



HAL
open science

Développement de ligations chimiosélectives "click": applications à la synthèse de sondes fluorescentes

Kévin Renault

► **To cite this version:**

Kévin Renault. Développement de ligations chimiosélectives "click": applications à la synthèse de sondes fluorescentes. Chimie organique. Normandie Université, 2018. Français. NNT: 2018NORMR127 . tel-02069413

HAL Id: tel-02069413

<https://theses.hal.science/tel-02069413>

Submitted on 15 Mar 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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de ligations chimiosélectives "click" - applications à la synthèse de sondes fluorescentes

**Présentée et soutenue par
Kévin RENAULT**

**Thèse soutenue publiquement le 23 Novembre 2018
devant le jury composé de**

Dr. Alain WAGNER	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg	Président du jury
Pr. Mélanie ETHEVE-QUELQUEJEU	Professeur, Université Paris Descartes	Rapporteuse
Pr. Elena ISHOW	Professeur, Université de Nantes	Rapporteuse
Dr. Cyrille SABOT	Chargé de recherche CNRS, Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Cyrille SABOT et Pierre-Yves RENARD, laboratoire COBRA UMR 6014





Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Chimie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement de ligations chimiosélectives "click" - applications à la synthèse de sondes fluorescentes

**Présentée et soutenue par
Kévin RENAULT**

**Thèse soutenue publiquement le 23 Novembre 2018
devant le jury composé de**

Dr. Alain WAGNER	Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg	Président du jury
Pr. Mélanie ETHEVE-QUELQUEJEU	Professeur, Université Paris Descartes	Rapportrice
Pr. Elena ISHOW	Professeur, Université de Nantes	Rapportrice
Dr. Cyrille SABOT	Chargé de recherche CNRS, Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur, Université de Rouen	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Cyrille SABOT et Pierre-Yves RENARD, laboratoire COBRA UMR 601



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier le professeur Pierre-Yves Renard, Université de Rouen et responsable de l'équipe de Chimie Bio-organique de l'UMR 6014 CNRS COBRA, de m'avoir accueilli dans son équipe durant ces trois années, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ainsi que ses conseils.

Je tiens, ensuite, à remercier le Docteur Cyrille Sabot, chargé de recherches au CNRS, pour sa disponibilité, sa compréhension, sa confiance, et pour m'avoir encadré tout au long de ces trois années de doctorat. Je le remercie également pour les conseils et les connaissances dont il m'a fait part et qui ont fortement contribué au bon déroulement de cette thèse. Avec Cyrille, ce sont des échanges perpétuels de connaissances, aussi bien, sur le plan théorique que technique. Je tiens à lui exprimer mon sincère respect pour la patience, le calme, et la gentillesse dont il a fait preuve durant ces trois ans.

Je tiens à remercier vivement les membres de ce jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et l'honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je remercie également les autres permanents pour leurs conseils et leurs disponibilités, en particulier : Ludovic Jean, Xavier Franck, Stéphane Leuleu, Thibault Gallavardin et Alexandre Haefelé pour leurs conseils sur la photophysique.

Je remercie également les chercheurs et le personnel de L'IRCOF qui m'ont aidé tout au long de mon parcours. Je remercie tout d'abord Patricia, voisine de bureau, pour sa gentillesse et pour son aide, tant sur le plan synthétique qu'analytique. Je remercie TiaTia et Emilie, pour leur bonne humeur et leur savoir encyclopédique sur l'HPLC qui m'ont grandement aidé. Je remercie également Françoise pour sa gentillesse ainsi que pour son aide. Marie-Hubert et Albert pour les analyses de spectrométrie de masse. Laurent, qui est toujours présent pour réparer mes bêtises informatiques et enfin, Charles, notre super verrier, qui a su réaliser mes demandes les plus farfelues.

Je remercie également toute l'équipe Bio-organique, à commencer par les « anciens », qui m'ont tant appris à mon arrivée au laboratoire. Je remercie « le chef » Arnaud Chevalier pour m'avoir formé quand j'étais encore tout petit et transmis son savoir sur la fluorescence. Je remercie également Antoine « Poupousse » Lizzul-Jurse le gaffeur légendaire, qui fut mon premier voisin de paillasse, pour sa bonne humeur quotidienne et pour m'avoir transmis sa passion du bricolage ; mais aussi Laurie-Anne Jouanno avec qui j'ai collaboré et dont les travaux ont été un formidable appui tout au long de cette thèse.

Je remercie tous les nombreux doctorants et post-Doctorants que j'ai pu croiser durant ces trois ans : Thibault, Mehdi, Sam-U, Romain « grand machin » et Margot « la Schtroumfette » avec qui je partageais un bureau et une cellule. Mais aussi, Xavier, Julien « yul », Benoit, Sovy, Mégane « tutut » pour sa bonne humeur pendant que « l'eau chauffe », Kathleen, Kilian, Pierre, Morgan, David, Emilie, Thomas, Anissa, Pierrick, Dorra « sac-à-dos », Baptiste, Maxime, pour leur accueil, leur écoute, leur disponibilité lors de l'accomplissement de ma mission et pour la bonne humeur véhiculée durant ces trois années.

Je remercie également toutes les personnes (Stagiaires, Doctorants et post-doctorants) avec qui j'ai pu travailler au sein de la Cyrille team. Tout d'abord Laura, dont la douceur, la bienveillance, la folie et l'accent de Rio remplissaient de soleil le laboratoire. Alexis pour sa bonne humeur et son aide sur certains projets. Axel « le petit animal des Forêts », pour sa spontanéité et les fous rires partagés. Tony qui fut mon voisin de paillasse lors de ma première année et enfin Madeleine, qui vient de commencer sa thèse et à qui je souhaite le meilleur pour les trois années à venir.

Je tiens ensuite à remercier le groupe des « Loulous » qui a rendu cette thèse plus facile, par leur bonne humeur et leur soutien. Plus que des collègues, ce sont devenus des amis. Je remercie ainsi Pauline, dont l'aide fut très précieuse pendant ces trois ans puisque nous avons commencé notre thèse au même moment, et donc, traversé les mêmes épreuves. Je remercie Karine pour sa gentillesse et sa spontanéité. Je remercie Matthieu pour sa gentillesse et les pauses manga et Florian pour sa bienveillance et les concerts improvisés. Je remercie également Wiwi, mon voisin de paillasse fan d'Eddy Michel et de Joey Starr, pour son soutien et pour nos fous rires qu'on pouvait entendre à l'autre bout de l'institut ; merci à lui pour avoir rendu ce doctorat plus joyeux. Il me reste maintenant à remercier un dernier membre des « Loulous » ; je tiens donc à adresser un grand merci à Morgane, qui a été là durant ces trois ans, pour son soutien sans faille, pour m'avoir supporté dans les moments les plus difficiles comme dans les meilleurs et, pour nos rires qui ont beaucoup contribué à rendre cette expérience unique, Merci à toi.

Je remercie également mes amis Adeline et Gaëtan qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse et qui ont été là pour moi.

Enfin je remercie mes parents. Il n'y a pas de mot pour leur exprimer ma reconnaissance. Je les remercie d'avoir toujours été là pour moi depuis toujours, pour leur soutien indéfectible tout au long de mon parcours. Je les remercie également pour leur immense patience, pour m'avoir supporté dans les moments difficiles, mais également d'être les premiers présents dans les moments de joie. Merci de m'avoir entouré car je sais que je ne serais pas devenu ce que je suis sans vous.

Abréviations, formules et acronymes

Å	Ångström
Abs	Absorption/Absorbance
Ac	Acétyle
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIBN	Azobisisobutyronitrile
Aq.	Aqueux
Ar	Aryle
ARN	Acide ribonucléique
BARAC	Biarylazacyclooctynone
BBQ	Black berry quencher
BCN	Bicyclononyne
BHQ	Black hole quencher
BHT	2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol
Bn	Benzyle
Boc	<i>t</i> -butyle oxycarbonyle
BODIPY	Bore-dipyrométhène
BSA	Bovine Serum Albumine (sérum albumine bovine)
cm	centimètre
CuAAC	Copper(I)-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition
Cy	Cyanine
DABCYL	4-(DimethylAminoazo)benzene-4-carboxylic acid
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DCE	Dichloroéthane
DCM	Dichlorométhane
DEAC	Diéthylaminocoumarine
DEL	diode électroluminescente
DIAD	Diisopropyl azodicarboxylate
DIEA	Di-isopropylamine
DIFO	Difluorocyclooctyne
DJA	Dose journalière admissible
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPBF	Diphénylbenzofurane
DTT	Dithiothréitol
EDCi	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide)
Em	Emission
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer

Et	Ethyle
ESI	Electrospray ionization
Exc	Excitation
FRET	Förster resonance energy transfer
h	heure
HBTU	N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphate
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HPLC	High performance liquid chromatography
HTMAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
ICT	Intramolecular charge transfert
iEDDA	Inverse electron-demand Diels–Alder
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
M	Molaire
MCR	Réactions multicomposantes
Me	Méthyle
min	Minutes
m	Milli
NAC	N-acétylcystéine
NBS	N-bromosuccinimide
ncAA	Non-canonical amino acid
NCL	Native chemical ligation
NHS	N-hydroxysuccinimide
NIR	Near infra-red
n	Nano
NMA	N-méthylaniline
NMP	N-méthylpyrrolidone
PB	Phosphate buffer (tampon phosphate)
PBS	Phosphate-buffered saline (tampon phosphate salin)
PEG	Polyéthylène glycol
Ph	Phényle
pH	Potentiel Hydrogène
pKa	Constante de dissociation
POM	pivaloyloxyméthyle
PTAD	4-Phenyl-1,2,4-triazole-3,5-dione
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
Pyr	Pyridine
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Seconde
S _e Ar	Substitution électrophile aromatique
S _n Ar	Substitution nucléophile aromatique
SPAAC	Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloadditions
SPOS	Solid phase oligonucleotide synthesis
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis

STORM	STochastic Optical Reconstructure Microscopy
t. a.	Température ambiante
TBET	Through-Bond Energy Transfer
TBHT	2,6-Di-tert-butyl-4-méthylphénol
tBu	<i>t</i> -butyle
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphine
TCO	Trans-CycloOctène
TEMP	Tomographie par émission monophotonique
TEMPO	(2,2,6,6-tétraméthylpipéridin-1-yl)oxy
TeP	Transfert d'électron Photoinduit
TEP	Tomographie par émission de Positons
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
Tol	Toluène
UV	Ultraviolet
W	Watt
°C	degré celsius

Préambule

Ces travaux de thèse ont été effectués entre le 1^{er} Octobre 2015 et le 30 Septembre 2018 au sein de l'équipe Chimie Bio-Organique (équipe 2 du laboratoire COBRA, UMR CNRS 6014, <http://www.lab-cobra.fr/?equipe=equipe-2>), sous la co-direction du Docteur Cyrille Sabot et du Professeur Pierre-Yves Renard, dans le bâtiment nommé "Institut de Recherche en Chimie Organique Fine (IRCOF)" qui est localisé sur le site de Mont-Saint-Aignan de l'Université de Rouen-Normandie. Ces travaux ont été co-financés par des fonds FEDER ("Fonds Européens de Développement Régional") et la région Haute-Normandie, *via* une allocation doctorale de la région Haute Normandie attribuée au réseau CRUNCh (Centre de Recherche Universitaire Normand en Chimie).

Plusieurs collaborations ont permis le développement ou l'évaluation de certains projets. Ainsi, le développement d'une voie d'accès au 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one a été réalisé en collaboration avec le Dr. Hasan Mtiraoui (Université de Monastir, Tunisie) qui est venu faire un stage de quelques mois au laboratoire. Les analyses de protéines marquées par gel d'électrophorèse ont été réalisées par Clément Guillou (INSERM, U905, Rouen, France, Normandie Université, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Rouen, France). J'ai en particulier collaboré avec Monsieur Alexis Lossouarn (étudiant en seconde année de thèse au laboratoire) pour l'étude de réactions de cycloaddition avec le motif maléimide. Mon mémoire de doctorat est rédigé sous forme de thèse sur publications pour une grande partie des résultats obtenus. Une revue sur l'utilisation des maléimides en bioconjugaison a également été rédigée et publiée cette année dans le journal « *Bioconjugate Chemistry* » : Covalent modification of biomolecules through maleimide-based labeling strategies Kévin Renault, Jean-Wilfried Frey, Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2497-2513. Une seconde revue a été publiée sur la chimie des 5-alkoxyoxazoles : 5-Alkoxyoxazole : a Versatile Building Block in (Bio)Organic Synthesis. Laurie-Anne Jouanno, Kévin Renault, Cyrille Sabot, Pierre-Yves Renard *Eur J Org Chem* **2016**, *20*, 3264–3281. Ces deux revues seront mises en annexe de ce manuscrit.

Ce manuscrit rassemble l'ensemble des résultats obtenus lors de mes trois années de thèse, dont la majorité, a été dédié au travail expérimental de synthèse, d'analyse et de validation des outils chimiques envisagés. L'objectif de ce manuscrit est aussi de replacer ces réalisations dans le contexte de la (bio)chimie pour le développement de ligation chimiosélective, qui est aujourd'hui un domaine en pleine expansion. Ainsi, la majorité des (bio)molécules synthétisées ont été conçues avec une volonté délibérée de fournir des stratégies hautement modulables et faciles à mettre en œuvre, dans le but de fournir des solutions pertinentes et innovantes aux problématiques associées à la synthèse et aux applications des réactions chimiosélectives. Nous espérons ainsi que ces travaux pourront servir de point de départ, mais aussi, de véritable "boîte à outils" aux actuels et futurs membres de notre équipe ainsi qu'aux nombreux chercheurs (des secteurs académiques et privés) travaillant dans le domaine général de la bioconjugaison.

Sommaire

Introduction

I. Introduction à la ligation biocompatible	19
1. Concept général.....	19
2. Principe de la bioconjugaison.....	20
2.1. Modification des chaînes latérales des résidus d'acides aminés	21
2.2. Modification en position N-terminale et C-terminale	24
2.2.1. Modification en position N-terminale	24
2.2.2. Modification en position C-terminale	25
3. Principe de la conjugaison chimiosélective	26
3.1. Définition.....	26
3.2. Exemples de ligations chimiosélectives	26
3.2.1. Les réactions de condensation sur les carbonyles	26
3.2.2. La réaction entre les nitrosos aromatiques et les acides sulfiniques.....	28
3.2.3. Les réactions de cycloaddition [4+2] et [3+2].....	28
3.2.3.1. Les réactions de cycloaddition [4+2]	28
3.2.3.2. Les réactions cycloaddition [3+2]	30
4. Principe de la ligation bio-orthogonale	32
4.1. Définition.....	32
4.2. Introduction du <i>reporter</i> chimique.....	32
4.3. Les réactions bio-orthogonales.....	35
4.3.1. La ligation de Staudinger.....	35
4.3.2. La ligation SPAAC.....	35
4.3.3. La ligation iEDDA	36
II. Introduction à la fluorescence	38
1. Concept général.....	38
2. Détection fluorogénique.....	42
2.1. Principe d'une sonde de type TeP	42
2.2. Principe d'une détection de type FRET	44
2.3. Principe d'une détection de type ESIPT	45
2.4. Principe d'une détection par modification structurelle du fluorophore	46

III. Présentation du sujet de thèse	47
Référence : Introduction.....	49

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

I. Etat de l'art	57
1. Les ligations fluorogéniques par libération de fluorophores.....	57
2. Les ligations fluorogéniques par effet FRET.....	58
3. Les ligations fluorogéniques par TeP.....	60
4. Les ligations fluorogéniques par formation d'un motif fluorescent.	61
II. Résultat et discussion.....	62
1. Développement d'une nouvelle réaction chimiosélective et fluorogénique basée sur la ligation Kondrat'eva	62
1.1. Présentation de la stratégie mise en œuvre.....	62
1.2. Article 1 : Fluorogenic Behaviour of the Hetero-Diels-Alder Ligation of 5-Alkoxyoxazoles with Maleimides and their Applications.....	64
2. Etude comparative des différentes ligations chimiosélectives basée sur des réactions de type [4+2] avec le maléimide.....	77
2.1. Etude cinétique	77
2.2. Comparaison de la stéréosélectivité de la ligation.....	79
2.3. Etude de stabilité.....	83
3. Développement de réactions chimiosélectives tricomposantes.....	84
3.1. les réactions multicomposantes en milieu physiologiques : état de l'art.....	84
3.2. Présentation de la stratégie mise en œuvre.....	84
3.3. Recherche d'un partenaire furane et tétrazine optimal pour la réaction tricomposante .	86
3.4. Etude cinétique	88
4. Conclusion et perspectives	89
Références : Chapitre 1.....	91

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

I. Etat de l'art	95
1. Synthèse des 1,2,4,5-tétrazines.....	95
1.1. Synthèse de tétrazines par condensation d'hydrazines sur les nitriles ou équivalents	95

1. 2.	Voies de synthèse alternatives de tétrazines	96
1. 3.	Synthèse de tétrazines par voie photochimique et enzymatique.....	97
2.	Réactivité des tétrazines et de leurs partenaires	98
3.	Utilisation spécifique de l'iEDDA	99
3.1.	L'iEDDA pour l'imagerie de super-résolution de marquage site-spécifique de protéine ..	99
3.2.	L'iEDDA pour l'étude de processus dynamiques rapides dans les cellules vivantes	100
3.3.	L'iEDDA pour le suivi de molécules biologiquement actives dans les cellules vivantes ..	101
3.4.	L'iEDDA pour le marquage par radioactivité	103
3.5.	L'iEDDA pour les réactions de clivage bio-orthogonales.....	104
3.6.	L'iEDDA pour le développement de ligation fluorogénique	106
II.	Résultats et discussions.....	109
1.	Recherche de nouveaux partenaires réactionnels de tétrazines	109
1.1.	Présentation de la stratégie mise en œuvre.....	109
1.2.	Article 2 : Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules+ criblage des composés énolisable extrait du SI.....	111
1.3.	Génération de pyrazolones <i>in situ</i>	123
1.3.1.	Principe des « propyrazolones ».....	123
1.3.2.	Propyrazolone pour la détection sélective de cystéine et homocystéine.....	123
1.3.3.	Autres « propyrazolones » synthétisées.....	125
2.	Conclusion.....	126
	Références : Chapitre 2.....	128

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

I.	Etat de l'art	133
1.	Synthèse des pyrazolones.....	134
2.	Réactivité des pyrazolones.....	135
2.1.	Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des sels de diazonium	135
2.2.	Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des aldéhydes.....	136
2.3.	Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des accepteurs de Michael	137
3.	Utilisation des pyrazolones en bioconjugaison	139
II.	Résultats et discussions.....	141

1.	Recherche d'un accepteur de Michael comme partenaire réactionnel de la pyrazolone.	141
2.	Etude de la réactivité entre les mérocyanines et les pyrazolones.	143
2.1.	Stratégie N°1 : Utilisation d'une « pince » pour des réactions de piégeage intramoléculaire.	143
2.2.	Stratégie N°2 : Addition de deux pyrazolones par réactions successives d'addition de Michael/élimination/addition de Michael.....	147
2.3.	Stratégie N°3 : Utilisation de la pyrazolone comme reporter chimique au sein de la biomolécules.....	151
3.	Synthèse et évaluation <i>in vitro</i> d'une sonde profluorescente basée sur un pigment pyrazolone pour la détection de biothiols.....	154
3.1.	Présentation de la stratégie mise en œuvre.....	154
3.2.	Article 3 : Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols.....	155
4.	Conclusion et perspectives	161
	Références : Chapitre 3.....	163

