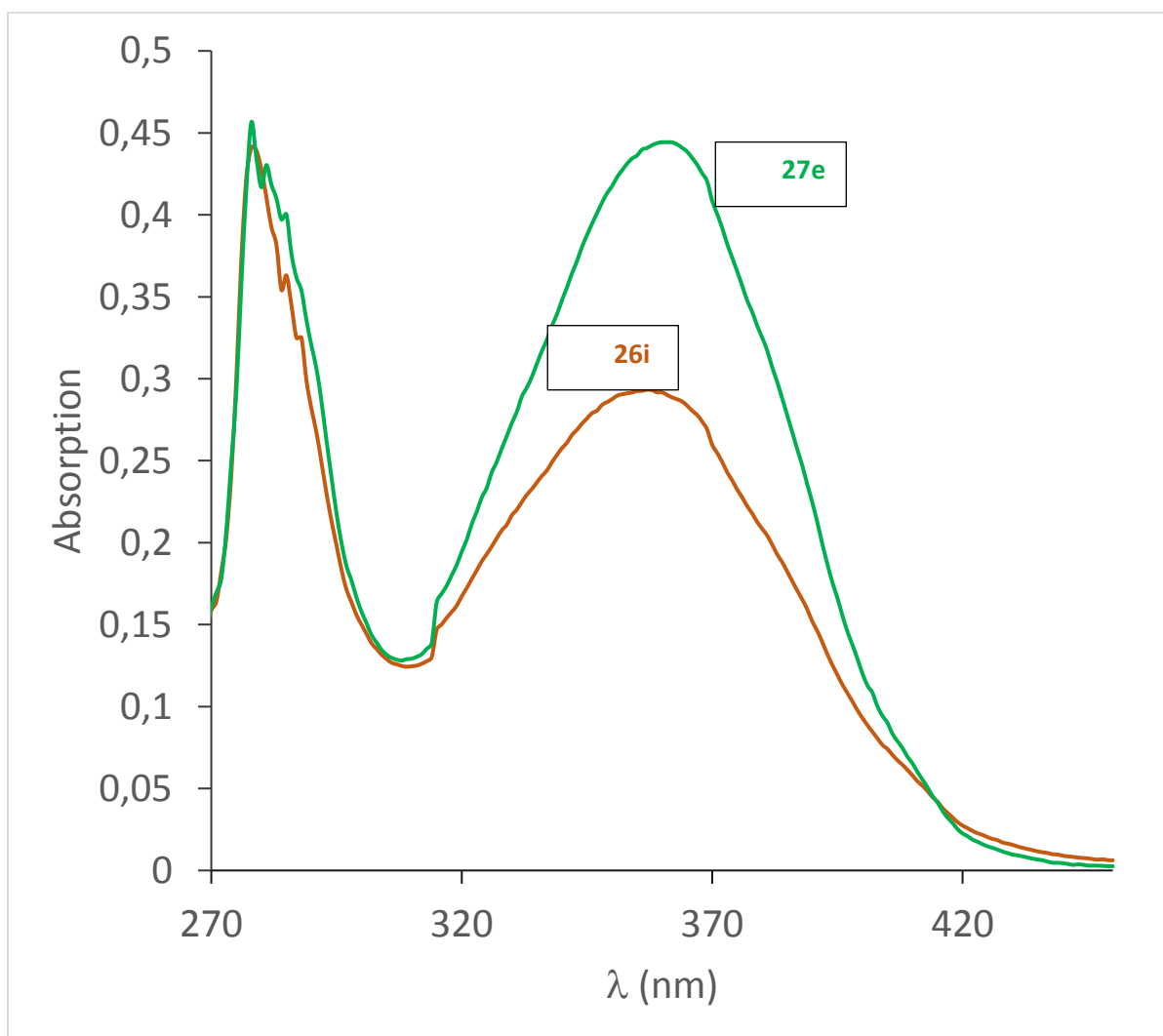


Table S17 : Calibration curves relating iminosydnone concentration and absorption.

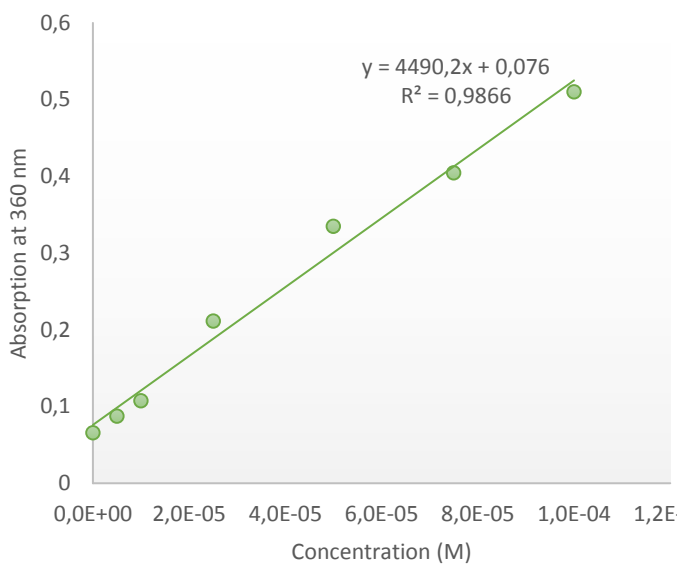
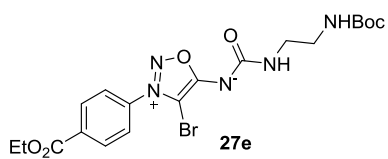
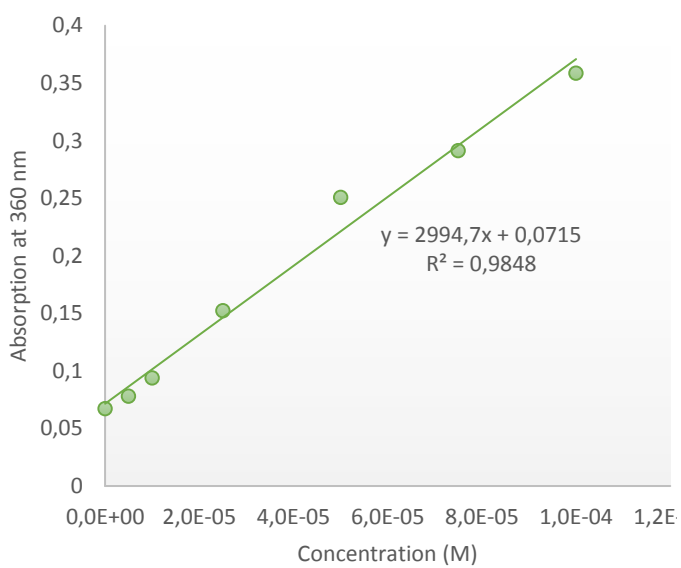
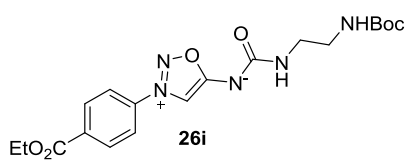


Table S18 : Linear regression curves showing $-\ln([A]/[B])/([A]_0 - [B]_0)$ plotted versus time

