

### Synthèse de nouveaux outils moléculaires pour l'imagerie in vivo d'oligo- et polysaccharides à la surface cellulaire

Monzer Awwad

### ► To cite this version:

Monzer Awwad. Synthèse de nouveaux outils moléculaires pour l'imagerie in vivo d'oligo- et polysaccharides à la surface cellulaire. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112174 . tel-02003591

### HAL Id: tel-02003591 https://theses.hal.science/tel-02003591

Submitted on 1 Feb 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.







### **UNIVERSITÉ PARIS-SUD**

Faculté des Sciences d'Orsay

### THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

Dicipline : Chimie Organique LG2M / ICMMO : Laboratoire de Glycochimie Moléculaire et Macromoléculaire ED 470: Ecole Doctorale Chimie de Paris Sud

Présentée et soutenue par

### Monzer AWWAD

Le 25 Septembre 2013

### SYNTHÈSE DE NOUVEAUX OUTILS MOLÉCULAIRES POUR L'IMAGERIE *IN VIVO* D'OLIGO- ET POLYSACCHARIDES À LA SURFACE CELLULAIRE

М	Jean-Marie BEAU	Professeur, Université Paris Sud	Président
М	Matthieu SOLLOGOUB	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
М	Yves BLERIOT	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
М	Boris VAUZEILLES	Chargé de recherche, Université Paris Sud	Directeur de thèse

À mes parents, mes sœurs, mon frère, qui sont toujours présents dans mon esprit et dans mon cœur, qui ont toujours cru en moi, qui ont été là pour me soutenir et m'encourager pendant toute la durée de ce travail.

À mon amour Roba, pour avoir été toujours à mon écoute, pour m'avoir réconforté, pour sa compréhension, son soutien et ses encouragements permanents.

Je dédie ce travail pour notre **petit trésor RIM.** 

Ce travail de thèse est l'aboutissement de trois années de recherche au sein de l'Equipe de Glycomimes et Reconnaissance (GlycoRec) au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO).

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur le Professeur David BONNAFFÉ pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je lui suis reconnaissant pour tout ce qu'il m'a appris pendant mon stage de Master 2 réalisé sous sa direction. J'ai eu l'honneur de bénéficier de ses conseils avisés et de ses critiques me permettant d'aller toujours plus en avant. Sa curiosité et sa capacité à trouver sans cesse de nouvelles idées resteront pour moi un exemple à suivre dans ma vie de chercheur. Je le remercie également pour sa bonne humeur qui règne au laboratoire. J'ai été particulièrement touché par sa sympathie et sa disponibilité tant dans le domaine scientifique que sur le plan humain.

Je voudrais aussi adresser mes profonds remerciements à mon directeur de thèse Monsieur Boris VAUZEILLES pour la confiance qu'il m'a montré en me confiant ce sujet de thèse, pour m'avoir écouté et re-motivé dans les moments de frustration et de découragement, et pour m'avoir dirigé dans mes travaux. Son œil critique et ses conseils pertinents m'ont aussi été très précieux pour structurer ce travail et améliorer la qualité de ce mémoire. Je lui suis également reconnaissant pour sa patience, pour son enthousiasme, sa bonne humeur et son professionnalisme dans la direction de cette thèse. Au-delà de sa grande capacité d'écoute, j'ai tout particulièrement apprécié sa constante disponibilité et surtout sa gentillesse. Puisse toute ma gratitude s'exprimer en ce mot : Merci.

Je souhaite également remercier Monsieur le Professeur Jean-Marie BEAU pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, Monsieur le Professeur Yves BLERIOT et Monsieur le Professeur Matthieu SOLLOGOUB pour l'honneur qu'ils me font d'accepter de juger ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Docteur Sam DUKAN du laboratoire de chimie bactérienne à l'université d'Aix Marseille pour les tests biologiques réalisés au sein de son équipe.

Je n'oublierai pas le personnel du laboratoire, et tout particulièrement Monsieur le professeur Philippe ROGER, Madame Annie MALLERON, Monsieur Aurélien ALIX, Madame Maryline MACE avec leur gentillesse, disponibilité et leur bonne humeur, qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements. Mes remerciements s'adressent aussi à tous les collègues, les thésards et les stagiaires (Jessie, Zhaoyu, Sophie, Wenqing, Amar, Yunyu, Corentin, Mohamad. Lu Vladimir, Stéphane, Damien, Ludovic, Valentine, Pierre, Christian, Jérôme,...) avec qui j'ai partagé les moments forts de cette thèse et pour l'ambiance de travail agréable qu'ils ont su créer.

Un clin d'œil chaleureux à tous mes amis avec qui j'ai passé de bons moments, de franches rigolades, et les personnes qui, de près ou de loin, m'ont fait part de leurs remarques et de leur conseils et m'ont encouragé à aller plus loin. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance et mes sincères remerciements.

La première partie de ce travail est réalisé dans le but de préparer des produits pouvant jouer un rôle très important de l'imagerie cellulaire des lipopolisaccharides sur la surface des cellules bactériennes, tout en utilisant des méthodes fiables telle que la ''chimie click''. Dans un premier temps, nous avons synthétisé une première génération d'outils fluorescents à base de rhodamine B et fluorescéine modifiée par une fonction oxyde de nitrile. Dans un deuxième temps nous avons cherché les meilleures conditions d'applications de la chimie click 3+2 sans cuivre, entre la fonction oxyde de nitrile et le motif saccharidique complémentaire portant une fonction vinylique. Finalement, nous avons appliquée, avec succès, la méthode click avec cuivre sur plusieurs types de bactéries portant sur leur membrane cellulaire des lipopolysaccharides ayant un motif ''Kdo'' fonctionnalisé par un groupement azoture synthétisé au sein de notre équipe, et une sonde fluorescente porteuse d'une fonction alcyne.

Une nouvelle génération d'outils de marquage saccharidique est en cours de finalisation dans le but d'optimiser les conditions finales, tel que le dérivé de "Kdo" fonctionnalisé cette fois-ci par des dérivées cycliques, bicycliques et aromatiques porteurs d'une fonction alcyne ou alcène, pour réaliser les derniers essais de marquage *in vitro*.

Le stress oxydant est lié au vieillissement des cellules et à de nombreuses maladies: cardiovasculaire, cancer, diabète, Alzheimer... Il est dû à un déséquilibre entre le système oxydant / antioxydant au niveau des cellules, et se caractérise par la présence principalement de substances radicalaires réactives oxygénées. Dans le but d'identifier le taux de substances réactives oxygénées dans les cellules, le travail dans la deuxième partie de la thèse reposait sur la synthèse multi étape d'une molécule fluorescente dérivée de la coumarine. Le composé ciblé est le peroxyde d'hydrogène, connu sous le nom d'eau oxygénée. Possédant un ester vinyl-boronique, notre molécule sera oxydée et réarrangée en aldéhyde conduisant à la condensation intramoléculaire avec le groupement aminé adjacent pour former un cycle indolique, libérant ainsi de la fluorescence. La recherche des conditions optimales de la dernière étape de la voie synthétique sont toujours en cours d'optimisation.

Dans le futur, on cherchera les conditions optimales de la dernière étape de la synthèse de la sonde spécifique au peroxyde d'hydrogène. Cette molécule est d'une importance remarquable comme sonde du stress oxydant. En réussissant cette étape, on pourra avoir en main une bibliothèque de "KDO" fonctionnalisé afin d'avoir des résultats satisfaisants *in vivo*.

Ac<sub>2</sub>O : Anhydride acétique

Ac: Acétyle

AcOEt : Acétate d'éthyle

BAIB : [bis (acétoxy)iodo]Benzène

Cat : catalytique

 $CH_2Cl_2$ : Dichlorométhane

DIPA : N,N-diisopropylamine

DIPEA : N,N-diisopropylethylamine

DMF: N,N-Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxide

d : Doublet

EtOH : Ethanol

Et<sub>3</sub>N : Triéthylamine

EP : Ether de pétrole

ESI : Electrospray

Et<sub>2</sub>O : Diéthyléther

h : Heure

J : Constante de couplage

m: Multiplet

Man: Mannose

Me : Méthyle

MeOH : Méthanol

Min :Minute

MS : Spectroscopie de masse

NCS : N-chloro-succinimide

T : Temps

TMSOTf : Triflate de triméthylsilyle

Rdt : Rendements

Rf : Rapport frontal

RMN : Résonance magnétique

nucléaire

Pyr : Pyridine

s : Singulet

THF : Tétrahydrofurane

t : Triplet

t.a. : température ambiante

Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique de la fluorescéine fonctionnalisé (P).

- Schéma 2 : Schéma de synthèse de (3).
- Schéma 3 : Schéma de synthèse du O-para-benzaldoxime fluorescéine (4).
- Schéma 4 : Schéma réactionnel de synthèse du benzaldéhyde oxime (6).
- Schéma 5 : Schéma de synthèse de (5) et de (7).
- Schéma 6 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse de (Q).
- Schéma 7 : Réaction de méthyl estérification de la fluorescéine donnant (8).
- Schéma 8 : Schéma de synthèse du produit (9).
- Schéma 9 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (R).
- Schéma 10 : Réaction de formation du produit (11).
- Schéma 11 : Réaction de formation de (12).
- Schéma 12 : Schéma rétrosynthétique de (R) à partir de (12).
- Schéma 13 : Réaction de synthèse de (13) à partir de (12) et (15).
- Schéma 14 : Réaction de synthèse de (14) à partir de (13).
- Schéma 15 : Réaction click pour former la molécule (16) utilisant le NCS.
- Schéma 16 : Formation de la molécule (16) à partir de (6) utilisant le BAIB.
- Schéma 17 : Schéma réactionnel de la réaction click réalisé entre la molécule (4) et le styrène pour former (K).
- Schéma 18 : Schéma réactionnel de la réaction click réalisé entre la molécule (14) et le styrène pour former (L).
- Schéma 19 : Schéma retrosynthétique de (S) à partir de l'arabinose commercial.
- Schéma 20 : Représentation de la réaction de synthèse de (17).
- Schéma 21 : Réaction de synthèse de (S) à partir de (17).
- Schéma 22 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (T) à partir de (18).
- Schéma 23 : Schéma de synthèse de (19) à partir de (18).
- Schéma 24 : Schéma réactionnel de synthèse de (T) à partir de (19).
- Schéma 25 : Schéma retrosynthétique de (U) à partir de l'arabinose commercial.
- Schéma 26 : Schéma de synthèse réactionnel de (20) à partir de l'arabinose commercial.

- Schéma 27 : Schéma de synthèse de (21) à partir de (20).
- Schéma 28 : Schéma de synthèse de (22) à partir de (21).
- Schéma 29 : Schéma représentatif des différentes réactions à partir du motif (23).
- Schéma 30 : Schéma de cinétique de réaction click.
- Schéma 31 : Schéma réactionnel de la cinétique entre (6) et (28).
- Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique de synthèse de (35) à partir de (34) et (22).
- Schéma 33 : Réaction de synthèse de (36).
- Schéma 34 : Réaction de synthèse de (37).
- Schéma 35 : Schéma de synthèse de (39).
- Schéma 36 : Schéma de synthèse de (40) à partir des molécules (14) et (T).
- Schéma 37 : Schéma représentatif de la réaction click 3+2 azoture/alcyne in vivo.
- Schéma 38 : Schéma représentatif de la cyclisation de (W) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de (V).
- Schéma 39 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (V) via (45) à partir de (41).
- Schéma 40 : Schéma retrosynthétique pour la synthèse de (42) à partir de (41).
- Schéma 41 : Schéma de synthèse de (42) en utilisant le chlorure d'étain.
- Schéma 42 : Réaction de synthèse de (42) en utilisant le nickel de Raney.
- Schéma 43 : Schéma représentatif de la synthèse de (43) dans le bromure de tétra-butyl-ammonium.
- Schéma 44 : Schéma représentatif de la synthèse de (43) dans le dichlorométhane.
- Schéma 45 : Schéma représentatif de la synthèse de (44) à partir de (43).
- Schéma 46 : Schéma représentatif de la déprotection de (44).
- Schéma 47 : Représentation de schéma de synthèse de (V) à partir de (45).
- Schéma 48 : Schéma retrosynthétique représentant la synthèse de (V) à partir de (46) via la réaction de Heck.
- Schéma 49 : Schéma représentatif de la synthèse de (46) à partir de (42).
- Schéma 50 : Schéma représentant les essais de couplage de Heck pour la synthèse de (V).
- Schéma 51 : Schéma représentant la réaction de Heck appliqué aux molécules modèles (47) et (48).
- Schéma 52 : Schéma de protection de la molécule (46) avec l'anhydride trifluoroacétique.

**Tableau 1 :** Représentation de différentes conditions pour la synthèse de (5) et (7).

- Tableau 2 : Différentes essais d'éthérification réductrice avec le 5-norbornène-2-carboxaldéhyde.
- Tableau 3 : Regroupements des différentes modifications et observations pour les conditions du schéma 41
- Tableau 4 : Regroupement des différentes modifications pour la réaction du schéma 42.
- **Tableau 5 :** Regroupement des différentes modifications pour la réaction du schéma 45.
- Tableau 6 : Différentes tests pour la synthèse de (53) et les produits secondaires détectés

- Figure 1 : Membrane cellulaire.
- Figure 2 : Différentes structures de glycanes.
- Figure 3 : Structures de monosaccharides modifiés avec un acétylure et un azoture.
- Figure 4 : La voie enzymatique du FucAz puis son marquage avec le DIFO-488.
- Figure 5 : La structure du lipide A.
- Figure 6 : La chaîne respiratoire mitochondriale.
- Figure 7 : Schéma récapitulatif des sources des ERO, des enzymes impliquées dans la défense antioxydante et des cibles biologiques.
- Figure 8 : Réaction Fenton.
- Figure 9 : Diagramme de Jablonsky.
- Figure 10 : Présentations de différentes réactions incluses dans le concept de « Click chemistry ».
- Figure 11 : Présentation des différentes versions de la réaction de Huisgen.
- Figure 12 : Mécanisme de synthèse de l'oxyde de nitrile selon la méthode de Mukaiyama.
- Figure 13 : Mécanisme de synthèse de l'oxyde de nitrile via chlorure d'hydroximinoyl.
- Figure 14 : La structure de l'herbicide synthétisé par l'équipe de Hwang.
- Figure 15 : Représentation de la réaction click réalisé sur l'ADN modifié.
- Figure 16 : Schéma représentatif de la différentiation des « réactions click ».
- Figure 17: Les différentes étapes de la cinétique de formation de (16).
- Figure 18 : Présentation de la cinétique de réaction entre BAIB et DMSO-d<sup>6</sup>.
- Figure 19 : Structure du Kdo-vinyl benzène.
- Figure 20 : Présentation de cinétique entre (6) et (25) en présence de BAIB.
- Figure 21 : Représentation de la cinétique entre (6) et (28) en présence du BAIB.
- Figure 22 : Images de marquages effectués sur différentes types de bactéries gram négatives en absence ou en présence de Kdo-N<sub>3</sub>.
- Figure 23 : Images de marquage des expériences de contre-exemple réaliser sur des bactéries de grams positifs et sur S. oneidensis.
- Figure 24 : Les résultats de la réaction click avec le Kdo-N<sub>3</sub>(S) catalysé par le Cu(I) appliqué sur *E. Coli* K12.

Figure 25 : Les résultats de la réaction click avec le Fuc-N<sub>3</sub> catalysée par le Cu(I) appliqué sur *E. Coli* K12.

Figure 26 : Les images de marquages des expériences réalisés entre le styryl-Fucose et la rhodamine B modifiée par l'oxime (14) utilisant le BAIB.

Figure 27 : La molécule PF1 fluoresce en prescence du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## TABLES DES MATIÈRES

### PARTIE PREMIERE

### VERS DE NOUVEAUX OUTILS DE MARQUAGES

I. FLUORESCENCE ET SONDES FLUORESCENTES ET « REACTION CLICK »	32
I.A. IMAGERIE DE FLUORESCENCE	32
I.A.1. Principe de la fluorescence :	32
I.A.1.a. Diagramme de Jablonski	32
I.B. LES REACTIONS DE « CLICK-CHEMISTRY»	
I.B.1. Généralité de la réaction click	
I.B.1.a. La réaction de cycloaddition 2+3 alcyne/azoture : La réaction de Huisgen catalysée a	u cuivre 35
I.B.1.b. Réaction 2+ 3 alcène/ oxyde de nitrile : formation des hétérocycles Isoxazolines	37
I.B.1.b.i. Oxyde de nitrile	37
I.B.1.b.ii. Généralité sur les Isoxazolines	38
I.B.1.c. Réactions bio-orthogonales et grandes applications en biologies	39
I.C. Synthese de sondes fluorescents	41
I.C.1. Synthèse de l'O-para-phényl d' un oxyde de nitrile dérivée de la fluorescéine (P) :	
I.C.1.a. Schéma rétrosynthétique :	41
I.C.1.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	42
I.C.1.b.i. Synthèse de l'O-para-benzaldéhyde fluorescéine (3) :	42
I.C.1.b.ii. Synthèse de l'O-para-benzaldoxime fluorescéine (4) :	42
I.C.1.b.iii. Synthèse de l'O-para-phenyl-chloro-hydroximinoyl fluorescéine (5) :	43
I.C.2. Synthèse de la fluorescéine fonctionnalisée (Q):	45
I.C.2.a Schéma rétrosynthétique :	45
I.C.2.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	45
I.C.2.b.i. Synthèse de l'ester méthylique de la fluorescéine (8) :	45
I.C.2.b.ii. Synthèse de la fluorescéine pipérazine amide (9) :	46
I.C.3. Synthèse de la rhodamine B fonctionnalisée (R):	
I.C.3.a. Schéma rétrosynthétique :	47
I.C.3.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	
I.C.3.b.i. Synthèse de la rhodamine B basique (11) :	48
I.C.3.b.ii. Synthèse de la rhodamine B pipérazine amide (12) :	48
I.C.3.b.iii. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldéhyde (13) :	49
I.C.3.b.iv. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldoxime (14)	50

I.D. LES ESSAIS DE REACTION CLICK AVEC DU STYRENE :	50
I.D.1. Utilisation du chloro benzhydroximidoyl:	50
I.D.2. Utilisation du [bis (acétoxy)iodo]Benzène (BAIB) :	51
I.D.3. Test cinétique avec la molécule (6) :	51
I.D.4. Application sur les molécules (4) et (14) :	53
I.D.4.a. Application sur la molécule (4) :	53
I.D.4.b. Application sur la molécule (14):	54
I.E. CONCLUSION :	54
II. SYNTHESE DES MONOSACCHARIDES MODIFIES	58
II.A. Synthèse du 8-azido-3,8-déoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)	58
II.A.1. Schéma retrosynthétique	58
II.A.2. Synthèse du 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (17)	59
II.A.3. Synthèse du 8-azido-3,8-déoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)	59
II.B. Synthèse de 6-O-p-vinylbenzyl-a,b-D galactopyranose (T)	60
II.B.1. Schéma retrosynthétique	60
II.B.2. Synthèse du 1,2 ; 3,4–di-O-isopropylidéne-6-O-p-vinylbenzyl-α-D galactopyranose (19)	60
II.B.3. Synthèse du 6-O-p-vinylbenzyl-α,β-D galactopyranose (T)	61
II.C. Synthese de 8-(Norbornene-2-methoxy)-3,8-desoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (U)	62
II.C.1. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-tritylyl- $lpha,$ β-D arabinofuranose (20)	63
II.C.2. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (21)	63
II.C.3. Synthèse du 5-O-((trimethl)silyl)- 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (22)	64
II.C.4. Différentes réactions réalisées à partir de l'acide 5-norbornène-2-carboxylique (23)	64
II.C.5. Test cinétique :	66
II.C.6. Ethérification réductrice utilisant le triflate de triméthylsilyle	68
II.C.7. Ethérification réductrice utilisant le Chlorure de fer (III)	72
II.D. CONCLUSION	73
III. TEST IN VITRO ET IN VIVO	76
III.A. REACTION CLICK ENTRE (14) ET (T) <i>IN VITRO</i>	
III.B. REACTION CLICK IN VIVO	

### PARTIE DEUXIEME

### SONDE BORONATE POUR LE STRESS OXYDANT

INTRODUCTION	86
IV.A. Synthèse du 6-amino-coumarine (42)	87
IV.A.1. Schéma rétrosynthétique :	87
IV.A.2. Utilisation du Chlorure d'étain :	87
IV.A.3. Utilisation du Nickel de Raney :	89
IV.B. Synthèse de la 6-amino-5-bromocoumarine (43)	90
IV.B.1. Sans solvant en utilisant le bromure de tétra-butyl-ammonium :	90
IV.B.2. Dans le dichlorométhane :	91
IV.C. Synthèse de la 6-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)-coumarine (44) :	91
IV.D. Synthèse de la 6-amino-5-ethynyl-coumarine (45) :	93
IV.E. Synthèse de (V) via l'hydroboration de la 6-amino-5-ethynyl-coumarine (45):	93
IV.F. Synthèse de la 6-amino-5-iodo coumarine (46) :	94
IV.G. Couplage de Heck sur la 6-amino-5-iodo coumarine (46)	95

EXPERIMENTAL SECTION :	
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	139

# Introduction Bibliographique

### **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**

#### A. Marquage métabolique de glycanes

#### A.1. Glycanes

Un glycane est un polymère composé de monosaccharides reliés entre eux par des liaisons glycosidiques.

Chez les bactéries et toutes les espèces vivantes, ils jouent un rôle fondamental dans les membranes cellulaires, et la communication intercellulaire. Ils constituent le glycome (la totalité du patrimoine des sucres d'une cellule ou d'un organisme vivant). Ils jouent un rôle important dans la cellule également (par exemple pour le bon repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique)



Figure 1 : Membrane cellulaire<sup>1</sup>.

Chez l'animal, ils jouent un rôle majeur au niveau cellulaire, mais aussi de l'organisme (chitine des crustacés), on les trouve souvent sous forme de chaine d'oligosaccharides liées



aux protéines (glycoprotéines), de peptido-glycanes, de glycolipides et de protéoglycanes. Ils se trouvent essentiellement sur la surface extérieure des cellules (voir Figure 1)<sup>1</sup>.

Figure 2 : Différentes structures de glycanes<sup>2</sup>.

Dans des exemples de structures trouvées chez les vertébrés, les glycanes sont longs et linéaires, comme dans le sulfate de chondroïtine, ou simples monosaccharides, comme dans les protéines cytosoliques et nucléaires. Ils peuvent aussi posséder des structures ramifiées dans des glycoprotéines et des glycolipides comme les N-glycanes et O-glycanes qui sont très communs chez les eucaryotes, et plus rarement chez les procaryotes<sup>2</sup> (voir Figure 2).

L'imagerie moléculaire permet la visualisation de molécules spécifiques *in vivo* et sans perturbation substantielle de l'environnement de la molécule cible. Les méthodes classiques pour le marquage des glycanes s'appuient sur la reconnaissance moléculaire avec des lectines ou des anticorps porteurs de sondes. Ce qui est adapté maintenant pour le marquage métabolique des glycanes est l'utilisation de sondes fluorescentes (fluorophores organique ou quantum dot (QD)).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Oyelaran O., Gildersleeve J. C., *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 13, 406-413.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Laughlin S.T., Bertozzi C.R., PNAS, 2009, 106, 12-17.

Les glycanes sont des cibles particulièrement intéressantes pour l'imagerie in vivo. Ces biopolymères jouent un rôle clé dans de nombreux processus biologiques<sup>3-4</sup>. Par exemple, les glycanes de la surface cellulaire participent à l'interaction entre les cellules impliquées dans le développement embryonnaire<sup>5</sup>, ainsi que le cancer<sup>6</sup>.

L'introduction de groupements chimiques au sein de protéines a un potentiel énorme pour faciliter les études de la fonction, le mécanisme et la structure des protéines à la fois in vivo et in vitro. Des acides aminés mimés introduits ont permis l'intégration de plusieurs fonctionnalités telles que des sondes spectroscopiques et bioorthogonals dans les protéines recombinantes<sup>7</sup>. Comme alternative à l'insertion d'acides aminés non naturels dans une chaîne polypeptidique, une fonctionnalité chimique peut également être introduite par modification



Figure 3 : Structures de monosaccharides modifiés avec un acétylure et un azoture<sup>8</sup>.

d'analogues de synthèse de monosaccharides naturels dans les cellules où elles sont traitées par une série d'enzymes afin d'engendrer des analogues actifs de nucléotides-sucres. Ces analogues fonctionnalisés, sont ensuite utilisés dans la biosynthèse des différents

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Ohtsubo, K., Marth, J.D., Cell, **2006**, 126, 855-867.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Bishop J.R., Schuksz M., Esko J.D., *Nature*, **2007**, 446, 1030-1037.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Haltiwanger R.S., Lowe J.B., Annu. Rev. Biochem., **2004**, 73, 491-537.

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Fuster M.M., Esko J.D., Nat. Rev. Cancer, 2007, 5, 526-542.

<sup>&</sup>lt;sup>7</sup> Wang L., Schultz P.G., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2004, 44, 34–66.

glycoconjugués cellulaires. Cette technique a été bien illustrée dans différentes études d'imagerie<sup>8</sup>.

De nombreuses recherches ont mis en œuvre des études sur des monosaccharides bien spécifiques qui peuvent être de bonnes cibles, soit pour subir des modifications par des fonctions azotures soit par des fonctions acétylures, selon plusieurs sites de modifications et selon leur mode de liaison (*O*-glycanes ou *N*-glycanes). Par exemple, l'acide sialique peut être étiqueté via l'acide *N*-azidoacetyl-neuraminique (Ac<sub>5</sub>SiaNAz), ou son précurseur métabolique la *N*-azidoacétyl-mannosamine, (ManNAz), l'acide 9-azido-*N*-acétylneuraminique et la *N*-alcynylacétyl-mannosamine (alcynyl ManNAc). La N-acétyl-galactosamine (GalNAc) peut être étiqueté avec des azotures en utilisant la *N*-azidoacétyl-galactosamine (GalNAz). La *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) d'un *O*-glycane peut également être marquée en utilisant la *N*-azidoacétyl-glucosamine GlcNAz. Le fucose peut aussi être étiqueté avec le 6-azido-fucose (FucAz) ou l'alcynyl-Fucose (6-AlcynylFuc) (voir Figure 3). Les monosaccharides sont utilisés sous forme peracétylée, pour des expériences de marquage métabolique. Après le passage vers l'intérieur de la cellule, les groupes acétylés seront clivés par des estérases.

Dans un exemple, la N-azido acétylgalactosamine per acétylée (Ac<sub>4</sub>GalNAz), a été métaboliquement utilisée pour suivre les étapes de la biosynthèse des glycanes, dans le développement des embryons du poisson zèbre sans qu'il cause des modifications embryonnaires.

Dans une deuxième étape, les larves de poisson-zèbre métaboliquement marqués, ont été incubés dans des solutions contenant un conjugué de fluorophore d'un cyclooctyne difluorés (DIFO-octyne), permettant la visualisation des glycanes *in vivo* en utilisant la réaction click sans cuivre<sup>6-9</sup>.

L'injection de N-acetylgalactosamine uridine 5'-diphosphate modifié par un azoture (UDP-GalNAz) permet la visualisation des glycanes pendant la gastrulation de l'embryon de poisson zèbre<sup>2</sup>.

Un autre exemple de marquage de glycane, est le marquage utilisant le 6-azido fucose (FucAz). Dans la voie biosynthèse du fucose, le FucAz est converti en FucAz-1-phosphate (FucAz-1-P), puis en 6 azido -fucose guanosine 5'-diphosphote (GDP-FucAz) par les actions successives de la fucose kinase (FUK) et de la fucose-1 phosphate guanyltransferase (FPGT).

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Laughlin S.T., Baskin J.M., Amacher S.L., Bertozzi C.R., Science, 2008, 320, 664–667.

<sup>&</sup>lt;sup>9</sup> Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 16793-16797.



Figure 4 : La voie biosynthèse du FucAz puis son marquage avec le DIFO.