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

I.	Etat de l'art	167
1.	Synthèse des quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones.....	167
2.	Modification chimique du noyau quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones.....	169
3.	Propriétés de fluorescence des quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones.....	171
II.	Résultats et discussions.....	174
1.	Nouvelle voie d'accès au 3-benzoylquinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones.....	174
1.1.	Présentation de la stratégie de synthèse mise en œuvre	174
1.2.	Article 4: Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalin	175
2.	Développement de nouvelles quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones fluorescentes et application à la détection <i>in vitro</i> du sulfure d'hydrogène	188
2.1.	Présentation de la stratégie de synthèse mise en œuvre	188
2.2.	Article 5: Photophysical properties of quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones: application in the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection of hydrogen sulfide.....	189
2.3.	Optimisation des propriétés de fluorescence de la 7-aminoquinoxalin-2(1 <i>H</i>)-one.....	197

2. 4. Les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones comme photosensibilisateur de dioxygène singulet	200
2. 5. Les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones comme marqueurs de photo-affinités.....	203
3. Conclusion et perspectives	208
Références : Chapitre 4.....	210

Conclusion et Perspectives

I. Conclusion.....	215
II. Perspectives.....	217

Reuves

I. Revue 1: 5-Alkoxyoxazole - A Versatile Building Block in (Bio)organic Synthesis	218
II. Revue 2: Covalent modification of biomolecules through maleimide-based labeling stratégies.....	238

Partie expérimentale

I. General remarks:	257
1 Instruments and methods:	257
2 High- and low-pressure liquid chromatography separations:	258
2.1. High-pressure liquid chromatography separations for reaction	258
2.2. Semi-preparative high-pressure liquid chromatography and lowpressure liquid chromatography (with a Biotage® flash purification system) for purification steps:.....	258
II. Unpublished experimental data	259
1 <i>In vitro</i> enzymatic assays – fluorescence bioassays and photo-cross-linking experiments.....	259
2 Unpublished synthesized compounds	260
III. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles.	287

1. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 1: Fluorogenic behaviour of the hetero-Diels–Alder ligation of 5-alkoxyoxazoles with maleimides and applications	287
2. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 2 : Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules.....	304
3. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 3: Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols	318
4. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 4 : Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones.....	342
5. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 5: Photophysical properties of quinoxalin-2(1 <i>H</i>)-ones: application to the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection hydrogen sulfide	352
IV. Annexes.....	364

Introduction

I. Introduction à la ligation biocompatible

1. Concept général

Depuis quelques décennies, l'étude de systèmes biologiques complexes est un domaine en plein essor. Cherchant à pousser toujours plus loin leur compréhension du vivant, les biologistes sont à la recherche de nouvelles techniques afin d'avoir une visualisation toujours plus fine et précise de ces systèmes. C'est pourquoi, dans leur quête de savoir, un travail conjoint avec celui des chimistes a donné naissance à une nouvelle discipline transfrontalière appelée chémobiologie, de l'anglais « chemical biology ». Cette discipline a pour objectif la création d'outils chimiques qui permettent une observation des systèmes biologiques à l'échelle moléculaire pour, *in fine*, avoir une meilleure compréhension du vivant. Pour cela, les chimistes ont, entre autres, développés différentes réactions compatibles avec les milieux imposés par les systèmes biologiques (et donc, en particulier, avec des milieux aqueux à des pH et des températures ne dénaturant pas les biomolécules). Ces réactions sont généralement classées en deux catégories : les réactions de bioconjugaison et les réactions bio-orthogonales. Cependant, il semble nécessaire de mettre en lumière une troisième classe de réactions souvent confondue avec les réactions bio-orthogonales, il s'agit des réactions chimiosélectives. Ainsi, ces réactions peuvent être divisées en trois catégories :

- Les réactions de bioconjugaison : l'une des fonctions impliquées dans la ligation est naturellement présente dans la biomolécule ou le système biologique étudié (exemple : réaction entre le thiol d'un résidu cystéine et le maléimide)
- Les réactions bio-orthogonales : ces ligations sont réalisées dans les systèmes biologiques (cellule biologique, bactérie, petit animal) à partir de fonctions généralement synthétiques, non présentes dans les matrices biologiques. Cette caractéristique leur confère donc une réactivité orthogonale aux systèmes biologiques (exemple : réaction entre un azoture organique et un cyclooctyne, ces deux fonctions d'origine synthétique ne peuvent, en principe, pas réagir avec des biomolécules). Elles nécessitent en revanche l'introduction d'un reporteur chimique en amont sur la biomolécule à modifier.
- Les ligations chimiosélectives : ces réactions peuvent s'apparenter aux réactions bio-orthogonales car elles se réalisent également entre deux partenaires synthétiques non présents dans les matrices biologiques. Cependant, les ligations chimiosélectives se réalisent préférentiellement *in vitro* car, bien que sélectives, elles présentent un certain nombre de limitations qui ne leur permettent pas d'être réalisées dans des systèmes biologiques complexes contrairement aux réactions bio-orthogonales. Les caractéristiques limitantes peuvent être de différentes natures : a) la réaction présente un caractère réversible (exemples : ligation oxime et hydrazone dont les produits peuvent être hydrolysés; réactions de Diels-Alder réversibles, notamment entre le furane et le maléimide); b) la ligation nécessite l'emploi d'additifs ou catalyseurs cytotoxiques (exemple : la catalyse au Cu(I) de la CuAAC); c) l'une des deux fonctions réactives peut également réagir avec les biomolécules (exemple : cycloaddition de Diels-Alder impliquant le maléimide en tant que diénophile, car le maléimide est également un accepteur de Michael qui réagit avec les thiols); d) la réaction n'est pas réalisée dans des conditions strictement physiologiques de température, pH,

Introduction

pression etc... ; e) les constantes cinétiques pas suffisamment élevées ($\ll 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) pour pouvoir être utilisées dans les milieux biologiques, c'est-à-dire à faible concentration.

Ainsi, en fonction des besoins et du système à étudier, il convient de choisir la catégorie de réaction appropriée. En effet, les réactions de bioconjugaison permettent de modifier directement la biomolécule native, toutefois avec un manque de sélectivité du site modifié (par exemple, si une protéine présente plusieurs amines accessibles, une réaction de bioconjugaison utilisant un ester activé aura lieu avec une répartition plus ou moins statistique sur chacune de ces amines - l'environnement local pouvant avoir cependant une légère influence, notamment sur le pKa des fonctions et donc leur réactivité-).

En revanche, les réactions bio-orthogonales sont compatibles avec les systèmes biologiques et caractérisées par des constantes cinétiques élevées (entre 1 et $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Elles n'ont lieu que sur un site précis de la biomolécule qui a été modifiée au préalable pour y introduire une des deux fonctions réactives. Toutefois, la majorité des ligations bio-orthogonales manquent généralement de régio-, stéréosélectivité. Elles sont donc faiblement adaptées pour la préparation de bioconjugués qui nécessitent leur isolement par purification HPLC.

Enfin, les réactions chimiosélectives sont, comme les ligations bio-orthogonales, utilisées pour des modifications spécifiques de sites biologiques préfonctionnalisés par un partenaire de réaction. Néanmoins, contrairement aux ligations bio-orthogonales, les réactions chimiosélectives nécessitent souvent l'emploi d'un prétraitement de la biomolécule, afin de masquer les fonctions naturelles pouvant interférer au bon déroulement de la réaction (par exemple, le masquage des résidus cystéine par des iodo-acétamides). Certaines réactions chimiosélectives (la CuAAC ou la ligation oxime par exemple) présentent l'avantage de ne générer qu'une seule molécule à l'issue de la ligation. Cette particularité rend donc les ligations chimiosélectives complémentaires vis-à-vis des ligations bio-orthogonales. De plus, cela en fait des outils particulièrement adaptés pour la modification de petites biomolécules (tels que des peptides par exemple), ou, pour des applications en construction (bio)moléculaire complexe, impliquant plusieurs partenaires, *via* l'utilisation de réactifs hétéromultifonctionnels^[1].

2. Principe de la bioconjugaison

Suite à l'abondance et à la diversité des fonctions réactives naturellement présentes sur les biomolécules (peptides, protéines (enzymes, récepteurs, anticorps...), acides nucléiques, sucres), différentes réactions de bioconjugaison ont été développées^[2]. Les produits de bioconjugaison peuvent servir, par la suite, à élucider la structure,^[3] étudier le rôle des biomolécules ou suivre leur devenir dans les milieux biologiques^[4,5]. Par souci de cohérence avec les travaux présentés tout au long de ce manuscrit, cette étude bibliographique sera restreinte à la modification de peptides et de protéines.

Introduction

2. 1. Modification des chaînes latérales des résidus d'acides aminés

Les réactions de bioconjugaison sont réalisées directement avec les fonctions naturellement présentes sur la biomolécule étudiée. Les fonctions les plus utilisées des protéines sont celles des chaînes latérales des acides aminés^[6]. La grande variété de fonctions issues des acides aminés a généré un grand nombre d'entités chimiques pouvant réagir spécifiquement avec un des acides aminés en particulier. Parmi les acides aminés sollicités, nous retrouvons principalement : le résidu cystéine et sa fonction thiol, le résidu lysine et sa fonction amine, le résidu tryptophane et son indole, la tyrosine et son phénol, le résidu arginine et sa guanidine, le résidu histidine et son imidazole, le résidu méthionine et la fonction thio-éther, les résidus sérine et thréonine et leur fonction alcool et enfin les résidus acides aspartique et glutamique et leur fonction acide carboxylique (Figure 1). De façon plus contrôlée, mais impliquant en général une seconde réaction de bioconjugaison (voir paragraphe suivant), les extrémités C et N terminales de la chaîne polypeptidique peuvent également être utilisées, ou modifiées, par les réactions ciblant les acides aspartiques et glutamiques d'une part, et les chaînes latérales des lysines d'autre part. Quelques exemples de réactions de bioconjugaison utilisent également les fonctions issues des modifications post-synthétiques des protéines, comme les oligosaccharides des glycoprotéines.

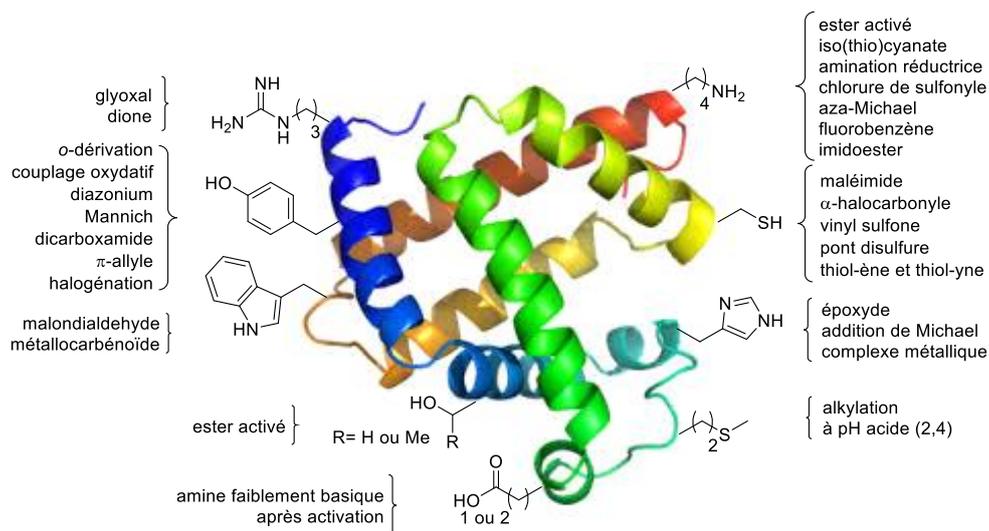


Figure 1 : Résumé des réactions de bioconjugaison et fonctions chimiques cibles portées par les peptides et protéines

La cystéine est l'un des résidus les plus couramment ciblés en bioconjugaison. Le pKa du couple thiol/thiolate de cet acide aminé étant d'environ 8^[7], la forme thiolate est donc présente à hauteur de 10% dans un milieu dont le pH se situe au voisinage de 7, ce qui en fait une des fonctions les plus réactives dans ces conditions^[8]. Il réagit *via* différents processus chimiques, à savoir : a) par réaction d'addition de Michael sur les maléimides et autres accepteurs de Michael^[9-12] du type vinyl sulfones^[13] ou aryl propionitriles^[14] ; b) par substitution nucléophile aromatique avec les méthyl arylsulfones^[15] ; c) par substitution nucléophile sur les composés α -halocarbonylés^[16-18] ; d) par réaction sur les ponts disulfures^[19] ; e) par réaction thiol-ène^[20] et thiol-yne^[21].

Introduction

Le résidu lysine est également une cible de choix de par la présence de sa fonction amine très réactive, mais également, par son abondance naturelle dans les protéines. En effet, la lysine représente 5,9% des résidus dans les protéines humaines contre 1.9% pour la cystéine^[7], laquelle est fréquemment engagée dans un pont disulfure. Il faut ensuite le réduire en utilisant du DTT ou une phosphine de type TCEP pour libérer le thiol réactif, au risque de perturber le repliement de la protéine. De nombreuses réactions chimiosélectives des amines ont été développées. On peut ainsi citer les esters activés comme les esters de N-hydroxysuccinimide par exemple,^[22,23] les isocyanates et les isothiocyanates,^[24] les chlorures de sulfonyles,^[25] les fluorobenzènes,^[26-28] les imidoesters,^[29,30] la réaction d'amination réductrice^[31,32] et la réaction d'aza-Michael^[33]. De plus, il est important de noter que ces réactions doivent être réalisées à un pH basique puisque le pKa des résidus lysine présents au sein de protéines est généralement compris entre 7,5 et 10. En effet, il faut déprotoner les ammoniums non réactifs afin de générer des amines nucléophiles. Ce domaine de pH prend tout son intérêt dans le cadre des réactions d'aza-Michael réalisées avec le 2-((methylsulfonyl)methyl)acrylate d'éthyle^[33]. C'est pourquoi, pour des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 8,5, on observe une compétition entre l'aza- et la thio-Michael. Malgré cela, la présence de sulfone va stabiliser le produit issu de la réaction d'aza-Michael par liaisons hydrogènes, ce qui va favoriser la bioconjugaison sur les résidus lysines. Dans le cadre des réactions avec les esters activés, la réaction de formation de la liaison amide est en compétition avec l'hydrolyse de l'ester activé par les molécules d'eau présentes dans le milieu ; ceci limite la gamme de pH accessible, et peut nécessiter l'utilisation d'un excès d'acide activé, ce qui ne permet pas de contrôler efficacement la stœchiométrie de la réaction de bioconjugaison.

L'arginine est le résidu le plus basique de tous les acides aminés avec un pKa d'environ 12. Il est généralement présent sous forme protonée ce qui en fait un mauvais nucléophile. Cependant, en fonction de la nature des résidus voisins, il peut être partiellement déprotoné et donc être réactif^[34]. Toutefois, peu de réactifs ont été mis au point pour réagir spécifiquement avec ce résidu. En effet, seuls les dérivés de 1,2-dione^[35] et de glyoxal^[36,37] permettent de réaliser une ligation avec la guanidine.

Le résidu tyrosine est très réactif de par la présence de sa fonction phénol. Cette dernière lui permet de réagir spontanément par réaction de substitution électrophile aromatique sur les dérivés de sel de diazonium^[38,39] ou les azodicarbonamides^[40] tels que le PTAD par exemple. Cette fonction phénol peut également être engagée dans d'autres réactions de S_eAr^[41], des dérivations en position *ortho*^[42,43] comme la réaction de Mannich,^[44,45] des couplages oxydatifs^[46-47] ou encore *via* des complexes de type π -allyles^[48]. Enfin, on retrouve également des réactions d'halogénéation en position *ortho* de la fonction phénol du résidu tyrosine (très utilisées pour les radiomarquages à l'iode). Une fois introduits par S_eAr, les halogènes peuvent ensuite être engagés dans des réactions pallado-catalysées en milieu aqueux. C'est le cas, par exemple, du couplage de Suzuki-Miyaura^[49].

Le résidu histidine est le seul résidu dont la valeur du pKa de 6,8 se situe dans la gamme physiologique. Cela veut donc dire qu'il existe, à la fois, sous forme acide et basique^[50]. La capacité de ce résidu à transférer un proton à pH physiologique en fait un résidu très important et très présent dans les sites catalytiques des enzymes, en participant, entre autres, aux triades catalytiques des hydrolases à sérine ou cystéine. De plus, une modification de ce résidu entraîne souvent une chute de l'activité biologique de la protéine. Nonobstant, quelques partenaires de bioconjugaison ont été

Introduction

développés. C'est le cas de dérivés d'époxide qui nécessitent des conditions de ligations assez rudes ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 11-12$)^[51,52]. Les complexes de métaux de transition tels que les complexes d'iridium ont été réalisés à l'aide d'un résidu histidine (*via* la fonction amine et imidazole d'une histidine située en N-terminale), voire de deux résidus histidines d'une même séquence peptidique ou protéique^[53]. De plus, l'utilisation de complexes de nickel a fait ses preuves pour le marquage d'étiquettes de type poly-histidine comportant 2, 4 ou 6 résidus^[54]. Enfin, il est possible de réaliser des additions de Michael sur des dérivés d'aldéhydes insaturés. Cependant, cette dernière approche n'est pas sélective des résidus histidine puisqu'une réaction avec les résidus lysine a également été observée à $\text{pH} 7,4$ ^[55,56].

Le résidu tryptophane se distingue des autres par sa faible abondance (1%)^[18] qui est proche de celle du résidu cystéine, ainsi que par ces propriétés photophysiques. En effet, il possède une absorbance caractéristique à environ 280 nm qui s'accompagne d'un phénomène de fluorescence avec une émission à environ 360 nm. Toutefois, ce résidu est peu sollicité dans les approches de bioconjugaison, puisque, seul les malondialdéhydes^[57] et les metallocarbenoïdes^[58] peuvent réagir avec lui.

Les résidus sérine et thréonine sont également peu sollicités pour la bioconjugaison suite à une valeur trop élevée du pKa du couple ROH/RO⁻ (supérieure à 13), ce qui les rend très peu nucléophiles à pH physiologique. Néanmoins, une fonctionnalisation est possible par des ester de N-hydroxysuccinimides.^[59] Ce réactif généralement utilisé avec les résidus lysine, peut être utilisé pour fonctionnaliser les résidus sérine et thréonine à condition que ces derniers se situent à côté (à environ deux acides aminés d'écart) d'un résidu histidine ou arginine.^[51] En effet, ces résidus basiques vont venir activer les fonctions alcools, probablement, par la mise en jeu d'une liaison hydrogène entre les deux résidus d'acides aminés, et ainsi, augmenter la réactivité des résidus sérine et thréonine à un niveau proche des résidus lysine. Toutefois, la ligation ne sera pas sélective par rapport aux lysines, et la fonction ester créée est plus fragile que la liaison amide obtenue avec les amines.