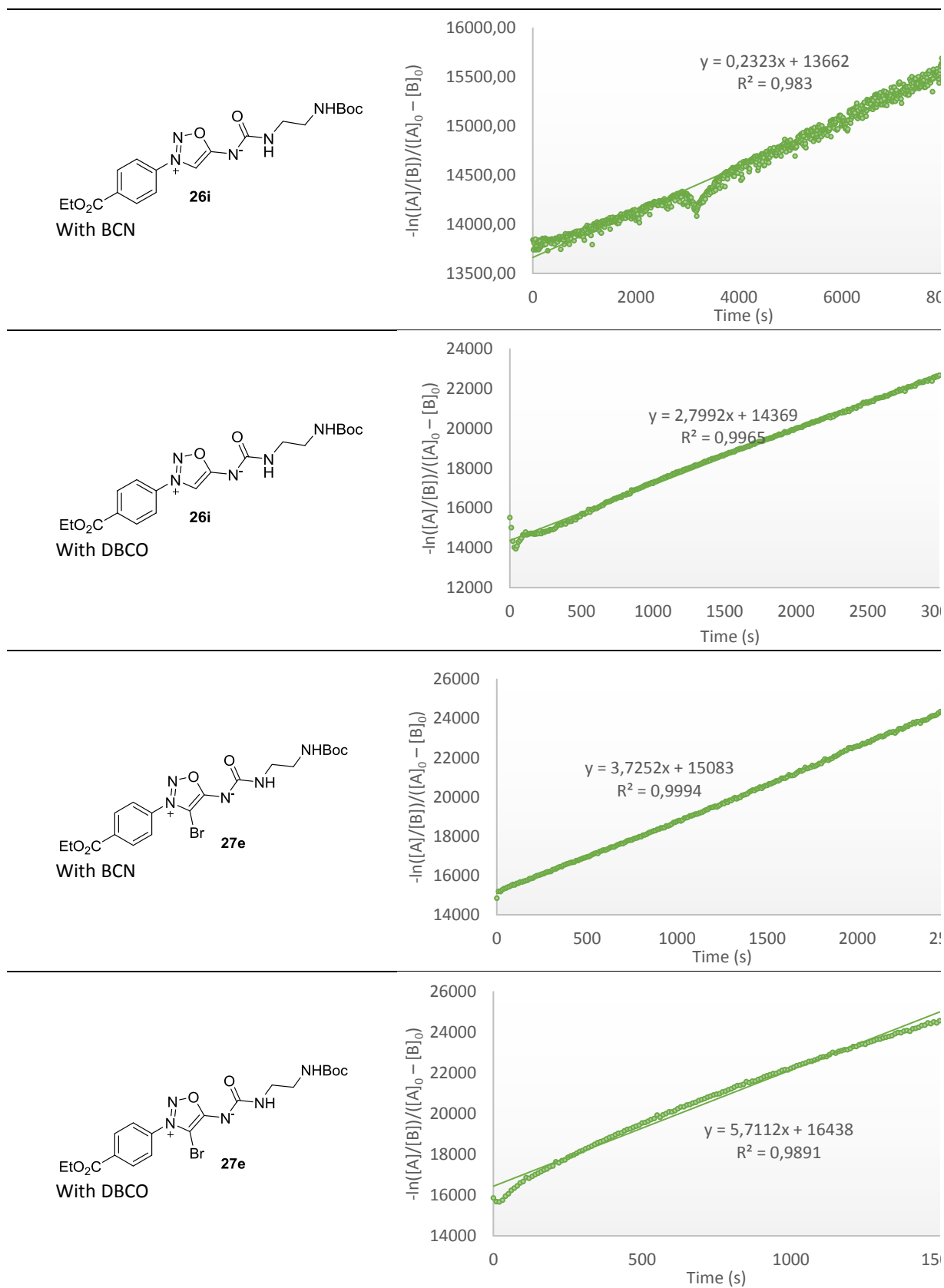
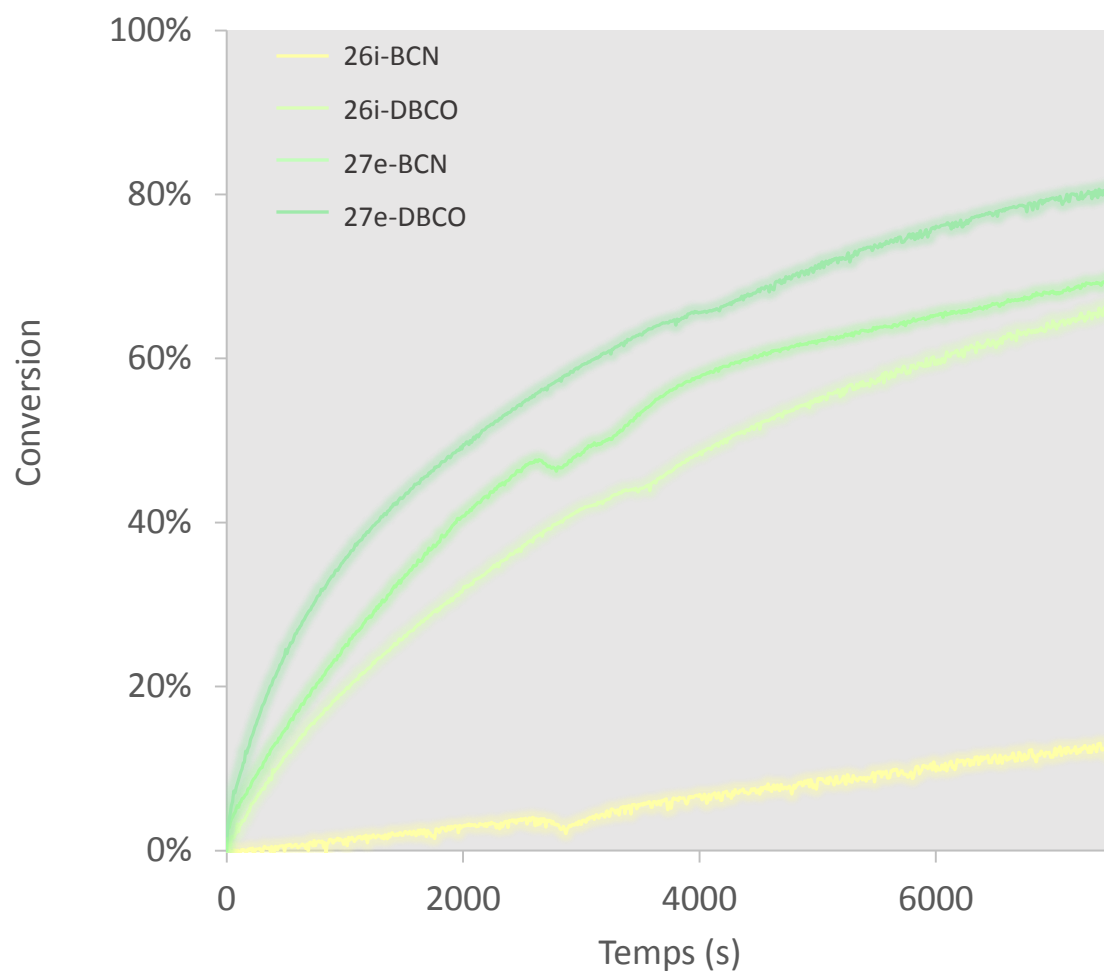


Figure S260 : Conversion of the click reactions of **26i** and **27e** with BCN and DBCO



C. Stability and reactivity in plasma

A solution of **73** in DMSO (10 mM, 2 μ L) was added to human plasma (1.0 mL). The stability of compound **73** in plasma was followed by LCMS. For one measurement, 25 μ L of the plasma solution were sampled. 160 μ L of EtOH were added and the resulting mixture was cooled down at 0 $^{\circ}$ C for 5 min. The medium was then centrifuged for 2 min and the supernatant was analyzed by LCMS.

After 95h, 2 μ L of DBCO in DMSO (24mM) was added to 25 μ L of the solution of **73** in plasma. After 30 min the mixture was treated as before for LCMS analysis.

Figure S261 : ES+ detection for **73** after 95h in human plasma

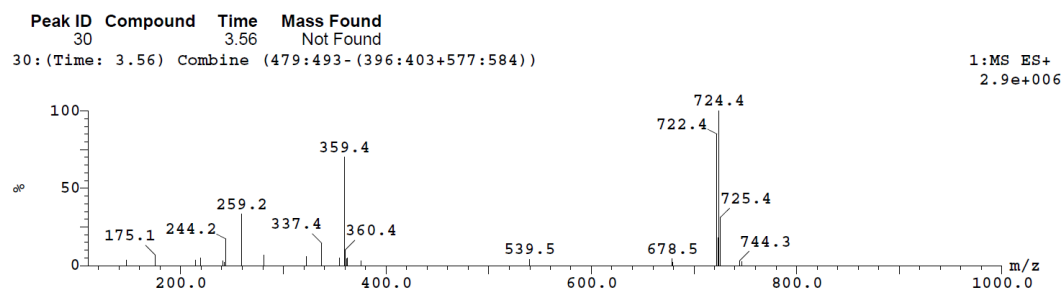


Figure S262 : ES+ detection after addition of DBCO on **73** after 95h in human plasma