La (GDP-FucAz) est ensuite transportée au sein de l'appareil de Golgi par le transporteur de GDP-fucose (GFT).

La fucosyltransférase (FucTs) ajoutera le FucAz aux glycoprotéines, qui ensuite est exporté vers la surface cellulaire ou sécrété. La deuxième étape importante de la détection de l'incorporation du FucAz par réalisation d'une réaction click avec un cyclo-octyne porteur d'un fluorophore conjugué (DIFO 488) (voir Figure 4).

Selon les exemples cités, nous avons commencé à formuler une idée sur l'orientation de la méthodologie du travail et des molécules ou sites à cibler.

#### A.2. Lipopolysaccharide ou (LPS)

Les lipopolysaccharides sont des complexes macromoléculaires présents constitutivement dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif. Ils sont constitués d'un partie lipidique dite lipide A et d'un cœur polysaccharidique débordant la membrane externe.

Le lipide A possédant de propriétés toxiques correspondant à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif qui ne sera libérée qu'après la lyse de la bactérie.

La partie polysaccharidique est responsable de la spécificité *O*-antigénique permettant de différencier plusieurs souches au sein d'une même espèce bactérienne.

#### **Structure :**



Le **lipide** A est constitué de deux sucres aminés liés par une liaison  $\beta$  1-6, phosphorylés en position 1 et 4', et liés à des acides gras hydroxylés sur leur troisième atome de carbone ainsi qu'à un ou deux autres acides gras non hydroxylés (Voir Figure 5). La nature des sucres aminés (glucosamines ou parfois 3-amino-3-desoxyglucosamine) ainsi que la nature et le nombre des acides gras sont variables selon les espèces bactériennes. L'utilisation de lipide A obtenu par synthèse a permis de démontrer que le lipide A est bien responsable du pouvoir toxique du LPS. L'intégrité de la structure du lipide A est nécessaire à l'activité toxique car des dérivés de synthèse modifiés sont toujours moins actifs que la molécule originale.

Figure 5 : La structure du lipide A.

La **partie polysaccharidique** est constitué d'un cœur interne lié au lipide A et d'un cœur externe lié à une chaîne polysaccharidique terminale appelée aussi chaîne O-antigène spécifique.

La structure du **cœur interne** est semblable pour les souches d'une même espèce mais varie selon les espèces. Elle contient deux sucres inhabituels, l'heptose et l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique (Kdo). Le Kdo est toujours présent dans le LPS et un mutant dépourvu de Kdo n'est pas viable<sup>10</sup>. Un résidu de Kdo est lié toujours au lipide A et selon les espèces le nombre de résidus de Kdo est variable (généralement deux ou trois).

Le cœur externe est constitué d'un nombre variable de résidus d'hexoses ou d'hexosamines.

La chaîne *O*-antigène spécifique est la partie la plus variable du LPS, constituée de chaînons répétitifs comprenant chacun 3 à 8 sucres variant d'une souche à une autre.

Donc on a envisagé d'avoir comme but de modifier un type de sucre assez courant dans la pluparts des lipopoysaccharides bactériens, le Kdo. On va parler des motifs saccharidiques de façon plus détaillé au niveau du chapitre 2 de ce manuscrit.

Le marquage de glycanes ne se fait pas seulement en modifiant la structure ou l'injection des motifs modifiés et fonctionnalisés, on a besoin aussi d'un partenaire porteur

<sup>&</sup>lt;sup>10</sup> Cipolla L., Polissi A., Airoldi C., Galliani P., Sperandeo P., Nicotra F., Curr. Drug Discovery Technol., 2009, 6, 19 – 33.

d'une sonde fluorescente en se basant par exemple sur la Chimie Click avec ou sans cuivre. Dans le premier chapitre de ce travail, on va parler plus en détail de la synthèse de ce motif fluorescent (sondes fluorescentes) et des raisons de notre choix des fonctions réactives oxyde de nitrile et azoture.

#### **B. Stress oxydant**

#### **B.1. Définition du stress oxydant**

Dans une cellule eucaryote normale, la libération de l'énergie nécessaire à son fonctionnement se fait de façon aérobie en utilisant des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions font intervenir des oxydants ou accepteurs d'électrons et des réducteurs ou donneurs d'électrons. Elles ont lieu dans la chaine respiratoire de la mitochondrie, qui fournit 90% de l'énergie nécessaire<sup>11</sup> (voir Figure 6).

Dans cet organite intracellulaire, l'oxygène est l'accepteur final d'électron après une cascade de réactions d'oxydo-réduction, faisant intervenir quatre complexes protéiques. Lorsque l'oxygène est transformé en molécule d'eau, cela permet de générer de l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à haut potentiel énergétique.



Figure 6 : La chaîne respiratoire mitochondriale.

Cependant 2 à 3% de l'oxygène n'est pas réduit en eau, il est dévié pour former des radicaux libres ou des espèces dérivées de l'oxygène très réactives<sup>12</sup>. Ces entités oxydantes sont physiologiquement maintenues en équilibre par de nombreux systèmes antioxydants. Quand un déséquilibre apparaît entre les molécules pro-oxydantes et antioxydantes, en faveur

 <sup>&</sup>lt;sup>11</sup> Rolfe D.F., Brown G.C., *Physiol. Rev.*, **1997**, 77, 731-58.
 <sup>12</sup> Koppenol W.H., *Redox Rep.*, **2001**, 6, 339-41.

des entités oxydantes, on parle alors de stress oxydant<sup>13</sup>. Il peut être la conséquence d'un système antioxydant défectueux ou d'une quantité d'entités oxydantes produites trop importante.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques)<sup>14</sup>. Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes à l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique.

#### **B.2. Les entités oxydantes**

Les entités oxydantes sont souvent des radicaux libres, c'est-à-dire des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire ou non apparié sur la dernière couche électronique. Cet électron célibataire rendant ces espèces très instables. Elles vont alors tenter de récupérer des électrons sur d'autres molécules comme les substrats biologiques, en les oxydant. Il existe majoritairement trois grandes familles d'espèces réactives :

- Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou ROS (Reactive Oxygen Species), issues de la réduction incomplète de l'oxygène, dont le précurseur est l'anion superoxyde  $O_2^{\circ}$ . Il est à l'origine de la formation d'autres ROS tel que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical hydroxyle OH<sup>°</sup>.

- Les espèces réactives de l'azote ou RNS (Reactive Nitrogen Species) qui donnent entre autres des peroxynitrites (ONOO<sup>-</sup>), du monoxyde d'azote NO<sup>°</sup> et le radical peroxyle (ROO<sup>°</sup>).

- Les espèces réactives du chlore ou RCS (Reactive Chlorine Species) comme l'acide hypochlorique, HOCl.

Enfin, il existe d'autres variétés d'entités oxydantes ou de radicaux, comme par exemple l'acide hypobromique, HOBr.

 <sup>&</sup>lt;sup>13</sup> Sies H., *Klin. Wochenschr.*, **1991**, 69, (21-23), 965-8.
 <sup>14</sup> Favier A., *Ann. Biol. Clin.*, **1997**, 55, 9-16.

Donc les espèces réactives d'oxygène (ERO) ne sont pas toutes des radicaux libres, par exemple le peroxyde d'hydrogène  $(H_2O_2)$  ou le peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>). Ces deux espèces dérivées de l'oxygène se retrouvent néanmoins à l'origine de la formation d'autres radicaux libres. Le terme espèces réactives de l'oxygène, permet d'inclure l'ensemble des espèces qui dérivent de l'oxygène moléculaire O2.

De nombreuses situations physiopathologiques telles que l'asthme, l'athérosclérose, les maladies rhumatismales, le vieillissement et le cancer retrouve une surproduction d'ERO<sup>15</sup>. En 1991, une découverte surprenante montra que différentes lignées cellulaires cancéreuses provenant d'une large variété de tissus étaient capables de produire une grande quantité de peroxyde d'hydrogène de manière constitutive<sup>16</sup>. Or le déséquilibre du statut antioxydant crée un stress oxydatif, responsable entre autres, de dommages moléculaires liés à la forte réactivité des ERO. Les acides nucléiques de l'ADN, les lipides des membranes cellulaires, les protéines enzymatiques ou structurales qui jouent un rôle fondamental pour la survie cellulaire, sont les cibles moléculaires de ces ERO.

#### B.3. La production des entités oxydantes au niveau cellulaire

Le précurseur des ERO, l'anion superoxyde  $O_2^{-\circ}$  peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction de l'oxygène O<sub>2</sub> par un électron et en présence d'un cofacteur Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Cet anion est très instable et peut traverser la membrane plasmique<sup>17</sup>. Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipooxygénases, les oxyde nitrique synthase (NOS), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie<sup>18</sup> (voir Figure 7).

Les NOS engendrent normalement du monoxyde d'azote NO, mais lorsque la concentration de son cofacteur, la tétrahydrobioptéridine diminue, elle produit  $O_2^{-\circ}$ . De plus, le NO formé par les NOS peut réagir avec l'anion superoxyde pour former des peroxynitrites, un composé oxydant secondaire.

Les superoxydes dismutases (SOD) vont ensuite dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est relativement stable et peut diffuser au travers des

<sup>&</sup>lt;sup>15</sup> Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., Rev. Rhum., 2007, 74, 636-643.

 <sup>&</sup>lt;sup>16</sup> Szatrowski T., Nathan C., Cancer Research, **1991**, 51, 794-798.
 <sup>17</sup> Mao G.D., Poznansky M.J., *FEBS Lett.*, **1992**, 305(3), 233-6.

<sup>&</sup>lt;sup>18</sup> Cai H., Harrison D.G., Circ Res., **2000**, 87(10), 840-4.

membranes. Cette molécule donne ensuite *via* la réaction de Fenton (non enzymatique) une entité très réactive, le radical hydroxyle, OH<sup>°</sup>. Le peroxyde d'hydrogène peut également entrer dans une voie alternative et être converti en eau par les catalases et la glutathion peroxydase (voir Figure 7).



Figure 7 : Schéma récapitulatif des sources des ERO, des enzymes impliquées dans la défense antioxydante et des cibles biologiques.

La réaction de Fenton implique des métaux de transition. L'oxydation de l'ion ferreux  $(Fe^{2+})$  en ion ferrique  $(Fe^{3+})$  en présence de peroxyde d'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendre le radical hydroxyle, le plus puissant oxydant de la famille des ERO, qui ne peut être détruit enzymatiquement (voir Figure 8). Il est à noter que la réaction de Fenton peut se faire directement à partir de l'anion superoxyde pour générer le même radical.

 $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{-} + HO^{-}$ 

#### Figure 8 : Réaction Fenton.

Les facteurs environnementaux contribuent également à la formation d'entités radicalaires ou de ERO. Une production beaucoup trop importante d'entités réactives est observée dans le cas d'intoxication aux métaux lourds ou dans les phénomènes d'irradiation.

En effet, des études menées sur des plasmas d'enfants vivant dans des zones pétrochimiques polluées en Serbie ont montré une augmentation de 26% d'un marqueur de peroxydation lipidique (malondialdéhyde) et une diminution de 11% de l'activité de l'enzyme SOD<sup>19</sup>. De plus, des métaux lourds comme le cadmium, le mercure ou l'arsenic sont souvent trouvés dans l'environnement. L'Homme y est de plus en plus exposé que ce soit par le sol, l'air ou l'eau. Des études ont montré que ces métaux lourds ont la capacité d'engendrer des espèces radicalaires actives, provoquant des dommages cellulaires importants en diminuant les activités enzymatiques et en lésant la bicouche lipidique et les molécules d'ADN<sup>20</sup>.

D'après tous les effets importants du stress oxydant sur notre vie quotidienne, on a envisagé de synthétiser une sonde spécifique pour le peroxyde d'hydrogène tout en se basant sur le principe de la fluorescence dont on va décrire notre schéma réactionnel et le but dans la  $2^{\text{ème}}$  partie de ce manuscrit.

<sup>&</sup>lt;sup>19</sup> Hatch G.E., *Indian Pediatr.*, **2010**, 47(3), 233-9.

<sup>&</sup>lt;sup>20</sup> Flora S.J., Mittal M., Mehta A. Indian J. Med. Res., 2008, 128(4), 501-23.

### PARTIE PREMIERE

### VERS DE NOUVEAUX OUTILS DE MARQUAGES

## **Chapitre Premier**

Fluorescence

& Sondes fluorescentes

& « Réaction click »

### SOMMAIRE

I. FLUORESCENCE ET SONDES FLUORESCENTES ET « REACTION CLICK »	32
I.A. IMAGERIE DE FLUORESCENCE	32
I.A.1. Principe de la fluorescence :	32
I.A.1.a. Diagramme de Jablonski	32
I.B. LES REACTIONS DE « CLICK-CHEMISTRY»	34
I.B.1. Généralité de la réaction click	34
I.B.1.a. La réaction de cycloaddition 2+3 alcyne/azoture : La réaction de Huisgen catalysée au cuivre	35
I.B.1.b. Réaction 2+ 3 alcène/ oxyde de nitrile : formation des hétérocycles Isoxazolines	37
I.B.1.b.i. Oxyde de nitrile	37
I.B.1.b.ii. Généralité sur les Isoxazolines	38
I.B.1.c. Réactions bio-orthogonales et grandes applications en biologies	39
I.C. Synthese de sondes fluorescents	41
I.C.1. Synthèse de l'O-para-phényl d' un oxyde de nitrile dérivée de la fluorescéine (P) :	41
I.C.1.a. Schéma rétrosynthétique :	41
I.C.1.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	42
I.C.1.b.i. Synthèse de l'O-para-benzaldéhyde fluorescéine (3) :	42
I.C.1.b.ii. Synthèse de l'O-para-benzaldoxime fluorescéine (4) :	42
I.C.1.b.iii. Synthèse de l'O-para-phenyl-chloro-hydroximinoyl fluorescéine (5) :	43
I.C.2. Synthèse de la fluorescéine fonctionnalisée (Q):	45
I.C.2.a Schéma rétrosynthétique :	45
I.C.2.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	45
I.C.2.b.i. Synthèse de l'ester méthylique de la fluorescéine (8) :	45
I.C.2.b.ii. Synthèse de la fluorescéine pipérazine amide (9) :	46
I.C.3. Synthèse de la rhodamine B fonctionnalisée (R):	47
I.C.3.a. Schéma rétrosynthétique :	47
I.C.3.b. Synthèse des sondes fluorescentes :	48
I.C.3.b.i. Synthèse de la rhodamine B basique (11) :	48
I.C.3.b.ii. Synthèse de la rhodamine B pipérazine amide (12) :	48
I.C.3.b.iii. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldéhyde (13) :	49
I.C.3.b.iv. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldoxime (14) :	50
I.D. LES ESSAIS DE REACTION CLICK AVEC DU STYRENE :	50
I.D.1. Utilisation du chloro benzhydroximidoyl:	50
I.D.2. Utilisation du [bis (acétoxy)iodo]Benzène (BAIB) :	51
I.D.3. Test cinétique avec la molécule (6) :	51
I.D.4. Application sur les molécules (4) et (14) :	53
I.D.4.a. Application sur la molécule (4) :	53
I.D.4.b. Application sur la molécule (14):	54
I.E. CONCLUSION :	54

#### I. Fluorescence et sondes fluorescentes et « réaction click ».

Bien que la fluorescence soit une technique fortement répandue dans le domaine biomédical, à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire, elle est encore peu employée pour réaliser de l'imagerie *in vivo*.

#### I.A. Imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est une méthode très sensible mais qui a l'inconvénient d'avoir une faible résolution spatiale et une profondeur de détection limitée. Il s'agit malgré tout de la méthode la plus rapide et la moins coûteuse pour imager des molécules ou des cellules. Son faible temps d'acquisition en fait la technique d'imagerie moléculaire la mieux adaptée aux méthodes de « screening ».

#### I.A.1. Principe de la fluorescence :

La fluorescence correspond à l'émission de lumière par une substance (molécule ou matériau par exemple) depuis un état électronique excité.

#### I.A.1.a. Diagramme de Jablonski

Les différents processus électroniques engendrés par l'absorption de la lumière par une substance fluorescente (appelée également fluorophore ou fluorochrome) peuvent être représentés par le diagramme de Jablonski (voir Figure 9). L'état électronique singulet fondamental ainsi que les deux premiers états électroniques singulets excités sont respectivement représentés par So, S1, S2. Chacun de ces niveaux d'énergie électronique, ainsi que l'état excité triplet (T1), comprend plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelle notés 0, 1, 2, etc. (les niveaux d'énergie rotationnelle ne sont pas représentés).

A température ambiante, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour peupler les états énergétiques S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub>. C'est l'absorption de l'énergie lumineuse apportée par un photon qui permet de peupler ces états excités. L'absorption a généralement lieu depuis les niveaux vibrationnels les plus bas de l'état fondamental car ce sont les plus peuplés. Un fluorophore est généralement excité jusqu'aux niveaux vibrationnels élevés, que ce soit ceux de S<sub>1</sub> ou de S<sub>2</sub>. Les molécules excitées se relaxent ensuite rapidement par conversion interne jusqu'au niveau vibrationnel le plus faible (0) de l'état excité S<sub>1</sub>.



Figure 9 : Diagramme de Jablonsky.

Le retour à l'état fondamental S<sub>0</sub> depuis le niveau vibrationnel 0 de l'état S<sub>1</sub> peut alors avoir lieu par émission d'un photon, ce qui correspond à la fluorescence, ou par désexcitation non radiative (principalement par dégagement de chaleur lors des collisions avec les molécules environnantes). D'autre part, des phénomènes concurrents comme le transfert d'énergie entre fluorophores ou vers un inhibiteur de fluorescence peuvent également avoir lieu à l'état excité. Ces processus concurrents de l'émission de fluorescence font que le nombre de photons émis est inférieur aux nombre de photons absorbés.

L'énergie libérée lors de l'émission de fluorescence est généralement inférieure à celle ayant permis l'excitation, de l'énergie étant dissipée lors des phénomènes de conversion interne qui suivent l'absorption. Les longueurs d'onde étant inversement proportionnelles à l'énergie du photon, la longueur d'onde d'émission est donc décalée vers le rouge (vers les plus grandes longueurs d'ondes) par rapport à la longueur d'onde d'excitation. La différence entre la longueur d'onde où l'absorption est maximale et celle où l'émission de fluorescence est la plus intense se nomme déplacement de Stokes.

Pour certaines molécules, un processus de conversion intersystème autorise le peuplement de l'état excité triplet T<sub>1</sub> depuis l'état excité singulet S<sub>1</sub>. Le retour à l'état S<sub>0</sub> peut dans ce cas s'effectuer soit par émission de lumière, on parle alors de phosphorescence, soit

par désexcitation non radiative. L'état excité triplet T<sub>1</sub> étant moins énergétique que S<sub>1</sub>, l'énergie libérée par la phosphorescence est plus faible que celle liée au processus de fluorescence. L'émission de phosphorescence est ainsi décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à l'émission de fluorescence.

Dans ce chapitre, on va parler de la synthèse des sondes fluorescentes fonctionnalisé et de la méthode d'application *in vitro* de la « chimie click » associée.

#### I.B. Les réactions de « click-chemistry»

#### I.B.1. Généralité de la réaction click

En 2001, Sharpless, Kolb et Finn, ont décrit un nouveau concept de chimie organique, la «click-chemistry»,<sup>21</sup> qui rassemble diverses réactions chimiques quasi parfaites. L'objectif de cette chimie est de lier rapidement et efficacement deux unités par un lien covalent. Pour cela, la réaction chimique mise en jeu doit répondre à plusieurs critères : elle doit aboutir au produit désiré avec un excellent rendement, donc sans sous-produit de réaction ou avec des sous-produits facilement séparables sans passer par une méthode chromatographique. Ce premier principe implique que la réaction soit régio- et stéréo-spécifique, insensible à l'oxygène et à l'eau, et orthogonale à d'autres réactions organiques classiques. De plus, elle doit être simple à mettre en œuvre, les réactifs devant être facilement accessibles. Enfin, elle doit être aisément adaptable à une large gamme de substrats.

Pour répondre à ces critères, les réactions « click » nécessitent une grande force motrice thermodynamique, souvent supérieure à 20 kcal.mol-1. Quatre familles de réactions peuvent répondre à cette sélection :

- Les réactions de cycloadditions : en particulier, les cycloadditions 1,3-dipolaires et les réactions de Diels-Alder.

- Les ouvertures de cycles par substitution nucléophile : en particulier, sur de petits hétérocycles tels que les époxides, les aziridines, les sulfates et sulfamidates cycliques et les ions aziridium ou episulfonium.

<sup>&</sup>lt;sup>21</sup> Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 2004-2021.

- Certaines réactions chimiques impliquant des carbonyles telles que les synthèses d'éthers d'oxime, d'hydrazones et d'hétérocycles aromatiques.

- Les additions sur des liaisons carbone-carbone insaturées : d'une part, des réactions d'oxydation telles que les epoxydations, dihydroxylations, aziridinations, l'addition d'halogénures et de thiols, et d'autre part certaines réactions de Michael (voir Figure 10).

L'une des réactions « click » les plus populaires est la réaction de cycloaddition 3+2 alcyne/azoture catalysée au cuivre. Et récemment la réaction de cycloaddition 3+2 alcène/ oxyde de nitrile a commencé à émerger.

On a donc envisagé 2 stratégies de marquages selon le même principe de réaction click avec ou sans cuivre



Figure 10 : Présentations de différentes réactions incluses dans le concept de « Click chemistry ».

## I.B.1.a. La réaction de cycloaddition 2+3 alcyne/azoture : La réaction de Huisgen catalysée au cuivre

La réaction de cycloaddition 2+3 alcyne/azoture a été découverte au début du XXème siècle, mais étudiée et valorisée dans les années 1960 par Huisgen *et al*. Toutefois, cette réaction nécessite un long temps de réaction et une température élevée, pour fournir deux
régioisomères : les 1,2,3-triazole 1,4- et 1,5- disubstitués, difficiles à séparer par chromatographie.

Ce résultat a été rationnalisé par une étude de calcul de minimisation d'énergie des deux états de transition menant à chacun des isomères.<sup>22</sup> Les énergies d'activations calculées sont de 25,7 et 26 kcal.mol<sup>-1</sup>, donc très proches, ce qui explique qu'il n'y ait en général pas d'isomère préférentiel.



Figure 11 : Présentation des différentes versions de la réaction de Huisgen.

Afin de favoriser l'un ou l'autre des isomères, différents catalyseurs ont été développés pour orienter la réaction (voir Figure 11). Le triazole 1,5-disubstitué peut être obtenu sélectivement par catalyse avec certains complexes de ruthénium, <sup>23</sup> alors que le triazole 1,4-disubstitué est obtenu sélectivement par catalyse au cuivre. En effet, en 2002, les groupes de Sharpless<sup>24</sup> et Meldal<sup>25</sup> rapportèrent indépendamment que la réaction de Huisgen pouvait être catalysée par des sels de cuivre (I), ne fournissant alors qu'un seul des deux isomères, à savoir l'isomère 1,2,3-triazole-1,4-disubstitué.

Le principal avantage de cette réaction est son efficacité. De plus, la synthèse de substrat portant un groupement alcyne ou azoture est facilement accessible à partir de diverses fonctionnalités. Ainsi, elle a été utilisée pour diverses applications à la fois en chimie médicinale<sup>26-27</sup> avec la préparation de librairies de molécules bio-actives de petite taille, d'oligonucléotides<sup>28</sup>, et également à des applications bioconjuguées<sup>29</sup> telles que le

<sup>27</sup> Tron, G. C., Pirali, T., Billington, R. A., Canonico, P. L., Sorba, G., Genazzani, A. A., *Med. Res. Rev.*, **2007**, 28, 278-308.

<sup>&</sup>lt;sup>22</sup> Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., Fokin, V. V., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.

<sup>&</sup>lt;sup>23</sup> Majireck, M. M., Weinreb, S. M., J. Org. Chem,. 2006, 71, 8680-8683.

<sup>&</sup>lt;sup>24</sup> Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Angew. Chem. Int. Ed., **2002**, 41, 2596-2599.

<sup>&</sup>lt;sup>25</sup> Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., J. Org. Chem., **2002**, 67, 3057-3064.

<sup>&</sup>lt;sup>26</sup> Kolb, H. C., Sharpless, K. B., *Drug Discov. Today*, **2003**, 8, 1128-1137.

<sup>&</sup>lt;sup>28</sup> Amblard, F., Cho, J. H., Schinazi, R. F., *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 4207-4220.

piégeage de ligand au sein d'une protéine,<sup>30</sup> la fonctionnalisation de surface de cellules<sup>31</sup> et même de dos de poissons zèbres.<sup>8, 32</sup>

### I.B.1.b. Réaction 2+ 3 alcène/ oxyde de nitrile : formation des hétérocycles isoxazolines

#### I.B.1.b.i. Oxyde de nitrile

Depuis longtemps, les travaux intéressés par la synthèse de l'intermédiaire oxyde de nitrile ou des isoxazolines à partir de l'aldoxyme, ont mentionnés beaucoup de réactifs efficaces tels que l'hypochlorite de sodium <sup>33</sup>, le bromate de sodium <sup>34</sup> et le dichloroiodobenzène <sup>35</sup>. Ces réactions sont d'une grande efficacité pour former soit l'isoxazoline, soit un dimère en absence d'ène, mais ne permettent pas d'isoler l'intermédiaire oxyde de nitrile, car une grande partie des dérivés oxydes de nitrile sont trop réactifs pour être isolés, sauf en cas d'encombrement stérique important.<sup>36-37</sup>

Le passage par le dérivé de chlorure d'hydroximoyle est considéré comme la voie la plus sure pour engendrer *in situ* l'oxyde de nitrile en présence d'une base préferentiellement une amine tertiaire. Ils sont particulièrement plus utiles, stables, stockables contrairement à l'oxyde de nitrile relativement instable, qui a tendance à se dimériser en quelques minutes à quelques jours.

Dans la bibliographie, deux méthodes pour la synthèse de l'oxyde de nitrile ont été cité :

- La méthode de Mukaiyama *et al*<sup>38</sup> (voir Figure 12).
- La méthode induite par l'élimination d'une molécule HCl du chlorure d'hydroximoyle (voir Figure 13) :

<sup>&</sup>lt;sup>29</sup> Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., Nat. Chem. Biol., 2005, 1, 13-21.

<sup>&</sup>lt;sup>30</sup> Agnew, H. D., Rohde, R. D., Millward, S. W., Nag, A., Yeo, W.-S., Hein, J. E., Pitram, S. M., Tariq, A. A., Burns, V. M., Krom, R. J., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Heath, J. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4944-4948.

<sup>&</sup>lt;sup>31</sup> Sletten, E. M., Bertozzi, C. R., *Org.*. *Lett.*, **2008**, *10*, 3097-3099.

<sup>&</sup>lt;sup>32</sup> Chen, J. K., Nat. Chem. Biol., **2008**, 4, 391-392.

<sup>&</sup>lt;sup>33</sup> Grundmann C., Dean J. M., J. Org. Chem., **1965**, 30, 2809.

<sup>&</sup>lt;sup>34</sup> Moriya O., Nakumara H., Kageyama T., Urata Y., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3987-3990.

<sup>&</sup>lt;sup>35</sup> Radhakrishna A. S., Sivaprakash K., Singh B. B., Synthetic Comm., 1991, 21-15, 1625-1629.

<sup>&</sup>lt;sup>36</sup> Ranganathan S., Singh B.B., Panda C.S., *Tetraheron Lett.*, **1970**, 1225.

<sup>&</sup>lt;sup>37</sup> Bode J. W., Hachisu Y., Matsuura T., Suzuki K., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 3555-3558.

<sup>&</sup>lt;sup>38</sup> Mukaiyama, T., Hoshino, T., J. Am. Chem. Soc., **1960**, 82, 5339–5342.



Figure 12 : Mécanisme de synthèse de l'oxyde de nitrile selon la méthode de Mukaiyama.



Figure 13 : Mécanisme de synthèse de l'oxyde de nitrile via chlorure d'hydroximinoyle.

Le réactif le plus simple utilisé pour transformer l'oxime en chlorure d'hydroximoyle est le N-chloro-succinimide dans le DMF<sup>39</sup>.