Le résidu méthionine est également peu sollicité par les réactions de bioconjugaison. Pourtant, il est le seul résidu nucléophile ne subissant pas de protonation jusqu'à des pH très acides (2,4)^[60], ce qui permet à de telles valeurs de pH, de procéder à des alkylations spécifiques de ce résidu^[61], mais les sulfoniums, ainsi formés, sont également assez fragiles.

Enfin, les résidus acides aspartiques et glutamiques sont, de par leur faible réactivité, difficiles à conjuguer. La technique utilisée à ce jour, consiste à activer leur fonction acide carboxylique à l'aide d'agents de couplage comme les carbodiimides (surtout l'EDCi pour sa bonne solubilité dans l'eau)^[62,63] ou le N-éthyl-5-phénylisoxazolium-3'-sulfonate, appelé également réactif de Woodward^[64] lui aussi hydrosoluble. Ensuite, il est important de réaliser le couplage peptidique avec des amines faiblement basiques afin que la réaction puisse être réalisée à un pH inférieur à 8 et d'éviter ainsi la réaction de couplage avec les résidus lysine de la protéine elle-même. C'est pour cette raison que ce couplage est souvent réalisé avec des dérivés d'hydrazides faiblement basiques^[65].

2. 2. Modification en position N-terminale et C-terminale

2.2.1. Modification en position N-terminale

Les modifications en position N-terminale reposent sur la réactivité de la seule amine primaire présente au sein de la chaîne principale d'un peptide ou d'une protéine. Cette particularité, fait que la réactivité de cette amine sera conditionnée par la présence d'une liaison amide en position α , mais dépendra également de la nature de la chaîne latérale.

Tout d'abord, la présence d'une liaison amide en position α , a pour effet de diminuer le pKa (à environ 8) de l'amine en position N-terminale par rapport à celui de l'amine présent sur les chaînes latérales des résidus lysine (environ 10). Cette particularité, permet donc la fonctionnalisation sélective de l'amine de la position N-terminale malgré un excès de réactif (5 éq.) à un pH de 6,5 et à basse température (4 °C). Cette approche a notamment permis la modification de peptides^[66] ou de protéines^[67].

L'amine en position N-terminale peut également être engagée dans des réactions de transamination. Ces réactions se réalisent à l'aide d'un aldéhyde en milieu modérément acide (pH 5-6,5) et sous activation thermique (65 -100 °C). les transaminations se réalisent selon le mécanisme du Schéma 1, c'est-à-dire, à partir d'aldéhydes activés par la présence d'ion métallique (Mn^{2+} , Cu^{2+} ou Ni^{2+})^[68], ou du pyridoxal^[69]. A l'issue de la réaction une cétone est générée. Dans le cas où le résidu en position N-terminale est une glycine, un aldéhyde est obtenu et ce dernier a notamment été utilisé dans le cadre d'une ligature oxime^[69] (voir page 26).

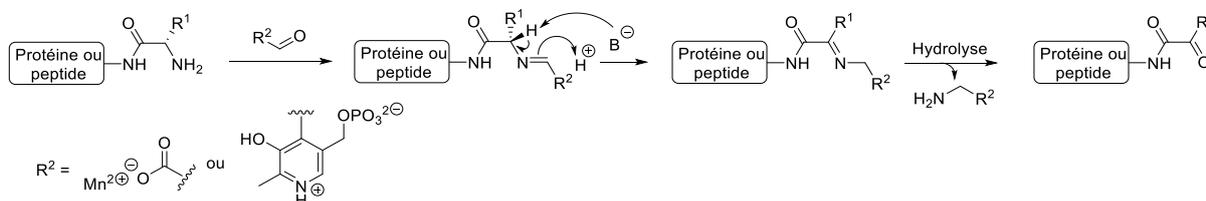


Schéma 1 : Mécanisme de la réaction de transamination en position N-terminale.

Un aldéhyde peut également être obtenu en position N-terminale par oxydation d'un résidu sérine ou thréonine, à l'aide du periodate de sodium ($NaIO_4$). L'aldéhyde ainsi généré peut alors être utilisé en ligature oxime ou hydrazone (voir page 26)^[70] ou de formation de thiazolidine^[71]. Cette méthode a été utilisée pour de la modification de peptides et de protéines (Schéma 2). Cependant, l'utilisation d'un oxydant puissant ($NaIO_4$) peut induire des réactions d'oxydation sur d'autres résidus (méthionine, tryptophane, histidine). Ces réactions parasites peuvent être évitées en diminuant le ratio molaire oxydant/protéine^[70] ou en réalisant la réaction à pH neutre^[71]. En revanche, cette méthode fournit un aldéhyde particulièrement réactif, lié à l'effet électroattracteur du carbonyle voisin, les ligatures oximes ou hydrazones sont donc plus rapides.

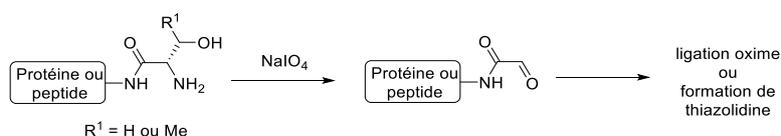


Schéma 2 : Oxydation de la position N-terminale au periodate de sodium

Introduction

Les résidus sérines et thréonines en position N-terminale peuvent également être impliqués dans une autre bioconjugaison. En effet, en présence d'un aldéhyde en milieu acide (pH 4-5) la formation d'une oxazolidine est observée. Cette approche a été utilisée pour de la modification de peptides^[72] ou pour la ligation de deux peptides entre eux^[73]. Le même type de réaction peut être réalisé en présence d'une cystéine toujours en position N-terminale et dans la même gamme de pH. La formation de la thiazolidine, ainsi obtenue, a permis la modification de peptides^[74], ou la formation de conjugués médicament-anticorps^[75] (Schéma 3). De plus, il est important de noter que la formation de thiazolidines, *via* une cystéine en position N-terminale, peut également être réalisée avec les 2-cyanobenzothiazoles à un pH de 7,4, à température ambiante en 30 min. Cette approche qui permet de former *in situ* un analogue de Luciférine, a notamment permis le marquage de protéine^[76].

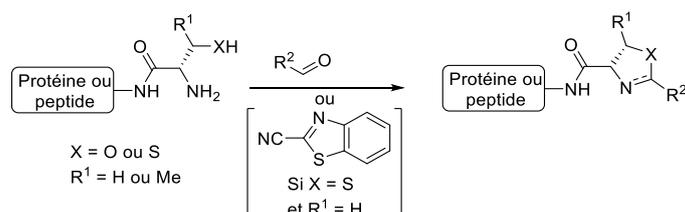


Schéma 3 : Principe de la formation d'oxazolidines et de thiazolidines en position N-terminale

Les résidus cystéine présents en position N-terminale peuvent également être utilisés dans des approches NCL (de l'anglais « Native Chemical Ligation »). La NCL a été découverte par Kent dans les années 1990 et le principe en est le suivant : il s'agit de générer un lien covalent entre deux peptides non protégés par le biais de fonctions réagissant spécifiquement l'une avec l'autre sans interférences des autres fonctions portées par les peptides^[77]. Ainsi en 1994, le groupe de Kent rapporte une NCL entre un peptide comportant une fonction thioester en C-terminal et, un autre comportant un résidu cystéine présent en position N-terminale. A la suite d'une trans-thioestérification, un transfert intramoléculaire S → N se réalise, permettant la formation d'un lien peptidique naturel et stable^[78] (Schéma 4). De plus, la même réaction peut également être réalisée avec un résidu histidine en position N-terminale^[79]. De nombreuses optimisations de ce procédé ont été répertoriées, notamment en utilisant un rapporteur chimique en lieu et place du peptide porteur de la fonction thioester. Cependant, cette stratégie de bioconjugaison nécessite la présence d'une cystéine accessible en N-terminale de la protéine à bio-conjuguer, ce qui limite son utilisation.

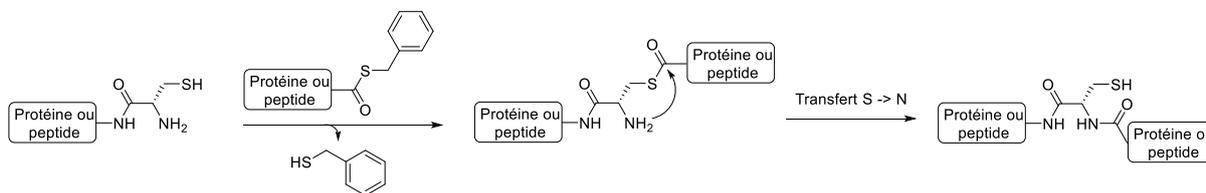


Schéma 4 : Principe de la NCL.

2.2.2. Modification en position C-terminale

Contrairement à la position N-terminale, les techniques de modifications de la position C-terminale sont peu nombreuses. On retrouve essentiellement les méthodes utilisées avec les résidus d'acide aspartique et glutamique, à savoir un couplage peptidique à la suite de l'activation de la fonction

Introduction

acide carboxylique (voir page 23). Néanmoins, cette méthode ne se révèle pas sélective de l'acide carboxylique en position C-terminale.

Avec le plein essor de la NCL, des méthodes sélectives permettant de générer un thioester en position C-terminale ont été développées, permettant ainsi de réaliser une ligation avec un résidu cystéine terminal ou une hydroxylamine^[80].

En conclusion de ce paragraphe sur les réactions de bioconjugaison, on peut dire que bien que ces réactions soient très utilisées, il est toutefois difficile de contrôler parfaitement le marquage d'une protéine par exemple. En effet, les réactions de bioconjugaison manquent de sélectivité par rapport au site à modifier, l'acide aminé ciblé étant présent en plusieurs exemplaires dans la protéine. C'est pourquoi, une nouvelle classe de réactions, appelée conjugaison chimiosélective, a été développée pour réaliser de telles modifications ciblées.

3. Principe de la conjugaison chimiosélective

3.1. Définition

Les réactions de conjugaison chimiosélective impliquent l'utilisation de deux fonctions réactives complémentaires, dont l'une des deux au moins est présente sur une biomolécule. Cette dernière fonction est préalablement introduite sur le biopolymère par voie chimique, enzymatique, métabolique (même si cette introduction est principalement réservée aux dérivés de polysaccharides), ou encore génétique^[81,82]. Ces réactions ont bien sûr pour vocation de modifier des protéines mais aussi et surtout d'autres biomacromolécules comme les polysaccharides et les acides nucléiques qui ne possèdent pas de fonctions chimiques réactives permettant de faire des réactions de bioconjugaison sélectives. C'est notamment le cas pour les protéines, mis à part quelques rares exceptions (extrémités 5' et 3' des acides nucléiques, diols syn présents sur certains sucres en utilisant des acides boroniques ou des carbonyles pour former des acétals cycliques^[83]). Les réactions qui seront abordées ci-après rentrent bien souvent dans le répertoire des réactions de la chimie click. De plus, les applications présentées par la suite seront restreintes aux peptides et aux protéines, sauf quelques cas présentant un intérêt sur d'autres bio-molécules. Contrairement aux réactions bioorthogonales qui seront développées dans le paragraphe suivant, ces réactions chimiosélectives présentent en revanche, quelques limitations ne permettant pas de les utiliser systématiquement dans des milieux biologiques complexes.

3.2. Exemples de ligations chimiosélectives

3.2.1. Les réactions de condensation sur les carbonyles

La première réaction de condensation, est la formation d'imines à partir d'amines sur des carbonyles (Schéma 5 A). Or, cette condensation se révèle particulièrement réversible en milieu aqueux à pH physiologique, ce qui rend difficile son utilisation pour des applications en ligation^[84]. Pour pallier cette limitation, une méthode d'amination réductrice peut être utilisée, mais elle nécessite

Introduction

l'utilisation de réducteurs externes^[85] (NaBH_4 ou NaBH_3CN par exemple). Dans ce contexte, l'une des premières réactions développées a été la réaction de condensation d'hydrazines, d'hydrazides ou d'alkoxyamines, sur des dérivés carbonylés pour conduire aux hydrazones ou oximes correspondantes, qui sont plus stables que les imines en conditions physiologiques^[86-88] (Schéma 5 B). Toutefois, les dérivés d'aldéhydes et de cétones utilisés pour ce genre de réaction se révèlent sensibles aux amines. Ceci peut être limité en réalisant cette ligation à pH acide. De même, la faible cinétique de la réaction ($10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[89] et sa réversibilité font que cette ligation n'est pas bio-orthogonale. Cette approche a notamment permis d'introduire la fluoescéine hydrazine, spécifiquement, sur le lysozyme pré-fonctionnalisé par un acide aminé, non naturel, comportant une fonction cétone, obtenue par mutagénèse dirigée^[87]. D'autres approches permettant de générer une fonction aldéhyde (ou cétone) en position N-terminale par oxydation ou transamination ont également été développées (voir page 24).

Alternativement, des réactions tandems condensation-cyclisation intramolécule de type Pictet-Spengler ont été, par la suite, développées afin d'éviter les réactions d'hydrolyse observées avec les conjugués hydrazone ou oxime (Schéma 5 C). Ces réactions sont réalisées avec des dérivés de tryptophane^[90], ou d'indole comportant une fonction alkoxyamine^[91] ou encore hydrazine^[92]. Elles ont été utilisées pour la modification de protéines et d'anticorps, ainsi que le marquage de bactéries^[93]. Plus récemment, d'autres partenaires réactifs vis-à-vis des aldéhydes ont été utilisés, comme les pyrazolones, afin de substituer les indoles peu réactifs. Ces hétérocycles réagissent *via* une première réaction de condensation de Knoevenagel avec les aldéhydes pour conduire à des accepteurs de Michael qui peuvent alors réagir soit: a) par addition de Michael intermoléculaire en présence d'un deuxième équivalent de pyrazolone, permettant finalement l'introduction de deux motifs identiques^[94] (Schéma 5 D); b) par une réaction de thio-Michael intramolécule dans le cas de pyrazolones fonctionnalisées par un groupement thiol^[89,95] (Schéma 5 E). Cette approche a été utilisée pour la préparation de protéines et d'anticorps modifiés par une fonction aldéhyde incorporée grâce à la formylglycine, afin d'obtenir des conjugués d'anticorps-médicaments.

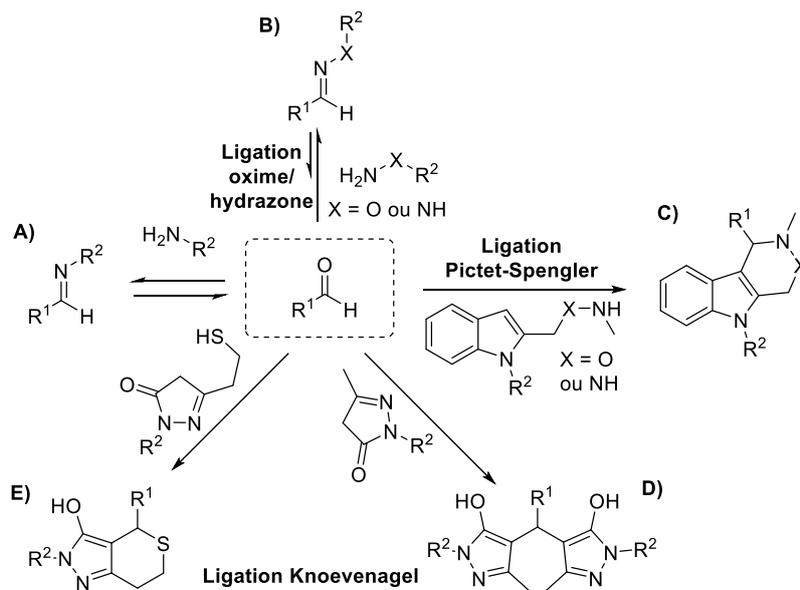


Schéma 5 : Résumé des ligations chimiosélectives par condensation avec des carbonyles

Introduction

Les partenaires carbonylés sont susceptibles de subir également des réactions de condensation avec les nombreuses fonctions amines présentes dans les protéines, comme les résidus lysines^[96]. Ces réactions doivent préférentiellement être menées à des pH légèrement acides, pour conserver les amines des lysines sous forme majoritairement protonnées. Par conséquent, d'autres classes de réactions chimiosélectives ont été développées.

3.2.2. La réaction entre les nitrosos aromatiques et les acides sulfiniques

Une autre classe de réactions chimiosélectives peut être représentée par les réactions d'addition nucléophile des acides sulfiniques sur des dérivés de nitrosos aromatiques. En effet, le groupe de Carroll a montré que les acides sulfiniques présentent un caractère nucléophile, et peuvent s'additionner sur les fonctions nitrosos. Il s'avère cependant, que cette addition est réversible. Ce problème de réversibilité peut être pallié par la présence d'une fonction ester en *ortho* de la fonction nitroso, qui permet de rendre la réaction irréversible par cyclisation intramoléculaire (Schéma 6). Ensuite, la biocompatibilité de la réaction a été établie en présence de divers bio-analytes comme des acides aminés, ou des espèces nucléophiles comme le glutathion par exemple^[97]. Cette réaction a ensuite été utilisée afin d'identifier la sulfinylation de protéines par spectrométrie de masse^[98]. Les acides sulfiniques sont obtenus par oxydation d'une fonction thiol avec H₂O₂. Malgré cela, le stress oxydatif présent au sein des cellules peut également générer ce type de fonction au sein des protéines limitant la bio-orthogonalité de la réaction.

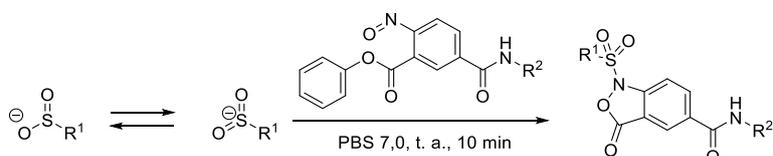


Schéma 6 : Réaction chimiosélective entre les acides sulfiniques et les nitroso aromatiques

3.2.3. Les réactions de cycloaddition [4+2] et [3+2].

3.2.3.1. Les réactions de cycloaddition [4+2]

Les réactions de Diels-Alder, ont été découvertes en 1928 par deux chimistes allemands, Otto Diels et Kurt Alder. Ces réactions sont également appelées cycloaddition [4+2] car elles s'effectuent entre un diène, comportant 4 électrons π , et un diénophile comportant, lui, 2 électrons π . De plus, elles permettent de générer un cycle carboné à 6 chaînons. De plus, ce sont des réactions présentant une économie atomique parfaite (Schéma 7).