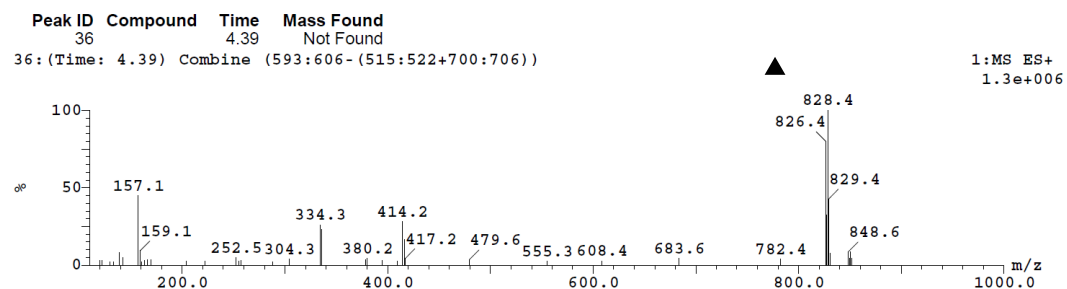
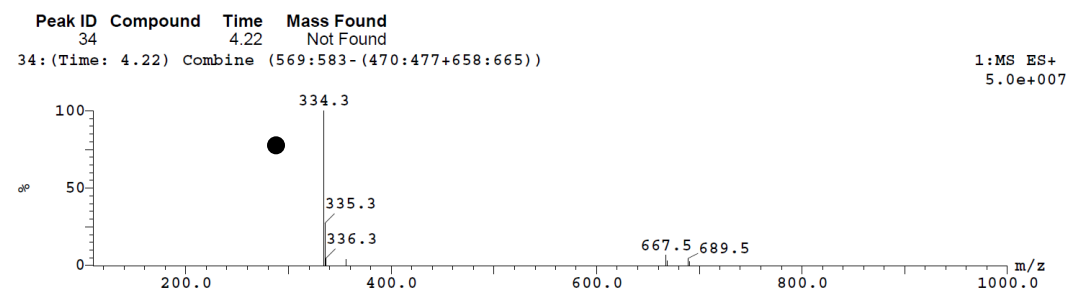
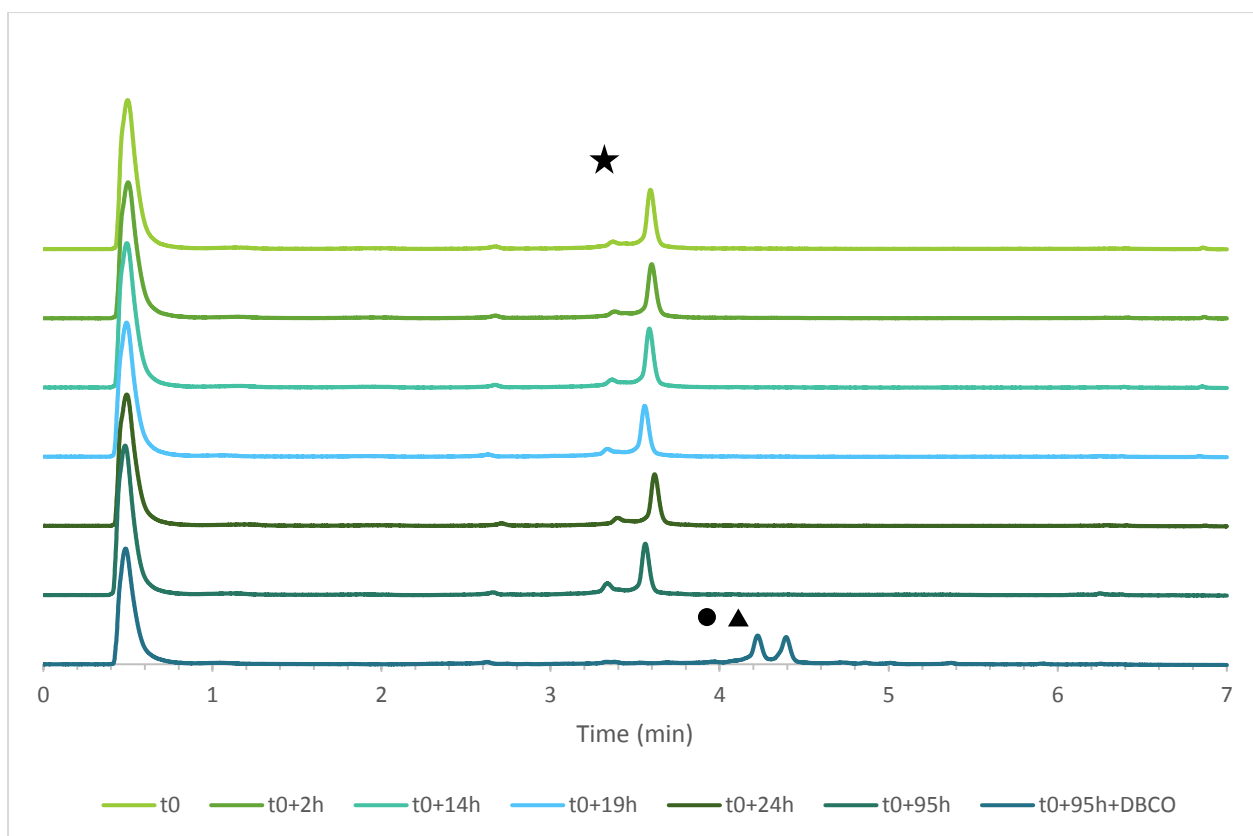
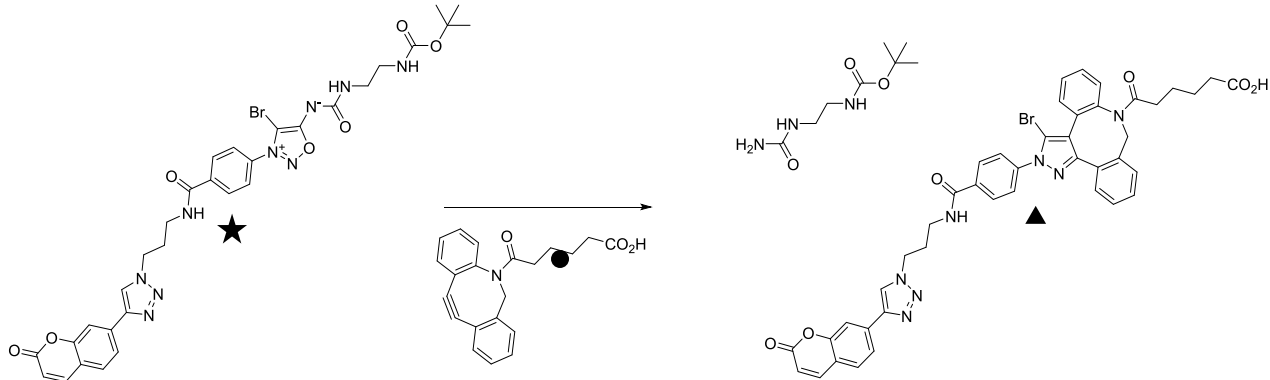


Figure S263 : HPLC chromatograms for 73 during 95h.



D. Experiments with Myoglobin:

MATERIALS

CuSO₄, AscNa, DBCO-*peg*₄TAMRA (MW = 936,06 Da), DMSO and mammalian protease inhibitor cocktail P8340 were purchased from Sigma Aldrich.

MYO-Alk (Myoglobin bearing alkyne function) was prepared as described before.³⁰⁸ Mice liver native protein extract was obtained using standard grinding technique including HEPES extraction buffer pH 7,4 containing 1% of mammalian protease inhibitor cocktail P8340. The Mini-Protean III electrophoresis system, 4-20% gradient mini-gels, running buffer (tris/glycine migrating buffer) and Precision Plus Molecular marker were from Bio-Rad Laboratories (Germany).

METHODS

SDS-PAGE

Proteins samples in loading buffer were boiled at 95 °C for 5 min and subsequently loaded into wells of a 4-20% mini-SDS gel.

FLUORESCENCE IMAGING

Fluorescent imaging on gel was performed with VersaDoc MP 4000 Molecular Digital Imaging System (Bio-Rad) allowing visualization of bands relative to fluorescent proteins. Blue LED was used as light source and the chosen filter for emission collection was 605BP.

CAPTURE EXPERIMENTS

Capture experiments were performed using magnetic beads functionalized with Streptavidin (Dynabeads M-280 Streptavidin, DYNAL Biotech). MPC-S magnet (DYNAL Biotech) was used to remove beads supernatant. Before use, beads were rinsed several time with water and PBK 20 mM pH 7,4 DMSO 0,5%.

PROTOCOLS

Experiments using Probe 1

Relationship between molecular weight and migration positions of MyoAlk, MyoBiot and MyoTAMRA.

MyoBiot and MyoTAMRA samples were prepared as follow and analysed together with MyoAlk starting material by SDS-PAGE.

Probe 1, CuSO₄, THPTA (48 µL of **Probe 1** 2,1 mM in DMSO+ 40 µL of CuSO₄ 7,4 mM in H₂O+20 µL of THPTA 16 mM in H₂O) were mixed and incubated 2 minutes before the addition of 40 µL of Na Asc. freshly prepared solution 14,8 mM in H₂O. 74 µL of this preparation were added to myoglobine-alkyne (**MyoAlk**) (50 µg, 3 nmoles) previously solubilized in PBK 20 mM pH 7,4 (85 µL). The solution containing **MyoAlk/ Probe 1** /CuSO₄/THPTA/Na Asc. at respective concentration of 18,75 µM (0,3125 µg/µL)/318 µM/937 µM /1,075 mM/1,875 mM was incubated at RT for 2 hours to provide **MyoBiot**. 4,8 µL (1,5 µg) of the reaction mixture as well as 1,5 µg of **MyoAlk** starting material were diluted with Laemmli 1X Laemli buffer to afford reference **MyoAlk** and **MyoBiot** samples for SDS-PAGE.