Un autre réactif utilisé pour former le chlorure d'hydroximoyle, est le N-tert-butyl-Nchlorocyanamide. La réaction est plus rapide dans le DCM, le temps de mélanger les réactifs le produit désiré est obtenu en moins d'une minute<sup>40</sup>.

#### I.B.1.b.ii. Généralité sur les Isoxazolines

Les 2-isoxazolines (souvent appelées simplement isoxazolines) sont des hétérocycles à 5 atomes comportant des atomes d'oxygène et d'azote ainsi qu'une liaison double sur l'azote. Elles sont apparentées aux oxazoles qui sont l'hétérocycle de base de cette famille. Le préfixe iso vient du fait que les hétéroatomes sont adjacents et la terminaison -ine rappelle que ces

 <sup>&</sup>lt;sup>39</sup> Liu K. C., Shelton B. R., Howe R. K., J. Org. Chem., **1980**,45, 3916-3918.
 <sup>40</sup> Kumar V., Maushik M. P., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 1457-1460.

hétérocycles sont partiellement saturés. Ils ont eu beaucoup d'attention en jouant un rôle intermédiaire important dans des synthèses totales de produits naturels.<sup>41,42,43</sup> La comparaison des 2-isoxazolines par rapport à leurs isomères 3- et 4-isoxazolines montre que la double liaison qui se trouve sur l'azote confère des propriétés assez différentes aux premières relativement aux dernières. En effet, les 2-isoxazolines sont plus faciles à préparer mais surtout, elles sont plus stables aux conditions ambiantes.

Elles sont très utilisés en synthèse dans des champs d'application diverses. L'équipe de Hwang a effectué la synthèse d'un herbicide contre une plante parasitaire dans les cultures de riz en Corée<sup>44</sup> (voir Figure 14).



Figure 14 : La structure de l'herbicide synthétisé par l'équipe de Hwang.

#### I.B.1.c. Réactions bio-orthogonales et grandes applications en biologie.

Il existe des applications *in vivo* des réactions bio-orthogonales de click 3 + 2 entre groupement azoture et alcyne, telles que les recherches de l'équipe de Bertozzi qui a obtenu un grand nombre de résultats en se basant sur la grande réactivité des cyclooctynes<sup>45</sup>. D'autres travaux, de l'équipe de Boons<sup>46</sup> ont récemment montré la double réactivité du cyclooctyne face à deux fonctions 1,3-dipolaire de réactivité différente, en fonction des conditions réactionnelles<sup>47</sup>. Pour favoriser la formation d'un triazole, il on utilisé une cyclooctyne dans le méthanol, tandis que pour favoriser la formation de l'isoxazoline il suffit d'utiliser du BAIB ([bis(acetoxy)iodo]benzène) dans le méthanol en présence de l'aldoxime. D'autres équipes

<sup>&</sup>lt;sup>41</sup> Kozikowski A. P., Acc. Chem. Res., **1984**, 17, 410.

<sup>&</sup>lt;sup>42</sup> Baraldi P. G., Barco A., Benetti S., Pollini G.P., Simoni D., Synthesis, **1987**, 857.

<sup>&</sup>lt;sup>43</sup> Bode J. W., Carreira E. M., J. Org. Chem., **2001**, 66, 6410-6424.

<sup>&</sup>lt;sup>44</sup> Hwang I. T., Kim H. R., Jeon D. J., Hong K. S., Song J. H., Cho K. Y., J. Agr. Food Chem., 2005, 53, 8639-8643.

<sup>&</sup>lt;sup>45</sup> a) Sletten E. M., Bertozzi C. R., *Angew. Chem.*, **2009**, 121, 7108–7133, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 6974–6998.
b) Chang P. V., Prescher J. A., Sletten E. M., Baskin J. M., Miller I. A., Agard N. J., Lo A., Bertozzi C. R., *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **2010**, 107, 1821–1826.

<sup>&</sup>lt;sup>46</sup> a) Poloukhtine A. A., Mbua N. E., Wolfert M.A., Boons G.J., Popik V. V., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 15769–15776,
b) Ning X., Guo J., Wolfert M. A., Boons G. J., Angew. Chem., 2008, 120, 2285–2287, Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 2253–2255.

<sup>&</sup>lt;sup>47</sup> Sanders B. C., Friscourt F., Ledin P. A., Mbua N. E., Arumugam S., Guo J., Boltje T. J., Popik V. V., Boons G. J., J. Am. Chem. Soc., **2011**, 133, 949–957.

ont tenté d'utiliser la chimie de l'oxyde de nitrile *in vitro*. On peut citer les travaux de Carell *et al*, qui ont appliqués la « réaction click » sans cuivre pour modifier l'ADN via une réaction d'addition 3+2 sans cuivre, entre une molécule fonctionnalisée avec un oxyde de nitrile et des bases azotés modifiées avec du norbornène<sup>48</sup> (voir Figure 15).



Figure 15 : Représentation de la réaction click réalisé sur l'ADN modifié<sup>48</sup>.

Les chercheurs ont montré une nouvelle combinaison de click *in vitro*, en se basant sur la différence de réactivité entre alcyne et alcène en face d'un azoture en présence de cuivre, puis l'enchainement d'une deuxième étape par une réaction click sans cuivre entre un oxyde de nitrile et un styrène<sup>49</sup> (voir Figure 16).



Figure 16 : Schéma représentatif de la différentiation des « réactions click ».

En combinant la chimie click au marquage fluorescent on obtient un outil central pour l'étude de la localisation et de l'expression des biomolécules dans les cellules vivantes. Les biologistes s'appuient sur ces informations pour étudier les processus cellulaires. La technique de marquage métabolique peut être utilisé pour introduire des fluorophores selon des réactions bio-orthogonales dans les biomolécules cellulaires sans manipulation génétique <sup>50</sup>. Un traitement ultérieur avec une sonde introduite extérieurement permet le marquage direct de la

<sup>&</sup>lt;sup>48</sup> Gutsmiedl K., Wirges C. T., Ehmke V., Carell T., Org. Lett., **2009**, 11, 2405-2408.

<sup>&</sup>lt;sup>49</sup> Gutsmield K., Fazio D., Carell T., *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 6877-6883.

<sup>&</sup>lt;sup>50</sup> Prescher J. A., Bertozzi C. R., *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.

biomolécule cible. La fonction bio-orthogonale la plus utilisée est l'azoture. Une fois en place, les azotures peuvent réagir avec des triphenylphosphines par la ligation de Staudinger<sup>51</sup> et des alcynes par une cycloaddition[3+2] cupro-catalysée (chimie click). Une autre approche que nous avons voulu tester utilise une oxime et la formation d'un oxyde de nitrile *in situ*.

Un réactif de marquage idéal resterait non-fluorescent jusqu'au moment de sa liaison à sa cible. Ce principe "fluorigène" a été largement utilisée pour la détection d'acides nucléiques<sup>52</sup>.

#### I.C. Synthèse de sondes fluorescentes

#### I.C.1. Synthèse d'un oxyde de nitrile dérivée de la fluorescéine (P) :

#### I.C.1.a. Schéma rétrosynthétique :

Notre premier choix de synthèse de la sonde fluorescente est la fluorescéine. On a décidé de la fonctionnaliser par le groupement oxyde de nitrile en utilisant un espaceur aromatique pour éviter les encombrements stériques qui peuvent avoir des effets sur la réaction click face aux motifs complémentaires (voir Schéma 1).



Schéma 1 : Schéma rétrosynthétique de la fluorescéine fonctionnalisé (P).

<sup>&</sup>lt;sup>51</sup> Saxon E., Bertozzi C. R., *Science* **2000**, 287, 2007.

<sup>&</sup>lt;sup>52</sup> Silverman A. P., Kool E. T., *Trends Biotechnol.*, **2005**, 23, 225.

#### I.C.1.b. Synthèse des sondes fluorescentes :

#### I.C.1.b.i. Synthèse d'une benzaldéhyde-fluorescéine (3) :

En partant de ce schéma rétrosynthétique, on a commencé notre synthèse avec une réaction entre la fluorescéine commerciale et le 4-(bromomethyl) benzaldéhyde (2), qu'on a synthétisé en un premier temps à partir du 4-(bromomethyl)benzonitrile selon les conditions décrites par l'équipe de Pharr<sup>53</sup> d'une façon reproductible, en présence du carbonate de Césium.

Un des premiers problèmes qu'on a rencontré dans cette synthèse était principalement rattaché à la solubilité de (1). On a essayé plusieurs solvants jusqu'à enfin, réussir à la solubiliser dans le DMF. On a donc repris la méthode d'écrite par l'équipe de Carell<sup>49</sup> sans modifier les conditions (voir Schéma 2).



Schéma 2 : Schéma de synthèse de (3).

#### I.C.1.b.ii. Synthèse d'une benzaldoxime-fluorescéine (4) :

Malgré le rendement faible (30%) de la synthèse du produit (3), on a continué notre synthèse dans le but d'avoir le produit final pour tester sa stabilité, son comportement et l'engager dans une « réaction click ». La deuxième étape de cette voie de synthèse est la formation du benzaldoxime dérivé de la fluorescéine (4). La réaction a été réalisée dans des conditions douces utilisant le chlorure d'hydroxylammonium et l'acétate de sodium (voir Schéma 3).

<sup>&</sup>lt;sup>53</sup> Gawley R. E., Mao H., Haque M. M., Thorne J. B., Pharr J. S., J. Org. Chem., 2007, 72, 218-2191.



Schéma 3 : Schéma de synthèse du O-para-benzaldoxime fluorescéine (4).

#### I.C.1.b.iii. Synthèse du chlorure d'hydroxymoyle dérivé de la fluorescéine (5) :

La réaction de formation de du chlorure d'hydroxymoyle dérivé de la fluorescéine (**5**) à partir de (**4**) en utilisant le N-chloro-succinimide (NCS) n'a pas abouti au produit désiré. On a essayé de modifier les conditions : on a divisé l'addition du NCS sur plusieurs fois, on a augmenté le nombre d'équivalent du NCS additionné, on a utilisé du NCS recristallisé, on a fait buller du HCl gazeux dans le milieu réactionnel<sup>54</sup>. Tous nos essais se sont montrés inefficaces, et on a donc essayé de réaliser d'autres essais sur un modèle. Le plus simple était le benzaldéhyde oxime (**6**) qu'on a synthétisé à partir du benzaldéhyde commercial selon la méthode décrite par l'équipe de Williams<sup>55</sup>(voir Schéma 4).



Schéma 4 : Schéma réactionnel de synthèse du benzaldéhyde oxime (6).

Avec la molécule modèle en main, on a tenté de comprendre ce qui bloque la réaction de formation de la molécule (5). On a regroupé dans le **Tableau 1** nos différents essais pour la formation de (5) et du chlorobenzhydroximidoyl (7), (voir Schéma 5).

<sup>&</sup>lt;sup>54</sup> Liu K., Shelton B. R., Howe R. K., J. Org. Chem., **1980**, 45, 3916-3918.

<sup>&</sup>lt;sup>55</sup> Allen L., Davulcu S., Williams M. J., Org. Lett., **2010**, 12, 5096-5099.



Schéma 5 : Schéma de synthèse de (5) et de (7).

Produit	Condition	Nombre d'eq	l solvant	C [M]	Durée	Rdt %
5	NCS cristallisé	1.1	DMF	0.1	3 h 30 min	0 %
5	50°C, HClg cat	1.2	DMF	0.5	2 jours	0 %
7	HClg cat	1.5	DMF	0.5	2 jours	0 %
7	NCS	1.5	DMF	1.2	3 h	78 %
7	NCS	2.0	DMF	0.5	5 h	78 %
7	NCS sur 3 fois	1.5	DMF	0.5	1 h 30 min	52 %
7 <sup>56</sup>	NCS	1	DCM/pyr	0.28	1 h 30 min	50 %
5	NCS	1	DCM/MeOH/pyr	0.3	1 jour	0 %
5	NCS	1.5	DMF	0.5	1 jour	0 %

<b>Tableau 1</b> : Representation de différentes conditions pour la synthèse de (5) et (7).	Tableau 1	<b>1</b> : Représentation	de différentes conditior	ns pour la synthèse de	e (5) et (7).
---	-----------	---------------------------	--------------------------	------------------------	---------------

<sup>&</sup>lt;sup>56</sup> Dubrovskiy A. V., Larock R. C., *Org. Lett.*, **2010**, 12, 1180-1183.

Selon les meilleures conditions appliquées pour obtenir la molécule (7), les rendements varient de 58 à 78 %. Mais ce n'était pas efficace pour obtenir la molécule (5). Donc on a envisagé de détourner la stratégie en masquant la fonction carboxylique présente.

#### I.C.2. Synthèse de la fluorescéine fonctionnalisée (Q):

Après ces difficultés d'introduction du chlorure en utilisant le NCS, on a changé de stratégie en ciblant la fonction carboxylique de la fluorescéine, tout en espérant qu'on gagne en efficacité de réaction et en comportement de la molécule (solubilité, produit secondaire,...). On a essayé d'appliquer la première stratégie sur la fonction carboxylique, en passant par l'estérification par un méthyle<sup>57</sup> puis amidation utilisant une pipérazine<sup>58</sup> (voir Schéma 6) pour introduire ensuite l'aldéhyde aromatique précurseur de l'oxyde de nitrile.

#### I.C.2.a Schéma rétrosynthétique :



Schéma 6 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse de (Q).

#### I.C.2.b. Synthèse des sondes fluorescentes :

#### I.C.2.b.i. Synthèse de l'ester méthylique de la fluorescéine (8) :

Selon le travail décrit par l'équipe de Moore, qui est une version amélioré de la synthèse décrite par l'équipe de Feuerstein en 1901. Utilisant le méthanol dans l'acide

 <sup>&</sup>lt;sup>57</sup> Adamczyk M., Grote J., Moore J. A., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 544-547.
 <sup>58</sup> Nguyen T., Francis M. B., *Org. Lett.*, **2003**, 5, 3245-3248.

sulfurique à reflux pour 14 heures (voir Schéma 7). On a réalisé l'estérification et la structure du produit (8) a bien été confirmée par RMN et spectroscopie de masse (MS). On s'est de nouveau trouvé devant un problème de solubilité, mais ça ne nous a pas empêché de passer à l'étape suivante de la nouvelle stratégie de synthèse.



Schéma 7 : Réaction de méthyl estérification de la fluorescéine donnant (8).

#### I.C.2.b.ii. Synthèse de la fluorescéine pipérazine amide (9) :

Avec le produit de l'ester méthylique de la fluorescéine (**8**) en main, on a appliqué la méthode décrite par l'équipe de Francis<sup>58</sup>, en utilisant le tri-méthyl aluminium dans le DCM en présence de la pipérazine (voir Schéma 8). La fluorescéine pipérazine amide (**9**) désirée était identifiée en spectroscopie de masse du milieu réactionnel, mais malgré toutes nos précautions (produit anhydre, sous atmosphère d'argon, ...), et avec le problème de solubilité qui était toujours présent, nous n'avons pas pu réaliser la purification de notre produit.



Schéma 8 : Schéma de synthèse du produit (9).

On a décidé de passer à notre deuxième choix de molécule fluorescente, la rhodamine B, et grâce à ces atomes d'azote, on n'a pas rencontrés des problèmes de solubilisation déjà rencontrés avec notre ancien choix.

#### I.C.3. Synthèse de la rhodamine B fonctionnalisée (R):

Tout en gardant le même schéma retrosynthétique qui était envisagé pour le produit  $(\mathbf{Q})$ , avec le produit  $(\mathbf{R})$ . On a envisagé de passer en première étape de la synthèse par la forme basique de la rhodamine B, pour éviter ou minimiser tout problème qui peut être en rapport avec à la forme acide de la molécule. Durant cette voie de synthèse, on a gagné en termes de solubilité, d'efficacité et de rendement des réactions en comparaison avec la fluorescéine.

#### I.C.3.a. Schéma rétrosynthétique :



Schéma 9 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (R).

Notre schéma synthétique pour la synthèse du produit (**R**) repose sur les travaux de l'équipe de Francis<sup>58</sup>, et sera initié par la synthèse de la forme basique de la rhodamine B (**11**), suivie d'une réaction d'amidation avec la pipérazine aboutissant à la formation de l'amide correspondant (**12**), qui conduit en quelques étapes à la rhodamine B fonctionnalisée par l'oxyde de nitrile (**R**) (voir Schéma 9).

#### I.C.3.b. Synthèse des sondes fluorescentes :



#### I.C.3.b.i. Synthèse de la rhodamine B basique (11) :

Schéma 10 : Réaction de formation du produit (11).

On a mélangé simplement de la rhodamine B dans un volume équivalent de soude (1 mol.l<sup>-1</sup>) et d'acétate d'éthyle à température ambiante, puis une extraction avec de l'acétate d'éthyle nous a donné le produit (**11**). (Voir Schéma 10)

#### I.C.3.b.ii. Synthèse de la rhodamine B pipérazine amide (12) :

On a réussi la synthèse du produit (12) tout en appliquant la même méthode de synthèse pour la formation du produit (9), avec du tri-méthyl aluminium (Me<sub>3</sub>Al 2 mol.l<sup>-1</sup> dans le toluène) dans le DCM en présence de la pipérazine (voir Schéma 11) avec de bons rendements arrivants jusqu'à 100%.



Schéma 11 : Réaction de formation de (12).

Les étapes suivantes de la synthèse consistent à la fonctionnalisation du produit (12) de manière à introduire un espaceur aromatique porteur d'une fonction aldéhydique (13), puis ensuite le transformer en une fonction benzaldoxime (14) par une condensation au chlorure

d'hydroxylammonium. Par la suite il sert de réactif pour la formation du produit final (**R**). (Voir Schéma 12).



Schéma 12 : Schéma rétrosynthétique de (R) à partir de (12).

#### I.C.3.b.iii. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldéhyde (13) :

Le réactif (12) déjà obtenu durant l'étape précédente de notre synthèse, est engagé dans une réaction d'amidation avec un chlorure d'acyle, le chlorure de 4-formylbenzoyl<sup>59</sup> (15), en présence d'une base tertiaire. On a utilisé 1,1 équivalent du chlorure d'acyle et 3 ou 4 équivalents de N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) dans le dichlorométhane anhydre, la réaction étant réalisée à température ambiante et à l'obscurité pour 2 heures. Les meilleurs rendements (47%) ont été obtenus en utilisant 3 équivalents de base tertiaire (voir Schéma 13).



Schéma 13 : Réaction de synthèse de (13) à partir de (12) et (15).

<sup>&</sup>lt;sup>59</sup> Mani N. S., Palmer D. C., Pandit C. R., Reyes M. B., Xiao T., Cesco-Cancian S., WO 2007/053427, PCT/US2006/041859.

#### I.C.3.b.iv. Synthèse de la rhodamine fonctionnalisée par un benzaldoxime (14) :

L'étape suivante de notre synthèse était la formation de la fonction aldoxime du produit (14). On a appliqué les mêmes conditions déjà utilisées pour la synthèse de la molécule (4). En comparant en terme de rendement, la réaction est plus efficace (59% pour 26%).



Schéma 14 : Réaction de synthèse de (14) à partir de (13).

Comme dans la littérature, les molécules de l'oxyde de nitrile sont peu isolables et se polymérisent rapidement, et pour gagner du temps, on s'est retourné à notre molécule modèle, le benzaldéhyde oxime (6), qu'on a engagée dans des réactions de click avec le styrène. Le but était de vérifier si à ce stade de la synthèse, on obtenait des résultats intéressants pour la formation du motif isoxazoline ainsi que la génération du produit (**R**) in vitro (voir Schéma 14).

#### I.D. Les essais de réaction click avec du styrène :

#### I.D.1. Utilisation du chloro benzhydroximidoyl:

En un premiers temps, on a réussi à réaliser, la réaction click entre styrène et le chloro benzaldoxime (7), tout en utilisant la triethylamine comme une amine tertiaire dans le N,N-dimethylformamide (DMF). Le produit de click (16) a bien été identifié en RMN (voir Schéma 15).



Schéma 15 : Réaction click pour former la molécule (16) utilisant le NCS.

#### I.D.2. Utilisation du [bis (acétoxy)iodo]Benzène (BAIB) :

On a cherché ce type de réaction pour avoir une autre voie de synthèse pour avoir notre produit de click. On a tenté de réaliser la réaction click à partir de molécules portant la fonction oxime sans passer par le chloro benzaldoxime, et en utilisant le BAIB.

Les essais réalisés sur (6) avec le styrène ont donné le produit de cyclisation (16) (voir Schéma 16) même sans utilisation d'excès et sans chauffage. On a réalisé la réaction avec le méthanol et l'éthanol, avec et sans chauffage pour voire le comportement de ce réactif et de la réaction avec de différentes solvants.

Les premières conclusions, ont montré une rapidité de la réaction indépendamment du chauffage, nous avons donc effectué plusieurs études réactionnelles pour étudier sa cinétique, en espérant d'avoir une idée pour identifier le temps de vie de l'intermédiaire réactionnel, et bien identifier la vitesse de formation de produit de réaction click après l'ajout du styrène.



Schéma 16 : Formation de la molécule (16) à partir de (6) utilisant le BAIB.

#### I.D.3. Test cinétique avec la molécule (6) :

Durant toutes les cinétiques qu'on a réalisées, on a utilisé les mêmes concentrations et le même nombre d'équivalent de réactifs pour pouvoir comparer les différents résultats. Ceci nous a permis de suivre le milieu réactionnel en RMN en réalisant l'expérience dans le tube RMN, dans des solvants deutérés. On a utilisé 1 équivalent de chaque réactif par rapport au benzaldoxime, avec un milieu réactionnel de concentration 0,025 mol.L<sup>-1</sup> en chaque constituant.

Notre premier essai était dans le Méthanol-d<sup>4</sup> (voir Schéma 16). Dans les 6 minutes qui ont suivi l'addition du BAIB, on a remarqué la disparition du proton porté par l'oxime.



Figure 17: Les différentes étapes de la cinétique de formation de (16).

Après l'ajout du styrène, on a remarqué la formation des pic correspondants à l'hétérocycle isoxazolinique, et qui évoluent en fonction de temps et au bout de 960 min on voit clairement la disparition presque totale de pics du vinyle du styrène et l'apparition des pics correspondants aux protons isoxasoliniques. (Voir Figure 17).

Notre deuxième essai a été l'étude de la même réaction mais dans le DMSO- $d^6$ , en espérant pouvoir l'utiliser comme solvant dans les réactions avec la fluorescéine fonctionnalisée (**4**) que l'on avait eu des difficultés à solubiliser.



Figure 18 : Présentation de la cinétique de réaction entre BAIB et DMSO-d<sup>6</sup>.

Mais on a été géné par une réaction secondaire entre le DMSO-d<sup>6</sup> et le BAIB, et le styrène n'a pas été totalement consommé. Donc on a relancé la même expérience, mais sans addition du styrène. On a trouvé la formation de beaucoup de pics qui ont évolué en fonction du temps et puis ont commencé à disparaitre (voir Figure 18).

En parallèle, une cinétique a été réalisée pour la réaction entre le benzaldoxime et l'ethynylbenzène dans le méthanol-d<sup>4</sup>, l'étape de disparition du proton de l'aldoxyme a été très rapide mais on n'a pas remarqué la formation d'un produit de click après l'addition de l'éthynylbenzène, donc on a décidé de synthétiser des motifs complémentaires pour la réaction click de type vinylique.

Avec ses résultats en main, on a décidé de réaliser des essais de click sur les produits (4) et (14) déjà synthétisés, dans le méthanol et en utilisant le BAIB en face du styrène.

#### I.D.4. Application sur les molécules (4) et (14) :

#### I.D.4.a. Application sur la molécule (4) :

On a fait un essai de réaction entre le styrène et la molécule (4) en présence du BAIB. La formation du produit de click (**K**) avec le styrène a été vérifiée par spectrométrie de masse du milieu réactionnel, sans être vérifiée par RMN. Un problème de précipitation a été remarqué dès qu'on ajoute le BAIB. Même avec un chauffage jusqu'à 50 °C, on n'a pas réussi à le solubiliser.donc on s'est orienté vers la molécule (**14**) pour la tester.



Schéma 17 : Schéma réactionnel de la réaction click réalisé entre la molécule (4) et le styrène pour former (K).

#### I.D.4.b. Application sur la molécule (14):

Contrairement à la molécule (**4**), on a réalisé des cinétiques avec la molécule (**14**) et le styrène en présence du BAIB. Le but a été d'avoir une idée du temps de la disparition totale du proton de l'oxime de notre rhodamine B fonctionnalisée, afin d'avoir une conversion totale. En lançant l'expérience avec 1 équivalent de BAIB, on a trouvé que le pic correspondant au proton de l'oxime n'a pas totalement disparu.



Schéma 18 : Schéma réactionnel de la réaction click réalisé entre la molécule (14) et le styrène pour former (L).

Donc on a ajouté un autre équivalent en cours de l'expérience et la disparition était totale. En réalisant notre deuxième essai, on a trouvé que 12 minutes ont été suffisantes dès l'ajout de 1,5 équivalent de BAIB pour sa disparition totale, malgré que l'identification a été difficile avec la superposition de pic dans le milieu réactionnel. Après l'addition du styrène, on a identifié le produit de click que par spectroscopie de masse.

#### I.E. Conclusion :

En conclusion pour ce premier chapitre, on a synthétisé notre sonde fluorescente à base de la rhodamine B, fonctionnalisée par une aldoxime. Malgré les difficultés qu'on a rencontrées afin de finaliser cette synthèse et accéder à la molécule fonctionnalisée par un oxyde de nitrile, on a réussi à tester la réaction click 3+2 entre le benzaldoxime et un styrène. On a réussi à l'appliquer à la molécule fonctionnalisé de la rhodamine B, donc on s'est arrêté a ce stade dans notre schéma rétrosynthétique proposé déjà pour la formation de (**R**), puis on

est parti sur la synthèse du motifs saccharidique complémentaire, qu'on va discuter dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, puis avec les deux motifs on applique la réaction click correspondante au sein du troisième chapitre.

# Chapitre Deuxième

Synthèse des

Monosaccharides modifiés

### SOMMAIRE

II. SYNTHESE DES MONOSACCHARIDES MODIFIES	58
II.A. Synthèse du 8-azido-3,8-déoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)	58
II.A.1. Schéma retrosynthétique	58
II.A.2. Synthèse du 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (17)	59
II.A.3. Synthèse du 8-azido-3,8-déoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)	59
II.B. Synthese de 6-O-p-vinylbenzyl-a,b-D galactopyranose (T)	60
II.B.1. Schéma retrosynthétique	60
II.B.2. Synthèse du 1,2 ; 3,4–di-O-isopropylidéne-6-O-p-vinylbenzyl-α-D galactopyranose (19)	60
II.B.3. Synthèse du 6-O-p-vinylbenzyl-α,β-D galactopyranose (T)	61
II.C. Synthese de 8-(Norbornene-2-methoxy)-3,8-desoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (U)	62
II.C.1. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-tritylyl-α,β-D arabinofuranose (20)	63
II.C.2. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (21)	63
II.C.3. Synthèse du 5-O-((trimethl)silyl)- 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (22)	64
II.C.4. Différentes réactions réalisées à partir de l'acide 5-norbornène-2-carboxylique (23)	64
II.C.5. Test cinétique :	66
II.C.6. Ethérification réductrice utilisant le triflate de triméthylsilyle	68
II.C.7. Ethérification réductrice utilisant le Chlorure de fer (III)	72
II.D. CONCLUSION	73

#### II. Synthèse des monosaccharides modifiés

Complémentairement à la partie précédente, dans ce chapitre on va s'intéresser à discuter la synthèse des motifs saccharidiques modifiés, en un premier temps, par un groupement azoture qu'on va engager dans une « réaction click » avec un fluorophore commercial porteur d'une fonction alcyne, Alexa Fluo 488 (A488-alcyne) dans le chapitre suivant, pour valoriser leurs application biologique.