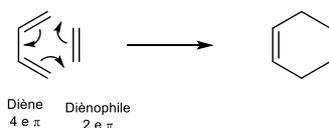


Schéma 7 : Principe général des cycloaddition [4+2]

Introduction

Ces réactions de cycloaddition [4+2] sont soumises à un contrôle orbitalaire, ce qui entraîne généralement la formation majoritaire du stéréoisomère endo lorsque le diène est cyclique, même si des mélanges sont souvent observés. On justifie fréquemment cette sélectivité par des considérations frontalières secondaires stabilisant l'approche endo. Les cycloadditions [4+2] se font de façon plus spontanées lorsqu'un rapprochement des niveaux énergétiques des HOMO et LUMO des deux partenaires est observé. Ainsi, il est possible de les classer en deux catégories. On retrouve donc les cycloadditions [4+2] à demande électronique normale et inverse. Les cycloadditions [4+2] à demande électronique normale se réalisent entre des diènes riches en électrons et des diénophiles pauvres en électrons. On observe donc une augmentation du niveau énergétique de la HOMO du diène électroniquement enrichis et une diminution du niveau énergétique de la LUMO du diénophile électroniquement appauvris, ce qui permet de faciliter la réaction par rapprochement des niveaux énergétiques HOMO du diène et la LUMO du diénophile. A l'inverse, Les cycloadditions [4+2] à demande électronique inverse se réalisent entre des diènes électroniquement pauvres en électrons et des diénophiles électroniquement riches en électrons. On observe donc une augmentation du niveau énergétique de la LUMO du diène appauvris et une augmentation du niveau énergétique de la HOMO du diénophile enrichis, ce qui permet de faciliter la réaction par rapprochement des niveaux énergétiques LUMO du diène et la HOMO du diénophile (Figure 2).

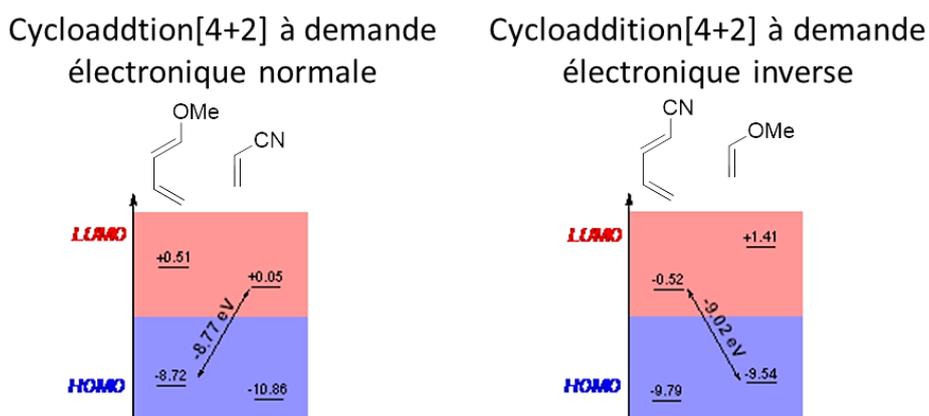


Figure 2 : Principe général des cycloadditions [4+2] à demande électronique normale et inverse

La réaction de Diels-Alder à demande électronique normale (c'est-à-dire, entre un diène riche en électrons et un diénophile appauvri en électrons) est l'une des premières réactions développées en chimie sélective. Il est important de noter que les diénophiles appauvris utilisés sont également des accepteurs de Michael sensibles à l'addition de thiols, ce qui rend cette réaction non bio-orthogonale. Elle peut cependant être chimiosélective si la cinétique de la réaction de cycloaddition est supérieure à celle de l'addition de Michael. Le maléimide est un des diénophiles les plus utilisés. En effet, les travaux pionniers du groupe de Jäschke en 1997, ont montré une première utilisation de cycloaddition [4+2] pour la modification site-spécifique d'ARN^[99]. Cette réaction entre l'antracène et le maléimide s'est même révélée compatible avec les conditions de SPOS (de l'anglais « solid-phase oligonucleotide synthesis »). Le maléimide^[9] est devenu, par la suite, le diénophile le plus utilisé pour sa grande réactivité avec des diènes de différentes natures, malgré sa sensibilité vis-à-vis des thiols, qui ne permet pas d'effectuer des réactions à proprement parler bio-orthogonales. Par ordre chronologique d'utilisation, on trouve les diènes suivants : l'antracène^[99], le butadiène^[100,101], le cyclohexadiène^[102], le furane^[103-105], le cyclopentadiène^[60] et le

Introduction

5-éthoxyoxazole^[107]. De plus, la réaction avec les 5-éthoxyoxazoles est la seule qui soit irréversible puisque la réaction de retro [4+2], possible dans tous les autres cas, se révèle impossible suite à une étape d'élimination-aromatisation. D'autres dérivés plus spécifiques ont également été développés comme une guanine modifiée pour une utilisation en SPOS^[108], ou encore des aldéhydes photoénolisables^[109,110] (Schéma 8).

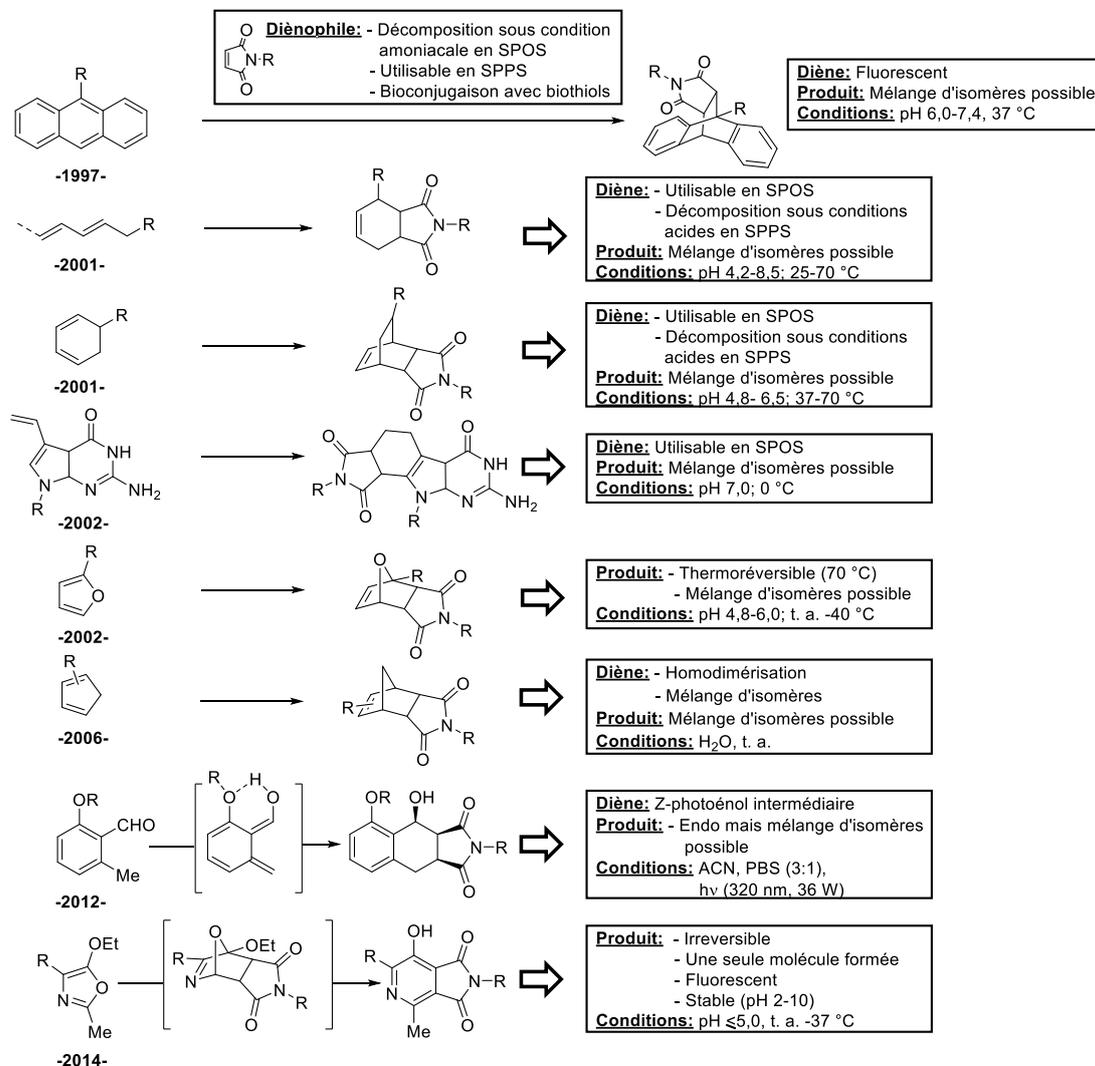


Schéma 8 : Résumé des ligations chimiosélectives de type [4+2] décrites avec le maléimide.

En 2014, Samoshin *et al.* ont également développé une réaction chimiosélective entre le cyclopentadiène et un dérivé nitroso comme diénophile, généré *in situ*^[111]. Cette réaction a été utilisée afin de lier, de manière site spécifique, deux polymères, de nature différente, entre eux.

3.2.3.2. Les réactions cycloaddition [3+2]

Les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire sont également beaucoup utilisées en ligation chimiosélective, la plus connue étant la réaction de Huisgen découverte par Michael à la fin du 19^{ème} siècle^[112]. A l'origine, cette réaction qui met en jeu un alcyne terminal avec un azoture, était réalisée

Introduction

sous activation thermique pour conduire à un mélange de 1, 2, 3-triazoles *syn/anti*. Le mécanisme de cette réaction péricyclique a été établi bien plus tard par Huisgen^[113]. L'utilisation d'un catalyseur au cuivre (I) conduisant, à température ambiante et avec des cinétiques acceptables, régiosélectivement au triazole *anti*, a ensuite été proposé indépendamment par Meldal^[114] et Sharpless^[115,116] au début des années 2000. Cette réaction est plus connue sous le nom de CuAAC (Copper catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition). Bien que celle-ci soit utilisée pour de la modification de protéines^[117], d'ARN^[118] ou même d'ADN^[119], l'utilisation du cuivre qui se révèle être particulièrement cytotoxique à forte dose pour les cellules bactériennes et mammifères. Cela limite donc son utilisation au sein de systèmes biologiques complexes^[120] (Schéma 10), et, par la même occasion, sa bio-orthogonalité *stricto sensu*. Cependant, il est important de noter que le cuivre est naturellement présent dans les cellules, étant donné qu'il s'agit d'un oligoélément essentiel pour l'homme. La dose journalière admissible (DJA) pour l'homme est de 0,15 mg/kg de poids corporel/jour (Valeurs données par l'ANSES « Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail »)

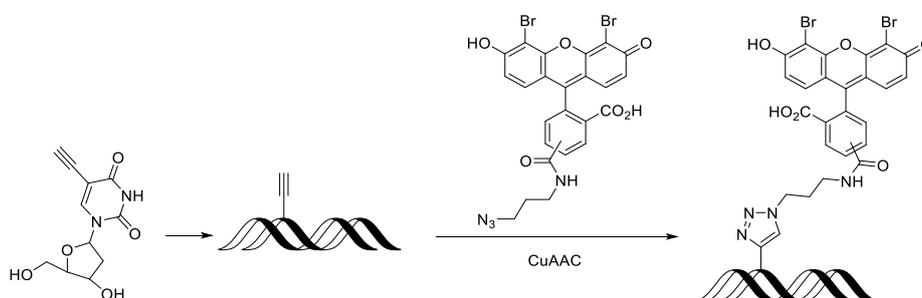


Schéma 9 : Réaction CuAAC sur un double brin d'ADN développée par le groupe de Van Kasteren en 2016^[119]

Plus récemment, une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire photoinduite entre des dérivés tétrazoles et différentes oléfines conduisant aux pyrazolines correspondantes, a été rapportée (Schéma 10). Cette réaction met en jeu la formation d'un nitrile imine intermédiaire capable de réagir indifféremment avec des alcènes riches^[121] ou pauvres^[122,123] en électrons. Néanmoins, une étude récente a mis en évidence que le nitrile imine, formé après activation photochimique, est également capable de réagir avec de nombreux nucléophiles présents au sein des systèmes biologiques tels que : les thiols, les amines, ou les carboxylates^[124]. La cinétique de la réaction avec l'alcène doit donc être plus rapide, pour que cette réaction de bio-conjugaison puisse être utilisée dans des milieux biologiques complexes, ce qui limite son utilisation et sa bio-orthogonalité.

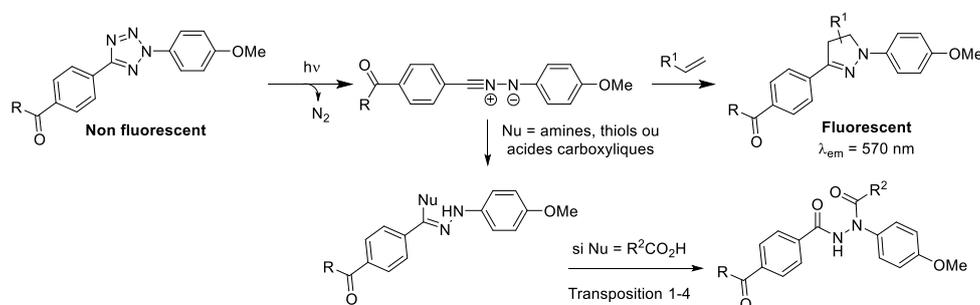


Schéma 10 : Cycloaddition photoinduite entre les tétrazoles et alcènes^[120].

Introduction

Les réactions de bioconjugaison et de conjugaison chimiosélective, susmentionnées, sont généralement limitées à des applications de fonctionnalisation *in vitro* ou à l'élaboration de réactifs hétérotrifonctionnels aux applications multiples^[1]. Toutefois, pour des applications en milieu biologique complexe, comme les cellules ou les organismes vivants par exemple, il faut travailler avec des réactions dites « bio-orthogonales » ; c'est-à-dire, des réactions qui n'interfèrent pas de manière significative avec le système biologique considéré.

4. Principe de la ligation bio-orthogonale

4.1. Définition

Comme leurs noms l'indique, les réactions bio-orthogonales sont des réactions qui ne doivent pas, autant que possible, interférer avec les fonctions réactives contenues dans les milieux biologiques telles que les amines, les thiols, ni même avec les processus biologiques comme par exemple les cycles catalytiques des différentes enzymes. De plus, il est préférable que les partenaires de réaction soient de petites tailles, faciles à synthétiser, et que la réaction de conjugaison ne dégage pas de sous-produits toxiques. Enfin, la réaction doit-être rapide à l'échelle des processus biologiques. Le développement des telles réactions^[125] a permis une meilleure compréhension des systèmes biologiques au cours des dernières années grâce au marquage de biomolécules réalisé *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*.

Le marquage bio-orthogonal procède en deux temps. Il y a tout d'abord l'introduction d'un *reporter* chimique dans le milieu biologique, qui peut se faire par une réaction de bioconjugaison chimique. Néanmoins, ce *reporter* est, préférentiellement, introduit par une autre méthode de type enzymatique, métabolique ou encore génétique (*vide infra*). Cette introduction du *reporter* est suivie, dans un deuxième temps, de l'ajout du deuxième partenaire qui réalise alors la ligation spécifique du marqueur souhaité; celle-ci étant réalisée avec la fonction introduite précédemment, sans que les autres constituants de la cellule n'interfèrent.

4.2. Introduction du *reporter* chimique

Le marquage sélectif et site spécifique des protéines est essentiel pour étudier la structure, l'activité, la localisation et le trafic des protéines. Au cours de la dernière décennie, une grande variété de rapporteurs bio-orthogonaux ont été incorporés dans des biomolécules, voire des cellules, par voie chimique ou biologique^[126].

La première approche pour l'introduction d'un *reporter* consiste à modifier chimiquement la molécule, ou biomolécule d'intérêt. Cette stratégie se divise en trois techniques :

- La première utilise une réaction de bioconjugaison permettant d'introduire un *reporter* sur la biomolécule cible. Cette méthode a, par exemple, été utilisée par le groupe Weissleder en 2009, en introduisant un *trans*-cyclooctène (TCO) sur les résidus lysine d'un anticorps *via* une fonction ester de NHS^[127] (Schéma 10 A).

Introduction

- La deuxième technique consiste à introduire le *reporter* sur une entité moléculaire ciblant spécifiquement l'analyte biologique visé. Cette approche a été, entre autres, appliquée à des phospholipides modifiés par un cyclopropène, préparés chimiquement en vue d'imager la membrane de cellules vivantes^[128] (Schéma 10 B).

- La troisième technique consiste à générer chimiquement des oligonucléotides, des peptides ou encore des protéines comportant le *reporter*. Ces biopolymères ont été respectivement préparés par synthèse sur support solide SPOS et SPPS. Des oligonucléotides ont été modifiés par des fonctions norbornène^[129], TCO^[130], ou tétrazine^[131] et ont permis le marquage par fluorescence de brin d'ADN (Schéma 10 C). La SPPS repose, quant à elle, sur des acides aminés non-canoniques (ncAAs) comportant le *reporter* (Schéma 11 D), ce qui a permis, par exemple, l'inhibition de la dimérisation de la protéine EGF.^[132]

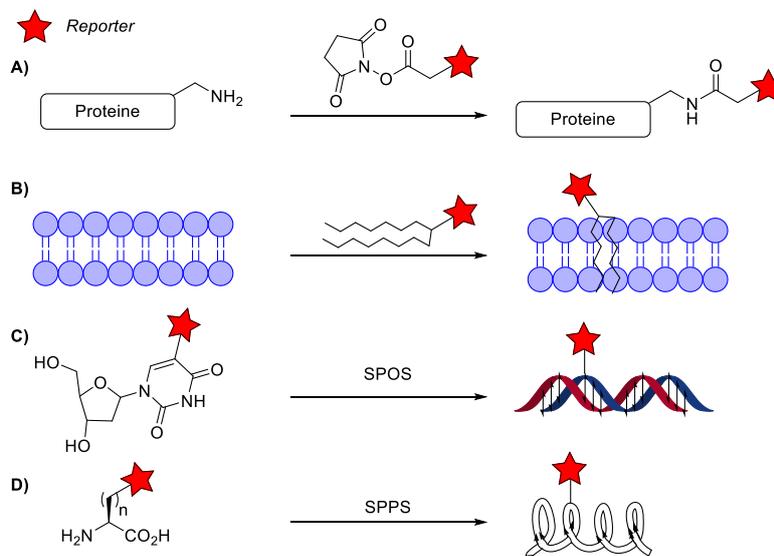


Schéma 11 : Approche générale d'un *reporter* par voie chimique

D'autres stratégies alternatives aux modifications chimiques ont été rapportées pour pallier les limites de cette approche. Ainsi l'incorporation par voie biologique permet une modification de la biomolécule étudiée, bien plus ciblée que dans le cas d'une approche par voie chimique. L'approche par voie biologique peut permettre donc un marquage « site spécifique », ce qui est difficile à obtenir avec l'approche chimique (hormis pour les approches supportées). On retrouve ainsi par ordre chronologique, les techniques d'expansion du code génétique utilisant aussi les ncAAs, l'incorporation métabolique de glycans modifiés et l'insertion par voie enzymatique.

- L'expansion du code génétique consiste en l'utilisation d'une paire aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS)/ARN de transfert (ARNt) pour insérer un ncAA dans la chaîne protéique en croissance en réponse à un codon stop (principalement le codon ambre UAG) sur l'ARNm (Figure 3). Cette stratégie a permis l'introduction de ncAAs possédant des azotures, des alcynes ou encore des tétrazines, au sein de cellules vivantes, de bactéries *E. Coli*, ou d'animaux^[133,134].