³⁰⁸ A. Sallustrau, S. Bregant, C. Chollet, D. Audisio, F. Taran *Chem. Commun.*, **2017**, DOI:10.1039/C7CC03247A.

Solution-based treatment of 1,5 µg of **MyoBiot** (0,09 nmoles) 1 mM of DBCO-TAMRA in a 20 µL total volume affords **MyoTAMRA**. After 1h of incubation at RT, 20 µL of Laemmli buffer 2X was added to the sample that was submitted to SDS-PAGE together with **MyoAlk** and **MyoBiot**.

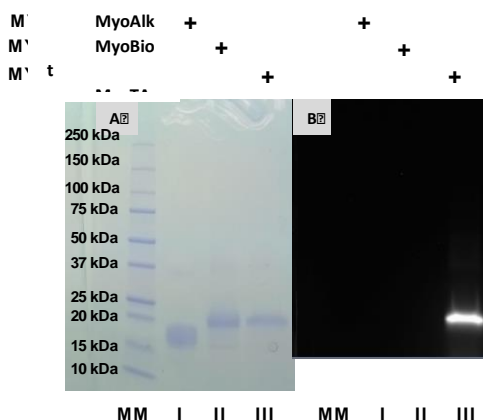


Figure S264 : SDS-PAGE analysis of 1,5 µg of MyoALK (lane I), MyoBiot (lane II) and MyoTAMRA (lane III). MM stands for Molecular Markers. Left panel: Coomassie stained gel; Right Panel : gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000

Standard CuAAC to provide MyoBiot with Probe 1

Probe 1, CuSO₄, THPTA (24 µL of **Probe 1** 2,1 mM in DMSO+ 20 µL of CuSO₄ 7,4 mM in H₂O+10 µL of THPTA 16 mM in H₂O) were mixed and incubated 2 minutes before the addition of 20 µL of Na Asc. freshly prepared solution 14,8 mM in H₂O. The whole volume of **Probe 1**/CuSO₄/THPTA/Na Asc. was added to myoglobine-alkyne (**MyoAlk**) (200 µg, 11,8 nmoles) previously solubilized in PBK 20 mM pH 7,4 (59 µL). The solution containing **MyoAlk/Probe 1** /CuSO₄/THPTA/Na Asc. at respective concentration of 84 µM (1,5 µg/µL)/380 µM/1,1 mM/1,15 mM/2,2 mM was incubated at RT for 1 hour before being used for the solution-based trans-tagging or capture experiments followed by release step described below.

Model capture-release experiments targeting isolation and tagging of MyoBiot

Model capture-release experiments uses as starting material biotinylated Myoglobin spiked or not in tissue extract.

Capture

0,5 mg of Dynal M-280 beads were incubated with 20 µL of a PBK 20 mM pH 7,4 DMSO 0,5% solution containing 1 µg of **MyoBiot** (0,06 nmoles) in presence or not of proteic mixture 25 µg. After 2 hours incubation with gentle shaking, beads supernatants were collected with the help of a magnet. Each supernatant was mixed with the recovered volume of a washing step (20 µL of PBK 20 mM pH 7,4 DMSO 0,5%.) and 13 µL of Laemmli Blue to afford 1X samples.

Release

Beads were then suspended in 19,5 µL of PBK 20 mM pH 8 and subjected to the addition of 0,5 µL of solution of DBCO-TAMRA (20 mM in DMSO) leading to a 500 µM release cocktail in contact with beads. After 2 hours incubation with gentle shaking, beads were first centrifugated and placed onto the magnet device to collect the beads supernatant that was mixed with the volume of an additive washing step performed using 20 µL of PBK 20 mM pH 8 to afford Release supernatant (RI) mixed with concentrated Laemmli blue to afford 1X samples. As control capture-release experiment, DMSO (0,5 µL) instead of DBCO-TAMRA was added for the release step as it uses a total 2,5 % DMSO solution. Same protocol was then followed to recover capture and release supernatants.

As labeling solution-based control experiments, 1 μg of **MyoBiot** (0,06 nmoles) in presence or not of proteic mixture 25 μg were directly labeled in a total 20 μL volume of PBK 20 mM pH 8 using 500 μM of DBCO-TAMRA.

a) analysis of release contents from beads compared to direct trans-tagging experiments

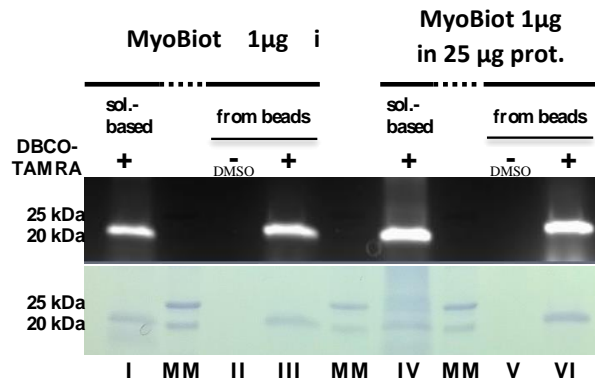


Figure S265 : SDS-PAGE analysis of a) solution-based trans-tagging experiments using DBCO₄-TAMRA of buffered **MyoBiot** (lane I), spiked **MyoBiot** in proteins extract (lane IV) b) release supernatants from beads chemical treatment with DMSO 2,5% (lanes II and V) or DBCO₄-TAMRA 26 in DMSO 2,5% (lanes III and VI) after capture experiments of buffered **MyoBiot** (lanes II and III), spiked **MyoBiot** in proteins extract (lanes V and VI). MM stands for Molecular Markers. Lower panel: Coomassie stained gel; top panel : gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000

b) supernatants contents after capture

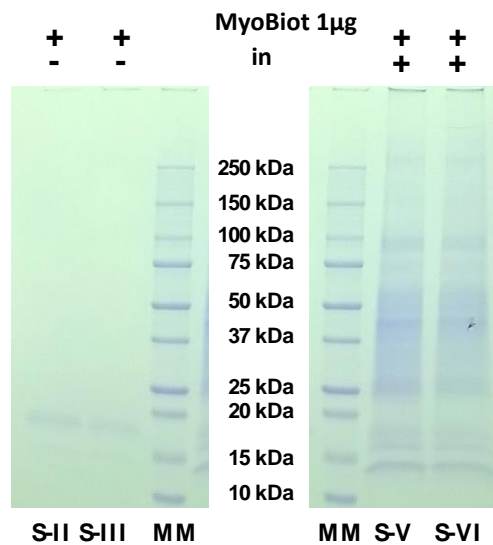


Figure S266 : SDS-PAGE analysis of capture supernatant S : S-II and S-III supernatants were isolated from beads after capture of buffered **MyoBiot** and S-V and S-VI after capture of spiked **MyoBiot** in proteins extract. MM stands for Molecular Markers. Left and right panels: Coomassie stained gel

c) remaining proteins on beads

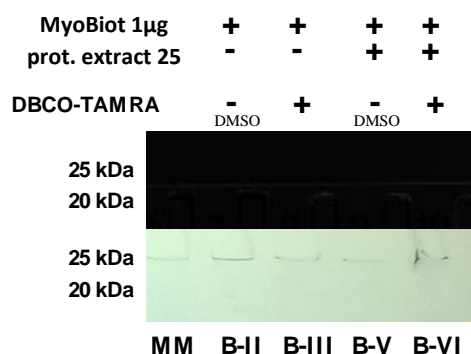


Figure S267 : SDS-PAGE analysis of remaining proteins on beads: B-II and B-III refer to beads used for buffered **MyoBiot** capture and B-V and B-VI to beads used for capture of **MyoBiot** spiked in proteins extract. B-II and B-V were previously treated with DMSO 2,5% and B-III and B-VI with DBCOpeg₄-TAMRA **26**. MM stands for Molecular Markers. Lower panel: Coomassie stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000

General procedure C for CuAAC

Probe X in DMSO, CuSO₄ in water, THPTA in water were mixed and incubated 15 minutes before the addition of a freshly prepared solution of Na Asc. This mixture (MIX) was incubated for 15 minutes and was then added to myoglobine-alkyne (**MyoAlk**) in buffer or complex medium. The solution containing **MyoAlk/Probe X** /CuSO₄/THPTA/Na Asc. was incubated at RT for 1 hour before being used.

General procedure D for Standard Capture

Dynal M-280 beads were incubated with the solution resulting from CuAAC. After 1 hour incubation with gentle shaking, beads supernatants were collected with the help of a magnet. Each supernatant was mixed with the recovered volume of a washing step (20 µL of PBK 20 mM pH 7,4 DMSO 0,5%.) and 13 µL of Laemmli Blue to afford 1X samples.