Puis en un deuxième temps, nous étudierons la préparation de dérivés de norbornène et de styrène pour avoir un motif saccharidique fonctionnalisé par une fonction complémentaire à la sonde fluorescente (**14**) déjà synthétisée au sein du premier chapitre.

## II.A. Synthèse du 8-azido-3,8-désoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)<sup>60</sup>

#### II.A.1. Schéma retrosynthétique

D'après nos recherches bibliographiques, on a décidé de synthétiser une molécule très repandue dans les LPS bactériens, d'où notre choix de modifier le Kdo par une fonction azoture (Kdo-N<sub>3</sub>). On a proposé le schéma retrosynthétique suivant pour la synthèse de  $(S)^{61}$  (voir Schéma 19).



Schéma 19 : Schéma retrosynthétique de (S) à partir de l'arabinose commercial.

<sup>&</sup>lt;sup>60</sup> Cette synthèse a été effectuée en collaboration avec Annie Malleron.

<sup>&</sup>lt;sup>61</sup> Dumont A., Malleron A., Awwad M., Dukan S., Vauzeilles B., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 3143 –3146.

#### II.A.2. Synthèse du 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (17)

La première étape de notre voie de synthèse repose sur la formation du 5-azido-5désoxy-D-arabinofuranose (17) à partir du D-arabinose commercial via une stratégie simple et directe et économique de temps, en évitant les purifications intermédiaires.

Une tosylation de l'hydroxyle primaire de la forme furanose de l'arabinose a été réalisée dans la pyridine anhydre en utilisant le chlorure de tosyle (TsCl), et a été suivie d'une acétylation des hydroxyles secondaires, en utilisant l'anhydride acétique (Ac<sub>2</sub>O) (voir Schéma 20).



Schéma 20 : Représentation de la réaction de synthèse de (17).

Ensuite on a réalisé une substitution nucléophile utilisant un anion azoture  $(NaN_3)$  dans le DMF. A ce stade, on a purifié le produit par chromatographie sur silice. Enfin une seul étape de déprotection des acétates a été réalisée avec le méthanolate de sodium dans le méthanol, pour aboutir à former le 5-azido-5 déoxy-D-arabinofuranose (**17**).

#### II.A.3. Synthèse du 8-azido-3,8-déoxy-D-manno-2-octulosonate d'ammonium (S)

Avec le produit (17) en main, on a procédé pour finaliser notre voie de synthèse. On a réalisé la réaction dans l'eau avec une solution d'acide oxaloacétique, en présence du NaOH, suivie d'une neutralisation avec une résine ( $H^+$ ) puis une décarboxylation par chauffage à 80 °C puis neutralisation avec une solution acide acétique (AcOH) (voir Schéma 21).



Schéma 21 : Réaction de synthèse de (S) à partir de (17).

De nouveau on a appliqué un traitement avec une résine, suivi par une neutralisation avec une solution aqueuse d'ammoniaque, pour obtenir le 8-azido-3,8-didéoxy-D-manno-octulosonate d'ammonium avec de bon rendement (57%).

#### II.B. Synthèse de 6-O-p-vinylbenzyl-α,β-D galactopyranose (T)

#### II.B.1. Schéma retrosynthétique



Schéma 22 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (T) à partir de (18).

En ce qui concerne les sucres porteurs d'un alcène, notre idée a été de synthétiser un D-galactose fonctionnalisé par un vinylbenzyle. Pour cela on a choisi le 1,2 ; 3,4–di-O-isopropylidène- $\alpha$ -D galactopyranose (**18**) comme précurseur, déjà synthétisé au sein du laboratoire, pour aboutir à notre molécule désirée (**T**) via la synthèse du 1,2;3,4–di-O-isopropylidène-6-O-p-vinylbenzyl- $\alpha$ -D galactopyranose (**19**) (voir Schéma 22).

### II.B.2. Synthèse du 1,2 ; 3,4–di-O-isopropylidène-6-O-p-vinylbenzyl-α-D galactopyranose (19)

On a engagé le réactif (**18**) en réaction avec le chlorure de 4-vinyle benzyle dans le DMF anhydre en utilisant l'hydrure de sodium comme base. On a obtenu le produit 6-O-p-vinylbenzyl- $\alpha$ -D galactopyranose protégé avec l'isopropylidène avec un rendement de 81% (voir Schéma 23).



Schéma 23 : Schéma de synthèse de (19) à partir de (18).

#### II.B.3. Synthèse du 6-0-p-vinylbenzyl-α,β-D galactopyranose (T)

Notre étape suivante repose sur une simple déprotection des fonctions hydroxyles secondaires. Pour cela on a utilisé l'acide chlorhydrique (HCl) dans le dioxane à reflux pendant 6 heures, donnant le 6-O-p-vinylbenzyl- $\alpha$ , $\beta$ -D galactopyranose avec un rendement de 86% (voir Schéma 24).



Schéma 24 : Schéma réactionnel de synthèse de (T) à partir de (19).

Le but de cette synthèse, a été d'optimiser la procédure pour la réaliser ensuite en série L, et préparer un analogue du L -fucose, présent dans le lipopolysaccharide de certaines bactéries, et qui peut nous servir pour le marquage cellulaire.



Figure 19 : Structure du Kdo-vinyl benzène.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la synthèse d'un Kdo-vinylbenzène (voir Figure 19) pour des applications de click face à des motifs porteurs de groupements oxyde de nitrile. Des tests ont été réalisés par notre équipe pour la synthèse du Kdo-vinylbenzène à partir de l'arabinose commercial, mais des problèmes de polymérisation ont été remarqués au niveau de l'arabinose-vinyl benzène

#### II.C. Synthèse de 8-(Norbornene-2-methoxy)-3,8-désoxy-D-manno-2octulosonate d'ammonium (U)



Schéma 25 : Schéma retrosynthétique de (U) à partir de l'arabinose commercial.

La première raison pour notre choix de la molécule (**U**) a été l'étude de la différence de réactivité comparée avec la molécule (**T**) en fonction de la nature de l'ène dans une réaction click. En ce qui concerne la première partie de la synthèse, reposant sur la fonctionnalisation de l'hydroxyle primaire, on a été orienté vers les travaux de l'équipe de Fairbanks<sup>62</sup>, suivit d'une éthérification réductrice, et en fin une condensation avec l'acide oxaloacétique (voir schéma 25).

#### II.C.1. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-trityl-α,β-D arabinofuranose (20)



Schéma 26 : Schéma de synthèse réactionnel de (20) à partir de l'arabinose commercial.

En première étape, on a solubilisé en 30 minutes à reflux notre réactif dans la pyridine distillée, puis on a ajouté le chlorure de trityle afin de protéger la position hydroxyle primaire de la forme furanose du D-arabinose. La molécule obtenue a été utilisée, après purification, dans une réaction de protection avec des groupements acétates utilisant l'anhydride acétique et la pyridine (voir schéma 26).

#### II.C.2. Synthèse du 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (21)

La troisième étape a été une déprotection du trityle déjà installé précédemment. On a solubilisé la molécule (**20**) dans une solution d'acide acétique, et on a laissé sous reflux pour 25 minutes et après purification on a obtenu le produit (**21**) avec un rendement 46% (voir Schéma 27).

<sup>&</sup>lt;sup>62</sup> Smellie I.A., Bhakta S., Sim E., Fairbanks A.J., Org. Bionol. Chem., 2007, 5, 2257-2266.



Schéma 27 : Schéma de synthèse de (21) à partir de (20).

### II.C.3. Synthèse du 5-O-((trimethyl)silyl)- 1,2,3-tri-O-acetyl-α,β-D arabinofuranose (22)

La synthèse de la molécule protégée en position 5 par le trimethylsilyle va nous permettre de réaliser l'éthérification réductrice à l'étape suivante. Pour cela on a utilisé le chlorure de trimethylsilyle dans un mélange dichlorométhane/pyridine pendant une heure à température ambiante. Le produit a été analysé en RMN puis utilisé sans autre purification (voir Schéma 28).



Schéma 28 : Schéma de synthèse de (22) à partir de (21).

#### II.C.4. Différentes réaction réalisées à partir de l'acide 5-Norbornène-2carboxylique (23)

Pour terminer notre voie de synthèse, et réaliser l'étape d'éthérification réductrice avec le 5-norbornène-2-carboxaldéhyde, on est parti d'un mélange d'isomère endo/exo de l'acide 5-norbornène-2-carboxylique commercial (**23**). Notre première réaction a été une différenciation des deux isomères endo/exo. On a appliqué la méthode utilisée par l'équipe de Diederich<sup>63</sup> en utilisant le tri-iodure de potassium (KI+I<sub>2</sub>), qui réagit seulement avec la forme endo pour former l'iodo-lactone correspondante (**24**) avec un rendement de 64% tandis que l'isomère exo (**25**) reste intact sans réagir et est récupéré avec un rendement 23% (voir Schéma 29).



Schéma 29 : Schéma représentatif des différentes réactions à partir du motif (23).

Suivant cette étape de différentiation, et en ce qui concerne l'iodo-lactone (25), on a réalisé la transformation inverse de la lactone et la reformation de l'isomère endo (26) en se basant sur les travaux de l'équipe de Flynn<sup>64</sup> en utilisant le zinc métallique dans l'acide

<sup>&</sup>lt;sup>63</sup> Raimundo J. M., Lecomte S., Edelmann M. J., Concilio S., Biaggio I., Bosshard C., Günter P., Diederich F., J. Mater. Chem., 2004, 14, 292-295

<sup>&</sup>lt;sup>64</sup> Becker D. P., Husa R. K., Moormann A. E., Villamil C.I., Flynn D. L., *Tetrahedron.*, **1999**, 55, 11787-11802.

acétique à reflux pour une demi-heure. On a obtenu l'isomère endo (26) avec un rendement de 61%.

Une réaction de réduction, décrite par l'équipe de Kondo<sup>65</sup>, de la forme acide de chaque isomère en utilisant le tétrahydruroaluminate de lithium dans l'éther éthylique à reflux pendant 4 heures, nous a permis de former l'alcool correspondant à chaque isomère d'acide, endo 5-norbornène-2-méthanol (**28**) avec une rendement 41,5% et exo 5-norbornène-2-méthanol (**27**) avec 25% de rendement.

Ensuite, on a réalisé une oxydation de l'isomère endo du norbornène alcool, pour former l'aldéhyde correspondant (29) en utilisant le trioxyde de chrome. Mais le produit était trop volatil. Le rendement qu'on a obtenu pour (29) a été de 2,5%, donc on s'est orienté au produit norbornène aldehyde commercial, mélange des deux isomères endo/exo.

Mais avant de passer à l'étape de l'éthérification réductrice, on a réalisé quelques essais de cinétique avec notre molécule modèle le benzaldehyde oxime (6).

#### II.C.5. Test cinétique :

On a réalisé une cinétique de la réaction entre le benzaldéhyde oxime (6) et l'5norbornène-2-carboxaldéhyde (25) en utilisant le BAIB selon les mêmes conditions déjà utilisées avec les tests appliqués sur le styrène étudiés au sein du chapitre précédent (voir Schéma 30).



Schéma 30 : Schéma de cinétique de réaction click.

On a trouvé qu'au bout de 4 minutes de l'addition de la molécule (**25**) à T= 21 minutes du lancement de l'expérience dans la figure 20, des pics correspondant à la réaction « click » ont commencé à apparaître, mais la réaction n'était pas totale à cause d'un défaut de réactif de

<sup>65</sup> Nakazaki M., Naemura K., Kondo Y., J. Org. Chem., 1976, 41, 1229-1233.



BAIB, pour cette raison les pics représentant les protons vinylique de l'isomère exo de l'acide 5-norbornène-2-carboxylique sont toujours présents (voir Figure 20).

Figure 20 : Présentation de cinétique entre (6) et (25) en présence de BAIB.

Au moins on a vérifié qu'avec la forme acide, la réaction « click » a été réalisable. On a par la suite préféré tester la même cinétique avec l'isomère endo de 5-norbornène-2-méthanol (voir Schéma 31).



Schéma 31 : Schéma réactionnel de la cinétique entre (6) et (28).

On a appliqué les mêmes conditions que celle avec l'acide, et au bout de 5 minutes après l'addition de la molécule (**28**) à T= 20 minutes du lancement de l'expérience dans la figure 21, on a remarqué l'apparition de nouveaux pics qui correspondent aux protons izoxazoliniques (H<sub>4</sub> et H<sub>5</sub>). Au fur et à mesure de l'avancement de la réaction, on a remarqué

la disparition des deux protons vinylique ( $H_4$  et  $H_5$ ) et celle du pont du bicycle ( $H_3$  et  $H_6$ ) et en parallèle, l'augmentation de celle du pont des deux isomères des produits de la réaction « click » (voir Figure 21).



Figure 21 : Représentation de la cinétique entre (6) et (28) en présence du BAIB.

On a réalisé la même réaction sur une plus grande quantité, on a obtenu les deux produits (**32**) avec un rendement total de 32% et (**33**) avec un rendement total de 29%, qui ont été bien confirmé en RMN ainsi qu'en spectroscopie de masse.

#### II.C.6. Ethérification réductrice utilisant le triflate de triméthylsilyle

En partant du mélange endo/exo 5-norbornène-2-carboxaldéhyde commercial, on a testé plusieurs conditions pour aboutir à la molécule (**35**) notre précurseur pour la synthèse de



Schéma 32 : Schéma rétrosynthétique de synthèse de (35) à partir de (34) et (22).

En appliquant les conditions décrites par l'équipe de Nishizawa<sup>66</sup> utilisant le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) et le triéthylsilane (Et<sub>3</sub>SiH).

On a ajouté le TMSOTf à -30°C puis après une heure sous agitation toujours à la même température, on a ajouté le  $Et_3SiH$ . On a réalisé différentes modifications des conditions : le nombre d'équivalent de TMSOTf ajouté, la température de la solution quand on a fait l'ajout, le temps d'attente avant l'addition du  $Et_3SiH$ , ainsi que le nombre d'équivalent de  $Et_3SiH$ . On les a regroupés dans le Tableau 2. Les résultats n'ont pas été satisfaisants, Le produit d'éthérification a été détecté par spectroscopie de masse mais en très faible quantité.

	Temp (°C)	Conditions	Nb. d'éq TMSOTf	T(h) et temp (°C) après TMSOTf	Nb. d'éq de l'Et <sub>3</sub> SiH ajouté	Conditions après Et <sub>3</sub> SiH	Rdt
1	-30°C	DCM anh	0.2	1 h, -30 °C	1.35	3 h, -30 °C	Trace <sup>a</sup>
2	-30°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	0.2	1h -30 °C puis - 78°C	1.35	3h, -78°C	Trace <sup>a</sup>
3	-78°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	0.2	1h, -78°C	1.35	3h, -78°C	Trace <sup>a</sup>
4	-78°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	1	1h, -78°C	1	3h, -78°C	Trace <sup>b</sup>
5	-78°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	1.5	1h, -78°C	1.5	3h, -78°C	Trace <sup>b</sup>
6	-78°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	2	1h, -78°C	2	3h, -78°C	4% <sup>a</sup>
7	-78°C	DCM <sub>anh</sub> , tamis 4 Å	3	1h, -78°C	3	3h, -78°C	Trace <sup>b</sup>

Tableau 2 : Différentes essais d'éthérification réductrice avec le 5-norbornène-2-carboxaldéhyde.

a : vérifier en spectroscopie de masse, b : vérifier sur CCM.

<sup>&</sup>lt;sup>66</sup> Hatakeyama S., Mori H., Kitano K., Yamada H., Nishizawa M., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 4367-4370.

Après tous ces essais, on s'est dirigé vers le benzaldéhyde pour des études modèles en espérant obtenir plus d'information, sur cette éthérification réductrice.

Notre premier essai, sur le benzaldéhyde, a été réalisé dans le dichlorométhane anhydre avec du tamis 4 Å à -78°C. On a ajouté 2 équivalent de TMSOTf à -78°C, puis on a laissé sous agitation pour 1 heure à -78°C avant l'addition de 2 équivalent d' $Et_3SiH$ , puis après 3 heures de réaction nous avons obtenu le produit (**36**) avec 27% de rendement.

On a modifié notre stratégie, et on a réalisé la réaction toujours dans le dichlorométhane anhydre avec du tamis 4 Å à -78°C. L'addition de 0.1 équivalent de TMSOTf, a été suivie après 15 minutes par l'ajout de 1.3 équivalent d'Et<sub>3</sub>SiH à la même température. Puis on a laissé la réaction monter en température jusqu'à -10°C pendant 3 heures. On a obtenu le produit d'éthérification réductrice (**36**) avec 65% de rendement (voir Schéma 33).



Schéma 33 : Réaction de synthèse de (35) et (36).

Ensuite on a repris les conditions qui ont été appliquées avec l'expérience du benzaldéhyde sur le 5-Norbornène-2-carboxaldéhyde, et on a obtenu la molécule (**35**) avec un rendement de 15%.



Schéma 34 : Réaction de synthèse de (37).

Dans le but d'avoir plus d'informations sur le comportement de cette réaction avec d'autre molécule simples et cyclique, donc on a lancé selon les dernières conditions, une réaction d'éthérification réductrice avec le cyclohexanecarbaldehyde (voir Schéma 34). On a obtenu le produit désiré avec un rendement de 11%.

On a pu conclure selon les trois différentes molécules (benzaldehyde, le 5-Norbornène-2-carboxaldéhyde, et le cyclohexanecarbaldehyde), une différence de réactivité, en faveur du dérivé aromatique.

On a lancé un dernier essai, selon les conditions de synthèse de (**36**) sur le 4éthnylbenzaldéhyde (**38**), pour synthétiser (**39**) dans le but d'une nouvelle voie de synthèse du Kdo- vinylbenzène.



Schéma 35 : Schéma de synthèse de (39).

On a obtenu le produit d'éthérification (**39**) avec un rendement de 25% (voir Schéma 35). On n'a pas avancé plus dans cette stratégie, mais on a tenté a essayé d'autre réactifs éthérification dans le but d'optimiser les rendements de synthèse de (**35**).

#### II.C.7. Ethérification réductrice utilisant le Chlorure de fer (III)

Suite à tous ces essais, on a modifié nos conditions en changeant le catalyseur du TMSOTf au chlorure de fer (III) anhydre. On a appliqué ce qui est été publié dans la
littérature par l'équipe d'Oriyama dans des réactions avec des alcools primaires<sup>67</sup>, sur la molécule 1,2,3-tri-O-acetyl- $\alpha$ , $\beta$ -D arabinofuranose (**21**). On a additionné 1 équivalent de la molécule (**21**) sur une solution contenant 5% en mole de chlorure de fer (III) anhydre et 0.95 équivalent de benzaldéhyde dans du nitrométhane distillé. Ensuite on a rajouté un équivalent d'Et<sub>3</sub>SiH, et la réaction est restée sous agitation à température ambiante pour une durée de 1 heure. Mais selon le suivit par CCM la réaction n'a pas beaucoup évolué. On a laissé de plus pour 16 heures, mais les résultats ont été similaires. Donc on réalisé la réaction sur la molécule (**22**), selon le travail de l'équipe d'Oriyama sur les molécules d'alcools protégés par de groupements silylés<sup>68</sup>. Dans un bain de glace a 0°C, 1 équivalent de la molécule (**22**), a été additionné sur une solution contenant 5% en mole de chlorure de fer (III) anhydre et 1.2 équivalent de benzaldéhyde dans le nitrométhane distillé, suivie d'un équivalent d'Et<sub>3</sub>SiH. La réaction a été laissée sous agitation pour 3 heures. Cette méthode n'a pas abouti à de meilleurs résultats que celle réalisé avec la molécule (**22**).

On a également essayé le chlorure de fer (III) hexahydrate comme catalyseur, en se reposant sur les travaux de l'équipe de Beau<sup>69</sup>, en utilisant un mélange de solvant anhydre dichlorométhane/acétonitrile dans les proportions (4/1) avec du tamis moléculaire 4 Å. On a additionné tous les réactifs à 0°C puis on a agité le milieu réactionnel à température ambiante pour une nuit, mais l'expérience n'a pas abouti au produit d'éthérification désiré, mais uniquement à des produits de dégradation.

Donc on a tenté de réaliser la réaction avec le chlorure de fer (III) hexahydrate de nouveau, mais en modifiant la température de la réaction de 0°C à -78°C. Puis on a laissé monter à température ambiante toute la nuit. Les résultats ont été similaires.

On a conclu que les groupements acétates agissent pour former un chélate sur le chlorure de fer (III) hexahydrate et diminuent la réactivité du catalyseur.

#### **II.D. Conclusion**

En conclusion pour ce chapitre, on a synthétisé à partir du D- arabinose, un motif saccharidique (Kdo) modifié à sa position 8 par un groupement azoture, qu'on va faire réagir dans une réaction click dans le chapitre suivant et on va parler de ces tests *in vivo*.

<sup>&</sup>lt;sup>67</sup> Iwanami K., Yano K., Oriyama T., *Chem. Lett.*, **2007**, 036, 38-39.

<sup>&</sup>lt;sup>68</sup> IwanamiK., Yano K., Oriyama T., Synthesis., **2005**, 16, 2669-2672.

<sup>&</sup>lt;sup>69</sup> Bourdreux Y., Lemétais A., Urban D., Beau J. M., Chem. Commun., 2011, 47, 2146-2148.

On a synthétisé aussi un motif saccharidique modifié par un groupement vinylique, à la base du D- galactose, qui va nous servir comme motifs complémentaire dans la réaction click au niveau du chapitre suivant.

Malgré les améliorations de la synthèse du motif saccharidique modifié par un norbornène, on n'a toujours pas pu accéder à l'étape finale de cette synthèse pour aboutir à la molécule (**U**).

Ainsi on a réalisé des tests sur l'éthérification réductrice avec différente molécule qui peuvent nous servir d'accès à des molécules d'intérêt tel que la molécule (**39**) qui par réduction de l'alcyne en alcène correspondant peut aboutir au Kdo-vynilbenzène.

# Chapitre Troisième

Tests

in vitro & in vivo

# SOMMAIRE

III. TEST IN VITRO ET IN VIVO	76
III.A. REACTION CLICK ENTRE (14) ET (T) IN VITRO	
III.B. REACTION CLICK IN VIVO	77
III.C. CONCLUSION	

#### III. Test in vitro et in vivo

Dans ce chapitre on va discuter l'application *in vitro* puis *in vivo* des exemples de « réaction click » que l'on a réalisées entre quelques motifs saccharidiques et la sonde fluorescente déjà synthétisés durant les deux chapitres précédents, ainsi que la sonde fluorescente commerciale Alexa Fluor 488 porteuse d'un alcyne (A488-yne), selon les conditions mises au point avec les molécules modèles. Nous chercherons ainsi à confirmer notre hypothèse de marquage du LPS bactérienne.

#### III.A. Réaction click entre (14) et (T) in vitro

La réaction de click *in vitro* qu'on a réalisée a été une expérience entre un motif fluorescent, la molécule de rhodamine B fonctionnalisée avec une aldoxime (**14**), et un motif saccharidique, 6-O-p-vinylbenzyl- $\alpha$ , $\beta$ -D galactopyranose (**T**), en utilisant le BAIB dans une système binaire méthanol/eau.



Schéma 36 : Schéma de synthèse de (40) à partir des molécules (14) et (T).

L'addition d'une solution aqueuse de (**T**) de concentration 84  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, 15 minutes après l'ajout de 2 équivalent de BAIB à une solution de (**14**) dans le méthanol à la même concentration, nous a permis, en 2 heures et demi à température ambiante, la formation du produit de click (**40**) avec un rendement de 14% (voir Schéma 36). Le produit a été vérifié en spectroscopie de masse, mais en RMN, ce n'était pas très propre, malgré la tentative de purification en utilisant la chromatographie de phase inverse (C18) et plusieurs lavages.

#### III.B. Réaction click in vivo

On a effectué tous nos essais *in vivo* chez nos collaborateurs biologistes à Marseille. Ils ont été effectués sur une gamme de bactéries à Gram négatif et positif, les Gram négatifs possédant un lipopolysaccharide pour vérifier notre hypothèse de son marquage, et les Gram positive ont été utilisés comme control-négatif.

Nous avons travaillé sur une bactérie non pathogène Escherichia coli K 12 et l'équipe de S. Dukan a appliqué les tests sur les bactéries pathogènes (Escherichia coli O 86, Salmonella typhimurium 12023, Shewanella oneidensis, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Legionella pneumophila Paris).

La stratégie mise en jeu était de mettre en culture les bactéries avec les motifs saccharidiques synthétisés, ce qui permet aux bactéries d'avoir la matière première qui sera utilisée dans la synthèse de leurs lipopolysaccharides, après le passage du motif saccharidique par les voies biosynthétiques cellulaires. On réalise, pour chaque molécule saccharidique, la réaction click correspondante soit en utilisant le Cu (I) comme catalyseur, tel que la click (3+2) entre azoture et alcyne, soit en utilisant le BAIB, pour la réaction entre l'oxyde de nitrile et la molécule porteuse d'alcène.

Les conditions de culture que l'on a appliquées aux bactéries sont les suivantes : *Escherichia coli* K 12, Escherichia coli O 86 et *Salmonella typhimurium* 12023 ont été cultivées dans un milieu M9 (contenant également: casamino acides 0,2%, glucose 0,2%, CaCl<sub>2</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup>), *Shewanella oneidensis*, *Baccillus subtilis* et *Staphylocosccus aureus* ont été cultivés dans un milieu Luria-Bertani (LB) et *Legionella pneumophila* Paris a été cultivé dans un milieu d'extrait de levure enrichi de L-cystéine, de pyrophosphate ferrique et d' $\alpha$ -cétoglutarate. Toutes les souches ont été cultivées dans un agitateur (160 rpm) à 37 °C, sauf Shewanella oneidensis (28 °C).

Pour notre première expérience, qui reposait sur l'application de la réaction click avec cuivre (I), entre la molécule du Kdo modifié par le groupement azoture (**S**) et l'alcyne porté par une sonde fluorescente commerciale (A488-yne), (voir Schéma 37), on a premièrement procédé par la culture des bactéries dans une solution contenant le Kdo modifié. Les bactéries prennent le sucre modifié dans leur système de biosynthèse, sucre qui ensuite sera exprimé à la surface membranaire dans le LPS bactériens. Nos bactéries ont été mises dans un milieu de culture frais dilué 1000 fois contenant du Kdo-N<sub>3</sub>(**S**), qui sera utilisé par les bactéries pour la formation du LPS bactériens. Elles ont été ensuite incubées à 37 °C pour 12 heures et puis lavées avec un tampon phosphate (0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5), en utilisant la centrifugation pour 1 min à température ambiante. Puis le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) et un ligand dérivé du glucose, le tris-(glucose-triazol) amine (TGTA)<sup>70</sup>, dont l'importance est de piéger le Cu(I) évitant sa toxicité et favoriser la cycloaddition catalysé par le cuivre <sup>71</sup>, ont été additionnés respectivement au sein du milieu cellulaire à une concentration finale de 2 mmol.L<sup>-1</sup> et 4 mmol.L<sup>-1</sup>. Puis ils ont été mélangés pendant une nuit dans un tampon phosphate (0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5) à 37 °C sous agitation vigoureuse.



Schéma 37 : Schéma représentatif de la réaction click 3+2 azoture/alcyne in vivo.

L'étape suivante a été l'addition respectivement de l'aminoguanidine, l'ascorbate de sodium qui nous permet de réduire le Cu(II) en Cu(I) *in situ*, et A488-yne à des concentrations finales de 4 mmol.L<sup>-1</sup>, 5 mmol.L<sup>-1</sup> et 0,13 mmol.L<sup>-1</sup>, au mélange CuSO<sub>4</sub>/TGTA agité durant une nuit. Les bactéries ont été remises en suspension dans cette solution. Au bout de 5, 30, 60 ou 180 minutes, les cellules ont été lavées 3 fois avec un tampon phosphate par centrifugation à 13000 g pendant 1 minute à température ambiante et analysées par microscopie.

Pour la détection de la fluorescence, les mesures ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence automatisé. Les bactéries ont été posées sur des lamelles de verre et couvertes d'un pad de gélose préparée avec une solution diluée de Luria-Bertani (LB).