Introduction

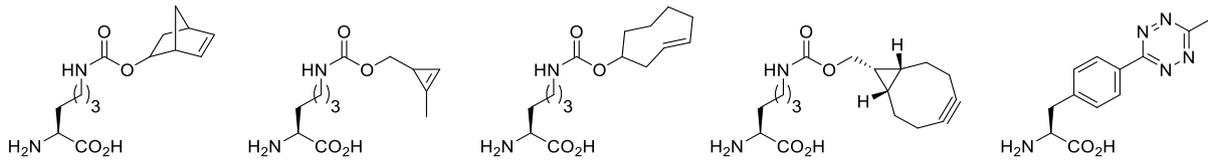


Figure 3 : Structure de quelques ncAAs utilisés pour l'expansion du code génétique^[126]

- L'incorporation métabolique, par exemple d'un glycanes, consiste à utiliser la biosynthèse endogène des cellules afin d'incorporer un monosaccharide modifié avec une fonction bio-orthogonale dans les glycanes présents sur la surface des cellules mammifères^[135] (Figure 4). Cette stratégie a permis l'introduction de fonctions azoture bicyclononyne (BCN) ou encore norbornène à la surface des cellules. Une des limitations de cette méthode est de s'assurer que le sucre modifié pénètre bien dans la cellule, et soit bien pris en charge par la machinerie de glycosylation. De plus, il faut que cette modification n'interfère pas dans l'adressage. Malgré toutes ces contraintes, de nombreuses applications ont pu être mises en œuvre avec succès comme l'étude dynamique de lignification au sein de plantes^[136] ou encore l'identification de bactéries vivantes^[137].

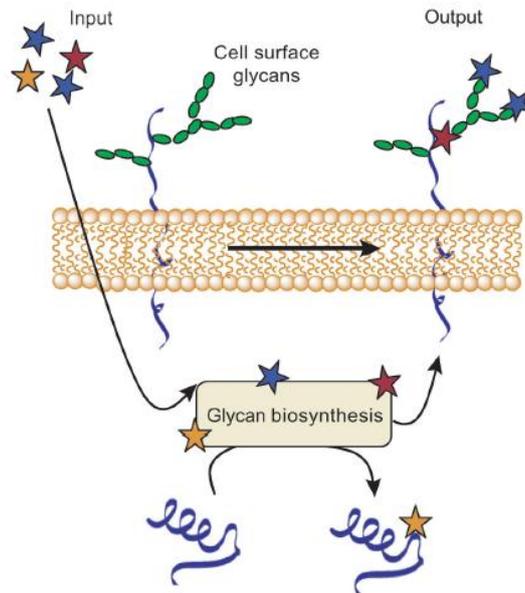


Figure 4 : Principe de l'incorporation de monosaccharides sur les glycanes présents sur la surface cellulaire (Figure extraite de l'article^[135])

- Enfin, l'insertion par voie enzymatique consiste à utiliser l'action d'une enzyme modifiée, ou non, afin d'incorporer une fonction bio-orthogonale sur une protéine ciblée. Ainsi en 2016, le groupe de Bordusa a utilisé la Trypsiligase afin d'incorporer un norbornène sur une protéine d'intérêt^[138]. Cette étude a permis d'introduire spécifiquement un norbornène ou une tétrazine sur des protéines ou des anticorps. Il a ensuite été possible d'introduire par iEDDA (de l'anglais « inverse electron demand Diels-Alder »), une chaîne PEG, un fluorophore ou encore un médicament sur les protéines et anticorps préalablement modifiés par l'enzyme.

4.3. Les réactions bio-orthogonales

4.3.1. La ligation de Staudinger

La première réaction de conjugaison bio-orthogonale à avoir été développée est basée sur la réaction entre un azoture et une phosphine. Il s'agit de la ligation de Staudinger, inspirée de la réaction de réduction des azotures par les phosphines, initialement rapportée par Meyer et Staudinger^[139]. Cette réaction repose sur la formation d'un iminophosphorane intermédiaire, qui est suivie par son hydrolyse pour former l'amine correspondante (Schéma 12). Dans le cas de la ligation Staudinger, un ester est placé en *ortho* sur un des aromatiques de la phosphine. Ceci a pour conséquence d'empêcher l'hydrolyse de l'imino-phosphorane intermédiaire *via* la formation spontanée d'un lactame. Ce lactame sera ensuite hydrolysé à son tour, pour générer un oxyde de phosphine et une liaison amide, créant ainsi un lien covalent et irréversible (Schéma 12).

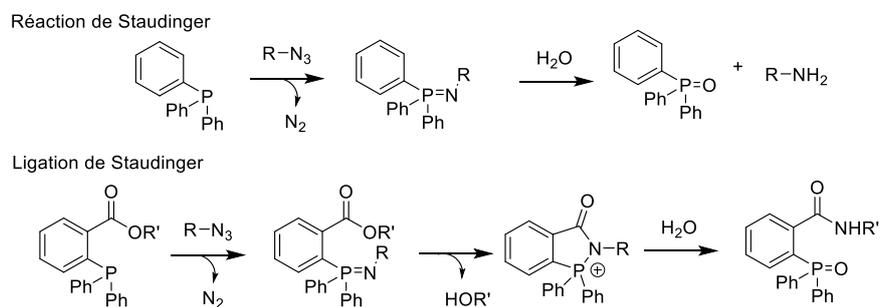


Schéma 12: Ligation de Staudinger

Cette réaction chimiosélective a notamment été utilisée par Bertozzi; cela en but de lier un polypeptide portant le partenaire phosphine avec une cellule modifiée à sa surface par une fonction azoture suite à la métabolisation d'un monosaccharide non naturel^[135,140,141]. Bien qu'efficace en milieu biologique complexe, la ligation de Staudinger possède quelques limites. En effet, que ce soit sous sa forme classique ou « traceless »^[142], cette réaction conduit toujours à un relargage de sous-produit. Effectivement, un alcool primaire est généré dans le cas de la ligation Staudinger, tandis que l'extrusion d'une phosphine oxydée est observée dans sa version « traceless ». De plus, les cinétiques observées pour cette réaction se révèlent particulièrement lentes puisqu'elles sont de l'ordre de $2,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Nonobstant, à cause de ses limitations, il est apparu nécessaire de développer des réactions plus rapides, ne générant pas de produit secondaire.

4.3.2. La ligation SPAAC

Une variante bio-orthogonale de la célèbre CuAAC a été développée afin de s'affranchir de l'utilisation du cuivre cytotoxique, même si des alternatives ont été développées comme l'utilisation de ligands rendant le cuivre inerte dans les cellules vivantes par exemple^[143,144]. Cette variante de la réaction CuAAC qui a été découverte par Wittig et Krebs^[145], repose sur l'utilisation des cyclooctynes, alcynes rendus plus réactives par la tension de cycle; elle a d'ailleurs été récemment utilisée par C. Bertozzi^[146,147] en conjugaison bio-orthogonale. Cette nouvelle réaction bio-orthogonale porte le nom de SPAAC de l'anglais « strained promoted alkyne azide cycloaddition ». De plus, les fonctions alcynes

Introduction

et azotures ne réagissent pas avec le milieu biologique dans les conditions physiologiques. Cela en fait d'excellents candidats pour la conjugaison bio-orthogonale (à noter qu'il a été démontré que certains alcynes tendus peuvent présenter des réactivités indésirables avec les thiols^[21,148,149], les persulfides^[150] ou les acide sulféniques^[151]). De plus, de nombreuses cyclooctynes ont été développées entre 2004 et 2015. Ainsi, il est possible de moduler la cinétique de la SPAAC en fonction de la nature de la cyclooctyne. En effet, les cyclooctynes possédant, dans leur structure, des éléments augmentant leur tension de cycle comme des benzènes (BARAC) ou un cyclopropane (BCN), présentent une cinétique de réaction plus élevée vis-à-vis des azotures^[152] (Figure 5). Néanmoins, au vu des accès synthétiques de ces composés, de leur fonctionnalisation, de leur réactivité et de leur stabilité, il apparaît que le BCN offre le meilleur compromis, ainsi qu'une large gamme d'utilisation pour des applications diverses, allant de la construction moléculaire à la ligation réalisée *in vivo*.

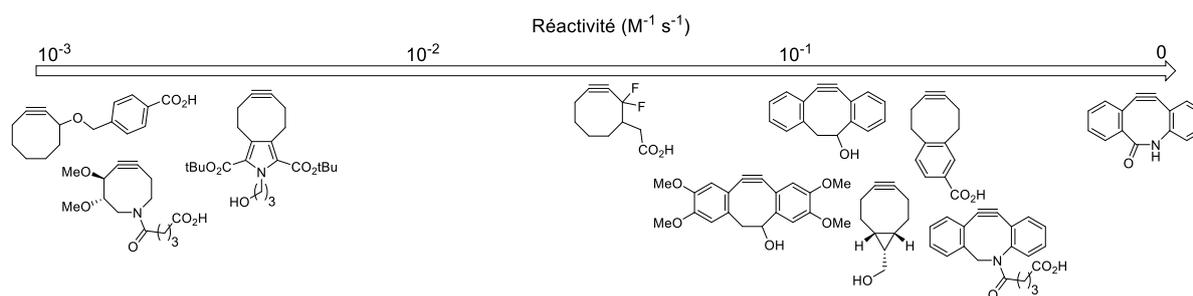


Figure 5 : Cinétique de réaction de différents cyclooctynes avec l'azoture de benzyle^[152].

Récemment, les groupes de Chin et Taran ont utilisés les alcynes sous contrainte de cycle dans une autre réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire, qui repose sur l'utilisation d'un partenaire sydnone^[153,154]. D'autre part, l'incorporation d'un atome de fluor en position 4 de la sydnone, a permis d'accélérer d'un facteur 10 000 la réaction avec les cyclooctynes^[155]. De même, la présence de cet atome de fluor peut permettre l'introduction d'un fluor radioactif utile pour de l'imagerie de type TEP (Schéma 13).

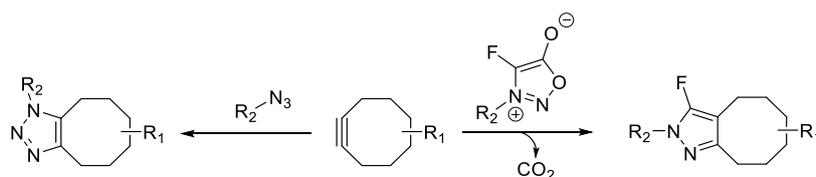


Schéma 13 : Réaction de SPAAC avec les azotures et les fluorosydnones.

4.3.3. La ligation iEDDA

La réaction de conjugaison entre les tétrazines et les alcènes contraints a suscité beaucoup d'intérêt de par son caractère bio-orthogonal et ses cinétiques généralement élevées. Cette conjugaison repose sur une première réaction [4+2] à demande électronique inverse (iEDDA), suivie par une retro [4+2] avec extrusion de diazote rendant la réaction irréversible. Enfin, une isomérisation d'une des doubles liaisons carbone-azote peut être observée dans un solvant polaire. Cette ligation a été décrite de manière indépendante par les groupes de Weissleder et Fox en 2008 en utilisant le

Introduction

norbornène ou le *trans* cyclooctène (TCO)^[156-158], respectivement et conjointement avec le motif tétrazine (Schéma 14). Ces deux réactions sont couramment utilisées pour le marquage en milieu biologique^[159]. Par la suite, en 2012, le groupe de Devaraj rapporte le cyclopropène comme partenaire d'iEDDA, dans le but de diversifier la gamme des diénophiles utilisables avec la tétrazine. Ce nouveau partenaire a été utilisé afin d'imager la membrane de cellules par fluorescence^[128]. Bien que le TCO, le cyclopropène et le norbornène soient largement utilisés il existe d'autres alcènes contraints, pouvant réagir avec la tétrazine (voir page 98).

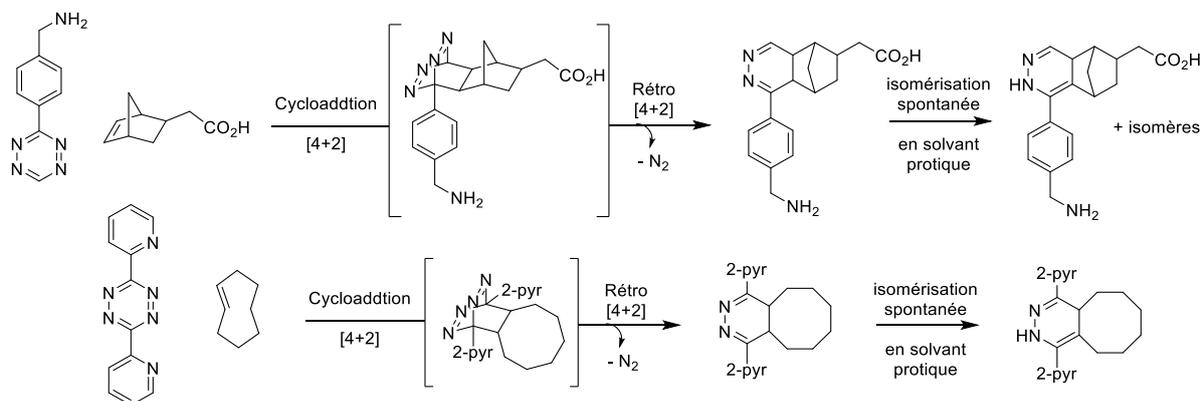


Schéma 14 : Mécanisme de la réaction entre la tétrazine et des alcènes contraints (le norbornène développé par Weissleder^[156] et le *trans*-cyclooctène développé par Fox^[158])

Par ailleurs, la ligation entre les tétrazines et les TCO est la réaction bio-orthogonale la plus rapide rapportée à ce jour^[160]. Les cinétiques des différentes réactions sont résumées dans le Tableau 1. Il est à noter que les réactions SPAAC et iEDDA conduisent toutes les deux à la formation de produits sous forme d'isomères. Ces réactions se révèlent très intéressantes pour des applications *in cellulo* ou *in vivo*, mais leur utilisation est difficile pour la modification d'objets moléculaires de plus petites tailles tels que des peptides par exemple^[156], puisque la formation d'un mélange de produits sous forme d'isomères est obtenu à l'issue de ces réactions.

Réaction	Vitesse [$M^{-1} s^{-1}$]
Azoture + Phosphine	$2,2 \times 10^{-3}$
Alcyne terminal + Azoture (CuAAC)	10^{-4} - 10^{-2}
Difluorocyclooctyne + Azoture	8×10^{-2}
Biarylazacyclooctynone + Azoture	1
Norbornène + Tétrazine	$1 \cdot 10^1$
Cyclopropène + Tétrazine	10^1
Fluorosydnone + BCN	10^3 - 10^4
TCO + Tétrazine	$3,8 \times 10^5$

Tableau 1 : Vitesses de réaction de différentes réactions de conjugaison bio-orthogonale^[128,155,160]

Malgré tout, le nombre de réactions chimiosélectives et bio-orthogonale reste assez restreint. L'ensemble des ligations repose donc sur un nombre limité de réactions. Ainsi, afin de diversifier le plus possible les applications réalisées avec ces réactions, il faut en créer de nouvelles permettant de

Introduction

pallier leurs faiblesses, afin d'ouvrir le champ des possibles. Une partie de cette thèse a donc été consacrée au développement de ce type de réaction.

Les réactions de conjugaison au sens large (bioconjugaison, ligation chimiosélective ou bio-orthogonale) sont très souvent associées à une technique d'imagerie. L'incorporation d'une sonde sur l'une des fonctions chimiques impliquées dans ces réactions permet de visualiser, mais aussi, de comprendre le système étudié. Parmi les différentes techniques de visualisation, l'imagerie optique moléculaire et en particulier la fluorescence est l'une des plus utilisées pour sa simplicité et sa facilité d'accès et d'utilisation. Une introduction sur les grands principes de la fluorescence fait l'objet de la partie suivante.

II. Introduction à la fluorescence

L'imagerie optique et, plus particulièrement, la fluorescence, est très utilisée puisque cette dernière possède de nombreux avantages. En effet, en comparaison avec les autres méthodes d'imagerie (écographie, radiographie, IRM et imagerie nucléaire), l'imagerie optique est une technique de détection peu coûteuse, très rapide (entre une seconde et cinq minutes), et elle possède une sensibilité très élevée. Les points faibles de l'imagerie optique sont sa faible résolution et la faible pénétrabilité des tissus biologiques (au maximum jusqu'à quelques mm)^[161,162]. Toutefois, de par sa simplicité d'utilisation, la fluorescence est très largement représentée dans la littérature pour des études biologiques réalisées *in vitro*, *in cellulo*, et parfois même *in vivo*.

1. Concept général

Les chromophores sont des composés constitués de groupements leur permettant d'absorber la lumière tels que des enchainements de doubles liaisons ou d'aromatiques par exemple. Lorsqu'un chromophore est soumis à une excitation photonique, il va passer de l'état fondamental S_0 à un état de plus haute énergie S_{n+1} , dit état excité. Une fois la molécule portée à son état excité, suite à l'absorption d'un photon, un rapide retour à l'état fondamental va être observé selon plusieurs voies possibles résumées dans la Figure 6. Parmi ces processus de désexcitation, il en existe un en particulier dont le retour à l'état fondamental s'accompagne par une émission lumineuse. Ce phénomène est appelé fluorescence^[163]. Dans ce cas précis, le chromophore est appelé fluorophore.

Introduction

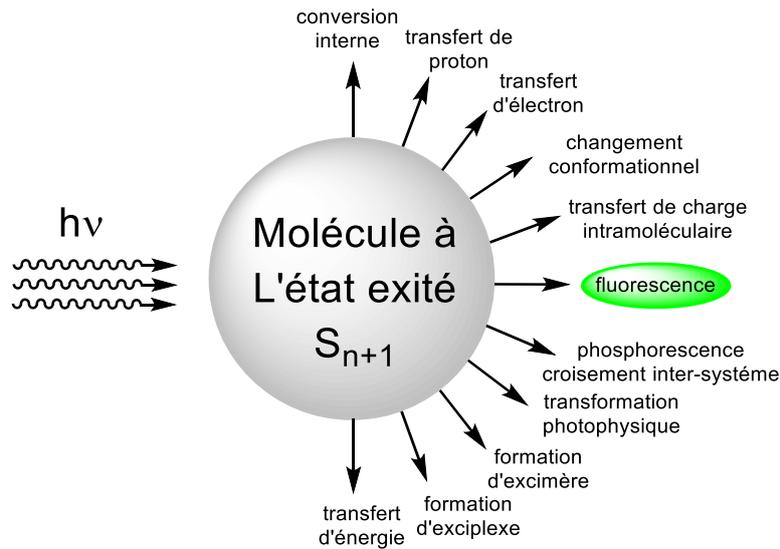


Figure 6 : Voies de désexcitation possibles d'un chromophore après irradiation.

La luminescence est l'émission d'un photon suite au retour de la molécule d'un état excité à l'état fondamental. On parle de fluorescence si le passage initial de la molécule de l'état fondamental à l'état excité fait suite à une excitation lumineuse. Effectivement, lorsque qu'une molécule aux propriétés fluorescentes, appelée fluorophore, absorbe un photon, un de ses électrons passe à un état d'énergie supérieure. La fluorescence se caractérise par un retour de la molécule à son état fondamental, *via* une émission de photon, comme on peut le voir sur le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 7).