General procedure E for Click & Release

Beads were then suspended in PBK 20 mM pH 8 and subjected to the addition of a solution of DBCO in DMSO. After 1 hour incubation with gentle shaking, beads were first centrifugated and placed onto the magnet device to collect the beads supernatant that was mixed with the volume of an additive washing step performed using PBK 20 mM pH 8 to afford Release supernatant (RI) mixed with concentrated Laemmli blue to afford 1X samples. Beads were then suspended in Laemmli blue 1X.

Experiment of CuAAC comparison between Probe 1–4**I**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 10 µg of **Myo-Alk** in 40 µL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe X** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (800 µM / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe X** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (14.75 µM / 100 µM / 200 µM / 1 mM / 1.5mM).

Click & Release adducts were obtained by the addition of 2 µL of a DBCO-COOH solution (50 mM in DMSO) to the CuAAC mixture, final concentration: 2.3 mM. This new mixture was incubated for 1 h before being mixed with concentrated Laemmli blue to afford 1X samples.

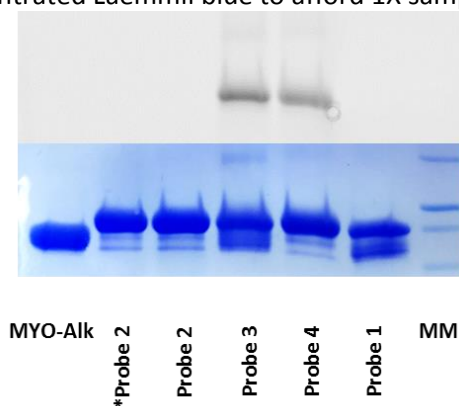


Figure S268 : SDS-PAGE analysis of CuAAC between MYO-Alk and Probes followed by Click & Release with DBCO-COOH. MM stands for Molecular Markers.

Lower panel: Coomassie stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Experiment of variation in Probe concentration with Probe 4**II**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 175 ng of **Myo-Alk** in 40 µL of PBK 20 mM pH 7.4 or protein extract (40 µg):

-MIX: **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (8x µM / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (250 nM / x µM / 200 µM / 1 mM / 1.5mM). x = 1, 3, 5, 10, 20.

The mixtures were then subjected to the addition of 1 µL of a DBCO-COOH solution (50 mM in DMSO, final concentration: 1.2 mM). These new mixtures were incubated for 1 h before being mixed with concentrated Laemmli blue to afford 1X samples.

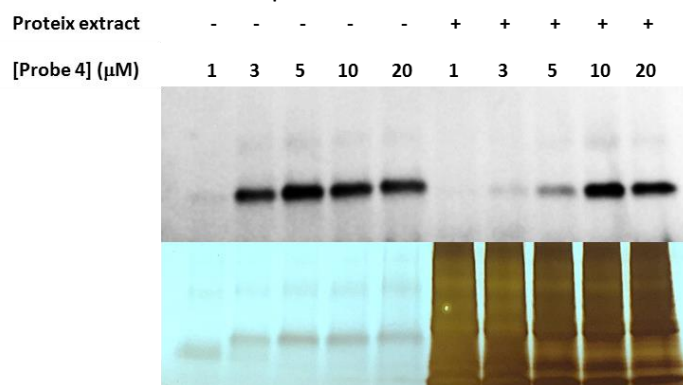


Figure S269 :SDS-PAGE analysis of samples from experiment II.

Lower panel: Silver nitrate stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Experiment for Click & Release with different cycloalkynes Probe 4**III**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 175 ng of **Myo-Alk** in 40 μ L of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (160 μ M / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (250 nM / 20 μ M / 200 μ M / 1 mM / 1.5mM).

The mixtures were then subjected to the addition of 1 μ L of a Cycloalkyne solution (DBCO-COOH and DBCO-NH₂: 50 mM in DMSO, final concentration: 1 mM; BCN 500 mM in DMSO, final concentration: 10 mM). These new mixtures were incubated for 1 h before being mixed with concentrated Laemmli blue to afford 1X samples.

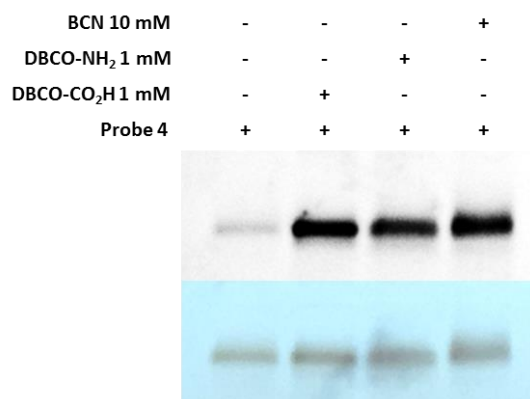


Figure S270 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment III.

Lower panel: Silver nitrate stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Target fishing with Probe 4**IV**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 1 μ g of **Myo-Alk** in 40 μ L of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (160 μ M / 1.6 mM / 8 mM / 40 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (1.48 μ M / 20 μ M / 200 μ M / 1 mM / 5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 100 μ L of beads. The beads were washed with 40 μ L of water and the Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 40 μ L of PBK pH 7.4 (20 mM) mixed with 1 μ L of a solution of DBCO-COOH (50 mM).

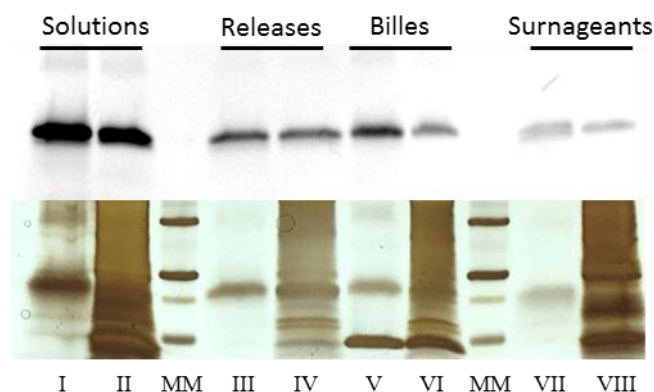


Figure S271 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment IV. solution-based trans-tagging experiments using DBCOpeg₄-TAMRA of buffered **MyoBiot** (lane I), spiked **MyoBiot** in proteins extract (lane II).

Releases (lanes III and IV) are the supernatants collected during step E, the remaining beads are spiked in lanes V and VI. Supernatants (VII and VIII) were collected after step D. MM stands for molecular markers.

Lower panel: Silver nitrate stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000

Target fishing with Probe 2 and 4 –Determination of beads quantity **V**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 0.5 µg of **Myo-Alk** in 20 µL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (40 µM / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe X** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (1.48 µM / 5 µM / 200 µM / 1 mM / 1.5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with x µL of beads. The beads were washed with 40 µL of water and the Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 40 µL of PBK pH 7.4 (20 mM) mixed with 1µL of a solution of DBCO-TAMRA (50 mM) for **Probe 2** and 1µL of a solution of DBCO-COOH (50 mM) for **Probe 4**.

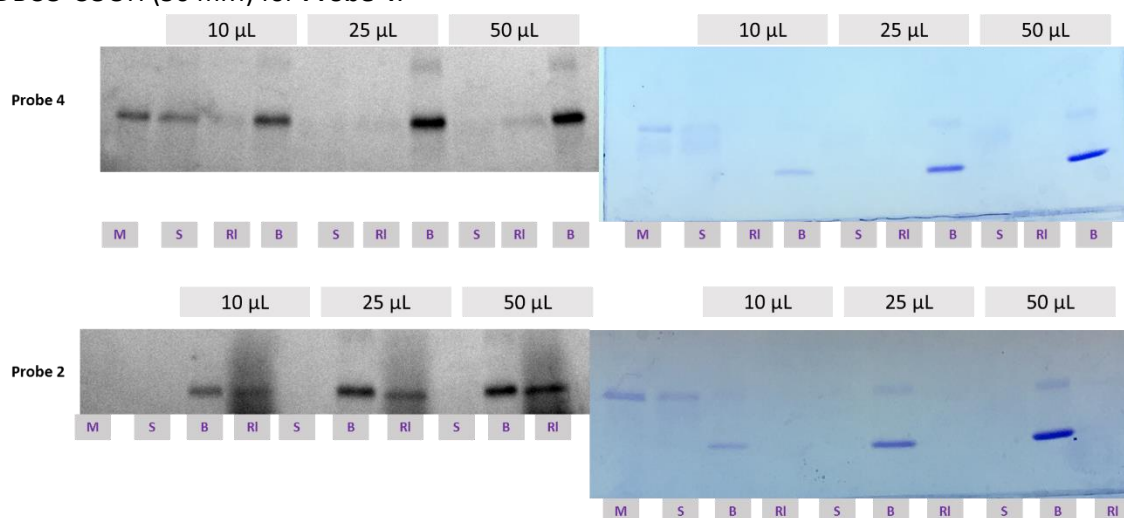


Figure S272 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment V. solution-based trans-tagging experiments using DBCO_{peg4}-TAMRA DBCO-COOH of buffered **MyoBiot** (lane M). Releases (lanes RI) are the supernatants collected during step E,

the remaining beads are spiked in lanes B. Supernatants (S) were collected after step D.