<sup>&</sup>lt;sup>70</sup> Baron A., Bleriot Y., Sollogoub M., Vauzeilles B., Org. Biomol. Chem., **2008**, 6, 1898 – 1901.

<sup>&</sup>lt;sup>71</sup> Chan T. R., Hilgraf R., Sharpless K. B., Fokin V. V., Org. Lett., **2004**, 6, 2853 – 2855.

A partir des images qu'on a réalisées sur les différents types de bactéries, on a pu clairement remarquer l'efficacité du marquage qui ne se produit qu'à la périphérie des bactéries à Gram négatif qui sont connue pour posséder un LPS. Le marquage réalisé sur chaque espèce a bien été membranaire en comparaison avec les expériences réalisées sans la présence de la molécule (**S**). Tous les résultats ont été regroupés dans la Figure 22 montrant le marquage positif dans les bactéries qui ont été incubés avec la molécule (**S**) et l'absence du marquage en absence dans le milieu de culture de la molécule (**S**).



Figure 22 : Images de marquages effectués sur différentes types de bactéries gram négatives en absence ou en présence de Kdo-N<sub>3</sub>.

En contrôle négatif, on a appliqué les mêmes expériences mais sur des bactéries de gram positives (B. subtilis, S. aureus) qui sont connue pour l'absence du LPS dans leur structure membranaire et les résultats ont confirmé notre hypothèse d'absence de marquage même en présence de Kdo- $N_3$  (voir Figure 23).

Malgré tous les tests réalisés sur les bactéries à gram négatif, S. oneidensis a présenté un résultat négatif. La raison est que le Kdo normal dans le LPS de cette bactérie possède sur le carbone 8 de la molécule une amine au lieu d'un groupement hydroxyle, introduit via deux étapes enzymatiques utilisant  $O_2$  et glutamate<sup>72</sup>.



Figure 23 : Images de marquage des expériences de contre-exemple réaliser sur des bactéries de grams positifs et sur S. oneidensis.

Les expériences positives sur les *E. coli* K12 ont permis de présenter un histogramme de la distribution de la fréquence par rapport à des intensité de fluorescence obtenue après culture, pour des bactéries cultivées en présence ou en absence du Kdo-N<sub>3</sub> (**S**), et ainsi le rapport signal/bruit de fond de la fluorescence en fonction de la durée de la réaction click. On observe clairement que celles cultivées en présence de Kdo-N<sub>3</sub> sont plus marquées (voir Figure 24).

<sup>&</sup>lt;sup>72</sup> Gattis S.G., Chung H. S., Trent M. S., Raetz R. H., J. Biol. Chem., **2013**, 288, 9216-9225.



Figure 24 : Les résultats de la réaction click avec le Kdo-N<sub>3</sub> (S) catalysé par le Cu(I) appliqué sur *E. Coli*K12 a) histogramme de la fréquence de la distribution bactérienne. b) courbe représentant le rapport signal de fluorescence par rapport au bruit de fond en fonction du temps de click.

Pour notre deuxième expérience, nos collaborateurs ont réalisés d'autre tests selon les conditions de réaction click catalysé par le Cu(I) entre la molécule fucose-N<sub>3</sub> et (A488-yne). Mais les résultats de marquage ont été négatifs, le fucose-N<sub>3</sub> (Fuc-N<sub>3</sub>) n'ayant probablement pas été intégré dans le système métabolique d'*E.coli* K12 (voir Figure 25) ceci est confirmé par l'histogramme de la distribution de la fréquence pour les bactéries cultivées en présence ou en absence du Fuc-N<sub>3</sub>.



**Figure 25 :** Les résultats de la réaction click avec le Fuc- $N_3$  catalysée par le Cu(I) appliqué sur *E. Coli* K12. a) les images de marquage des expériences. b) l'histogramme de la fréquence de la distribution de fluorescence.

Ensuite on a réalisé notre troisièmes expérience, en se basant sur le test de click qu'on a réalisé entre (14) et le 6-O-p-vinylbenzyl- $\alpha$ , $\beta$ -D galactopyranose (styryl D-fucose, **T**), mais face au styryl-L-fucose dans une réaction avec le BAIB. Nos bactéries ont été mises, pour une nuit, dans un milieu de culture frais dilué 1000 fois contenant du styryl-L-fucose, qui sera potentiellement introduit au sein du LPS bactériens. Elles ont été ensuite incubées à 37 °C pour 12 heures et puis lavées avec un tampon phosphate (0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,5), en utilisant la centrifugation. Un mélange de (14) / BAIB a été ajouté sur les bactéries au bout de 4 minutes (le temps suffisant pour la génération, in situ, de l'oxyde de nitrile correspondant) à deux concentration différentes (10<sup>-2</sup> mol.L<sup>-1</sup> et 10<sup>-3</sup>mol.L<sup>-1</sup>).



**Figure 26 :** Les images de marquages des expériences réalisés entre le styryl-L-Fucose et la rhodamine B modifiée par l'oxime (14) utilisant le BAIB.

Selon les images, les résultats ont montré que le marquage du styryl-L-fucose n'a pas été spécifique avec la molécule (14) (voir figure 26). La molécule dérivée de la rhodamine B a marqué toute les bactéries même en absence du styryl-L-fucose, donc on n'est pas sur si la réaction click a été réalisée ou pas, et si le styryl-L-fucose a été incorporé. En plus, on a remarqué que la sonde fluorescente a pu s'insérer à l'intérieure des bactéries et le marquage n'a pas été membranaire comme avec le Kdo-N<sub>3</sub> (**S**).

#### **III.C. Conclusion**

En conclusion pour ce chapitre, on a réalisé les tests biologiques concernant le marquage du LPS au sein de plusieurs souches bactériennes. Pour des réactions click catalysés avec le Cu(I) des résultats ont confirmé notre stratégie de marquage, sans avoir à

introduire des modifications génétiques au sein de l'ADN, avec le Kdo- $N_3$ . D'autres expériences n'ont pas été positives, comme avec le fucose- $N_3$ .

Les essais de réaction click sans cuivre en utilisant le BAIB ont échoué car les résultats n'ont pas montré de marquage spécifique.

# PARTIE DEUXIEME

# SONDE BORONATE POUR LE STRESS OXYDANT

# SOMMAIRE

INTRODUCTION	86
IV.A. Synthèse du 6-amino-coumarine (42)	87
IV.A.1. Schéma rétrosynthétique :	87
IV.A.2. Utilisation du Chlorure d'étain :	87
IV.A.3. Utilisant le Nickel de Raney :	89
IV.B. Synthèse de la 6-amino-5-bromocoumarine (43)	90
IV.B.1. Sans solvant en utilisant le bromure de tétra-butyl-ammonium :	90
IV.B.2. Dans le dichlorométhane :	91
IV.C. Synthèse de la 6-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)-coumarine (44) :	91
IV.D. Synthèse de la 6-amino-5-ethynyl-coumarine (45) :	93
IV.E. Synthèse de (V) via l'hydroboration de la 6-amino-5-ethynyl-coumarine (45):	93
IV.F. Synthèse de la 6-amino-5-iodo coumarine (46) :	
IV.G. Couplage de Heck sur la 6-amino-5-iodo coumarine (46)	95

### **IV. Introduction**

Dans cette deuxième partie du manuscrit, nous sommes intéressés à la synthèse d'une nouvelle sonde fluorescente qui sera sensible au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive d'oxygène et un des acteurs du stress oxydant dont on a parlé en généralité au début de ce manuscrit. L'une des sondes citées dans la littérature, est la sonde boronate. Ces sondes sont des molécules possèdant une fonction boronate qui masque leur fluorescence. Cette fluorescence sera émise par oxydation du boronate en présence du peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel. On citera l'exemple de la molécule peroxyfluor 1 (PF1) testée par l'équipe de Chang<sup>73</sup> (voir figure 27).



**Figure 27** : a) La molécule PF1 fluoresce en présence du  $H_2O_2^{72}$ , b) Le mécanisme d'oxydation<sup>72</sup>.

Notre idée est de synthétiser, la sonde boronate, dérivée de la 6-amino-coumarine, dont le principe est d'exprimer la fluorescence en se basant sur la cyclisation du groupement amine primaire sur le groupement aldéhyde formé à partir d'un vinyle boronate, en présence de peroxyde d'hydrogène comme oxydant (voir schéma 38).



Schéma 38 : Schéma représentatif de la cyclisation de (W) en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de (V).

<sup>&</sup>lt;sup>73</sup> Lippert A. R., Van De Bittner G. C. Chang C.J., Acc. Chem. Res., **2011**, 44, 793-804

Notre schéma retrosynthétique proposé à partir de la 6-nitrocoumarine commerciale (41), se base soit sur un couplage de Sonogashira suivie d'une hydroboration, soit sur un couplage de Heck.



Schéma 39 : Schéma retrosynthétique de la synthèse de (V) via (45) à partir de (41).

#### IV.A. Synthèse du 6-amino-coumarine (42)

#### IV.A.1. Schéma rétrosynthétique :



Schéma 40 : Schéma retrosynthétique pour la synthèse de (42) à partir de (41).

#### IV.A.2. Utilisation du chlorure stanneux:

La première méthode qu'on a essayée, a été celle décrite par l'équipe de De<sup>74</sup>, dont la réalisation a été effectuée sans solvant en présence de 1,5 équivalent de bromure de tétrabutyl-ammonium ainsi que 3 équivalents du chlorure d'étain (II) dihydrate (voir Schéma 41). Durant la première réaction, qui a était faite dans un tube scellé bien fermé et sous agitation à 90°C pour une nuit, on a obtenu le produit (**42**) avec un rendement de 30% ainsi qu'une impureté de couleur bleue visible en lampe UV, et une quantité importante de réactif de départ qui n'a pas réagi. Un traitement par une solution saturée de carbonate de sodium a ensuite été nécessaire pour la neutralisation du milieu et l'extraction du produit.

<sup>&</sup>lt;sup>74</sup> De P., *Synlett*, **2004**, 10, 1835-1837.

On a regroupé dans le tableau 3 les différentes conditions et modifications qu'on a appliquées pour améliorer le comportement de la synthèse de (42).



Schéma 41 : Schéma de synthèse de (42) en utilisant le chlorure d'étain.

**Tableau 3 :** Regroupements des différentes modifications et observations pour les conditions du schéma 41.

Réaction	SnCl₂.2H₂O nb. d'éq.	Milieu anhydre	16 heures à T (°C)	Observations	
1	3 éq.	Oui	90	Il reste beaucoup du réactif de départ qui n'a pas réagi. Un aspect multitâches sur CCM. Rdt = 30%	
2	3 éq.	Non	t.a.	Il reste beaucoup du réactif de départ qui n'a pas réagi. Un aspect multitâches sur CCM. Rdt = 15%	
3	3 éq.	Oui	t.a.	ll reste beaucoup du réactif de départ qui n'a pas réagi. Un aspect multitâches sur CCM. Rdt = 15%	

Dans nos deuxième et troisième essais avec 3 équivalents de chlorure stanneux, qu'on a réalisés à température ambiante, on a remarqué une chute dans les rendements de 30% à 15% ainsi que les mêmes aspects multitâches sur le suivit par CCM et des quantités importantes de réactif de départ qui n'a pas réagi.

#### IV.A.3. Utilisation du Nickel de Raney :

Après tous nos essais, on a changé de réactif, et on a utilisé le nickel de Raney et le dihydrogène selon les travaux de l'équipe de Seyfried<sup>75</sup>. On a eu un problème de solubilité de notre réactif, donc on a réalisé quelques essais qu'on a groupé dans Tableau 4, pour trouver les meilleures conditions pour réaliser cette réaction.



Schéma 42 : Réaction de synthèse de (42) en utilisant le nickel de Raney.

En utilisant 1,2 équivalents de nickel de Raney, on a premièrement utilisé un système ternaire de solvant (méthanol, *tert*-butanol, eau : 5/2,5/1), et on a eu un problème de solubilité, de telle sorte qu'une grande quantité de réactif de départ n'a pas réagi. Le rendement a été de 15%.

Donc pour nos essais suivants et toujours avec 1,2 équivalents de nickel de Raney, on a changé le système de solvant soit en utilisant un système binaire (toluène, éthanol : 1/1), soit en utilisant l'acétone. Les rendements ont été meilleurs comparés au premier essai, mais avec le système binaire de solvant on a remarqué qu'a un moment donné la réaction n'évolue plus, on a même ajouté quelques gouttes d'acide acétique pour réactiver le nickel de Raney, tandis qu'avec l'acétone le comportement a été plus facile mais il reste toujours une petite quantité du réactifs de départ qui n'a pas réagi.

Donc on a réalisé notre dernier essai, dans l'acétone mais en utilisant 1,5 équivalent de nickel de Raney, en faisant buller le dihydrogène a l'intérieur, de la solution ce qui nous a conduit à 60% de rendement au bout de 48 heures.

<sup>&</sup>lt;sup>75</sup> Heinrich T., Böttcher H., Schiemann K., Hölzemann G., Schwarz M., Bartoszyk G. D., van Amesterdam C., Greiner H. E., Seyfried C. A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4843-4852.

	Nb. d'éq Ni de Raney	Solvant	Concentratio n (mol.L- <sup>1</sup> )	Observations et Rdt
1	1,2	MeOH/ <i>t</i> -BuOH/H <sub>2</sub> O 5/2,5/1	0,28	Le réactif était insoluble. Il reste beaucoup du réactif de départ qui n'a pas réagi, Rdt=15%.
2	1,2	Toluène/EtOH 1/1	0,23	Il reste beaucoup du réactif de départ qui n'a pas réagi. Addition de quelque goutte d'acide acétique. La réaction n'évolue plus après 48 heures. Rdt=56%
3	1,2	Acétone	0,21	Le réactif de déaprt est bien soluble. Un peu de produit de départ n'a pas réagi après 48 heures. Rdt=54%
4	1,5	Acétone	0,2	Le réactif de déaprt est bien soluble. Un peu de produit de départ n'a pas réagi après 48 heures. Rdt=60%

**Tableau 4 :** Regroupement des différentes modifications et observations pour la réaction du schéma 42.

Donc notre meilleur rendement de 60% a été obtenu en utilisant l'acétone comme solvant.

#### IV.B. Synthèse de la 6-amino-5-bromocoumarine (43)

#### IV.B.1. Sans solvant en utilisant le bromure de tétra-butyl-ammonium :

Pour introduire le brome sur la position 5 de la coumarine, nous nous sommes basés sur la méthode appliqueé par l'équipe de Dutta<sup>76</sup> (voir Schéma 43), qui a été réalisée sans solvant mais avec de rendements faibles (30-32%) même en chauffant à 100 °C pour 3 heures.

<sup>&</sup>lt;sup>76</sup> Ganguly N. C., De P., Dutta S., *Synthesis*, **2005**, 1103–1108.



Schéma 43 : Schéma représentatif de la synthèse de (43) dans le bromure de tétra-butyl-ammonium.

#### IV.B.2. Dans le dichlorométhane :

On a appliqué la méthode d'écrite dans la littérature par l'équipe de Yao<sup>77</sup>, et une bromation a été réalisée dans le dichlorométhane et à température ambiante, avec de meilleur rendements et reproductibilités que celle avec le bromure de tétra-butyl-ammonium (voir Schéma 44). En ajoutant 1 équivalent de N-bromo-succinimide sur 4 fois pendant 40 minutes, puis en laissant sous agitation pendant 90 minutes à température ambiante, nous avons obtenu le produit désiré avec de rendement arrivant jusqu'à 98%.



Schéma 44 : Schéma représentatif de la synthèse de (43) dans le dichlorométhane.

#### IV.C. Synthèse de la 6-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)-coumarine (44) :

Pour cette étape de la synthèse, on a réalisé un couplage de Sonogashira selon la méthode d'écrite par Majumdar<sup>78</sup>. On a changé dans le système de mélange des solvants la triethylamine (NEt<sub>3</sub>) par la diisopropylamine (DIPA). On a laissé la réaction sous agitation à température ambiante pour 1 heure puis pour une nuit à 80 °C.

<sup>&</sup>lt;sup>77</sup> Chen L., Hu T. S., Yao Z. J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 6175-6182.

<sup>&</sup>lt;sup>78</sup> Majumdar K. C., Mondal S., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 2418-2420.

Les premiers essais ont été réalisés en ajoutant au mélange de solvant un complexe de palladium et de l'iodure de cuivre, l'alcyne protégé avec le groupement triméthyl silyle puis en dernière étape la molécule (**43**), mais les rendements ont été équivalents à 20% (voir Schéma 45). Donc on a modifié l'addition des réactifs. On a ajouté en premier étape la molécule (**43**) au milieu réactionnel puis on a ajouté l'alcyne protégé, en utilisant des solvants anhydres, dégazés et préparés le jour même.

Dans le Tableau 5, on a regroupé les réactions qu'on a réalisées et ainsi que nos observations.



Schéma 45 : Schéma représentatif de la synthèse de (44) à partir de (43).

Tableau 5 : Regroupement des différentes modifications pour la réaction du schéma 45.

	Modification	<b>Observations et Rdt</b>		
1	<ul> <li>Les solvants sont bien dégazés.</li> <li>Ajout de l'alcyne avant la molécule (43).</li> <li>Agitation à t.a. pour 3 jours.</li> </ul>	<ul> <li>Présence toujours de réactif de départ.</li> <li>Rdt=41%.</li> </ul>		
2	<ul> <li>Les solvants sont bien dégazés.</li> <li>Ajout de la molécule (43) avant l'alcyne.</li> <li>Agitation pour une nuit.</li> </ul>	<ul> <li>Présence toujours de réactif de départ.</li> <li>Rdt= 56%.</li> </ul>		

### IV.D. Synthèse de la 6-amino-5- ethynyl-coumarine (45) :

L'étape suivante était une désilylation en utilisant le  $K_2CO_3$  dans le méthanol à température ambiante pour 70 minutes<sup>79</sup>, qui a abouti au produit (**45**) avec 64% de rendement (voir Schéma 46).



Schéma 46 : Schéma représentatif de la déprotection de (44).

# IV.E. Synthèse de (V) via l'hydroboration de la 6-amino-5-ethynylcoumarine (45):

Cette étape représente l'étape finale de notre synthèse. Elle est été basée sur les travaux de l'équipe de Chavant<sup>80</sup>, en utilisant le complexe de zirconium HZrCp<sub>2</sub>Cl (5% mol) en solution dans le dichlorométhane (voir Schéma 49). Malgré tous les essais réalisés, la réaction n'a pas abouti au produit désiré.



<sup>&</sup>lt;sup>79</sup> Baron A., Herrero C., Quaranta A., Charlot M., Leibl W., Vauzeilles B., Aukauloo A., *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 11011-11013.

<sup>&</sup>lt;sup>80</sup> PraveenGanesh N., d'Hondt S., Chavant P. Y., J. Org. Chem., 2007, 72, 4510-4514

#### IV.F. Synthèse de la 6-amino-5-iodo coumarine (46) :

Après plusieurs essais réalisés pour l'hydroboration selon le même principe avec le complexe de zirconium, on a envisagé une nouvelle voie de synthèse via un couplage de Heck.

Le couplage de Heck avec le vinyle pinacolborane sur les dérivés iodés est plus rapide que les dérivés bromés tels que la molécule (**43**). On a donc envisagé l'incorporation d'un atome d'iode sur la position 6 de la molécule (**42**) formant la 6-amino-5-iodo coumarine (**46**) (voir Schéma 48).



Schéma 47 : Schéma retrosynthétique représentant la synthèse de (V) à partir de (46) via la réaction de Heck.

Cette étape d'introduction de l'iode sur la position 5 de la coumarine a été bien achevée par l'utilisation de mono chlorure d'iode dans l'éthanol comme dans le travail de l'équipe de Kun<sup>81</sup> aboutissant à la 6-amino-5-iodo coumarine (**46**) avec un rendement = 95% (voir Schéma 48).



Schéma 48 : Schéma représentatif de la synthèse de (46) à partir de (42).

<sup>&</sup>lt;sup>81</sup> Kun E., Mendeleyev J., WO 92/06687 PCT/US91/07665.

#### IV.G. Couplage de Heck sur la 6-amino-5-iodo coumarine (46)

Pour les premiers essais, on a appliqué ce qui était fait par l'équipe de Whiting<sup>82</sup>, utilisant l'acétate de palladium, mais on n'a pas réussi à obtenir le produit désiré. On a également suivi le travail de l'équipe de Sampson qui décrit dans un brevet l'utilisation d'un autre complexe, le bis-tri-*tert*-butyl palladium  $Pd[P(tBu_3)]_2^{83}$ , mais les résultats n'ont pas été différents que ceux obtenus dans les premières conditions (voir Schéma 50).



Schéma 50 : Schéma représentant les essais de couplage de Heck pour la synthèse de (V).

Donc on a envisagé de faire des essais du couplage de Heck sur de molécules modèles, tel que l'iodo-benzène (**47**) et l'iodo-toluène (**48**).

On a appliqué les conditions décrite par l'équipe Yoshida<sup>84</sup>, qui reposait sur l'utilisation de 5 % en mole du complexe de palladium  $(Pd[P(tBu_3)]_2)$  dans le toluène à 50 °C pour 5 heures (voir Schéma 51).



Schéma 51 : Schéma représentant la réaction de Heck appliqué aux molécules modèles (47) et (48).

<sup>&</sup>lt;sup>82</sup> Batsanov A. S., Knowles J. P., Whiting A., J. Org. Chem., 2007, 72, 2525-2532.

<sup>&</sup>lt;sup>83</sup> Sampson P. B., Li S. W., Liu Y., Pauls H. W., Edwards L. G., Forrest B. T., Feher M., Patel N.K., Guohua Pan G., WO2010/115279 PCT/CA2010/00518.

<sup>&</sup>lt;sup>84</sup> Itami K., Tonogaki K., Nokami T., Ohashi Y., Yoshida J. I., Angew. Chem. Int. Ed., 2006, 45, 2404-2409.

Dans le cas de l'iodo-benzène (47), on a réussi à identifier en spectroscopie de masse et en RMN, le produit de couplage (50) mais le rendement n'a pas été satisfaisant, tandis que pour l'iodo-toluène (48), on a réussi à isoler et identifier le produit de couplage avec un bon rendement (70%).

Pour des raisons de solubilité de notre 6-amino-5-iodo coumarine (**46**), on a changé le solvant en remplaçant le toluène par du tétrahydrofurane (THF). On a réussi à obtenir le produit de couplage sur l'iodo-toluène mais on a perdu en rendement (30%).

Un test de couplage sur la molécule (42), selon les conditions déjà testées avec la molécule (48) n'as pas abouti au produit désiré. Donc on a envisagé de protéger la fonction amine primaire.

Un essai d'acétylation selon le travail de l'équipe de Fagnou<sup>85</sup>, n'a pas abouti à la molécule protégée. Donc on a essayé de protéger l'amine primaire en utilisant le di-tert-butyl dicarbonate  $(Boc_2O)^{86}$ , mais on n'a pas réussi à obtenir le produit protégé.

On a décidé de protéger la fonction amine en utilisant l'anhydride trifluoro-acetique (TFAA) selon le protocole d'écrit par l'équipe de Carreira<sup>87</sup>, ce qui a abouti à la molécule (**52**) avec un rendement (92%) (voir Schéma 52).



Schéma 52 : Schéma de protection de la molécule (46) avec l'anhydride trifluoroacétique.

On a représenté dans le tableau 6 les différentes conditions et résultats observés lors de la réaction de couplage de Heck réalisée sur la molécule (**52**).

<sup>&</sup>lt;sup>85</sup> Stuart D. R., Bertrand-Laperle M., Burgess K. M. N., Fagnou K., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 16474-16475.

<sup>&</sup>lt;sup>86</sup> Nagle P. S., Rodriguez F., Kahved**zic A.,** Quinn S. J., Rozas I., *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 7113-7121.

<sup>&</sup>lt;sup>87</sup> Edwards J. P., Jones T. K., Riggenberg J. D., Carreira E. M., United States Patent 6,001,846. 1999.

Tableau 6 : Différentes tests pour la synthèse de (53) et les produits secondaires détectés.

	Réaction	1	2	3	4	5
	$\underset{F_{3}C}{\overset{O}{}\underset{H}{\overset{N}{}}\underset{H}{\overset{N}{}\underset{I}{}\underset{52}{\overset{O}{}\underset{52}{\overset{O}{}}}}$	1 éq	1 éq	1 éq	1 éq	1 éq
		1 éq	1 éq	1 éq	2 éq	1 éq
	NEt <sub>3</sub> distillée	2 éq	2 éq	2 éq	4 éq	2 éq
	$Pd[P(tBu_3)]_2$	5% en mol	5% en mol	20% en mol	20% en mol	1 éq
	Solvant, Température, Durée	THF, 50 °C, 18h	Toluène, 50 °C, 18h	Toluène, 50 °C, 18h	Toluène, 50 °C, 5h	Toluène, 50 °C, 5h
¥	$F_{3C} \xrightarrow{O}_{H} \xrightarrow{N}_{H} \xrightarrow{O}_{H} \xrightarrow{O}_{F_{3}C} 53$	Traces	Traces F <sub>3</sub> C	о Н н н с н о в он 22%	≠ <sup>0</sup> Traces	Traces
	$\underset{F_{3}C}{\overset{O}{\underset{H}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset{N}{\overset$	Traces	12%	Traces	22%	47%
	$\underset{F_{3}C}{\overset{O}{\underset{H}{\overset{N}{\longleftarrow}}}} \underbrace{\overbrace{\overset{O}{\underset{H}{\overset{N}{\longleftarrow}}}}^{O}}_{55} \underbrace{\overbrace{\overset{O}{\underset{H}{\overset{O}{\longleftarrow}}}}^{O}}_{55}$	Traces	7%	Traces	19%	50%
	Produit résiduel	Vérifié en CCM	Vérifié en CCM	Vérifié en CCM	Vérifié en CCM	Absence en CCM

La réaction 1, a été réalisé dans le THF comme solvant en utilisant 5% en mole du complexe  $Pd[P(tBu_3)]_2$ . En a ajouté en premier temps, 1 équivalent de la molécule (**52**) à une solution du complexe de palladium dans le THF, ensuite on a ajouté 1 équivalent de (**49**) et 2 équivalents de la triméthylamine. On a bien dégazé le milieu réactionnel mis sous atmosphère d'argon en utilisant la double rampe. Puis la réaction est mise sous agitation à 50°C pour une durée de 18 heures (voir Tableau 6).

La réaction avec le THF n'a pas avancé donc on l'a reprise en utilisant le toluène comme solvant selon le même mode opératoire. En suivant la réaction 2 par CCM, on a observé l'apparition de deux produits majoritaires en plus du réactif de départ restant. On a isolé les deux produits majoritaires, (54) avec 12% de rendement et (55) avec 7% de rendement. Ces produits ont été identifiés par RMN. Par contre on n'a pas obtenu notre produit désiré (53).

Le seul produit qui ressemblait à notre produit désiré (**53**), qu'on a obtenu dans nos essais, a été le produit (**56**), qu'on a isolés avec un rendement (22%) en utilisant 20% en moles du complexe  $Pd[P(tBu_3)]_2$ . Ensuite, on a réalisé un test de déprotection de la fonction amine protégé en se basant sur les travaux réalisé par l'équipe de Keana<sup>88</sup>, utilisant le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans le méthanol, mais on n'a obtenu que des produits de dégradation. Une perspective serait donc de réaliser la déprotection de la fonction amine en utilisant l'acide paratoluènesulfonique dans les conditions décrites par l'équipe de Li<sup>89</sup>.

<sup>&</sup>lt;sup>88</sup> Cai S. X., Keana J., *Bioconjugate Chem.*, **1991**, 2, 317-322.

<sup>&</sup>lt;sup>89</sup> Spenser C., Balsells J., Li H., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50,1010-1012.