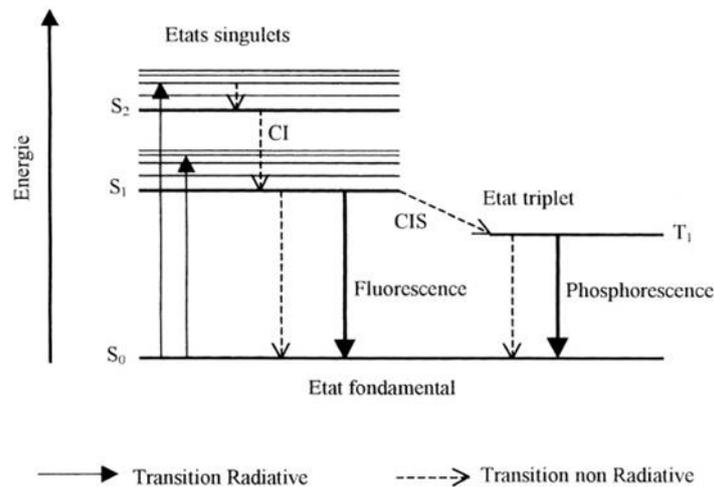


Figure 7: Diagramme de Perrin-Jablonski

Introduction

Chaque fluorophore est caractérisé par un spectre d'absorption et d'émission donnant lieu à des valeurs maxima dépendantes à la fois du solvant,^[164] du pH et de la température à laquelle on effectue la mesure. Une émission de lumière, dont le retour à l'état fondamental est issu d'un niveau d'énergie inférieur à celui du niveau du fluorophore à l'état excité, se caractérise par un spectre d'émission dont le maximum se situe à une longueur d'onde supérieure à celui du spectre d'absorption. L'écart entre la longueur d'onde maximale du spectre d'absorption et le maximum du spectre d'émission est appelé déplacement de Stokes (Figure 8). Il correspond à la conversion interne précédant le retour à l'état fondamental.

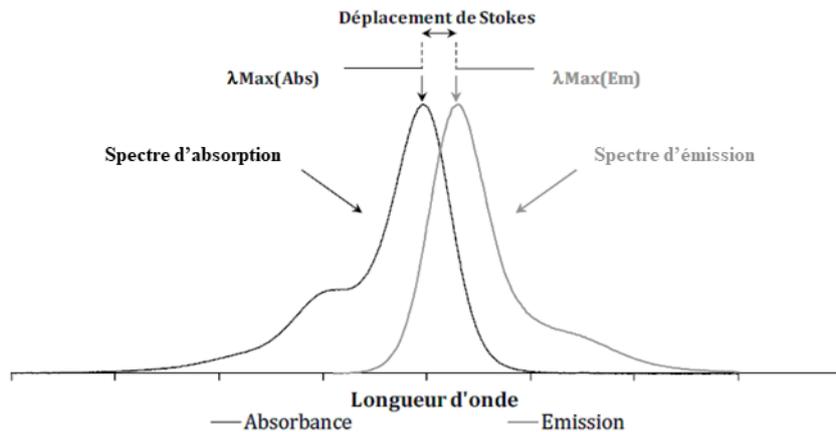


Figure 8 : Exemple de spectre d'absorption et d'émission d'un fluorophore

La fluorescence d'une molécule est caractérisée par plusieurs grandeurs comme le rendement quantique, le coefficient d'absorption molaire et la brillance. Le rendement quantique, noté Φ_f , est défini par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés et s'exprime en pourcentage. En général, il est mesuré par comparaison avec un fluorophore de référence dont le rendement quantique est parfaitement connu. Il caractérise l'efficacité du processus de fluorescence. En effet, le phénomène de fluorescence peut rentrer en compétition avec des interactions entraînant une désexcitation non radiative de la molécule, limitant ainsi sa fluorescence.

Le coefficient d'absorption molaire, noté ϵ et exprimé en $M^{-1}cm^{-1}$, caractérise l'efficacité d'absorption de la lumière par un composé. Plus un composé a un coefficient d'extinction molaire élevé, plus la lumière incidente sera absorbée.

La brillance est un paramètre également important. En effet, c'est la valeur qui donne au biochimiste l'information la plus pertinente concernant un fluorophore, puisqu'elle tient compte, non seulement, de l'efficacité de fluorescence mais également de sa capacité à absorber la lumière. Cette grandeur est proportionnelle au rendement quantique Φ_f . Selon la formule suivante : $B = \Phi_f \cdot \epsilon$.

Il existe de nombreuses familles de fluorophores, comme les xanthènes réputés pour leur stabilité thermique aux variations pH, mais également au photoblanchiment. Il y a également Les coumarines, les cyanines qui peuvent émettre dans le proche infra-rouge et possèdent des valeurs d' ϵ très élevées, et les BODIPYS qui sont quant à eux caractérisés par leur bande d'absorption et d'émission très fines^[165,166] (Figure 9). Tous ces fluorophores sont dit de types « *push-pull* » c'est-à-

Introduction

dire, que leur faculté de fluorescence est due à une délocalisation d'électrons π allant d'une fonction électrodonneuse (le *push*) vers une fonction électroacceptrice (le *pull*). A la suite de la délocalisation électronique, le donneur devient accepteur et l'accepteur devient donneur et ainsi de suite.

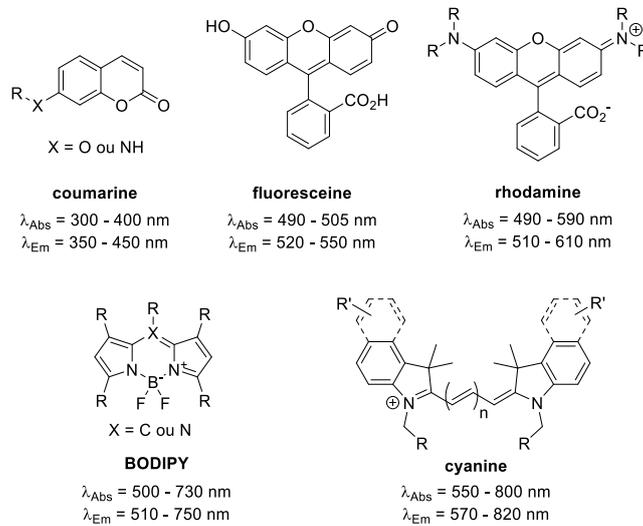


Figure 9: Différentes familles de fluorophores

Le choix d'un fluorophore dépend essentiellement de l'application que l'on souhaite réaliser. Pour de l'imagerie de surface, des fluorophores émettant dans le vert, c'est-à-dire vers 520 nm, peuvent convenir. En revanche, l'imagerie *in vivo* nécessite, quant à elle, l'utilisation de fluorophores plus performants, ayant de hautes valeurs de brillance, et émettant dans le proche infra-rouge, afin de limiter les interférences avec la fluorescence intrinsèque des tissus biologiques (auto-fluorescence), et l'absorbance des tissus biologiques. Les tissus biologiques sont des milieux très diffusant et très peu absorbant entre 600 et 1000 nm. Peu de fluorophores présents naturellement dans les milieux biologiques absorbent et émettent dans cette gamme. On parle ainsi de « fenêtre thérapeutique » (Figure 10).

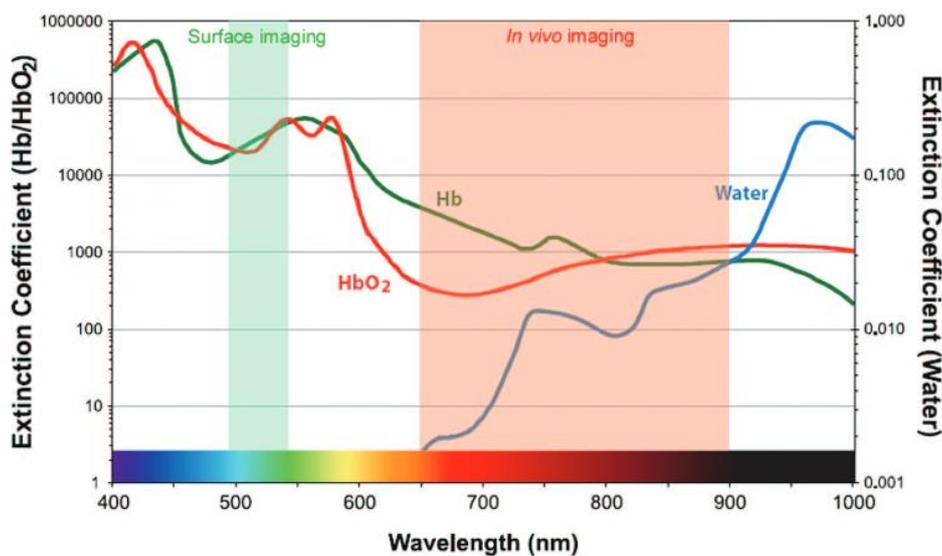


Figure 10 : Courbes mettant en évidence les fenêtres thérapeutique et d'imagerie de surface, et les spectres d'absorption de l'hémoglobine (Hb) oxygénée ou non, principale biomolécule interférant au-delà de 500 nm ^[167]

2. Détection fluorogénique

L'étude et les modifications chimiques apportées aux fluorophores depuis les années 1990, a permis le développement de nouveaux outils appelés, de façon générique, sondes. Ces sondes, *via* des modifications de leurs propriétés de fluorescence en présence d'analytes d'intérêt biologique, ont permis la détection et l'analyse d'une multitude de ces analytes. Parmi les approches les plus utilisées on retrouve l'approche ratiométrique et celle de type OFF-ON. Usuellement, l'approche ratiométrique repose sur l'utilisation de sondes présentant un changement dans leur spectre d'excitation et/ou d'émission en présence de l'analyte à cibler. De plus, cette méthode permet une caractérisation quantitative qui peut être suivie sur deux longueurs d'ondes différentes^[168]. L'approche OFF-ON repose sur une différence d'intensité de fluorescence en présence de l'analyte, dans l'idéal, une forte exaltation de cette fluorescence doit être observée. Ayant été la seule utilisée dans le cadre de cette thèse, et par souci de concision, l'approche OFF-ON sera la seule à être développée par la suite. L'approche de type OFF-ON signifie que la sonde sera « éteinte » et n'émettra pas de lumière sous sa forme native. Après interaction avec l'analyte souhaité, la sonde sera « allumée » et une émission de lumière caractérisera la présence de l'analyte dans le milieu étudié. L'approche OFF-ON nécessite de modifier chimiquement un fluorophore afin de masquer sa fluorescence, on parle de désactivation, d'extinction, ou plus fréquemment de « quenching » de la fluorescence. Différentes approches ont été utilisées au fil des années. Il est ainsi possible de quencher un fluorophore par l'incorporation d'un motif avec lequel le fluorophore va échanger ses électrons *via* un phénomène de transfert d'électrons photo-induit (TeP). Il est également possible d'absorber l'énergie émise par le fluorophore par rapprochement spatial d'une entité chimique capable de dissiper de manière non-radiative cette énergie. Sont regroupés dans ces transfert d'énergie, les phénomènes de quenching statique (formations d'eximères et d'exiPLEXES^[169,170]), de quenching par interaction collisionnelle (quenching de Dexter^[171]) ou de quenching dynamique, par transfert d'énergie de type dipôle-dipôle (on parle alors de FRET ou Förster resonance energy transfer). Enfin une modification directe de la structure du fluorophore, qui sera restaurée après réaction avec l'analyte, peut conduire à l'extinction du fluorophore. Par souci de concision, seules les quatre principales stratégies utilisées (TeP, FRET, ESIPT et modification structurale du fluorophore) seront exposées plus en détails dans ce manuscrit.

2.1. Principe d'une sonde de type TeP

Le phénomène de TeP est caractérisé par un transfert mono-électronique du fluorophore à l'état excité vers l'orbitale la plus basse vacante LUMO (TeP oxydatif), ou vers l'orbitale la plus haute occupée HOMO (TeP réductif) d'un récepteur spatialement proche (Figure 11). La relaxation indirecte de l'électron excité du fluorophore vers l'état fondamental empêche ainsi l'émission de fluorescence.

Introduction

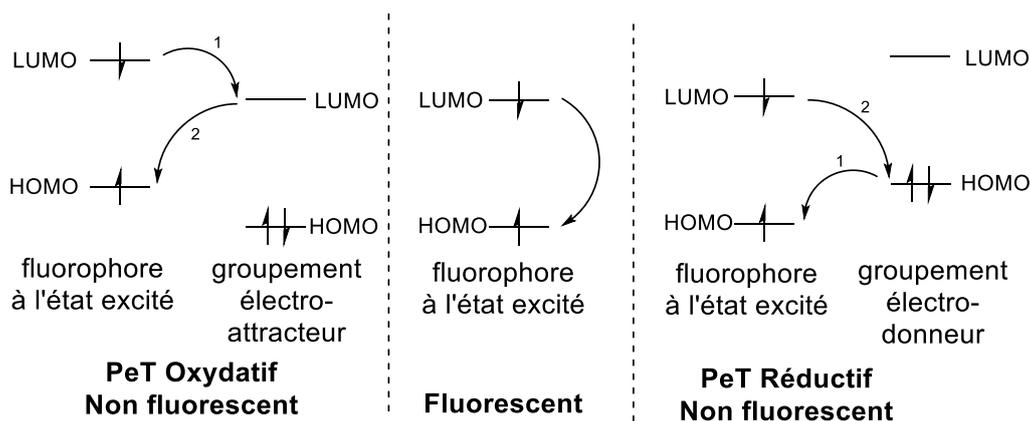


Figure 11 : Principe du phénomène de TeP

Les approches de type TeP réductif impliquent généralement des récepteurs avec des groupements riches en électrons tels que les anilines^[172] ou les phénolates^[173], tandis que les mécanismes TeP oxydatif utilisent des fonctions pauvres en électrons telles que les nitroaryles^[174] ou les maléimides^[175]. Ainsi, en modifiant la structure du récepteur au moyen d'une réaction chimique, le mécanisme de TeP peut être interrompu, rétablissant ainsi la fluorescence attendue. Cette stratégie a été utilisée en particulier dans la conception de récepteurs à base de maléimides pour la détection spécifique de thiols^[9]. En effet, après une addition conjuguée d'un thiol sur le maléimide, le niveau énergétique de sa LUMO ne se trouve plus entre la HOMO et la LUMO du fluorophore, ainsi la fluorescence peut être restaurée, attestant de la présence de thiols dans le milieu étudié. Sur le principe du TeP réductif, les anilines sont particulièrement utilisées et notamment pour le développement de sonde à pH. A pH basique les électrons présents dans le doublet non liant de l'aniline sont dans un niveau énergétique leur permettant de « quencher » le fluorophore avec lequel elle est rattachée. En milieu acide, l'aniline sera sous sa forme protonée et perdra sa capacité à échanger ses électrons avec le fluorophore, qui retrouvera ainsi sa fluorescence. Ce principe été utilisé par le groupe de Wu en 2014 pour de développement d'une sonde à pH dont le pKa a été mesuré à 3, présentant une exaltation de fluorescence de 505^[176] (Schéma 15).

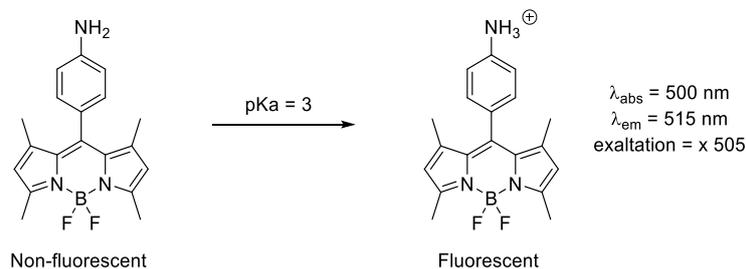


Schéma 15 : Principe d'une sonde à pH de type TeP réductif.

2.2. Principe d'une sonde de type FRET

Le FRET, ou « Förster resonance energy transfer »^[177,178], est un transfert d'énergie non radiatif entre une molécule dite donneuse, qui sera un fluorophore, et une molécule dite acceptrice, qui pourra être un autre fluorophore, qui réémet l'énergie sous forme de fluorescence, ou une molécule capable de dissiper cette énergie de façon non radiative, appelée quencher.

Il existe deux conditions au bon déroulement d'un FRET : premièrement, il faut qu'il y ait un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. Deuxièmement, il faut que les deux partenaires soient à une distance maximale de 100 Å l'un de l'autre. En effet, Förster a démontré que l'efficacité du transfert était proportionnelle à $1/d^6$, où d représente la distance entre les deux partenaires (Figure 12). De plus, un alignement des moments dipolaires est également un élément limitant dans ce phénomène de FRET.

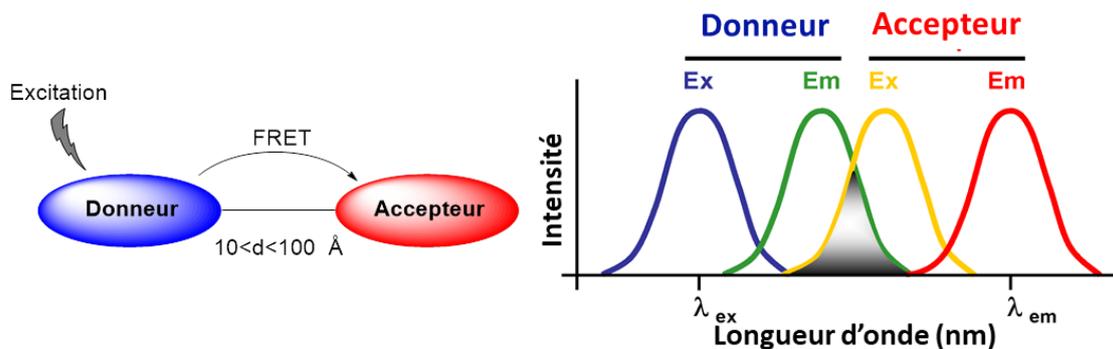


Figure 12 : Représentation des conditions sine qua non à la réalisation d'un système FRET.

Ainsi le bon fonctionnement d'un système FRET repose sur un choix judicieux des deux partenaires. C'est pourquoi, il faut un bon recouvrement spectral entre les deux entités mises en jeu, qu'il s'agisse de deux fluorophores ou d'un couple fluorophore-quencher. L'approche à deux fluorophores a, par exemple, été utilisée pour la détection simultanée de deux peptidases.^[179] L'approche fluorophore-quencher (ou fluorophore-extincteur de fluorescence) repose sur l'utilisation d'une molécule capable d'absorber l'énergie émise par le fluorophore pour ensuite la dissiper de manière non-radiative. Il existe différents types de quenchers, mais nous ne nous attarderons ici que sur la famille des quenchers diazoïques. Ils comportent un pont diazo qui est à l'origine de l'extinction de fluorescence par une réaction de photo-isomérisation E/Z^[180]. Ces quenchers sont très populaires. En effet, leur mécanisme d'extinction est efficace, il possède des valeurs d' ϵ élevées leur garantissant une bonne absorption de la lumière et donc de l'énergie transmise par le donneur, il couvre une large gamme d'absorbance (supérieure ou égale à 100 nm) ce qui leur assure une utilisation avec un large panel de fluorophores. Enfin, un certain nombre de ces quenchers sont disponibles commercialement. Parmi ces quenchers, on retrouve le DABCYL (de 4-(DiméthylAminoazo) Benzène-4-CarboxYLic acid), l'ECLIPSE, la gamme des BHQ (pour Black Hole Quencher), et le BBQ-650 (pour BlackBerry Quencher) dont les caractéristiques sont résumées dans la Figure 13.