Right panels: Coomassie stained gel; left panels: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000;

Top panels: Experiments made with Probe 4; Bottom panels: experiments made with probe 2.

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 175 ng of **Myo-Alk** in 20 μ L of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 4** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (40 μ M / 1.6 mM / 8 mM / 40 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (500 nM / 5 μ M / 200 μ M / 1 mM / 5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μ L of beads. The beads were washed with 40 μ L of water twice. Sample b) was washed once with Laemmli blue 1/20X. The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf then washed twice with PBK pH 8 (20 mM). The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 20 μ L of PBK pH 8 (20 mM) mixed with 1 μ L of a solution of DBCO-COOH (a) 200 mM or (b) 20 mM).

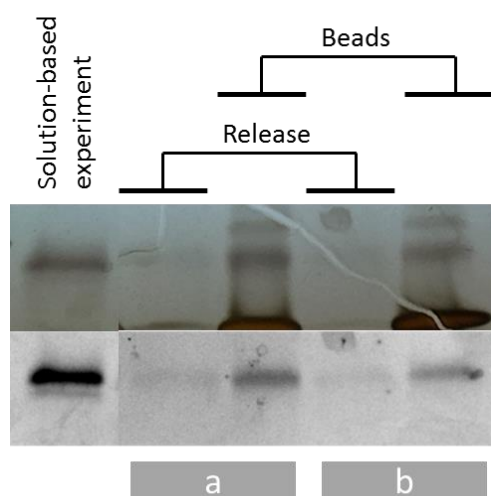


Figure S273 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment VI. -

Releases are the supernatants collected during step E

Top panel: Silver nitrate stained gel; lower panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 175 ng of **Myo-Alk** in 20 μ L of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (40 μ M / 1.6 mM / 8 mM / 40 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO₄ / THPTA / Na Asc (500 nM / 5 μ M / 200 μ M / 1 mM / 5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μ L of beads. The beads were washed with 40 μ L of water twice. The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf then washed twice with PBK pH 8 (20 mM). The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 20 μ L of PBK pH 8 (20 mM) mixed with 1 μ L of a solution of cycloalkyne (a) DBCO-COOH, 20 mM \rightarrow 1 mM, (b) DBCO-NH₂, 20 mM \rightarrow 1 mM, (c) BCN, 200 mM \rightarrow 10 mM).

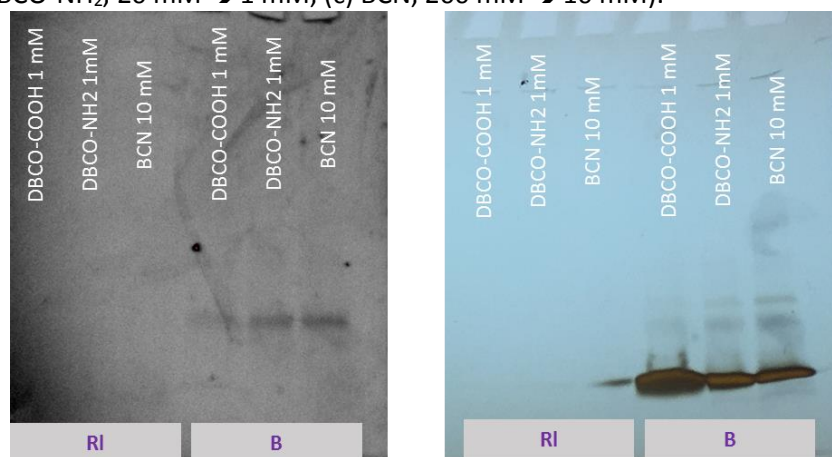


Figure S274 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment VII. -

Releases (RI) are the supernatants collected during step E. B stands for beads.

Right panel: Silver nitrate stained gel; left panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 1.14 μg of **Myo-Alk** in 40 μL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 4** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (80 μM / 1.6 mM / 8 mM / 40 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 4** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (1.7 μM / 10 μM / 200 μM / 1 mM / 5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μL of beads. The beads from sample EDTA were washed with 100 μL of PBK pH 7.4 (20 mM), with 100 μL of EDTA (1mM), twice with 100 μL of water. All the samples were then washed with water, twice with PBK pH 7.4 (20 mM). The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf. The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 40 μL of PBK pH 7.4 (20 mM) mixed with 1 μL of a solution of DBCO-COOH (20 mM \rightarrow 1 mM).

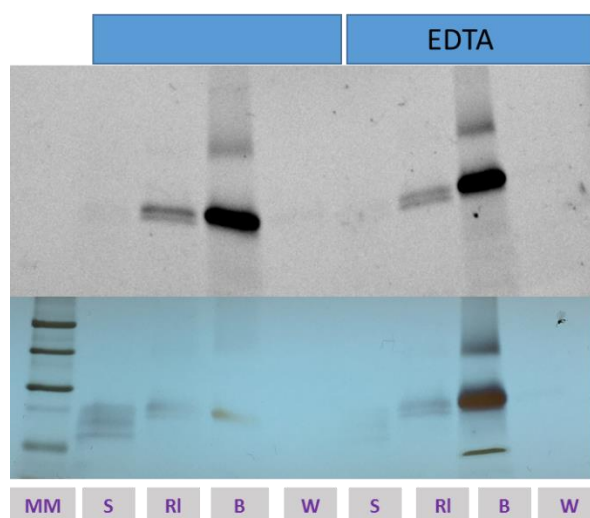


Figure S275 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment VIII. Supernatants (S) are collected after step D, Releases (RI) are the supernatants collected during step E. B stands for beads
Lower panel: Silver nitrate stained gel; top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 0.95 μg of **Myo-Alk** in 35 μL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 2** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (80 μM / 1.6 mM / 8 mM / 40 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 2** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (1.7 μM / 10 μM / 200 μM / 1 mM / 5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μL of beads. The beads were washed twice with 100 μL of PBK pH 7.4 (20 mM), and with 100 μL of water. The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf and washed twice with PBK pH 8 (20 mM). The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 20 μL of PBK pH 7.4 (20 mM) mixed with 1 μL of a solution of DBCO-TAMRA (20 mM \rightarrow 1 mM). The sample from batch 2 was washed with Laemmli buffer 1/20X at 30 $^\circ\text{C}$ for 5 min. The beads were washed with 100 μL PBK 40 mM pH 8. Standard procedure **E** was once more applied to all samples with DBCO-COOH (200 mM \rightarrow 10 mM).

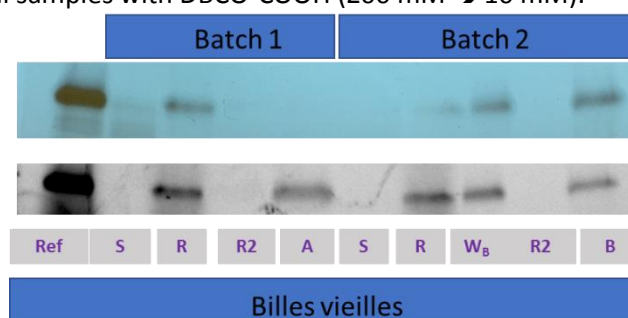


Figure S276 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment IX. Supernatants (S) are collected after step D, Releases (R) are the supernatants collected during step E and R2 is obtained after the second step E on Batch 1. A and B refer to the beads' samples. W_B is the supernatant obtained after Laemmli 1/20X wash of Batch 2. Top panel: Silver nitrate stained gel; lower panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Target fishing with Probe 2**X**

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 1 μg of **Myo-Alk** in 40 μL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe 2** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (40 μM / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe 2** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (1.4 μM / 5 μM / 200 μM / 1 mM / 1.5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μL of beads. The beads were washed twice with 100 μL of PBK pH 7.4 (20 mM), and with 100 μL of water. The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf and washed twice with PBK pH 8 (20 mM). The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 20 μL of PBK pH 8 (40 mM) mixed with 1 μL of a solution of DBCO-TAMRA (20 mM \rightarrow 1 mM). The beads were washed with Laemmli buffer 1/20X at 30 $^\circ\text{C}$ for 5 min and the resulting supernatant were collected and mixed with concentrated Laemmli blue to reach 1X concentration.