# PARTIE EXPERIMENTALE

#### **Experimental section :**

#### General

All moisture-sensitive reactions were performed under an argon atmosphere using oven-dried glassware. Evaporations were performed under reduced pressure. Solvents were evaporated in vacuo. All solvents were dried by filtration on alumina columns or over standard drying agents and freshly distilled prior to use. Flash column chromatography was performed on Silica Gel 60 A.C.C. (6 – 35  $\mu$ m). Reactions were monitored by TLC on Silica Gel 60 F<sub>254</sub> plates with detection by UV at 254 nm and 356 nm and by charring with 5 % ethanolic H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Orcinol, or Ammonium Molybdate.

<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at room temperature in CDCl<sub>3</sub>, MeOH-d<sup>4</sup>, DMSO-d<sup>6</sup> on a Bruker Avance 250 (<sup>1</sup>H: 250.13 MHz, <sup>13</sup>C: 62.89 MHz), 300 (<sup>1</sup>H: 300.13 MHz, <sup>13</sup>C: 75.47 MHz), 360 (<sup>1</sup>H: 360.13 MHz, <sup>13</sup>C: 90.55 MHz). Chemical shifts (δ) are given in parts per million relative to Me<sub>4</sub>Si for <sup>1</sup>H NMR ( $\delta = 0.00$  ppm) and to the residual solvent peak used as an internal standard for <sup>13</sup>C NMR ( $\delta = 77.0$  ppm). The following abbreviations were used to describe the multiplicities: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), br (signal). All multiplicities were approximated to the first order; coupling constants, *J*, are reported in Hz and with an accuracy of +/- 0.2 units on the last digit.

HRMS analyses were recorded in positive mode on a Bruker Micro Tof Q spectrometer using electrospray ionization.

## Synthesis of 4-(bromomethyl)benzaldehyde (2)<sup>53</sup>:



To a solution of 4-(bromomethyl) benzonitrile (1 g, 5.1 mmol) in anhydrous toluene (25 mL) was added DIBAL-H (1 M in toluene, 7.7 mL, 7.65 mmol) at 0 °C. After stirring for 1 hour, HCl (10% aq. Sol., 25mL) was added carefully. The mixture was extracted three times with  $CH_2Cl_2$  (2 x 30 mL), and the combined organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub> and concentrated to give (**2**) as pure white solid product (790 mg, 80%).

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.00 (s, 1H, CHO), 7.85 (d, 2H, *J*= 8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.54 (d, 2H, *J*= 8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 4.49 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>**C NMR** (62 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 191.5 (*C*=O), 144.2, 136.1 (*C*<sub>arom</sub>), 130.2, 129.7 (*C*H<sub>arom</sub>), 31.9 (*C*H<sub>2</sub>).

 Syntesis of 2-[6-(4- formyl-benzyloxy)-3-oxo-3H-xanthen-9yl]-benzoic acid (3)<sup>49</sup>:



Fluorescein (1 g, 3.01 mmol), 4-(bromo methyl) Benzaldehyde (**2**) (600 mg, 3.01 mmol) and cesium carbonate ( $Cs_2CO_3$ ) (1.18g, 3.61 mmol) were dissolved in DMF (15 mL). The mixture was stirred at room temperature overnight. The pH was adjusted to pH = 1 with aqueous HCl (2 M). The solution was diluted with 50 mL AcOEt and the organic layer washed with 200 mL of water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The residue was purified via flash column chromatography over silica gel (AcOEt to AcOEt/MeOH 10: 2.5) to yield (**3**) (406 mg, 30%) as a red solid.

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) : δ (ppm) 10.00 (s, 1H, CHO), 8.26 (dd, 1H, *J*=0.9 Hz, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.80 (dt, 1H, *J*=1.2 Hz, *J*= 7.8 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.81(dt, 1H, *J*=1.0 Hz, *J*=7.8 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.75 (d, 2 H, *J*=8.1 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.48 (dd, 1H, *J*=0.8 Hz, *J*= 7.6 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.22 (d, 2 H, *J*= 8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 6.78 (d, 2 H, *J*= 10Hz, *H*<sub>arom</sub>), 6.53 (m, 2H, *H*<sub>arm</sub>), 6.45 (br, 1H, *H*<sub>arom</sub>), 5.11 (s, 2 H, *CH*<sub>2</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>19</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 451.1182; found: 451.1179.

 $R_f = 0.20$  (AcOEt)

 Syntesis of 2-(6-(4-((hydroxyimino)methyl)benzyloxy)-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid (4)<sup>49</sup>:



Compound (3) (56 mg, 0.125 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (4:1, 5 mL) and NH<sub>2</sub>OH.HCl (11.2 mg, 0.162 mmol) as well as NaOAc (13.2 mg, 0.162 mmol) were

added thoroughly. After 1 hour reaction time the solvent was removed in vacuo. The residue was purified by flash column chromatography over silica gel (AcOEt to AcOEt/MeOH : 20:1) providing compound (4) (15 mg, 26%) as a red solid.

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) : δ (ppm) 11.30 (s, 1H, OH), 8.12 (d, 1H, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 8.12 (s, 1H, *CH*N), 7.88 (dt, 1H, *J*=1.0 Hz, *J*= 7.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.78(dt, 1H, *J*=1.0 Hz, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.48 (d, 2 H, *J*=8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.44 (d, 2H, *J*= 8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 7.02 (d, 2 H, *J*= 8.5 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 6.75 (d, 2 H, *J*= 10.0 Hz, *H*<sub>arom</sub>), 6.49 (d, 2H, *J*= 9.0Hz, *H*<sub>arom</sub>), 6.41(br, 1H, *H*<sub>arom</sub>), 5.01 (s, 2 H, *CH*<sub>2</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 466.1285; found: 466.1269.

 $R_f = 0.38$  (DCM/ MeOH 10:1)

• Synthesis of benzaldehyde oxime (6)<sup>55</sup>:



To a stirred solution of hydroxylamine hydrochloride (5.56 g, 80.0 mmol) in ethanol : water (5 : 1) (120 mL) was added benzaldehyde (4.18 mg, 4.00 mL, 40.0 mmol) at 0 °C. Then sodium acetate (9.84 mg, 120 mmol) was added slowly and the reaction was warmed to room temperature and left stirring for 3 hours. Ethanol was removed in vacuo from the solution, and then 60 mL of water were added on to the product which was then extracted into dichloromethane (3x40 mL). The combined organic extracts were dried over magnesium sulphate and the solvent removed in vacuo to provide compound (**6**) (4.84 g, 100%) which was used without further purification.

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO): δ (ppm) 11.22 (s, 1H, C=N-O*H*), 8.14 (s, 1H, C*H*=NOH), 7.62 (d, 2H, J = 6.8 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.40 (t, 3H, J = 6.8 Hz,  $H_{arom}$ ).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>NO [M+H]<sup>+</sup>: 122.0603; found: 122.0599.

**R**<sub>f</sub> = 0.35 (EP/AcOEt 9:1).

### Synthesis of N-hydroxybenzimidoyl chloride (7)<sup>56</sup>:



To a solution of benzaldehyde oxime (6) (100 mg, 0.826 mmol) in DMF (700  $\mu$ L) was added N-chlorosuccinimide (110 mg, 0.826 mmol) slowly and the reaction mixture was left stirring for 1 hour 30 min at room temperature. Then were added (55 mg, 0.413 mmol, 0.5 eq) of N-chlorosuccinimide and the mixture was left stirring for 30 min. The product was washed with cold water then extracted with ether, rewashed with water, then dried over magnesium sulphate, filtered, concentrated to give (7) (101 mg, 78%) of N-hydroxybenzimidoyl chloride as a white solid.

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.04 (s, 1H, C=N-O*H*), 7.85 (d, 2H, J = 8.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.46–7.40 (m, 3H,  $H_{arom}$ ).

 $R_{f} = 0.47 (EP/AcOEt 9:1)$ 



• <u>Synthesis of fluoresceine methyl ester (8)<sup>57</sup>:</u>

A concentrated commercial sulfuric acid (7.5 mL) was added dropwise to a suspension of fluorescein (10.0 g, 30.0 mmol) in MeOH (30 mL). The resulting suspension was refluxed for 14 hours with an addition funnel packed with oven-dried 3 Å molecular sieves between the pot and condenser to continuously dry the cooled methanol. The mixture was cooled, and

ice (10 g) was added, followed by sodium bicarbonate (30 g). The suspension was filtered and washed with water. The resulting red solid was suspended in 2% aqueous sodium bicarbonate (200 mL) filtered and washed with water. The washing process was repeated four additional times; the solid was resuspended in 1% HOAc, filtered, and finally washed with water. After drying, yielded (8) as a red solid (9.00 g, 86%).

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, d<sup>6</sup>-DMSO) : δ (ppm) 8.20 (d, 1H, J= 7.4 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.83 (dt, 1H, J=1.4 Hz, J= 7.2 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.75 (dt, 1H, J=1.4 Hz, J=7.3 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.457 (d, 1 H, J=7.6 Hz,  $H_{arom}$ ), 6.78 (d, 2H, J=9.2 Hz,  $H_{arom}$ ), 6.65-6.48 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 3.58 (s, 3 H,  $CH_3$ ).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 347.0914; found: 347.0920.

 $R_f = 0.2 (DCM/MeOH 9:1)$ 

### • <u>Synthesis of fluoresceine piperazine amide (9)<sup>58</sup>:</u>



A 2.0 M solution of trimethyl aluminum in toluene (5.75 mL, 11.5 mmol) was added dropwise to a solution of piperazine (1.99 g, 23.08 mmol) in 9 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After 4 hours, a white precipitate formed. A solution of fluorescein methyl ester (**8**) (2.00 g, 5.77 mmol) in 13.77 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was then added dropwise to the heterogeneous mixture. After stirring at reflux for 18 hours in the dark, the reaction was cooled at room temperature and 50 mL of MeOH were added and followed by slow addition of aqueous 130 mL HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> and gaz evolution was observed. The heterogeneous solution was stirred in the dark until gaz used without further purification.

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) : δ (ppm) 7.89-7.84 (m, 3H,  $H_{arom}$ ), 7.73-7.69 (d, 2 H, J= 9.2 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.67-7.62 (m, 1 H,  $H_{arom}$ ), 7.42-7.38 (m, 2H,  $H_{arom}$ ), 7.31 (dd, 2 H, J=2.0 Hz, J = 9.2 Hz,  $H_{arom}$ ), 4.55 (s, 1 H, OH), 3.47-3.42 (m, 4 H, CONCH<sub>2</sub>), 3.22-3.10 (m, 4H, CH<sub>2</sub>HNCH<sub>2</sub>), 1.91(s, 1 H, NH).

 $R_f = 0.3$  (DCM/ MeOH 8:2).



Preparation of Rhodamine B base (11)<sup>58</sup>:

Rhodamine B (3.30 g, 6.90 mmol) was dissolved and partitioned between aqueous 1 M NaOH and AcOEt. After isolation of the organic layer, the aqueous layer was extracted with two additional portions of AcOEt. The combined organic layers were then washed with NaOH. The resulting organic solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure to yield (2.55 g, 83 %) of product (**11**) as pink foam.

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) : δ (ppm) 8.12-8.06 (m, 1H,  $H_{arom}$ ), 7.56-7.7 (m, 2 H,  $H_{arom}$ ), 7.31-7.23 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 7.04-6.96 (dd, 2H, *J*=2.4 Hz,  $H_{arom}$ ), 6.92 (d, 2 H, *J*= 2.4 Hz,  $H_{arom}$ ), 3.66 (q, 8 H, *J*=6.9 Hz, NCH<sub>2</sub>), 1.29 (t, 12 H, *J*= 6.9 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>**C NMR** (62 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) δ (ppm): 169.5 (C=O), 151.9, 151.7, 149.4 (C-Ar), 133.5, 128.8, 127.2, 126.1, 125.8, 124.7, 106.5, 97.7 (CH-Ar), 84.8, 46.9 (CH<sub>2</sub>), 12.7 (CH<sub>3</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 443.5566; found: 443.5562.



### • Synthesis of Rhodamine B piperazine amide (12)<sup>58</sup>:

A 2.0 M solution of trimethyl aluminium in toluene (2.26 mL, 4.5 mmol) was added dropwize to a solution of piperazine (0.78 g, 9.1 mmol) in 3.5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> at room temperature. After one hour of stirring, a white precipitate was observed. A solution of rhodamine B base (**11**) (1.00 g, 2.26 mmol) in 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was added dropwise to the heterogeneous solution. Gas evolution was observed during the addition period. After stirring at reflux for 24 h, an aqueous solution of HCl (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) was added dropwise until gas evolution ceased. The heterogeneous solution was filtered and retained solids were rinsed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 4:1. The combined filtrate was concentrated and the residue was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtered to remove insoluble salts, and concentrated again.

The resulting glassy solid was then partitioned between dilute aqueous NaHCO<sub>3</sub> and AcOEt. After separation, the aqueous layer was washed with 3 additional portions of AcOEt to remove residual starting material. Then saturated with NaCl, acidified with 1 M aqueous HCl, and then extracted with multiple portions of iPrOH:  $CH_2Cl_2$  2:1, until a faint pink color persisted. The combined organic layers were then dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated under reduced pressure. The glassy purple solid was dissolved in a minimal amount of MeOH and precipitated by dropwise addition of a large volume of Et<sub>2</sub>O. The product was collected by filtration as a dark purple solid (1.23 g, 100%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) : δ (ppm) 7.86-7.76 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 7.58-7.53 (m, 1 H,  $H_{arom}$ ), 7.32-7.26 (d, 2 H, J= 9.5,  $H_{arom}$ ), 7.13 (dd, 2H, J=2.5 Hz, J= 10 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.10 (d, 2 H, J= 2.5 Hz,  $H_{arom}$ ), 3.80-3.64(m, 4H, CONC $H_2$ ), 3.18-3.10 (m, 12 H,  $CH_2$ HNC $H_2$ ), 1.71(s, 1 H, NH), 1.34(t, 12 H, J= 7.5 Hz,  $CH_3$ ).
<sup>13</sup>**C NMR** (62 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) δ (ppm): 161.7 (*C*=O), 154.6, 149.5, 142.4(*C*<sub>arom</sub>), 136.4, 135.5, 134.3, 133.5, 129.4, 127.7(*C*H<sub>arom</sub>), 123.2, 114.7, 111.5, 105.8, 105.3, 92.7, 92.1, 52.6, 47.2 (*C*H<sub>2</sub>-N), 46.7(*C*H<sub>2</sub>), 14.3, 12.7 (*C*H<sub>3</sub>).

 $\mathbf{R_f} = 0.15 \text{ (DCM/ MeOH 10:1)}.$ 

<u>Synthesis of N-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(4-formylbenzoyl)piperazine-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride (13):</u>



Compound (12) (276 mg, 505  $\mu$ mol) was added to a solution of (15) (91.6 mg, 550  $\mu$ mol, 1.09 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (18 mL) followed by 260  $\mu$ L (1.51 mmol, 3 eq) of DIPEA. The solution was stirred in the dark for 2 hours, then concentrated in vacuo, purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/MeOH 10 : 0.25 to 10 :1) to yield product (13) (160.7 mg, 47%).

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) : δ (ppm) 10.01 (s, 1 H, CHO), 7.96 (d, 2 H, J= 8.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.88-7.66 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 7.56 (d, 2 H, J= 8.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.54-7.49 (m, 1 H,  $H_{arom}$ ), 7.35 (d, 1 H, J= 8.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.28 (d, 2H, J= 9.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 7.09 (d, 2 H, J= 9.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 6.98 (d, 2H, J= 2.0 Hz,  $H_{arom}$ ), 3.70 (q, 8H, J= 7.0 Hz,  $CH_2$ ), 3.65-3.39 (m, 8 H,  $CH_2$ ), 1.31 (t, 12 H, J= 7.0 Hz,  $CH_3$ ).

<sup>13</sup>C NMR (90 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) δ (ppm): 193.30, 172.29, 171.05, 169.48, 159.16, 157.13, 156.86, 144.98, 141.81, 138.74, 136.43, 136.38, 135.84, 133.13, 132.18, 131.71, 131.30, 130.87, 128.92, 128.79, 127.90, 127.51, 115.42, 114.80, 98.06, 97.36, 46.90, 12.90.

**IR:** *v* = 3411.18, 2972.67, 2925.44, 2275.63, 1694.77, 1631.13, 1587.94, 1528.16, 1467.14, 1412.69, 1336.97, 1272.37, 1247.03, 1180.24, 1131.68, 1072.98, 1001.70, 921.23, 823.22, 756.64, 682.81, 529.70, 430.71.

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 643.3279; found: 643.3256.

 $R_f = 0.34$  (DCM/MeOH 10:1)

 <u>Synthesis of N-(6-(diethylamino)-9-(2-(4-(4-</u> ((hydroxyimino)methyl)benzoyl)piperazine-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride (14):



Compound (13) (160 mg, 236  $\mu$ mol) was dissolved in (dry DCM/MeOH) (6.8mL, 2mL) and NH<sub>2</sub>OH.HCl (21.2 mg, 307  $\mu$ mol, 1.3 eq) as well as NaOAc (25.2 mg, 306  $\mu$ mol, 1.3 eq) were added thoroughly. After stirring for 3 hours, the mixture was concentrated over vacuo. The residue was purified by flash column chromatography silica gel (DCM/MeOH 10: 0.25) (97 mg, 59%) provided compound (14).

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) : δ (ppm) 8.09 (s, 1 H, HC=N), 7.85 -7.68 (m, 3 H, 3 H-Ar), 7.65 (d, 2H, *J*= 8.0 Hz, 2 H-Ar), 7.37 (d, 1 H, *J*= 8.0 Hz, 1 H-Ar), 7.28 (d, 2H, *J*= 9.0 Hz, 2 H-Ar), 7.07 (d, 2H, *J*= 9.0 Hz, 2 H-Ar), 6.97 (d, 2H, *J*= 2.0 Hz, 2 H-Ar), 3.69 (q, 7H, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.61-3.34 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>), 1.31(t, 12 H, *J*= 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>**C NMR** (90 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) δ (ppm): 169.63(N-C=O), 159.28 (N-C=O), 157.23 (C-C=C), 148.94 (C=N-OH), 136.62, 136.49, 133.20, 131.74, 131.36, 131.34, 131.31, 128.95, 128.58, 127.88, 115.43, 114.86 (C-Ar), 97.37, 46.92 (CH<sub>2</sub>), 12.85 (CH<sub>3</sub>).

**ESI- HRMS:** m/z calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 658.3388; found: 658.3385.

 $\lambda$  (ex) : 562.5 cm<sup>-1</sup>,  $\lambda$  (em) : 585.1 cm<sup>-1</sup>

 $R_f = 0.58$  (DCM/MeOH 8:2)

• <u>Synthesis of 4-formyl-benzoyl chloride (15)<sup>60</sup>:</u>



To a thin suspension of 4-carboxybenzaldehyde (200mg, 1.33 mmol) in tetrahydrofuran (1mL) was added at 0 °C in an ice bath anhydrous DMF (4 $\mu$ L, 0.04 mmol), then oxalyl chloride (137  $\mu$ L, 1.2 eq) was added slowly to the reaction mixture while stirring at 0 °C. After stirring for 1 hour and 10 min, the heterogeneous mixture changed into a yellow homogeneous mixture and was then concentrated in vacuo and used without further purification (223 mg, 100%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.18 (s, 1H), 8.32 (d, 2H), 8.06 (d, 2H).



• Synthesis of 3,5-diphenyl-4,5-dihydroisoxazole (16):

1<sup>er</sup> méthode :

To a solution of styrene (5.5  $\mu$ L, 48  $\mu$ mol) in DMF (125  $\mu$ L), was added (8.25 mg, 53  $\mu$ mol) of benzo hydroximinoyl chloride and (7.5  $\mu$ L, 54  $\mu$ mol) of Trimethylamine. After stirring for 1 hour at room temperature, the mixture was diluted with AcOEt and then organic layer washed with water, dried over sodium sulfate, filtered, concentrated to give 3, 5-diphenyl-4, 5-dihydro-isoxazol (**16**) (9 mg, 85 %) as a white solid.

#### 2<sup>ème</sup> méthode :

To a solution of (6) (50 mg, 413  $\mu$ mol) in MeOH (15 mL) was added (133 mg, 413  $\mu$ mol) of BAIB at room temperature. After stirring for 15 minutes, (42  $\mu$ L, 371  $\mu$ mol) of styrene was added. After stirring for 10 minutes the mixture was concentrated and compound (16) was confirmed by NMR.

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.68 – 7.58 (m, 2H,  $H_{arom}$ ), 7.48 – 7.21 (m, 8H,  $H_{arom}$ ), 5.67 (dd, 1H,  $J_{4,5} = 11.0$  Hz,  $J_{4',5} = 8.3$  Hz, H- 5), 3.71 (dd, 1H,  $J_{4,4'} = 17.0$  Hz, H- 4), 3.27 (dd, 1H,  $J_{4,4'} = 17.0$  Hz, H- 4').

 $R_f = 0.47 (EP/AcOEt 9:1)$ 

 Synthesis of 2-(3-oxo-6-((4-(5-phenyl-4,5-dihydroisoxazol-3yl) benzyl) oxy) -3H-xanthen-9-yl) benzoic acid (K):



In an eppendorf, a solution of (4) in MeOH (13  $\mu$ mol, 0.025 mol.L<sup>-1</sup>) was heated at 50°C, and then BAIB (14  $\mu$ mol, 1.1 eq) was slowly added. A red solid appeared. And after 3

minutes, 0.9 eq of a solution of styrene in MeOH (0.06 mol.L<sup>-1</sup>) was added and left stirring for 16 hours. Compound (**K**) was identified only with mass spectroscopy without purification.

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 568.1755; found: 568.1760.

 $\mathbf{R_f} = 0.47 \text{ (EP/AcOEt 9:1)}.$ 

• <u>Synthesis of 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose (17)</u>



Commercial D-arabinose (6.00 g, 40 mmol) was heated at 100°C for 2 hours in pyridine (40 mL). The solution was allowed to cool down, further treated with tosyl chloride (8.38 g, 44 mmol; 1.1 equiv.), and stirred for 16 hours at room temperature. Acetic anhydride (20 mL) was then added. After complete acetylation, as determined by TLC, solvents were evaporated, and residual traces were co-evaporated several times with toluene. The residue was dissolved in DMF (100 mL), NaN<sub>3</sub> (5.20 g, 80 mmol, 2 equiv.) was added, and the suspension was heated at 80°C for 20 hours. After dilution with ethyl acetate and washing with water, the organic layer was dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated. The residue was purified by flash chromatography (EP/AcOEt 7:3). The first eluted product was determined to be the expected 5-azido-1,2,3-tri-O-acetyl-D-arabinofuranose (1.83 g, 15 %,  $\alpha/\beta$  2:1).

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6.41 (d, 0.33H,  $J_{1,2}$  3.5 Hz, H-1β); 6.23 (d, 0.67H, H-1α); 5.40-5.37 (m, 1,34H, H-2β, H-3β); 5.23 (d, 0.67H,  $J_{1,2}$  ~1 Hz, H-2α); 5.06 (d, 0.67H,  $J_{3,4}$ 4.6 Hz, H-3α); 4.30 (ddd, 0.67H, H-4α); 4.16-4.10 (m, 0.33H, H-4β); 3.69 (dd, 0.67H,  $J_{4,5a}$ 3.1 Hz,  $J_{5a,5b}$  13.5Hz, H-5aα); 3.61 (dd, 0.33H,  $J_{4,5a}$  3.6,  $J_{5a,5b}$  13.1 Hz, H-5aβ); 3.51-3.43 (m, 1H, H-5bα, H-5bβ); 2.15, 2.13, 2.12, 2.11, 2.11, 2.09 (6s, 18H, 6 CH<sub>3</sub>CO). <sup>13</sup>**C NMR** (62.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 170.3, 170.0, 169.1 (OC(O)CH3), 99.2 (C-1α), 93.5 (C-1β), 84.1(C-4α), 80.8 (C-4β), 80.6 (C-3α), 77.4 (C-2α), 75.1 (C-2β), 74.8 (C-3β), 53.0 (C-5β), 51.3 (C-5α), 20.9, 20.6, 20.3 (OC(O)CH3).

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>) 324.0 [M+Na]<sup>+</sup>;

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) calculated for  $[C_{11}H_{15}N_3NaO_7]^+$  324.0802, found: 324.0802;

Protected 5-azido-1,2,3-tri-O-acetyl-D-arabinose was then dissolved into anhydrous methanol (30 mL), treated with a methanolic solution of MeONa (0.2 mol.L<sup>-1</sup>, 3 mL) and stirred at room temperature for 3 h under an argon atmosphere. After neutralization (Dowex 50 (H<sup>+</sup>)) filtration, and concentration, 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose **17** was obtained in 99% yield (1.03 g).

<sup>1</sup>**H NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) : 5.20 (d, 0.45H,  $J_{1,2}$  3 Hz, H-1β); 5.16 (d, 0.55H,  $J_{1,2}$  3 Hz, H-1α); 4.12-4.05 (m, 0.55H, H-4α); 4.02-3.85 (m, 2H, H-2α, H-2β, H-3α, H-3β); 3.84-3.76 (m 0.45H, H-4β); 3.56 (dd, 0.55H,  $J_{5a,5b}$  13.5,  $J_{4,5a}$  3.0 Hz, H-5aα); 3.51 (dd, 0.45H,  $J_{5a,5b}$  13.0 Hz,  $J_{4,5a}$  3.5 Hz, H-5aβ); 3.35 (dd, 0.55H,  $J_{4,5b}$  6.5 Hz, H-5bα); 3.33 (dd, 0.45H,  $J_{4,5b}$  6.5 Hz, H-5bβ);

<sup>13</sup>**C NMR** (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm) : 101.1 C-1α; 95.3 C-1β; 81.4, 81.3, 79.7, 76.4, 75.9, and 74.8 C-2α, 2β, 3α, 3β, 4α, 4β; 52.7 C-5β; 51.6, C-5α.

**LRMS** (ESI<sup>+</sup>) 198.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 40%, 230 [M+MeOH+Na]<sup>+</sup>, 100%;

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) calculated for  $[C_5H_9N_3NaO_4]^+$  198.0485, found: 198.0485.

# <u>Synthesis of Ammonium 8-azido-3,8-dideoxy-D-manno-</u> octulosonate (S)



A cool (4°C) solution of 5-azido-5-deoxy-D-arabinofuranose **17** (437 mg, 2.5 mmol) in water (2.1mL) was added to a solution of oxaloacetic acid (528 mg, 4.0 mmol) in water (2.5 mL), the pH of which has been adjusted to 11 by addition of aqueous NaOH (10M). After being stirred for two hours at room temperature, the solution was neutralized (Dowex 50  $(H^+)$ ), filtrated, and heated 20 min. at 80°C.

After its pH had been adjusted to 7 with AcOH (0.5M), the mixture was purified by anion exchange chromatography (Dowex 1x8 ( $HCO_2^{-}$ )). Initial elution with water gave unreacted **17** (150 mg, 34%). Further elution with a concentration gradient of formic acid (0.5 mol.L<sup>-1</sup> to 2 mol.L<sup>-1</sup>), freeze-drying, treatment with a Dowex 50 (H<sup>+</sup>) resin, and neutralization by ammonia (0.2 mol.L<sup>-1</sup>), gave after concentration, ammonium 8-azido-3,8-dideoxy-D-manno-octulosonate (**S**•NH3, 400 mg, 57%).

**R**<sub>f</sub> =0.38 (iPrOH/H<sub>2</sub>O 9:1).

**LRMS** (ESI<sup>-</sup>) 262.1 [M-H]<sup>-</sup>, 100%; 525.1 [2M-H]<sup>-</sup>, 5%; 547.1 [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 10%;

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>) calculated for  $[C_8H_{12}N_3O_7]^-$  262.0681, found: 262.0667.

**IR** v (cm<sup>-1</sup>) = 3210, 2111 (N<sub>3</sub>), 1604, 1401, 1077.

NMR of (S), like free KDO and derivatives, is complicated due to the presence of multiple forms (e.g.  $\alpha$ -pyranose ( $\alpha p$ , 58%),  $\beta$ -pyranose ( $\beta p$ , 4%),  $\alpha$ -furanose ( $\alpha f$ , 24%),  $\beta$ -furanose ( $\beta f$ , 14%)).