Introduction

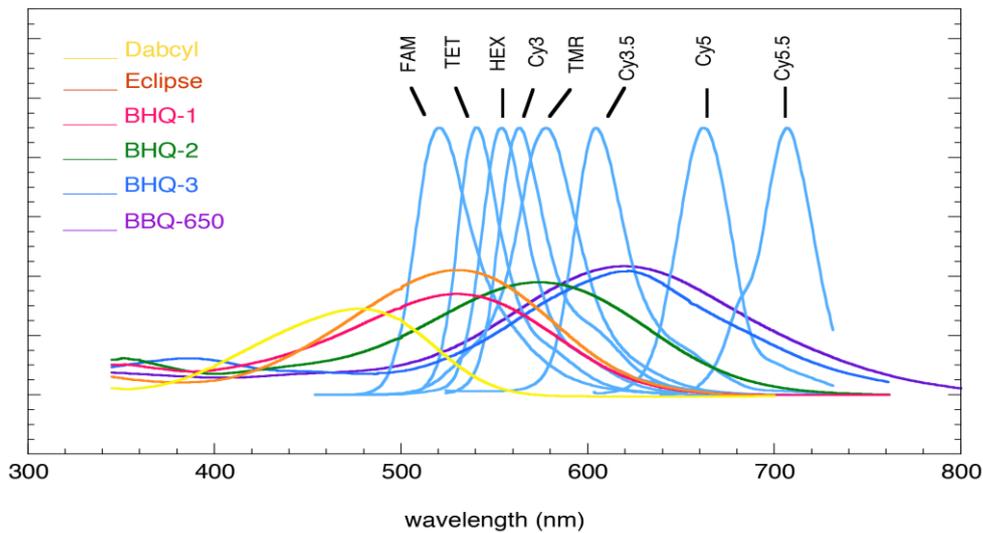
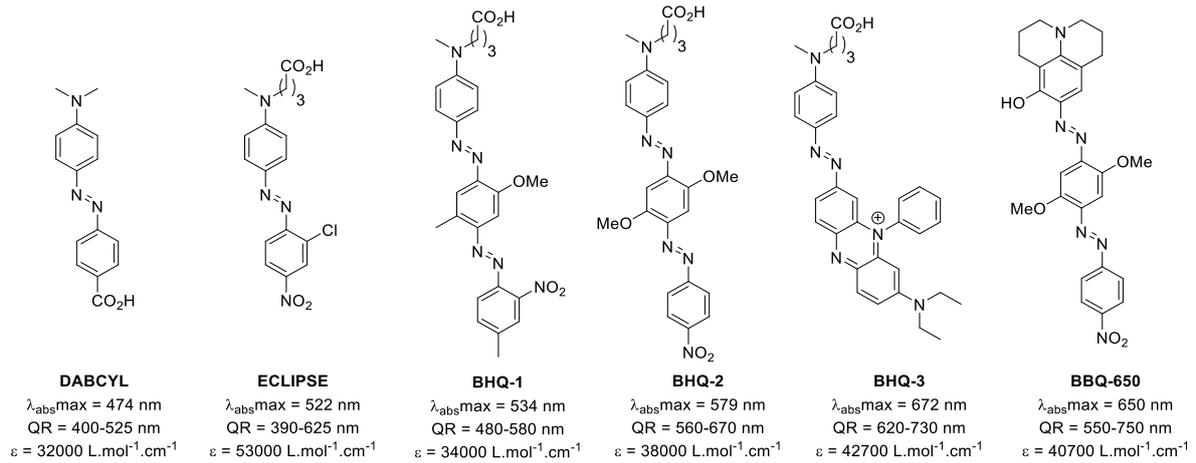


Figure 13 : Structures et propriétés optiques des quenchers diazoïques commerciaux, au regard des spectres d'émission des fluorophores les plus utilisés (FAM = carboxyfluorescéine, TET = tétrachlorofluorescéine, HEX = hexachlorofluorescéine, TMR = tétraméthylrhodamine (TAMRA)).

Ces quenchers sont utilisés pour l'élaboration de sondes FRET permettant la détection de protéases^[181-183], ou bioanalytes comme le peroxyde d'hydrogène^[184] ou les thiols^[185,186], ou encore pour l'étude de l'appariement des brins d'ADN^[187]. Bien qu'il soit admis que ces quenchers diazoïques reposent sur un phénomène de FRET, des études ont montré que leur mécanisme de quenching de fluorescence pouvait également reposer sur un phénomène de type TeP^[188].

2.3. Principe d'une détection de type ESIPT

L'ESIPT (de l'anglais « excited state intramolecular proton transfer ») est un processus dans lequel les molécules photo-excitées réalisent un transfert de protons d'un hétéroatome à un autre hétéroatome spatialement proche. La tautomérisation prend souvent la forme d'un équilibre céto-énolique. Les molécules qui présentent un phénomène d'ESIPT dans l'état fondamental existent principalement sous forme d'énol (E). Cependant, lors de la photoexcitation, ils subissent une tautomérisation en formes cétone ($E^* \rightarrow K^*$) via un processus ESIPT ultra-rapide et irréversible. Par la

Introduction

suite, le retour de la forme cétone excitée à son état fondamental ($K^* \rightarrow K$) s'accompagne d'une émission de lumière. Enfin, un retour à la forme énol est observé ($K \rightarrow E$) (Figure 14)^[189]. Une des caractéristiques des fluorophores de type ESIPT est leurs déplacements de Stokes particulièrement grands (jusqu'à 200 nm)^[190].

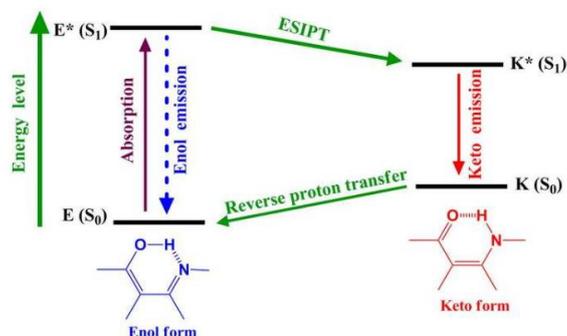


Figure 14 : Principe du phénomène d'ESIPT (Figure extraite de l'article^[189])

Le principe d'une détection par ESIPT est plutôt simple. Effectivement, le phénomène de fluorescence étant dû à un transfert de proton d'un énol (souvent un phénol) vers une imine (le plus souvent). Ainsi, masquer ce proton permet de rendre l'ESIPT inactif. La méthode la plus employée est une acylation de cet énol rendant le fluorophore non émissif. Ensuite, en présence de l'analyte souhaité, la fonction masquant l'énol est éliminée permettant le retour du phénomène d'ESIPT, avec une émission concomitante de lumière. Ce principe a notamment été utilisé par le groupe d'Hasserodt en 2014, pour la détection d'une peptidase (LAP) au sein de cellules vivantes, *via* l'utilisation d'un bras auto-immolable libérant l'énol (ici un phénol)^[191] (Schéma 16).

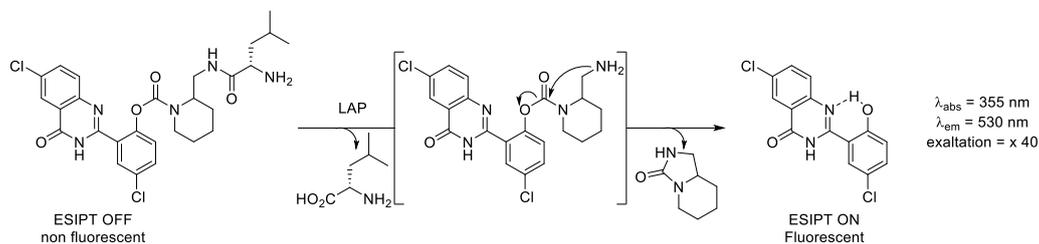


Schéma 16 : Sonde de type ESIPT pour la détection de protéase développée par le groupe d'Hasserodt en 2014^[191].

2.4. Principe d'une détection par modification structurelle du fluorophore

Alternativement aux approches de transferts d'énergies (FRET) ou d'électrons (TeP), il est possible d'obtenir une sonde OFF-ON par modification directe de la structure du fluorophore. Pour ce faire, la modification doit entraîner une chute des propriétés de fluorescence du chromophore étudié, pour qu'ensuite une entité de nature biologique, chimique ou photo-chimique joue le rôle de déclencheur pour redonner le fluorophore natif avec ses pleines propriétés optiques. Les fluorophores de type xanthène, tels que les rhodamines, sont couramment utilisés pour ce type d'approche. En effet, les

Introduction

rhodamines existent sous deux formes : une forme ouverte et fluorescente et une forme fermée dite spirolactonisée pour laquelle il n'existe plus de conjugaison au système polyaromatique ; cela entraîne une disparition totale de la fluorescence. L'exemple présenté dans le Schéma 17, montre une rhodamine dont l'aniline primaire est engagée dans une liaison peptidique. Cela a pour effet, de diminuer l'effet donneur de l'aniline et génère donc la rhodamine sous sa forme fermée. Suite à l'hydrolyse de la liaison peptide par un stimulus enzymatique, on observe la formation de la forme ouverte avec un retour concomitant de la fluorescence^[192]. De plus, des phénomènes de dissipations par rotation^[193], photo-isomérisation^[194] ou par ICT (de l'anglais « Intramolecular Charge Transfer »)^[195] ont été utilisées pour la conception de sondes fluorogéniques.



Schéma 17 : Exemple d'une sonde profluorescente par modification de structure développée par T. Urano en 2018^[192]

Plus récemment, cette approche s'est étendue à la formation de fluorophores par réaction domino. C'est-à-dire que l'activité de l'analyte sur la sonde déclenche une réaction chimique spontanée qui conduit à la synthèse d'un fluorophore. La sonde de départ étant non émissive, cette approche permet d'accroître grandement les exaltations de fluorescences post déclenchement, mais également de diminuer le bruit de fond résiduel. Cette approche a notamment permis la génération *in situ* d'imino-coumarine^[196] et de xanthène (pyronine)^[197] utilisés respectivement pour la détection de la phosphatase alcaline et de la LAP (Schéma 18).

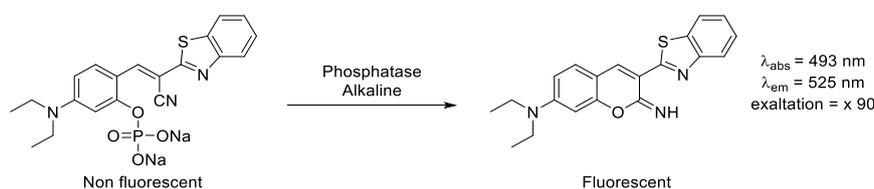


Schéma 18 : Pro-coumarine développée par le groupe de Kim en 2011^[196]

III. Présentation du sujet de thèse

Les réactions chimiosélectives développées à ce jour comportent un certain nombre de limites comme, par exemple, la réversibilité des processus chimiques mis en jeu (alkoxyamine/carbonyle), la formation d'isomères (réactions de Diels-Alder), la présence d'une catalyse métallique (CuAAC), ou d'additifs (NaBH_3CN) pas toujours compatibles avec les biomolécules manipulées. Ainsi, cette thèse porte sur le développement de nouvelles réactions de ligations chimiosélectives, flexibles, et d'un emploi facile en vue de simplifier la construction biomoléculaire, tant au niveau de la synthèse que de l'isolement du produit de ligation. L'efficacité des transformations développées sera évaluée par la préparation de sondes pour l'imagerie moléculaire optique. Une partie de la thèse sera donc consacrée au développement et à l'étude de nouveaux fluorophores.

Introduction

Nous aborderons donc successivement dans cette thèse la mise au point de plusieurs nouvelles réactions chimiosélectives. En effet, le premier chapitre portera sur l'étude photophysique de la ligation de Kondrat'eva qui met en jeu le motif 5-alkoxyoxazole et maléimide, une réaction développée au préalable au laboratoire. En effet, cette partie de ma thèse s'inscrit dans la continuité de la thèse du Dr. Laurie-Anne Jouanno (2011-2014, thèse intitulée Préparation et réactivité des 5-alkoxyoxazoles : application en synthèse organique et bio-organique), dans laquelle est décrite la découverte et l'utilisation d'une nouvelle réaction de ligation chimiosélective basée sur une réaction de Kondrat'eva. Ainsi, la stratégie développée dans le cadre de ma thèse sera illustrée par différentes applications fluorogéniques utilisées pour la détection de protéines, ou encore pour le criblage de partenaires potentiels de tétrazines. Cette dernière application sera développée plus en détail dans le chapitre 2, qui sera consacré à l'identification d'un partenaire énolisable des tétrazines, les pyrazolones. Cette étude permettra d'explorer une nouvelle réactivité inattendue de la tétrazine, qui sera mis à profit dans le marquage de peptides et d'une protéine.

Le chapitre 3 sera consacré à l'étude de la réactivité des pyrazolones vis-à-vis d'accepteurs de Michael ou aldéhydes masqués en ligation chimiosélective. Les résultats indirects de cette étude conduiront à la mise au point d'une sonde profluorescente hydrosoluble originale pour la détection de biothiols.

Enfin le chapitre 4, sera consacré à la mise au point d'une méthodologie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2-ones, ainsi qu'à l'étude des propriétés photophysiques de leurs dérivés. Ces travaux seront clôturés par l'élaboration et l'évaluation *in vitro* d'une nouvelle sonde fluorogénique pour la détection du gasotransmetteur sulfure d'hydrogène.

Références: Introduction

- [1] G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2693-2705.
- [2] S. Ranallo, A. Amodio, A. Idili, A. Porchetta, F. Ricci, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 66–71.
- [3] A. Sinz, *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 1225–1237.
- [4] H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Current Opinion in Structural Biology* **2007**, *17*, 488–494.
- [5] B. A. Griffin, *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [6] O. Koniev, A. Wagner, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495–5551.
- [7] C. B. Rosen, M. B. Francis, *Nature Chemical Biology* **2017**, *13*, 697–705.
- [8] F. Brotzel, H. Mayr, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, *5*, 3814-3820.
- [9] C. Sabot, P.-Y. Renard, K. Renault, J. W. Fredy, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, DOI 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252.
- [10] Y. Zhang, X. Zhou, Y. Xie, M. M. Greenberg, Z. Xi, C. Zhou, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 6146–6151.
- [11] N. Forte, M. Livanos, E. Miranda, M. Morais, X. Yang, V. S. Rajkumar, K. A. Chester, V. Chudasama, J. R. Baker, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 486–492.
- [12] O. Koniev, G. Leriche, M. Nothisen, J.-S. Remy, J.-M. Strub, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorselaer, R. Baati, A. Wagner, *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 202–206.
- [13] J. Morales-Sanfrutos, F. J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 4039–4047.
- [14] O. Koniev, G. Leriche, M. Nothisen, J.-S. Remy, J.-M. Strub, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorselaer, R. Baati, A. Wagner, *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 202–206.
- [15] N. Toda, S. Asano, C. F. Barbas, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 12592–12596.
- [16] J.-R. Kim, H. W. Yoon, K.-S. Kwon, S.-R. Lee, S. G. Rhee, *Analytical Biochemistry* **2000**, *283*, 214–221.
- [17] M. L. Nielsen, M. Vermeulen, T. Bonaldi, J. Cox, L. Moroder, M. Mann, *Nature Methods* **2008**, *5*, 459–460.
- [18] N. Lundell, T. Schreitmüller, *Analytical Biochemistry* **1999**, *266*, 31–47.
- [19] D. P. Gamblin, P. Garnier, S. J. Ward, N. J. Oldham, A. J. Fairbanks, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3642-3644..
- [20] N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7798–7802.
- [21] M. L. Conte, S. Staderini, A. Marra, M. Sanchez-Navarro, B. G. Davis, A. Dondoni, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 11086.
- [22] M. Trester-Zedlitz, K. Kamada, S. K. Burley, D. Fenyö, B. T. Chait, T. W. Muir, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 2416–2425.
- [23] M. Q. Müller, F. Dreiocker, C. H. Ihling, M. Schäfer, A. Sinz, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 6958–6968.
- [24] L. D. Burtneck, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1984**, *791*, 57–62.
- [25] J.-K. Lin, J.-Y. Chang, *Analytical Chemistry* **1975**, *47*, 1634–1638.
- [26] D. A. SUTTON, S. E. DREWES, U. WELZ, *Biochem. J.* **1972**, *130*, 589-595.
- [27] S. Uchiyama, T. Santa, N. Okiyama, T. Fukushima, K. Imai, *Biomedical Chromatography* **2001**, *15*, 295–318.
- [28] T. Santa, T. Fukushima, T. Ichibangase, K. Imai, *Biomedical Chromatography* **2008**, *22*, 343–353.

Introduction

- [29] R. R. Traut, A. Bollen, T.-T. Sun, J. W. B. Hershey, J. Sundberg, L. R. Pierce, *Biochemistry* **1973**, *12*, 3266–3273.
- [30] H. Bozler, K. D. Jany, G. Pfleiderer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1983**, *749*, 238–243.
- [31] B. J. KAMICKER, B. A. SCHWARTZ, R. M. OLSON, D. C. DRINKWITZ, G. R. GRAY, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1977**, *183*, 393–398.
- [32] J. M. McFarland, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 13490–13491.
- [33] M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, P. M. S. D. Cal, J. Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins, J. Howard, M. J. Deery, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 4004–4017.
- [34] Y. Xiao, M. S. Hutson, M. Belenky, J. Herzfeld, M. S. Braiman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12809–12818.
- [35] J. F. Riordan, *Biochemistry* **1973**, *12*, 3915–3923.
- [36] M. A. Gauthier, H.-A. Klok, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 482–493.
- [37] I. Dovgan, S. Erb, S. Hessmann, S. Ursuegui, C. Michel, C. Muller, G. Chaubet, S. Cianférani, A. Wagner, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, 1305–1311.
- [38] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3718–3723.
- [39] M. W. Jones, G. Mantovani, C. A. Blindauer, S. M. Ryan, X. Wang, D. J. Brayden, D. M. Haddleton, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 7406–7413.
- [40] H. Ban, M. Nagano, J. Gavriilyuk, W. Hakamata, T. Inokuma, C. F. Barbas, *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 520–532.
- [41] L. H. Jones, A. Narayanan, E. C. Hett, *Molecular BioSystems* **2014**, *10*, 952–969.
- [42] M. Kai, J. Ishida, Y. Ohkura, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1988**, *430*, 271–278.
- [43] G. Nikov, V. Bhat, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, *Analytical Biochemistry* **2003**, *320*, 214–222.
- [44] N. S. Joshi, L. R. Whitaker, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15942–15943.
- [45] H.-M. Guo, M. Minakawa, F. Tanaka, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 3964–3966.
- [46] M. D. Person, K. C. Brown, S. Mahrus, C. S. Craik, A. L. Burlingame, *Protein Science* **2009**, *10*, 1549–1562.
- [47] K. L. Seim, A. C. Obermeyer, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 16970–16976.
- [48] S. D. Tilley, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 1080–1081.
- [49] M. Vilaró, G. Arsequell, G. Valencia, A. Ballesteros, J. Barluenga, *Organic Letters* **2008**, *10*, 3243–3245.
- [50] S. Li, M. Hong, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 1534–1544.
- [51] H. Wakabayashi, M. Miyagawa, Y. Koshi, Y. Takaoka, S. Tsukiji, I. Hamachi, *Chemistry – An Asian Journal* **2008**, *3*, 1134–1139.
- [52] X. Li, *Talanta* **2004**, *62*, 367–371.
- [53] X. Wang, J. Jia, Z. Huang, M. Zhou, H. Fei, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 8028–8032.
- [54] K. Okitsu, T. Misawa, T. Shoda, M. Kurihara, Y. Demizu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 3417–3422
- [55] R. Zamora, M. Alaiz, F. J. Hidalgo, *Chemical Research in Toxicology* **1999**, *12*, 654–660.
- [56] K. Uchida, E. R. Stadtman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 4544–4548.
- [57] A. Foettinger, M. Melmer, A. Leitner, W. Lindner, *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 1678–1683.
- [58] J. M. Antos, M. B. Francis, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 10256–10257.