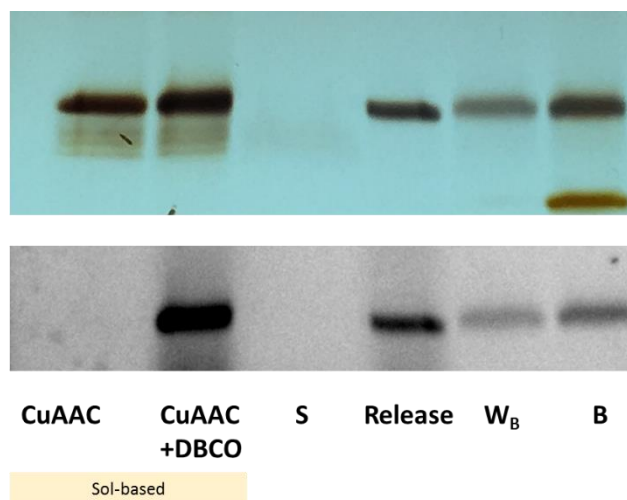


Figure S277 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment X. First two lanes were spiked with the solution-based references after CuAAC and after Click & Release. Supernatant (S) is collected after step D, Release is the supernatants collected during step E. B refers to the beads' samples.

W_B is the supernatant obtained after Laemmli 1/20X wash of Batch 2.

Top panel: Silver nitrate stained gel; lower panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

Standard procedure **C** was used first for CuAAC step using 3.4 μg of **Myo-Alk** in 40 μL of PBK 20 mM pH 7.4:

-MIX: **Probe X** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (40 μM / 1.6 mM / 8 mM / 12 mM).

-Final concentration for CuAAC: **Myo-Alk** / **Probe X** / CuSO_4 / THPTA / Na Asc (4 μM / 5 μM / 200 μM / 1 mM / 1.5 mM).

Standard procedure **D** for Capture was then used with 50 μL of beads. The beads were washed twice with 100 μL of PBK pH 7.4 (20 mM), and with 100 μL of water. The beads were suspended in water and transferred to a new Eppendorf and washed twice with PBK pH 8 (20 mM). The Click & Release step was achieved using standard procedure **E** in 20 μL of PBK pH 8 (40 mM) mixed with 1 μL of a solution of DBCO-TAMRA (20 mM \rightarrow 1 mM). The beads were washed with Laemmli buffer 1/20X at 30 $^\circ\text{C}$ for 5 min and the resulting supernatant were collected and mixed with concentrated Laemmli blue to reach 1X concentration.

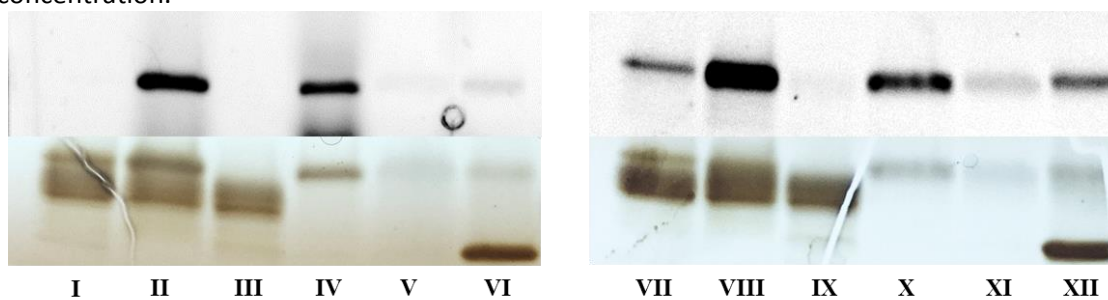


Figure S278 : SDS-PAGE analysis of samples from experiment XI. (I), (VII) CuAAC reference in solution ; (II), (VIII) CuAAC + Click & Release solution-based reference; (III), (IX) Supernatants obtained after step D ; (IV),(X) Supernatants obtained after step E ; (V),(XI) Supernatants obtained after washing the beads with Laemmli 1/20X ; (VI), (XII) Beads after step D ;

Lower panel: Silver nitrate stained gel; Top panel: gel scanned for fluorescence with Versadoc MP4000.

MASS EXPERIMENTS

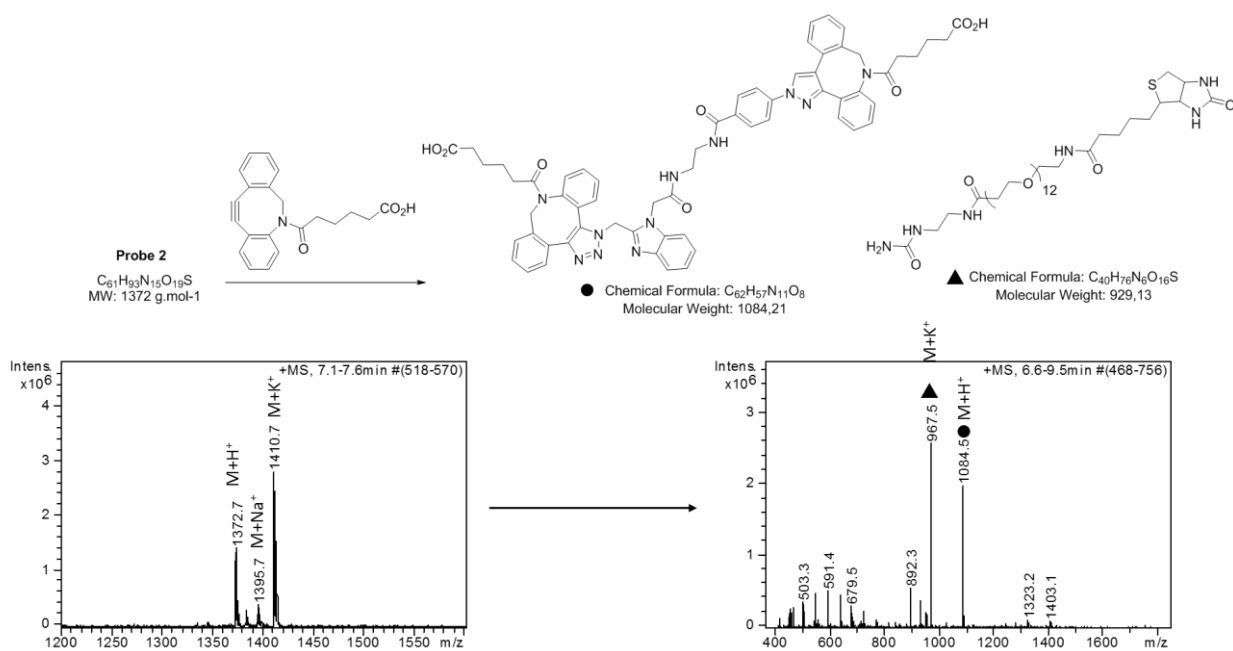


Figure S279 : MS analysis of reaction between Probe 2 and DBCO-COOH.

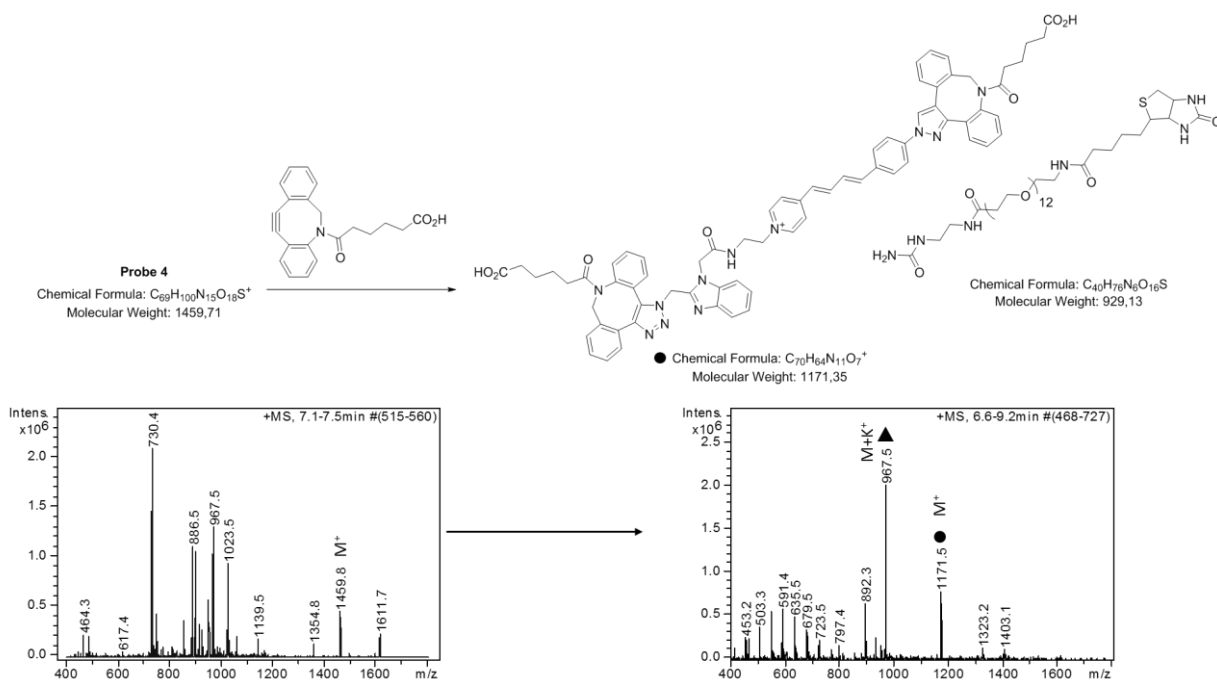


Figure S280 : MS analysis of reaction between Probe 4 and DBCO-COOH.