Selected NMR data: **1H NMR** (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm) : 3.56 (dd,  $J_{8a,8b}$  13.2,  $J_{7,8a}$  2.4 Hz, H-8a $\alpha p$ ); 3.39 (dd,  $J_{7,8b}$  6.0 Hz, H-8b $\alpha p$ ); 2.55 (dd,  $J_{3a,3b}$  14.3 Hz,  $J_{3a,4}$  7.2 Hz, H-3a $\alpha f$ ); 2.33 (dd,  $J_{3a,3b}$  13.1,  $J_{3a,4}$  6.6 Hz, H-3a $\beta f$ ); 2.26 (dd,  $J_{3b,4}$  7.3 Hz, H-3b $\beta f$ ); 2.03 (dd,  $J_{3b,4}$  3.6, H-3b $\alpha f$ ); 1.94 (dd,  $J_{3a,3b}$  12.7,  $J_{3a,4}$  12,7 Hz, H-3a $\alpha p$ ); 1.84 (dd,  $J_{3b,4}$  4.9 Hz, H-3b $\alpha p$ ); 1.71 (dd,  $J_{3a,3b} = J_{3b,4}$  12.0 Hz, H-3b $\beta p$ ).

**13C NMR** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 176.4 (C-1α*p*), 104.1 (C-2α*f*), 96.2 (C-2α*p*), 85.3 (C-5α*f*), 71.5, 68.0, 66.3 and 66.0 (C- 4α*p*, 5α*p*, 6α*p*, 7α*p*), 53.8 (C-8α*p*), 44.6 (C-3α*f*), 33.5 (C-3α*p*).

 Synthesis of 1,2 ;3,4 -di-O- isopropylidene-6-O-p-vinylbenzyla-D galactopyranose (19)



To a solution of 1,2:3,4-di-O-isopropylidene- $\alpha$ -galactopyranose (**18**) (387 mg; 1.49 mmol) in DMF (abs, 7.5 mL) was added NaH (60% in oil; 119 mg; 2 eq) the solution was stirred for 15 min under argon atmosphere then p-vinyl benzyl chloride (0.272 mL; 1.93 mmol; 1.3 eq) was added and the reaction was stirred at room temperature for 2 hours then (1 mL) of MeOH was added dropwise .Then product was extracted with AcOEt and the organic layer washed with water.

The organic layer was dried with MgSO<sub>4</sub>, condensed and the residue was purified on  $SiO_2$  using (EP0 to EP/AcOEt : 9/1) to give the product (**19**) (451 mg ; 81%).

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.40 - 7.26 (m, 4 H,  $H_{arom}$ ), 6.69 (dd, 1H,  $J_{H,Htrans} =$  18Hz,  $J_{H,Hcis} =$  11.5 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>), 5.72 (dd, 1H, J = 18.5 Hz, J = 0.9 Hz, HtransCH=CH-), 5.52 (d, 1H,  $J_{1,2} =$  5 Hz,  $H_{1\alpha}$ ), 5.21 (dd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 0.9 Hz, HcisCH=CH-), 4.59 (d, 1H, J = 12.5 Hz, PhCH-H), 4.58(dd, 1H,  $J_{2,3} =$  2.5 Hz,  $J_{3,4} =$  8.5 Hz,  $H_3$ ), 4.52 (d, 1 H, PhCH-H), 4.29 (dd, 1H ,  $H_2$ ), 4.25 (dd, 1H,  $J_{4,5} =$  1.5 Hz,  $H_4$ ), 3.98 (ddd, 1H,  $J_{5,6} =$  6.0 Hz,  $J_{5,6} =$  7.0 Hz,  $H_5$ ), 3.67(dd, 1H,  $J_{6,6'} =$ 10 Hz,  $H_6$ ), 3.61 (dd, 1H,  $H_6$ ), 1.52 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.32 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>).

 $\mathbf{R_f} = 0.8$  (Toluène/AcOEt 9:1).

Synthesis of 6-O-p-vinylbenzyl-a,β-O-D galactopyranose (T)



A solution of compound (**19**) (780 mg; 2.07 mmol) in a mixture of dioxane (75 mL) and HCl (0.12 M, 75 mL) was heated at 80 °C for 6 hours. After getting cold, the mixture was neutralized with dowex resin 1x8 (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) then filtered, and concentrated *in vacuo* to afford the compound (**T**) (525 mg, 86%) as a yellow oil.

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, D<sub>2</sub>O/d<sup>4</sup>-MeOH : 1/1) δ (ppm) 7.53 - 7.31 (m, 4 H, *H<sub>arom</sub>*), 6.77 (dd, 1H, *J<sub>H,Htrans</sub>* = 18.0Hz, *J<sub>H,Hcis</sub>*= 11.5 Hz, -C*H*=CH<sub>2</sub>), 5.82 (d, 1H, *J*= 18.0 Hz, *Htrans*CH=CH-), 5.29 (d, 1H, *J*= 11.5 Hz, *Hcis*CH=CH), 5.22 (d, 0.4H, *J*<sub>1 α,2</sub> = 3.5 Hz, H<sub>1-α</sub>), 4.61 (d, 1H, *J<sub>H-H</sub>* = 13.0 Hz, PhCH-*H*), 4.55 (d, 1 H, PhCH-*H*), 4.51 (d, 0.6H, *J*<sub>1β,2</sub> = 8.0 Hz, *H*<sub>1β</sub>), 3.90 (d, 0.4 H, *J*<sub>3α,4α</sub>= 2.5Hz, *H*<sub>4α</sub>), 3.85 (d, 0.6H, *J*<sub>3β,4β</sub> = 3.0 Hz, H<sub>4β</sub>), 3.56 (dd, 1H, *J*=10.0 Hz, *J*=3.5 Hz, *H*<sub>6</sub>), 3.46 (dd, 1H, *J*=10.0 Hz, *J*=8.0 Hz, *H*<sub>6</sub>).

**13C NMR** (D<sub>2</sub>O, 92 MHz) δ (ppm): 138.84, 131.08, 128.76 (C<sub>arom</sub>), 116,65 (CH<sub>2</sub>=C), 100.02 (C<sub>1α</sub>), 99.21 (C<sub>1β</sub>), 76.35, 76.03, 75.55, 75.38, 75.24, 74.53, 72.01, 71.85, 71.71.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>) calculated for [C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 319.3055, found: 319.3052;

**R**<sub>f</sub> =0.42 (DCM/MeOH 8:2).

## Synthesis of 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-trityl-D-arabinofuranose (20)<sup>61</sup>



 $C_{30}H_{30}O_8$ 518.55 g.mol<sup>-1</sup> Rdt<sub>total</sub> =41%

In refluxing dry pyridine (70 mL), D-Arabinose (2 g, 13.3 mmol, 1 eq) was stirred until it totally dissolved. After that the solution was cooled to room temperature, and trityl chloride (3.7 g, 13.3 mmol, 1 eq) was added and the reaction was stirred for 48 h at room temperature. Then the reaction was quenched with methanol (25 mL) and the solvent was removed *in vacuo* and co-evaporation with toluene. The residue was dissolved in dichloromethane (25 mL) and the organic layer was washed with water (75 mL), separated and dried over MgSO<sub>4</sub>, purified by flash column chromatography over silica gel, (EP/AcOEt 1:1 then 1:8), to yield a yellow gummy product (2.3 g, **44**%), that was then dissolved in dry pyridine (14 mL), cooled to 0 °C and acetic anhydride (7 mL) was slowly added. The mixture was then stirred for 24 h at room temperature under argon atmosphere. The solvent was removed *in vacuo* by co-evaporation with toluene to afford the compound (**20**) as yellow oil (2.8 g, **93**%) on the second step.

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.49 - 7.47 (m, 6 H, *H*<sub>arom</sub>), 7.33 - 7.25 (m, 7 H, *H*<sub>arom</sub>), 6.41 (d, 1 H, *J*<sub>β</sub>= 4.8 Hz, *H*<sub>β</sub>), 6.23 (s, 1 H, *H*<sub>α</sub>), 5.58 (dd, 1H, *J*= 6.7 Hz, *J*= 6.5 Hz, *H*<sub>3β</sub>), 5.35 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub>= 7.2 Hz, *J*<sub>1,2</sub>= 4.6 Hz, *H*<sub>2β</sub>), 5.29 (dd, 1H, *J*<sub>2,3</sub>= 4.7 Hz, *J*<sub>1,2</sub>= 1.4 Hz, *H*<sub>3α</sub>), 5.21 (d, 1H,*J*= 1.3 Hz, *H*<sub>2α</sub>), 4.34 (dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub>= 9.2 Hz, *J*<sub>3,4</sub>= 4.6 Hz, *H*<sub>4α</sub>), 4.19(dd, 1H, *J*<sub>4,5</sub> = 10.9 Hz, *J*<sub>3,4</sub> = 5.2 Hz, *H*<sub>4β</sub>), 3.42 - 3.29 (m, 4 H, H<sub>5αβ,5'αβ</sub>), 2.13 (s, 3 H, CH<sub>3α</sub>), 2.10 (s, 3 H, CH<sub>3α</sub>), 2.09 (s, 3 H, CH<sub>3α</sub>), 2.08 (s, 3 H, CH<sub>3β</sub>), 2.06(s, 3 H, CH<sub>3β</sub>), 1.93 (s, 3 H, CH<sub>3β</sub>).

**R**<sub>f</sub> =0.24 (EP/AcOEt 1:1).



### Synthesis of 1,2,3-tri-O-acetyl-D-arabinofuranose (21)<sup>61</sup>

Reactant (20) (7.76 g, 14.6 mmol) was refluxed for 25 min in 80% aqueous solution of acetic acid then cooled immediately to 0 °C using an ice-bath. The crystallized product was filtered and the filtrate washed with a NaCl saturated aqueous solution, then it was extracted with dichloromethane (60 mL). The organic layers were washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, and the solvent was removed *in vacuo*. Then purification by flash column chromatography silica gel (EP/AcOEt 6:4 to 4:6) gave the desired product (21) as yellow oil (1.915 g, 46%)

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.32 (d, 1 H,  $J_{\beta}$ = 3.4 Hz,  $H_{\beta}$ ), 6.12 (s, 1 H,  $H_{\alpha}$ ), 5.37-5.26 (m, 2H,  $H_{2\beta}, H_{3\beta}$ ), 5.18 (d, 1H,  $J_{2,3}$ = 1.8 Hz,  $H_{2\alpha}$ ), 5.06 (dd, 1H,  $J_{2,3}$ = 5.2 Hz,  $J_{1,2}$ = 1.7 Hz,  $H_{3\alpha}$ ), 4.18 (dd, 1H,  $J_{4,5}$ = 8.7 Hz,  $J_{3,4}$ = 4.3 Hz,  $H_{4\alpha}$ ), 4.10-3.95 (m, 1H,  $H_{4\beta}$ ), 3.9-3.55(m, 4 H,  $H_{5\alpha\beta,5'\alpha\beta}$ ), 2.44-2.20(br, 1H, OH), 2.12-1.90 (m, 18 H,  $CH_{3\alpha\beta}$ ).

**ESI-HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 277.2481; found: 277.2479

**R**<sub>f</sub> =0.24 (EP/AcOEt 1:1).

Synthesis of 1,2,3-tri-O-acetyl-5-O-trimethylsilyl-D-

arabinofuranose (22)



In a mixture of pyridine (3 mL) and dry dichloromethane (11.5 mL) was dissolved (550 mg, 2 mmol, 1eq) of (**23**). Then (434 mg, 4 mmol, 2 eq) of trimethylsilyl chloride were added slowly and the mixture was stirred at room temperature for 1 h, then the mixture was extracted with dichloromethane (60 mL). The organic layer was washed with saturated NaHCO<sub>3</sub>, then with water. The solvent was removed *in vacuo*, and co-evaporated three times with toluene. The product was used without further purification.

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 6.32 (d, 1 H,  $J_{\beta}$ = 4.6 Hz,  $H_{\beta}$ ), 6.14 (s, 1 H,  $H_{\alpha}$ ), 5.47-5.36 (m, 2H,  $H_{2\beta}, H_{3\beta}$ ), 5.35-5.25 (m, 1H,  $H_{2\alpha}$ ), 5.18-5.07 (m, 1H,  $H_{3\alpha}$ ), 4.20 (dd, 1H,  $J_{4,5}$ = 8.6 Hz,  $J_{3,4}$ = 3.5 Hz,  $H_{4\alpha}$ ), 4.15-3.95 (m, 1H,  $H_{4\beta}$ ), 3.90-3.67(m, 4 H,  $H_{5\alpha\beta,5^{\circ}\alpha\beta}$ ), 2.12-1.90 (m, 18 H,  $CH_{3\alpha\beta}$ ), 0.15(s, 18 H, SiC $H_{3\alpha\beta}$ ).

**ESI- HRMS:** m/z calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 349.4290; found: 349.4288. **R**<sub>f</sub> =0.85 (EP/AcOEt 1:1).

 <u>Separate 5-Iodo-Bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-lactone (24) from</u> exo-5-norbornene-2-carboxylic acid (25)<sup>62</sup>



 $C_8H_9IO_2$ 264.06 g.mol<sup>-1</sup> Rdt =64% We dissolved a commercial mixture of endo an exo-5-norbornene-2-carboxylic acid (23) (endo/exo : 4/1) (3 g, 21.7 mmol), in 30 mL of aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> (0.745 mol.L<sup>-1</sup>), then an aqueous solution of KI (54 mmol, 2.5 eq) and I<sub>2</sub> ( 17.3 mmol, 0.8 eq) in 26 mL of water was added dropwise at room temperature until a brown color persisted. The 5-iodo-bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-lactone (24) was extracted with Et<sub>2</sub>O (3 X 25 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> then concentrated *in vacuo*, and crystallized in pentane to provide (24) as a withe solid which melted at room temperature to a colorless oil (3.661 g, 64%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.86 (d, 1H, J= 4.8 Hz, H<sub>4</sub>), 3.68 (s, 1H,  $H_5$ ), 2.93 (br, 1H,  $H_6$ ), 2.41 (br, 1H,  $H_3$ ), 2.33-2.15 (m, 1H,  $H_1$ ), 2.09-1.93 (br, 1H,  $H_7$ ), 1.9-1.68 (m, 1H,  $H_2$ ), 1.62-1.46 (m, 2H,  $H_7$ ).

 $R_f = 0.8$  (DCM/AcOEt 8:2)



An aqueous solution of  $Na_2S_2O_3$  (10%) was added to the aqueous layer until it totally decolorized, then was next adjusted to pH= 2 by addition of HCl (1 mol.l<sup>-1</sup>), then extracted with Et<sub>2</sub>O (2x20 mL). We adjusted one more time the resulting aqueous layer to pH=2. It was then extracted with Et<sub>2</sub>O (2x20 mL). The combined extracted layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to provide (**25**) as a colorless oil (694 mg, **23**%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 12.0 - 11.44 (br, 1H, COO*H*), 6.20-5.95 (m, 2 H,  $H_4, H_5$ ), 3.08-2.98 (br, 1H,  $H_6$ ), 2.92-2.79 (br, 1H,  $H_3$ ), 2.24-2.13 (m, 1H,  $H_1$ ), 1.92-1.80 (m, 1H,  $H_7$ ), 1.51-1.40 (m, 1H,  $H_{7'}$ ), 1.38-1.25 (m, 2H,  $H_{2,2'}$ ).

 $R_f = 0.32$  (DCM/AcOEt 8:2).

• Synthesis of endo-5-norbornene-2-carboxylic acid (26)<sup>63</sup>



To a solution of (24) (3.66 g, 13.86 mmol) in glacial acetic acid (22 mL) was added  $Zn^{0}$  (3.62g, 55.4 mmol, 4 eq). The mixture was refluxed for 5 h, then cooled and filtered on celite, concentrated *in vacuo* and co-evaporated three times with toluene. The product was then purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/AcOEt 9:1 to 8:2). The desired product (26) was isolated as colorless oil (1.16 g, 61%).

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 11.6 - 10.08 (br, 1H, COO*H*), 6.1 (dd, 1 H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 3.0 Hz, *H*<sub>4</sub>), 5.89 (dd, 1 H, *J*= 5.9 Hz, *J*= 3.0 Hz, *H*<sub>5</sub>), 3.16-3.06 (br, 1H, *H*<sub>6</sub>), 2.95-2.86 (m, 1H, *H*<sub>1</sub>), 2.84-2.76 (br, 1H, *H*<sub>3</sub>), 1.85-1.76 (m, 1H, *H*<sub>2</sub>), 1.70-1.58 (m, 1H, *H*<sub>7</sub>), 1.36-1.23 (m, 2H,  $H_{2',7'}$ ).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 161.0573; found: 161.0571.

**R**<sub>f</sub> = 0.56 (DCM/AcOEt 8:2)

Synthesis of endo 5-Norbornene-2-methanol (28)<sup>65</sup>



To a solution of (**26**) in Et<sub>2</sub>O (1.16 g, 8.39 mmol, 0.83 mol.L<sup>-1</sup>) was added (12 mmol, 1.44 eq) of a solution of LiAlH<sub>4</sub> in dry Et<sub>2</sub>O (1 mol.L<sup>-1</sup>). The solution was refluxed for 4

hours, then cooled in ice-bath, washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl, and filtrated. The filtrate was extracted with  $Et_2O$ , and washed with water then dried over MgSO<sub>4</sub>, then purified by flash column chromatography silica gel (DCM/AcOEt 9:1). The desired product (**28**) was isolated as colorless oil (431 mg, **42**%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 5.97 (dd, 1 H, J= 5.7 Hz, J= 3.0 Hz,  $H_4$ ), 5.81 (dd, 1 H, J= 5.8 Hz, J= 3.0 Hz,  $H_5$ ), 3.78-3.66 (br, 1H, OH), 3.19 (dd, 1H, J= 10.6 Hz, J= 6.5 Hz,  $H_8$ ), 3.03(t, 1H, J= 10.0 Hz,  $H_8$ ), 2.85-2.73 (br, 1H,  $H_6$ ), 2.70-2.58 (br, 1H,  $H_3$ ), 2.23-2.05 (m, 1H,  $H_1$ ), 1.75-1.55 (m, 1H,  $H_2$ ), 1.35-1.23 (br, 1H,  $H_7$ ), 1.17-1.05 (br, 1H,  $H_7$ ), 0.45-0.25 (m, 1H,  $H_2$ ).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O [M+H]<sup>+</sup>: 125.0966; found: 125.0961.

 $R_f = 0.32$  (DCM/AcOEt 9:1)



To a solution of (**25**) in  $Et_2 O$  (500 mg, 3.619 mmol, 0.83 mol.L<sup>-1</sup>) was added (5.43 mmol, 1.5 eq) of a solution of LiAlH<sub>4</sub> in dry  $Et_2O$  (1 mol.L<sup>-1</sup>). Refluxed for 4 h, then cooled in ice-bath, washed with saturated NH<sub>4</sub>Cl, then filtrated. The filtrate was extracted with  $Et_2O$ , and washed with water then dried over MgSO<sub>4</sub>, then (**27**) was used without further purification.

 $R_{f} = 0.35$  (DCM/AcOEt 9:1)



### Synthesis of compound (32) and compound (33)

To a solution of (6) (54.5 mg, 450  $\mu$ mol) in MeOH (16 mL) was added (145 mg, 450  $\mu$ mol) of BAIB at room temperature. After stirring for 15 minutes, was added (53 mg, 426  $\mu$ mol) of (28). Then left stirring for 5 hours the mixture was concentrated then purified by flash column chromatography silica gel (EP/AcOEt 7:3 to 1:1). The product (32) was isolated as colorless oil (34.6 mg, 32%) and the product (33) was isolated as colorless oil (31.6 mg, 29%).

Compound (32)

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.75 - 7.71 (m, 2 H,  $H_{arom}$ ), 7.70 - 7.31 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 4.52 (d, 1 H, J= 8.5 Hz,  $H_4$ ), 3.83 (d, 1 H, J= 6.9 Hz,  $H_5$ ), 3.78 (d, 1 H, J= 6.5 Hz,  $H_8$ ), 3.49 (t, 1 H, J= 10.4 Hz,  $H_{8'}$ ), 2.70-2.60 (br, 1H,  $H_6$ ), 2.60-2.50 (br, 1H,  $H_3$ ), 2.30-2.10 (m, 1H,  $H_1$ ), 2.05 (s, 1H, OH), 1.65 (m, 1H,  $H_2$ ), 1.60-1.47 (br, 1H,  $H_7$ ), 1.35-1.15 (br, 1H,  $H_{7^2}$ ), 0.57(ddd, 1H, J= 13.0 Hz, J= 5.6 Hz, J= 2.2 Hz,  $H_{2^2}$ ).

**ESI- HRMS:** *m/z* calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 266.1151; found: 266.1146 **R**<sub>f</sub> = 0.48 (EP/AcOEt 1:1)

Compound (33)

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7.75 - 7.55 (m, 2 H,  $H_{arom}$ ), 7.44- 7.28 (m, 3 H,  $H_{arom}$ ), 4.91 (d, 1 H, J= 8.3 Hz,  $H_4$ ), 3.70-3.50 (m, 2 H,  $H_{8,8^{\circ}}$ ), 3.47 (d, 1 H, J= 8.2 Hz,  $H_5$ ), 2.77-2.67 (br, 1H,  $H_6$ ), 2.53-2.43 (br, 1H,  $H_3$ ), 2.28-1.95 (m, 2H,  $H_1$ , OH), 1.90-1.74 (m, 1H,  $H_2$ ), 1.63-1.48 (br, 1H,  $H_7$ ), 1.34-1.15 (br, 1H,  $H_{7^{\circ}}$ ), 0.94(ddd, 1H, J= 12.7 Hz, J= 5.0 Hz, J= 2.8 Hz,  $H_{2^{\circ}}$ ).

**ESI- HRMS:** *m/z* calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 266.1151; found: 266.1143.

 $\mathbf{R_f} = 0.39 \text{ (EP/AcOEt 1:1)}.$ 

• Synthesis of (35)



To a solution of (22) (50 mg, 143  $\mu$ mol, 1eq) in dry dichloromethane (700  $\mu$ L).with molecular sieve 4Å, was added (22.7 mg, 186  $\mu$ mol, 1.3 eq) of (34). The mixture was cooled to -78 °C, then was added (3.18 mg, 14.3  $\mu$ mol, 0.1 eq) of TMSOTF. After the mixture was

stirring for 15 min at -78°C, (21.6 mg, 186  $\mu$ mol, 1.3 eq) of Et<sub>3</sub>SiH was slowly added. Then mixture was allwed to worm up to -10°C in 3 hours. The reaction was quenched at this temperature using a solution of Et<sub>3</sub>N and was then filtered. Then the residue was extracted with dichloromethane (10 mL). The organic layer was washed with water. The solvent was removed *in vacuo*, and co-evaporated three times with toluene. Then the product was purified by flash column chromatography silica gel (EP/AcOEt 9:1 to7:3) to yield (**35**) as yellow oil (8.4 mg, 15 %).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 405.1520; found: 405.1497.

 $R_f = 0.55$  (EP/AcOEt 7:3).



#### • Synthesis of (36)

To a solution of (22) (50 mg, 143  $\mu$ mol, 1eq) in dry dichloromethane (700  $\mu$ L).with molecular sieve 4Å, was added (20 mg, 186  $\mu$ mol, 1.3 eq) of benzaldehyde. The mixture was cooled to -78 °C, then was added (3.18 mg, 14.3  $\mu$ mol, 0.1 eq) of TMSOTf. After the mixture was stirring for 15 min at -78°C, (21.6 mg, 186  $\mu$ mol, 1.3 eq) of Et<sub>3</sub>SiH was slowly added. Then mixture was allowed to worm up to -10°C in 3 hours. The reaction was quenched at this temperature using a solution of Et<sub>3</sub>N and was then filtered. Then the residue was extracted with dichloromethane (10 mL). The organic layer was washed with water. The solvent was removed *in vacuo*, and co-evaporated three times with toluene. Then the product was purified by flash column chromatography silica gel (EP/AcOEt 9:1 to7:3) to yield (**36**) as yellow oil (33.5 mg, 65%).

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) ): 7.30 - 7.11 (m, 5 H,  $H_{arom}$ ), 6.26 (d, 1 H,  $J_{\beta}$ = 4.8 Hz,  $H_{\beta}$ ), 6.11 (s, 1 H,  $H_{\alpha}$ ), 5.39 (dd, 1H, J= 6.9 Hz, J= 6.2 Hz,  $H_{3\beta}$ ), 5.28-5.19 (m, 1H,  $H_{2\beta}$ ), 5.12-5.04 (m, 2H,  $H_{2\alpha,3\alpha}$ ), 4.53-4.46 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>), 4.30-4.18 (m, 1H,  $H_{4\alpha}$ ), 4.15-4.03 (m, 1H,  $H_{4\beta}$ ), 3.69-3.47(m, 4 H,  $H_{5\alpha\beta,5'\alpha\beta}$ ), 2.01 (s, 6 H, 2C $H_{3\alpha}$ ), 1.98 (s, 3 H, C $H_{3\alpha}$ ), 1.96 (s, 3 H, C $H_{3\beta}$ ), 1.93 (s, 3 H, C $H_{3\beta}$ ), 1.86 (s, 3 H, C $H_{3\beta}$ ).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 389.1207; found: 389.1199.

 $R_f = 0.38$  (EP/AcOEt 7:3).



#### • Synthesis of (37)

To a solution of (**22**) (50 mg, 143 µmol, 1eq) in dry dichloromethane (700 µL).with molecular sieve 4Å, was added (20.8 mg, 186 µmol, 1.3 eq) of cyclohexanecarbaldehyde. The mixture was cooled to -78 °C, then was added (3.18 mg, 14.3 µmol, 0.1 eq) of TMSOTf. After the mixture was stirring for 15 min at -78°C, (21.6 mg, 186 µmol, 1.3 eq) of Et<sub>3</sub>SiH was slowly added. Then mixture was allowed to worm up to -10°C in 3 hours. The reaction was quenched at this temperature using a solution of Et<sub>3</sub>N and was then filtered. Then the residue was extracted with dichloromethane (15 mL). The organic layer was washed with water. The solvent was removed *in vacuo*, and co-evaporated three times with toluene. Then the product was purified by flash column chromatography silica gel (EP/AcOEt 9:1 to7:3) to yield (**37**) as colorless oil (6 mg, 11 %).

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) ): 6.26 (d, 1 H,  $J_{\beta}$ = 4.8 Hz,  $H_{\beta}$ ), 6.11 (s, 1 H,  $H_{\alpha}$ ), 5.39 (dd, 1H, J= 6.9 Hz, J= 6.2 Hz,  $H_{3\beta}$ ), 5.28-5.19 (m, 1H,  $H_{2\beta}$ ), 5.12-5.04 (m, 2H,  $H_{2\alpha\beta}$ ), 4.30-4.18 (m, 1H,  $H_{4\alpha}$ ), 4.15-4.03 (m, 1H,  $H_{4\beta}$ ), 3.69-3.47 (m, 4 H,  $H_{5\alpha\beta,5'\alpha\beta}$ ), 3.40-3.10 (m, 2 H,

OCH<sub>2</sub>), 2.01 (s, 6 H, 2CH<sub>3 $\alpha$ </sub>), 1.98 (s, 3 H, CH<sub>3 $\alpha$ </sub>), 1.96 (s, 3 H, CH<sub>3 $\beta$ </sub>), 1.93 (s, 3 H, CH<sub>3 $\beta$ </sub>), 1.86 (s, 3 H, CH<sub>3 $\beta$ </sub>), 1.82-1.5 (br, 6 H, CH<sub>2</sub>), 1.4-1 (m, 2 H, 5CH<sub>2</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 395.1676; found: 395.1662.

 $R_f = 0.38$  (EP/AcOEt 7:3).

Synthesis of compound (40)



To a solution of compound (14) (55.6 mg, 84  $\mu$ mol, 1 eq) in 3.5 mL MeOH, (40.7 mg, 126  $\mu$ mol, 2 eq) of BAIB was added, then left to stirred for 15 minutes. The mixture was added to a solution of compound (T) (25 mg, 84  $\mu$ mol, 1 eq) in 3.5 mL of water. The reaction was left to stir at room temperature for 2 hours and half. The product was extracted with water (15 mL) then aqueous layer was washed with DCM. Then the product was purified on reverse phase chromatography (MeOH/H<sub>2</sub>O 25/75 to MeOH 1) to yield product (40) (11.4 mg, 14%)

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH ) δ (ppm) 7.8 - 7.5 (m, 4 H, *H<sub>arom</sub>*), 7.4 - 7.05 (m, 7 H, *H<sub>arom</sub>*), 6.89 (br, 1H), 6.8 (d, 1H), 5.62 (t, 1H, *J*= 8.9 Hz, *H*C-CH<sub>2</sub>), 4.02-3.46 (br, 7H), 2.4-1.7 (m, 2H), 1.3-0.5 (m, 4H).

**ESI- HRMS:** m/z calcd. for C<sub>55</sub>H<sub>62</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 952.4491; found: 952.4490.

 $\lambda$  (ex) : 557.8 cm<sup>-1</sup>,  $\lambda$  (em) : 578.7 cm<sup>-1</sup>

**R**<sub>f</sub> =0.57 (DCM/MeOH 8:2).

• Synthesis of 6-amino-coumarine (42):.



To a solution of 6-nitro-coumarine (1 g; 5.23 mmol) in acetone (26 mL) was added (460 mg; 7.845 mmol) of Raney Nickel and under  $H_2$  atmosphere. After 24 hours, TLC indicated complete conversion. The mixture was filtered through celite using AcOEt, then solvent was removed under vacuo then the crud product was purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/AcOEt 95:5) to yield 506 mg (60%) as a yellow product.

<sup>1</sup>**H** NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.55 (d, 1H, J = 9.6 Hz, H<sub>2</sub>), 7.12 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H<sub>8</sub>), 6.85 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, H<sub>7</sub>), 6.69 (d, 1H, J = 2.7 Hz, H<sub>5</sub>), 6.35 (d, 1H, J = 9.5 Hz, H<sub>3</sub>), 3.65 - 3.75 (br, 2H, NH<sub>2</sub>).

 $R_f = 0.13$  (DCM/AcOEt 95:5).



• <u>Synthesis of 6-amino-5-bromocoumarine (43)</u><sup>75</sup>

To a solution of 6-aminocoumarin (212 mg;1.32 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (6 mL) was added NBS (235 mg;1.32 mmol) in four portions in 40 min at rt. the mixture was stirred for 60 min, and then diluted with  $CH_2Cl_2$ . The organic layer was washed with saturated aq. NaHSO<sub>3</sub> and

saturated aq. NaCl dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and purified by column chromatography over silica gel (DCM/AcoEt 9.7:0.3) given (**43**) as a yellow solid (315 mg, 98%). <sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.00 (d, 1H, *J* = 9.7 Hz, H<sub>2</sub>), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H<sub>8</sub>), 6.94 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>7</sub>), 6.44 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, H<sub>3</sub>), 3.98–4.40 (bd, 2H, NH<sub>2</sub>).

 $R_f = 0.55$  (DCM/AcOEt 9:1).

 Synthesis of 6-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)coumarine (44)<sup>76</sup>:



To Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (91 mg, 157  $\mu$ mol, 6% mol) and CuI (60 mg, 314  $\mu$ mol, 12% mol) and compound (**43**) (625 mg, 2.616.10<sup>-3</sup> mol), in a dry sealed tube, was added a degassing mixture of (DMF/THF/DIPA 5:3:2) (10 mL), then was added (411 mg, 560  $\mu$ L, 4.18 mmol) of trimethylsylilacetylene under argon atmosphere. After stirring for 1 hour at room temperature the reaction was heated to 80 °C and left stirring at this temperature for the night. The solvent was removed under vacuum. The resulting residue was dissolved in AcOEt and Then filtrated over celite, removal of the solvent then purified by flash column chromatography over silica gel, (DCM/AcOEt 95:5) given (**44**) as a yellow solid (380 mg, 56%).

<sup>1</sup>**H** NMR (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.97 (d, 1H, *J* =9.7 Hz, H<sub>2</sub>), 7.06 (d, 1H, *J* =8.9 Hz, H<sub>8</sub>), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H<sub>7</sub>), 6.40 (d, 1H, *J* =9.6Hz, H<sub>3</sub>), 4.4 - 3.8 (br, 2H, NH<sub>2</sub>), 0.27 (s, 9H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **ESI- HRMS:** *m/z* calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 258.0945; found: 258.0933.

 $R_f = 0.56$  (DCM/AcOEt 95:5).



• Synthesis of 6-amino-5-ethynyl-coumarine (45)<sup>77</sup>

To a solution of (44) (447 mg, 1.737 mmol) in MeOH (44 mL) was added (288 mg, 2.084 mmol, 1.2 éq)  $K_2CO_3$ , and stirred at room temperature for 70 min TLC indicated that reaction was finished, mixture was quenched with H<sub>2</sub>O, then solvent was remove under vacuum, extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>. After filtration and evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/AcOEt 97:3) given (45) as a yellow solid (297 mg, 64%).

<sup>1</sup>**H NMR** (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.03 (d, 1H, *J* =9.8 Hz, H<sub>2</sub>), 7.13 (d, 1H, *J* =9.0 Hz, H<sub>8</sub>), 6.87 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H<sub>7</sub>), 6.43 (d, 1H, *J* =9.8Hz, H<sub>3</sub>), 4.45 – 4.15 (br, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.73 (s, 1H, H<sub>9</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>7</sub>NNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 208.0369; found: 208.0363.

 $R_f = 0.37$  (DCM/AcOEt 95:5).

#### • Synthesis of 6-amino-5-iodocoumarine (46):



To a stirred solution of 6-amino coumarine (**42**) (100 mg,  $6.2.10^{-4}$  mol) in 12.5 mL of 96% EtOH at 60 °C was added iodine monochloride (201 mg,  $1.24.10^{-4}$ mol), and after 10 minutes at 60 °C TLC analysis indicated that reaction ended. The mixture was cooled and we added 14 mL of AcOEt, 10 mL H<sub>2</sub>O and 0.5 mL of aqueous 2 M Sodium bisulfite NaHSO<sub>3</sub>. Then we extracted the mixture using an important volume of AcOEt and washed with water, then dried over MgSO<sub>4</sub>. After filtration and evaporation of the solvent, the crude product was purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/AcOEt 98:2) given (**46**) as a yellow solid (169 mg, 95%).

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.92 (d, 1H, *J* =9.8 Hz, H<sub>2</sub>), 7.14 (d, 1H, *J* =8.9 Hz, H<sub>8</sub>), 6.92 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>7</sub>), 6.40 (d, 1H, *J* =9.9Hz, H<sub>3</sub>), 4.4 - 4.0 (br, 2H, NH<sub>2</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>INNaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 309.9335; found: 309.9325.

 $R_f = 0.45 (PE/AcOEt 95:5)$ 



# • <u>Synthesis of 4,4,5,5-tetramethyl-2-(styryl)-1,3,2-</u> <u>dioxaborolane (50):</u>

To (63 mg, 0.31 mmol) of 4-iodo-benzene (**47**), (47.5 mg, 0.31 mmol, 1 eq) of vinylboronate pinacol ester (**49**), (84  $\mu$ L, 0.62 mmol, 2 eq) of NEt<sub>3</sub> and (8 mg, 15.4  $\mu$ mol, 5% mol) of Pd[P(tBu)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> was mixed in dry toluene (1.5 mL) under argon atmosphere, heated at 50°C for 5 hours. Then it was cooled to room temperature, filtered through silica gel pad using AcOEt. The filtrate was evaporated and the residue was purified by flash column chromatography over silica gel (EP/AcOEt 97:3) given (**50**) (6 mg, 9%).

<sup>1</sup>**H** NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.47 (d, 2 H, *J* =8.2 Hz, H<sub>arom</sub>), 7.38 (d, 1 H, *J* =18.4 Hz, C*H*), 7.33-7.26 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 6.15 (d, 1H, *J* =18.3Hz, C*H*), 1.29 (s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub> of PinB).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>BO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 231.1553; found: 231.1540.

 $R_f = 0.57 (EP/AcOEt 95:5)$ 

 Synthesis of 4,4,5,5-tetramethyl-2-(4-methylstyryl)-1,3,2dioxaborolane (51):<sup>82</sup>



To (67 mg, 0.31 mmol) of 4-iodo-toluene, (47.5 mg, 0.31 mmol) of vinylboronate pinacol ester, (84  $\mu$ L, 0.62 mmol) of NEt<sub>3</sub> and (8 mg, 15.4  $\mu$ mol, 5% mol) of Pd[P(tBu)<sub>3</sub>]<sub>2</sub> was mixed in dry toluene (1.5 mL) under argon atmosphere, heated at 50°C for 5 hours. then cooled to room temperature, filtered through silica gel pad using AcOEt. The filtrate was evaporated and residue was purified by flash column chromatography over silica gel (EP/AcOEt 97:3) given (**51**) (53 mg, 70%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.37 (d, 2 H, J =8.2 Hz, H<sub>arom</sub>), 7.36 (d, 1 H, J =18 Hz, CH), 7.12 (d, 2H, J = 8.0 Hz, H<sub>arom</sub>), 6.09 (d, 1H, J =18.5Hz, CH), 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.29 (s, 12 H, 4 CH<sub>3</sub> of PinB).

**ESI- HRMS:** *m/z* calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>BO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 245.1710, found: 245.1711.

 $\mathbf{R_{f}} = 0.63 \text{ (EP/AcOEt 95:5)}.$ 

 Synthesis of 2,2,2-trifluoro-N-(5-iodo-2-oxo-2H-chromen-6yl) acetamide (52):



To a solution of (**46**) (192 mg, 0.69 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (22.5 mL) was added NEt<sub>3</sub> (203 mg, 2 mmol, 3 eq) at room temperature, and trifluoroacetic anhydride (232 µL, 1.67 mmol, 2.5 eq) was added dropwise and the reaction was finished in 15 min. the mixture was poured in saturated solution of water and brine, the product was extracted with  $CH_2Cl_2$ ( 2 x 50 mL) and the organic layer washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated, purified by flash column chromatography over silica gel (DCM/AcOEt 97:3) given (**52**) (236 mg, 92%).

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.97 (d, 1H, *J* =9.8 Hz, H<sub>2</sub>), 7.18 (d, 1H, *J* =8.9 Hz, H<sub>8</sub>), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H<sub>7</sub>), 6.44 (d, 1H, *J* =9.9Hz, H<sub>3</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>INNaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 405.9158; found: 405.9136.

 $R_f = 0.7$  (DCM/AcOEt 95:5).



• Synthesis of compound (54) and compound (55):

To a solution of palladium complex  $Pd[P(tBu_3)]_2$ .(66 mg, 1 eq) in dry toluene (650  $\mu$ L) was added (50 mg, 130  $\mu$ mol) of (**52**). Then (20 mg, 130  $\mu$ mol, 1 eq) of (**49**) and (26 mg, 260  $\mu$ mol, 2 eq) of NEt<sub>3</sub> was added to the mixture. Then the mixture was wormed 50 °C for 5 hours. The mixture was then filtred through silica gel pad using AcOEt. Solvent was removed in vacuo, and residue was purified by flash column chromatography over silica gel (DCM to DCM/AcOEt 95:5) given (17.5 mg, 47%) of (**54**) and (17 mg, 50%) of (**55**).

#### Compound (54)

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.25(d, 1H, *J* =9.5 Hz, H<sub>8</sub>), 7.88(d, 1H, *J* =9.8 Hz, H<sub>2</sub>), 7.31(d, 1H, *J* =9.1 Hz, H<sub>7</sub>), 6.76(dd, 1H, *J* = 17.8 Hz, *J* = 11.7 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 6.44(d, 1H, *J* = 9.8 Hz, H<sub>3</sub>), 6.0 (dd, 1H, *J* =11.5 Hz, *J* =1.2 Hz,HC=CHH), 5.59 (d, 1H *J* =18 Hz, *J* =1.3 Hz, HC=CHH).

**ESI- HRMS:** m/z found for C<sub>13</sub> H<sub>7</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup>; 282.0402.

#### Compound (55)

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 8.30- 8.19(br, 1H, NH), 8.05(d, 1H, *J* =2.6 Hz, H<sub>5</sub>), 7.75 (d, 1H, *J* =9.6 Hz, H<sub>2</sub>), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.9 Hz, *J* = 2.5 Hz, H<sub>7</sub>), 7.40 (d, 1H, *J* =8.8 Hz, H<sub>8</sub>), 6.53 (d, 1H, *J* =9.7 Hz, H<sub>3</sub>).

**ESI- HRMS:** *m*/*z* found for C<sub>11</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 256.0223.



#### • Synthesis of compound (56)

To a solution of palladium complex  $Pd[P(tBu_3)]_2$ .(13 mg, 20% mol) in dry toluene (650 µL) was added (50 mg, 130 µmol) of (**52**). Then (20 mg, 130 µmol, 1 eq) of (**49**) and (26 mg, 260 µmol, 2 eq) of NEt<sub>3</sub> was added to the mixture. Then the mixture was wormed 50 °C for 5 hours. The mixture was then filtered through silica gel pad using AcOEt. Solvent was removed in vacuo, and residue was purified by flash column chromatography over silica gel (DCM to DCM/AcOEt 95:5 to DCM/MeOH 9/1) and (**56**) was obtained (12.7 mg, 22%)

<sup>1</sup>**H NMR** (250 MHz, d<sup>4</sup>-MeOH) δ (ppm): 8.17(d, 1H, *J* =9.9 Hz, H<sub>2</sub>), 7.58(d, 1H, *J* =8.9 Hz, H<sub>7</sub>), 7.39(s, 1H, N*H*), 7.34(d, 1H, *J* = 9.5 Hz, CH=C*H*B), 6.5(d, 1H, *J* = 9.9 Hz, H<sub>3</sub>), 5.85 (d, 1H, *J* =18.6 Hz, C*H*=CHB), 5.2-4.5(br, 2H, OH).

**ESI- HRMS:** *m/z* calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>BF<sub>3</sub>NO<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 326.0455; found: 326.0455.

# **Conclusion Générale**

Et perspectives

Dans le but général de synthétiser des outils moléculaires pour l'imagerie cellulaire, on a réalisé dans un premier temps des tests de synthèse sur plusieurs sondes fluorescentes qui se sont avérés intéressants, et qui, par la suite, ont abouti à la synthèse d'une molécule fonctionnalisée par une fonction aldoxime à base de rhodamine B. Cette molécule a joué un rôle dans l'optimisation de la réaction mise en jeu utilisant le bis(acetoxy)iodo benzène (BAIB) pour réagir selon le principe de la chimie click face à des molécules modèles porteuses d'une fonction alcène.

Dans un deuxième temps, on a réalisé la synthèse de plusieurs motifs saccharidiques modifiés, soit par un groupement azoture pour la réalisation de la réaction click [3+2] catalysé par le cuivre, soit dans une version vinylique pour réagir avec la rhodamine B fonctionnalisée déjà synthétisée. Des tests ont été réalisés pour les différentes molécules en main *in vitro*, ainsi que *in vivo*. Ils ont abouti à des résultats remarquables concernant le marquage des bactéries à gram négatif selon la réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par le cuivre. En perspective, l'optimisation de la voie de synthèse doit être réalisée en effectuant plus de tests concernant la rhodamine B, étant donné que le marquage n'a pas été spécifique.

D'autre part, et dans le concept du stress oxydant, on a proposé deux stratégies pour la synthèse de notre sonde spécifique pour le peroxyde d'hydrogène. Malgré les résultats positifs des essais réalisés sur les molécules modèles de l'insertion du pinacol boronate ester, la difficulté de l'insertion du boronate via l'hydroboration et via le couplage de heck sur la coumarine a toujours été observée. En perspective, il faudra s'attacher à trouver les conditions optimales pour cette dernière étape d'insertion du boronate, ainsi que pour la déprotection finale de la fonction amine.

# **Références Bibliographiques**

- <sup>1</sup>Oyelaran O., Gildersleeve J. C., Curr. Opin. Chem. Biol., 2009, 13, 406-413.
- <sup>2</sup> Laughlin S.T., Bertozzi C.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009, 106, 12-17.
- <sup>3</sup> Ohtsubo, K., Marth, J.D., Cell, **2006**, 126, 855-867.
- <sup>4</sup> Bishop J.R., Schuksz M., Esko J.D., *Nature*, **2007**, 446, 1030-1037.
- <sup>5</sup> Haltiwanger R.S., Lowe J.B., Annu. Rev. Biochem., 2004, 73, 491-537.
- <sup>6</sup> Fuster M.M., Esko J.D., Nat. Rev. Cancer, 2007, 5, 526-542.
- <sup>7</sup> Wang L., Schultz P.G., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2004, 44, 34–66.
- <sup>8</sup> Laughlin S.T., Baskin J.M., Amacher S.L., Bertozzi C.R., Science, 2008, 320, 664–667
- <sup>9</sup> Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 16793-16797.
- <sup>10</sup> Cipolla L., Polissi A., Airoldi C., Galliani P., Sperandeo P., Nicotra F., Curr. Drug Discovery Technol., 2009, 6, 19 – 33.
- <sup>11</sup> Rolfe D.F., Brown G.C., *Physiol. Rev.*, **1997**, 77, 731-58.
- <sup>12</sup> Koppenol W.H., *Redox Rep.*, **2001**, 6, 339-41.
- <sup>13</sup> Sies H., Klin. Wochenschr., **1991**, 69, (21-23), 965-8.
- <sup>14</sup> Favier A., Ann Biol Clin, **1997**, 55, 9-16.
- <sup>15</sup> Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., *Rev. Rhum.*, **2007**, 74, 636-643.
- <sup>16</sup> Szatrowski T., Nathan C., *Cancer Res.*, **1991**, 51, 794-798.
- <sup>17</sup> Mao G.D., Poznansky M.J., FEBS Lett., **1992**, 305(3), 233-6.
- <sup>18</sup> Cai H., Harrison D.G., Circ Res., **2000**, 87(10), 840-4.
- <sup>19</sup> Hatch G.E., *Indian Pediatr.*, **2010**, 47(3), 233-9.
- <sup>20</sup> Flora S.J., Mittal M., Mehta A. Indian J. Med. Res., **2008**, 128(4), 501-23.
- <sup>21</sup> Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 2004-2021.
- <sup>22</sup> Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., Fokin, V. V., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 210-216.
- <sup>23</sup> Majireck, M. M., Weinreb, S. M., J. Org. Chem, **2006**, 71, 8680-8683.
- <sup>24</sup> Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Angew. Chem. Int. Ed., 2002, 41, 2596-2599.
- <sup>25</sup> Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., J. Org. Chem., 2002, 67, 3057-3064.
- <sup>26</sup> Kolb, H. C., Sharpless, K. B., Drug Discov. Today, 2003, 8, 1128-1137.
- <sup>27</sup> Tron, G. C., Pirali, T., Billington, R. A., Canonico, P. L., Sorba, G., Genazzani, A. A., *Med. Res. Rev.*, **2007**, *28*, 278-308.
- <sup>28</sup> Amblard, F., Cho, J. H., Schinazi, R. F., *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 4207-4220.
- <sup>29</sup> Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., Nat. Chem. Biol., 2005, 1, 13-21.
- <sup>30</sup> Agnew, H. D., Rohde, R. D., Millward, S. W., Nag, A., Yeo, W.-S., Hein, J. E., Pitram, S. M., Tariq, A. A., Burns, V. M., Krom, R. J., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Heath, J. R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4944-4948.
- <sup>31</sup> Sletten, E. M., Bertozzi, C. R., Org. Lett., 2008, 10, 3097-3099.
- <sup>32</sup> Chen, J. K., Nat. Chem. Biol., 2008, 4, 391-392.
- <sup>33</sup> Grundmann C., Dean J. M., J. Org. Chem., **1965**, 30, 2809.
- <sup>34</sup> Moriya O., Nakumara H., Kageyama T., Urata Y., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 3987-3990.
- <sup>35</sup> Radhakrishna A. S., Sivaprakash K., Singh B. B., Synthetic Comm., **1991**, 21-15, 1625-1629.
- <sup>36</sup> Ranganathan S., Singh B.B., Panda C.S., *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 1225.
- <sup>37</sup> Bode J. W., Hachisu Y., Matsuura T., Suzuki K., *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 3555-3558.
- <sup>38</sup> Mukaiyama, T., Hoshino, T., J. Am. Chem. Soc., **1960**, 82, 5339–5342.
- <sup>39</sup> Liu K. C., Shelton B. R., Howe R. K., J. Org. Chem., **1980,**45, 3916-3918.
- <sup>40</sup> Kumar V., Maushik M. P., *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 1457-1460.
- <sup>41</sup> Kozikowski A. P., Acc. Chem. Res., **1984**, 17, 410.
- <sup>42</sup> Baraldi P. G., Barco A., Benetti S., Pollini G.P., Simoni D., Synthesis, 1987, 857.
- <sup>43</sup> Bode J. W., Carreira E. M., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 6410-6424.

- <sup>44</sup> Hwang I. T., Kim H. R., Jeon D. J., Hong K. S., Song J. H., Cho K. Y., J. Agr. Food. Chem., 2005, 53, 8639-8643.
- <sup>45</sup> a) Sletten E. M., Bertozzi C. R., Angew. Chem., 2009, 121, 7108 7133, Angew. Chem. Int. Ed., 2009, 48, 6974–6998.
  - b) Chang P. V., Prescher J. A., Sletten E. M., Baskin J. M., Miller I. A., Agard N. J., Lo A., Bertozzi C. R., *Proc. Natl Acad. Sci.USA*, **2010**, 107, 1821–1826.
- <sup>46</sup> a) Poloukhtine A. A., Mbua N. E., Wolfert M.A., Boons G.J., Popik V. V., J. Am. Chem. Soc., 2009, 131, 15769–15776,
  - b) Ning X., Guo J., Wolfert M. A., Boons G. J., Angew. Chem., **2008**, 120, 2285 2287, Angew. Chem. Int. Ed. **2008**, 47, 2253–2255.
- <sup>47</sup> Sanders B. C., Friscourt F., Ledin P. A., Mbua N. E., Arumugam S., Guo J., Boltje T. J., Popik V. V., Boons G. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 949–957.
- <sup>48</sup> Gutsmiedl K., Wirges C. T., Ehmke V., Carell T., Org. Lett., **2009**, 11, 2405-2408.
- <sup>49</sup> Gutsmield K., Fazio D., Carell T., Chem. Eur. J., 2010, 16, 6877-6883.
- <sup>50</sup> Prescher J. A., Bertozzi C. R., *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
- <sup>51</sup> Saxon E., Bertozzi C. R., *Science* **2000**, 287, 2007.
- <sup>52</sup> Silverman A. P., Kool E. T., *Trends Biotechnol.*, **2005**, 23, 225.
- <sup>53</sup> Gawley R. E., Mao H., Haque M. M., Thorne J. B., Pharr J. S., *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 218-2191.
- <sup>54</sup> Liu K., Shelton B. R., Howe R. K., J. Org. Chem., **1980**, 45, 3916-3918.
- <sup>55</sup> Allen L., Davulcu S., Williams M. J., Org. Lett., **2010**, 12, 5096-5099.
- <sup>56</sup> Dubrovskiy A. V., Larock R. C., Org. Lett., **2010**, 12, 1180-1183.
- <sup>57</sup> Adamczyk M., Grote J., Moore J. A., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 544-547.
- <sup>58</sup> Nguyen T., Francis M. B., Org. Lett., **2003**, 5, 3245-3248.
- <sup>59</sup> Mani N. S., Palmer D. C., Pandit C. R., Reyes M. B., Xiao T., Cesco-Cancian S., WO
- 2007/053427, PCT/US2006/041859.
- <sup>60</sup> Dumont A., Malleron A., Awwad M., Dukan S., Vauzeilles B., Angew. Chem. Int. Ed., 2012, 51, 3143–3146.
- <sup>61</sup> Smellie I.A., Bhakta S., Sim E., Fairbanks A.J., Org. Bionol. Chem., 2007, 5, 2257-2266.
- <sup>62</sup> Raimundo J. M., Lecomte S., Edelmann M. J., Concilio S., Biaggio I., Bosshard C., Günter P., Diederich F., *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 292-295.
- <sup>63</sup> Becker D. P., Husa R. K., Moormann A. E., Villamil C.I., Flynn D. L., *Tetrahedron*, **1999**, 55, 11787-11802.
- <sup>64</sup> Nakazaki M., Naemura K., Kondo Y., J. Org. Chem., **1976**, 41, 1229-1233.
- <sup>65</sup> Hatakeyama S., Mori H., Kitano K., Yamada H., Nishizawa M., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 4367-4370.
- <sup>66</sup> Iwanami K., Yano K., Oriyama T., Chem. Lett., 2007, 36, 38-39.
- <sup>67</sup> IwanamiK., Yano K., Oriyama T., Synthesis, **2005**, 16, 2669-2672.
- <sup>68</sup> Bourdreux Y., Lemétais A., Urban D., Beau J. M., Chem. Commun., 2011, 47, 2146-2148.
- <sup>69</sup> Baron A., Bleriot Y., Sollogoub M., Vauzeilles B., Org. Biomol. Chem., 2008, 6, 1898 1901.
- <sup>70</sup> Chan T. R., Hilgraf R., Sharpless K. B., Fokin V. V., *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2853 2855.
- <sup>71</sup> Gattis S.G., Chung H. S., Trent M. S., Raetz R. H., J. Biol. Chem., **2013**, 288, 9216-9225.
- <sup>72</sup> Lippert A. R., Van De Bittner G. C. Chang C.J., Acc. Chem. Res., 2011, 44, 793-804.
- <sup>73</sup> De P., Synlett, **2004**, 10, 1835-1837.
- <sup>74</sup> Heinrich T., Böttcher H., Schiemann K., Hölzemann G., Schwarz M., Bartoszyk G. D., van Amesterdam C., Greiner H. E., Seyfried C. A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4843-4852.
- <sup>75</sup> Ganguly N. C., De P., Dutta S., *Synthesis*, **2005**, 1103–1108.
- <sup>76</sup> Chen L., Hu T. S., Yao Z. J., *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 6175-6182.
- <sup>77</sup> Majumdar K. C., Mondal S., *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 2418-2420.
- <sup>78</sup> Baron A., Herrero C., Quaranta A., Charlot M., Leibl W., Vauzeilles B., Aukauloo A., *Chem.Commun.*, **2011**, 47, 11011-11013.
- <sup>79</sup> PraveenGanesh N., d'Hondt S., Chavant P. Y., J. Org. Chem., 2007, 72, 4510-4514.

- <sup>80</sup> Kun E., Mendeleyev J., WO 92/06687, PCT/US91/07665.
- <sup>81</sup> Batsanov A. S., Knowles J. P., Whiting A., J. Org. Chem., 2007, 72, 2525-2532.
- <sup>82</sup> Sampson P. B., Li S. W., Liu Y., Pauls H. W., Edwards L. G., Forrest B. T., Feher M., Patel N.K., Guohua Pan G., WO2010/115279, PCT/CA2010/00518.
- <sup>83</sup> Itami K., Tonogaki K., Nokami T., Ohashi Y., Yoshida J. I., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2404-2409.
- <sup>84</sup> Stuart D. R., Bertrand-Laperle M., Burgess K. M. N., Fagnou K., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 16474-16475.
- <sup>85</sup> Nagle P. S., Rodriguez F., Kahvedzic A., Quinn S. J., Rozas I., J. Med. Chem., 2009, 52, 7113-7121.
- <sup>86</sup> Edwards J. P., Jones T. K., Riggenberg J. D., Carreira E. M., *United States Patent* 6,001,846. 1999.
- <sup>87</sup> Cai S. X., Keana J., *Bioconjugate Chem.*, **1991**, 2, 317-322.
- <sup>88</sup> Spenser C., Balsells J., Li H., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50,1010-1012.