E. Determination of CMI

General procedure for CMI determination

1) *Inocula* preparation

A few colonies from the bacterial strain were suspended into suspension buffer and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland. 800 μL of this suspension were added to 19.2 mL of broth. These *inocula* were kept at 4 °C during the preparation of the antibiotic solutions.

2) Antibiotics and analogues stock solutions preparation

The desired quantity of antibiotic is solubilized in broth, concentration corresponds to twice the higher concentration tested.

Table S19 : Concentrations of the stock solutions used for CMI determination

Compounds	Stock solution concentration (S_0)	
	In $\mu\text{g/mL}$	In mol/L
Chloramphenicol	1024	$3.17 \cdot 10^{-3}$
Chloramphenicol-Release (92)	1066	$3.17 \cdot 10^{-3}$
Tobramycin	8	$17 \cdot 10^{-6}$
	128	$0.27 \cdot 10^{-3}$
Tobramycin-Release	11.6	$17 \cdot 10^{-6}$
(100+DBCO)	186	$0.27 \cdot 10^{-3}$
Tobramycin-Control	-	$17 \cdot 10^{-6}$
(Syd+DBCO)	-	$0.27 \cdot 10^{-3}$
Vancomycin	8	$5.4 \cdot 10^{-6}$
	1024	$0.69 \cdot 10^{-3}$
Vancomycin-Release	8.3	$5.4 \cdot 10^{-6}$
(95+DBCO)	1060	$0.69 \cdot 10^{-3}$
Vancomycin-Control	-	$5.4 \cdot 10^{-6}$
(Syd+DBCO)	-	$0.69 \cdot 10^{-3}$

The solutions Tobramycin-Release/Tobramycin-Control and Vancomycin-Release/Vancomycin-Control were prepared from a click and release mixture (C&R):

- [C&R]= $10 \times S_0$ for **ImSyd/Syd**
- DBCO: 1.5 eq.
- solvent= $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99/1

C&R was then diluted in broth + DMSO (final ratio: 90/10).

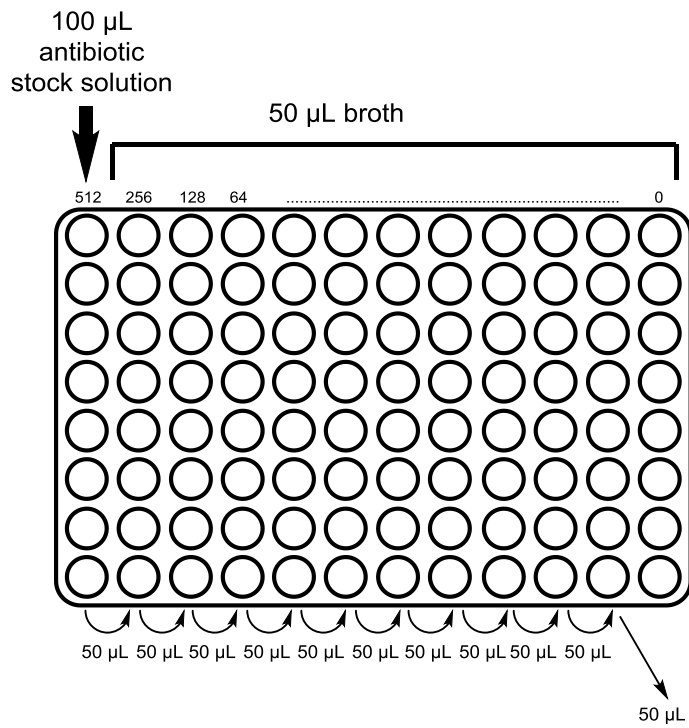
3) Preparation of plates for CMI determination

The CMI are determined in a 96 well-plate and each antibiotic and analogues were tested on each bacterial strain in triplicate.

The first row of wells was filled with 100 μL of antibiotic stock solutions and 50 μL of broth was added in each other wells. Then 50 μL were taken from one row (beginning with first row) and added to the next row. this operation was repeated until the second-to-last row. 50 μL of solution were taken from the second-to-last row and were thrown away. After this, all the wells should contain 50 μL of liquid, and the last row shouldn't contain any antibiotic.

Then 50 μL of *inoculum* were added to each wells.

The plate was incubated for 24h at 37 °C before the results were analyzed.



+ 50 μ L Inoculum

Figure S281 : 96 well plate scheme for CMI determination.

Titre : Les iminosydnone, de nouveaux outils pour la chimie bioorthogonale

Mots clés : chimie bioorthogonale, espaceurs clivables, pro-fluorescence, antibiotiques, chimie click

Résumé : Le développement de réactions chimiques compatibles avec les milieux biologiques est un défi scientifique de taille. Les outils dont actuellement disponibles pour le marquage spécifique d'entités biologiques se sont multipliés pendant cette dernière décennie. Parmi les réactions vedettes du domaine, on trouve les réactions de Diels-Alder entre alcènes tendus et tétrazines ou encore les cycloadditions entre les cycloalcynes et les azotures (SPAAC). En revanche, les réactions de clivage bioorthogonal ont retenu une attention plus faible de la part de la communauté scientifique. Récemment notre groupe a identifié une réaction bioorthogonale entre une iminosydnone et un cycloalcyne permettant d'effectuer simultanément le clivage d'un composé et la ligation de deux entités. Ces travaux de thèse ont été entièrement dirigés vers cette nouvelle réactivité.

En premier lieu, nous avons étudié la synthèse et la fonctionnalisation du partenaire iminosydnone dans le but d'obtenir une librairie de composés pour l'étude de la cinétique de la réaction de click & release avec les cycloalcynes.

Dans un second temps, nous avons utilisé les outils synthétiques développés pour concevoir des sondes iminosydnones à double exaltation de fluorescence. Cela a marqué l'entrée de ces composés dans le contexte de la chimie bioorthogonale puisque la sonde la plus prometteuse a été utilisée sur des cellules vivantes. Enfin, la capacité des iminosydnones à être clivées par les cycloalcynes a été exploitée sous la forme d'espaceurs clivables dans deux applications. Nous avons tout d'abord conçu des outils pour le target-fishing. Les sondes obtenues ont permis l'immobilisation de protéines sur un support solide. La libération du support des protéines a pu être effectuée de manière quantitative tout en leur apposant une étiquette fluorescente. Le second objet exploitant les propriétés d'espaceurs clivables des iminosydnones est un ADC. Celui en développement dans cette thèse est destiné à traiter les infections bactériennes, cible atteignable uniquement en employant un espaceur clivable par un agent exogène.

Title : Iminosydnones, new tools for bioorthogonal chemistry

Keywords : bioorthogonal chemistry, cleavable linkers, fluorogenicity, antibiotics, click chemistry

Abstract : The development of chemical reactions compatible with the biological medium is a major challenge. The availability of chemical tools for the specific labeling of biological entities increased dramatically during the last decade. The Diels-Alder reactions between tetrazines and strained alkenes or the Strained Promoted Azide Alkyne Cycloaddition (SPAAC) are among the most popular reactions for bioorthogonal ligations. On the other hand, moderate attention was given to bioorthogonal cleavage reactions. Recently our group identified a new bioorthogonal reaction between an iminosydnone and a cycloalkyne, enabling a cleavage and the ligation of two partners at the same time.

The first aim of this PhD thesis was to study the synthesis and functionalisation of the iminosydnone partner. With the large library of compounds in our hands, we could study the

kinetic properties of the click & release reaction. Next, using this transformation, we synthesized double fluorogenic iminosydnone probes. The most promising probe was then used on living cells, underlining the bioorthogonality of the reaction.

Finally, we took advantage of the iminosydnone properties to use them as cleavable linkers in two applications. The first field we explored was target-fishing. The tools we developed allowed protein immobilization on a solid support. The quantitative release from the support of labeled proteins was achieved using the click & release reaction. The second object using iminosydnones as cleavable linkers we considered was an ADC. The one developed in this PhD thesis is aimed at bacteria. For treatment with ADCs, this target can only be reached using a linker cleavable with an external agent.