Introduction

- [59] B. T. Miller, M. E. Rogers, J. S. Smith, A. Kurosky, *Analytical Biochemistry* **1994**, *219*, 240–248.
- [60] K. Lindorff-Larsen, J. R. Winther, *Analytical Biochemistry* **2000**, *286*, 308–310.
- [61] J. R. Kramer, T. J. Deming, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 5144–5146.
- [62] D. G. Hoare, D. E. Koshland, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 2057–2058.
- [63] J. C. Sheehan, J. J. Hlavka, *The Journal of Organic Chemistry* **1956**, *21*, 439–441.
- [64] P. Bodlaender, G. Feinstein, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4941–4949.
- [65] R. Renthal, M. Cothran, N. Dawson, G. J. Harris, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1987**, *897*, 384–394.
- [66] G. Gaudriault, J.-P. Vincent, *Peptides* **1992**, *13*, 1187–1192.
- [67] O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 477–485.
- [68] H. Dixon, *Biochemical Journal* **1964**, *92*, 661–666.
- [69] J. M. Gilmore, R. A. Scheck, A. P. Esser-Kahn, N. S. Joshi, M. B. Francis, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 5307–5311.
- [70] K. F. Geoghegan, J. G. Stroh, *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 138–146.
- [71] L. Zhang, J. P. Tam, *Analytical Biochemistry* **1996**, *233*, 87–93.
- [72] C.-F. Liu, J. P. Tam, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 4149–4153.
- [73] C. F. Liu, J. P. Tam, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 6584–6588.
- [74] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 9218–9227.
- [75] G. Casi, N. Huguenin-Dezot, K. Zuberbühler, J. Scheuermann, D. Neri, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 5887–5892.
- [76] H. Ren, F. Xiao, K. Zhan, Y.-P. Kim, H. Xie, Z. Xia, J. Rao, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 9658–9662.
- [77] M. Schnolzer, S. Kent, *Science* **1992**, *256*, 221–225.
- [78] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.
- [79] L. Zhang, J. P. Tam, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 3–6.
- [80] L. Yi, H. Sun, Y.-W. Wu, G. Triola, H. Waldmann, R. S. Goody, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 9417–9421.
- [81] Z. Hao, S. Hong, X. Chen, P. R. Chen, *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 742–751.
- [82] I. Dovgan, S. Ursuegui, S. Erb, C. Michel, S. Kolodych, S. Cianférani, A. Wagner, *Bioconjugate Chemistry* **2017**, *28*, 1452–1457.
- [83] H. Suenaga, S. Arimori, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1996**, 607–612.
- [84] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20*, 34–41.
- [85] V. Raindlová, R. Pohl, M. Hocek, *Chemistry - A European Journal* **2012**, *18*, 4080–4087.
- [86] D. Rideout, *Science* **1986**, *233*, 561–563.
- [87] V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 8150–8151.
- [88] T. Uno, B. Gong, P. G. Schultz, *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 1145–1146.
- [89] J. Yu, D. Shen, H. Zhang, Z. Yin, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 1016–1020.
- [90] T. Sasaki, K. Kodama, H. Suzuki, S. Fukuzawa, K. Tachibana, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 4550–4553.
- [91] P. Agarwal, J. van der Weijden, E. M. Sletten, D. Rabuka, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 46–51.
- [92] P. Agarwal, R. Kudirka, A. E. Albers, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. M. Drake, L. C. Jones, D. Rabuka, *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 846–851.
- [93] S. Elahipanah, P. Radmanesh, W. Luo, P. J. O'Brien, D. Rogozhnikov, M. N. Yousaf, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 1082–1089.

Introduction

- [94] R. A. Kudirka, R. M. Barfield, J. M. McFarland, P. M. Drake, A. Carlson, S. Bañas, W. Zmolek, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *7*, 994–998.
- [95] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, et al., *Chemistry & Biology* **2015**, *22*, 293–298.
- [96] I. Yapici, K. S. S. Lee, T. Berbasova, M. Nosrati, X. Jia, C. Vasileiou, W. Wang, E. M. Santos, J. H. Geiger, B. Borhan, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 1073–1080.
- [97] M. Lo Conte, K. S. Carroll, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 6502–6505.
- [98] M. Lo Conte, J. Lin, M. A. Wilson, K. S. Carroll, *ACS Chemical Biology* **2015**, *10*, 1825–1830.
- [99] B. Seelig, A. Jäschke, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 7729–7732.
- [100] A. D. de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, O. Seitz, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12*, 6095–6109.
- [101] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, et al., *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 5352–5358.
- [102] G. M. Husar, D. J. Anziano, M. Leuck, D. P. Sebesta, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2001**, *20*, 559–566.
- [103] K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins, A. Madder, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 2927–2929.
- [104] R. Stevenson, G. De Bo, *Journal of the American Chemical Society* **2017**, *139*, 16768–16771.
- [105] E. H. Discekici, A. H. St. Amant, S. N. Nguyen, I.-H. Lee, C. J. Hawker, J. Read de Alaniz, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 5009–5013.
- [106] A. H. St. Amant, D. Lemen, S. Florinas, S. Mao, C. Fazenbaker, H. Zhong, H. Wu, C. Gao, R. J. Christie, J. Read de Alaniz, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, DOI 10.1021/acs.bioconjchem.8b00320.
- [107] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 10353–10366.
- [108] A. Okamoto, T. Taiji, K. Tainaka, I. Saito, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 1895–1896.
- [109] M. Glassner, K. K. Oehlenschlaeger, T. Gruending, C. Barner-Kowollik, *Macromolecules* **2011**, *44*, 4681–4689.
- [110] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1071–1074.
- [111] A. V. Samoshin, C. J. Hawker, J. Read de Alaniz, *ACS Macro Letters* **2014**, *3*, 753–757.
- [112] A. Michael, *Journal für Praktische Chemie* **1893**, *48*, 94–95.
- [113] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2*, 565–598.
- [114] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [115] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 210–216.
- [116] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [117] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 535–546.
- [118] V. Hong, S. Presolski, C. Ma, M. G. Finn, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 9879–9883.
- [119] D. M. van Elsland, S. I. van Kasteren, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 9472–9473.
- [120] A. J. Link, D. A. Tirrell, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 11164–11165.
- [121] L. Sun, J. Ding, W. Xing, Y. Gai, J. Sheng, D. Zeng, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 1200–1204.
- [122] D. Estupiñán, C. Barner-Kowollik, L. Barner, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 5925–5929.
- [123] P. An, T. M. Lewandowski, Q. Lin, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1326–1333.

Introduction

- [124] Z. Li, L. Qian, L. Li, J. C. Bernhammer, H. V. Huynh, J.-S. Lee, S. Q. Yao, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 2002–2006.
- [125] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [126] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chemical Society Reviews* **2017**, *46*, 4895–4950.
- [127] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 7013–7016.
- [128] J. Yang, J. Šečutè, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 7476–7479.
- [129] K. Gutmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Organic Letters* **2009**, *11*, 2405–2408.
- [130] J. Schoch, M. Staudt, A. Samanta, M. Wiessler, A. Jäschke, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1382–1386.
- [131] G. Cserép, O. Demeter, E. Bätzner, M. Kállay, H.-A. Wagenknecht, P. Kele, *Synthesis* **2015**, *47*, 2738–2744.
- [132] L. E. Hanold, K. Oruganty, N. T. Ton, A. M. Beedle, N. Kannan, E. J. Kennedy, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0118796.
- [133] S. Greiss, J. W. Chin, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 14196–14199.
- [134] A. Bianco, F. M. Townsley, S. Greiss, K. Lang, J. W. Chin, *Nature Chemical Biology* **2012**, *8*, 748–750.
- [135] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 13–21.
- [136] C. Lion, C. Simon, B. Huss, A.-S. Blervacq, L. Tiroit, D. Toybou, C. Spriet, C. Slomianny, Y. Guerardel, S. Hawkins, et al., *Cell Chemical Biology* **2017**, *24*, 326–338.
- [137] J. Mas Pons, A. Dumont, G. Sautejeau, E. Fugier, A. Baron, S. Dukan, B. Vauzeilles, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 1275–1278.
- [138] C. Meyer, S. Liebscher, F. Bordusa, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 47–53.
- [139] H. Staudinger, J. Meyer, *Helvetica Chimica Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [140] E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 14893–14902.
- [141] R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 896–901.
- [142] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Organic Letters* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [143] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21*, 1912–1916.
- [144] V. Bevilacqua, M. King, M. Chaumontet, M. Nothisen, S. Gabillet, D. Buisson, C. Puente, A. Wagner, F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 5872–5876.
- [145] G. Wittig, A. Krebs, *Chemische Berichte* **1961**, *94*, 3260–3275.
- [146] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Organic Letters* **2008**, *10*, 3097–3099.
- [147] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [148] B. D. Fairbanks, E. A. Sims, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 4113–4119.
- [149] R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 392–398.
- [1] E. Galardon, D. Padovani, *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 1013–1016.
- [151] T. H. Poole, J. A. Reisz, W. Zhao, L. B. Poole, C. M. Furdui, S. B. King, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 6167–6170.
- [152] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Topics in Current Chemistry* **2016**, *374*, DOI 10.1007/s41061-016-0016-4.
- [153] S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 12056–12060.
- [154] S. Wallace, J. W. Chin, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1742–1744.

Introduction

- [155] H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuypere, D.-A. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, et al., *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 12073–12077.
- [156] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297–2299.
- [157] H.-S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, M. G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 7838–7839.
- [158] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [159] R. Selvaraj, B. Giglio, S. Liu, H. Wang, M. Wang, H. Yuan, S. R. Chintala, L.-P. Yap, P. S. Conti, J. M. Fox, et al., *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 435–442.
- [160] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 5131–5142.
- [161] J. Bai, F. Liu, X. Liu, *Current Medical Imaging Reviews* **2012**, *8*, 295–301.
- [162] T. Lihoreau, A. Guichard, F. Fanian, A. Jeudy, J.-M. Sainthillier, B. Wacogne, L. Pazart, P. Humbert, *J. Méd. Esth. et Chir. Derm.* **2015**, *XXXII*, 175–184.
- [166] B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, De Boeck, Bruxelles, **2005**.
- [164] A. S. Klymchenko, Y. Mely, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Elsevier, **2013**, pp. 35–58.
- [165] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chemical Biology* **2008**, *3*, 142–155.
- [166] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chemical Biology* **2014**, *9*, 855–866.
- [167] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 2620–2640.
- [168] A. P. Demchenko, A. S. Klymchenko, V. G. Pivovarenko, S. Ercelen, in *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes* (Eds.: R. Kraayenhof, A.J.W.G. Visser, H.C. Gerritsen), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2002**, pp. 101–110.
- [169] Y. Wang, O. Haze, J. P. Dinnocenzo, S. Farid, R. S. Farid, I. R. Gould, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72*, 6970–6981.
- [170] J. Liang, Q. L. Nguyen, S. Matsika, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2013**, *12*, 1387.
- [171] D. L. Dexter, *The Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836–850.
- [172] Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima, T. Nagano, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 3357–3367.
- [173] A. Bamesberger, C. Schwartz, Q. Song, W. Han, Z. Wang, H. Cao, *New J. Chem.* **2014**, *38*, 884–888.
- [174] A. Lizzul-Jurse, L. Bailly, M. Hubert-Roux, C. Afonso, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 7777–7791.
- [175] W. Zhang, Z. Ma, L. Du, M. Li, *Analyst* **2014**, *139*, 2641–2649.
- [176] Z.-H. Pan, G.-G. Luo, J.-W. Zhou, J.-X. Xia, K. Fang, R.-B. Wu, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 8499–8507.
- [177] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7–17.
- [178] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 4562–4589.
- [179] M. R. Cerón, M. Izquierdo, N. Alegret, J. A. Valdez, A. Rodríguez-Forteza, M. M. Olmstead, A. L. Balch, J. M. Poblet, L. Echegoyen, *Chemical Communications* **2016**, *52*, 64–67.
- [180] A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Chemistry - An Asian Journal* **2017**, *12*, 2008–2028.
- [181] D. Maxwell, Q. Chang, X. Zhang, E. M. Barnett, D. Piwnica-Worms, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 702–709.
- [182] J. J. Yim, M. Tholen, A. Klaassen, J. Sorger, M. Bogoy, *Molecular Pharmaceutics* **2018**, *15*, 750–758.
- [183] Y. Kimura, T. Komatsu, K. Yanagi, K. Hanaoka, T. Ueno, T. Terai, H. Kojima, T. Okabe, T. Nagano, Y. Urano, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 153–157.
- [184] O. Redy, E. Kisin-Finifer, E. Sella, D. Shabat, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 710–715.

Introduction

- [185] B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015, 166-182.
- [186] A. Chevalier, J. Hardouin, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Organic Letters* **2013**, 15, 6082–6085.
- [187] S. A. E. Marras, in *Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes*, Humana Press, New Jersey, **2006**, pp. 3–16.
- [188] L.-H. Liu, K. Nakatani, E. Ishow, *New Journal of Chemistry* **2009**, 33, 1402-1408.
- [189] K.-Y. Chen, H.-Y. Tsai, W.-C. Lin, H.-H. Chu, Y.-C. Weng, C.-C. Chan, *Journal of Luminescence* **2014**, 154, 168–177.
- [190] V. S. Padalkar, S. Seki, *Chemical Society Reviews* **2016**, 45, 169–202.
- [191] M. Prost, L. Canaple, J. Samarut, J. Hasserodt, *ChemBioChem* **2014**, 15, 1413–1417.
- [192] R. J. Iwatate, M. Kamiya, K. Umezawa, H. Kashima, M. Nakadate, R. Kojima, Y. Urano, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, 29, 241–244.
- [193] S. I. Reja, I. A. Khan, V. Bhalla, M. Kumar, *Chemical Communications* **2016**, 52, 1182–1185.
- [194] K. Chantalakana, N. Choengchan, P. Yingyuad, P. Thongyoo, *Tetrahedron Letters* **2016**, 57, 1146–1149.
- [195] B. Babür, N. Seferoğlu, M. Öcal, G. Sonugur, H. Akbulut, Z. Seferoğlu, *Tetrahedron* **2016**, 72, 4498–4502.
- [196] T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Chemical Communications* **2011**, 47, 9825-9827.
- [197] S. Debieu, A. Romieu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, 15, 2575–2584.

**Chapitre 1 : Propriétés
photophysiques de la ligation de
Kondrat'eva et études comparatives
des réactions de Diels-Alder à base
de maléimides**

I. Etat de l'art

Depuis le début des années 2000, le développement de réactions chimiosélectives et bio-orthogonales est en pleine expansion. De plus, l'utilisation de ces outils va souvent de pair avec la microscopie de fluorescence. Cette instrumentation nécessite l'utilisation de fluorophores dont les modifications synthétiques peuvent se révéler délicates et fastidieuses. De plus, l'utilisation de fluorophores rend obligatoire les étapes de lavages post-marquages, puisque les fluorophores non greffés sont eux aussi fluorescents. Ces raisons ont poussés les chimistes à développer des réactions qui soient fluorogéniques. Ces ligations évitent surtout le bruit de fond qui serait dû à un marquage non spécifique résiduel et ce, en dépit de multiples lavages afin d'éliminer le fluorophore en excès. De plus, lors de la ligation, le retour de fluorescence observé permet d'avoir un point de contrôle supplémentaire quant à la réussite et au rendement de la réaction. Les réactions de conjugaison à proprement parler fluorogéniques sont très rares dans la littérature, pour élargir le propos, et proposer des pistes potentielles pour le développement de telles réactions, nous avons choisi d'exemplifier les réactions fluorogéniques mettant en jeu des réactions de conjugaisons chimiosélectives et bio-orthogonales. Le principe de ces réactions repose sur des mécanismes habituellement utilisés dans le cadre du développement de sondes profluorescentes. On retrouve donc des systèmes dont la réaction chimiosélective permet soit : 1) la libération du fluorophore ; 2) la disparition du phénomène FRET ou TeP responsable de l'extinction de fluorescence ; 3) la formation d'un motif fluorescent^[1].

1. Les ligations fluorogéniques par libération de fluorophores.

La première approche présentée ici repose sur la libération du fluorophore au cours de la réaction de ligation, dont la fluorescence est initialement masquée. Cette approche est très utilisée dans la mise au point de sondes à bras auto-immolable, dont le fluorophore est libéré spécifiquement en présence de bioanalytes (exemple de la détection de nitroréductase^[2]) (Schéma 19). Cependant, le fluorophore n'étant plus greffé sur la biomolécule bioconjugué, la localisation de la molécule bioconjugée n'est pas précise, puisque le fluorophore (ou le bioluminophore) peut diffuser dans le milieu. Ces réactions fluorogéniques permettent toutefois de quantifier l'efficacité des réactions de bioconjugaison.



Schéma 19 : Principe de la ligation fluorogénique par libération de fluorophores

Ainsi, en 2004 l'équipe de Taylor a utilisé la ligation Staudinger afin de contrôler la libération d'un fluorophore. En effet, une phosphine reliée à un fluorophore à phénol (la fluorescéine) *via* une fonction ester a été préparée. Sous cette forme, le composé n'est pas fluorescent mais lors de la réaction avec un azoture, le fluorophore est libéré et un retour concomitant de fluorescence est observé. Cette approche a été utilisée pour la détection spécifique de séquences d'ARN. Ainsi, deux brins d'ARN complémentaires à la séquence cible ont été synthétisés respectivement avec un azoture

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

et le conjugué fluorescéine-phosphine. Ensuite, en présence de la séquence cible, un appariement des brins se réalise, ce qui rapproche spatialement l'azoture et la phosphine. La ligation se réalise, et la libération du fluorophore permet ainsi la détection de la séquence d'ARN souhaitée (Schéma 20). De plus, le rapprochement spatial entre les deux partenaires de réaction a permis une accélération de la cinétique de la réaction d'un facteur 188^[3].

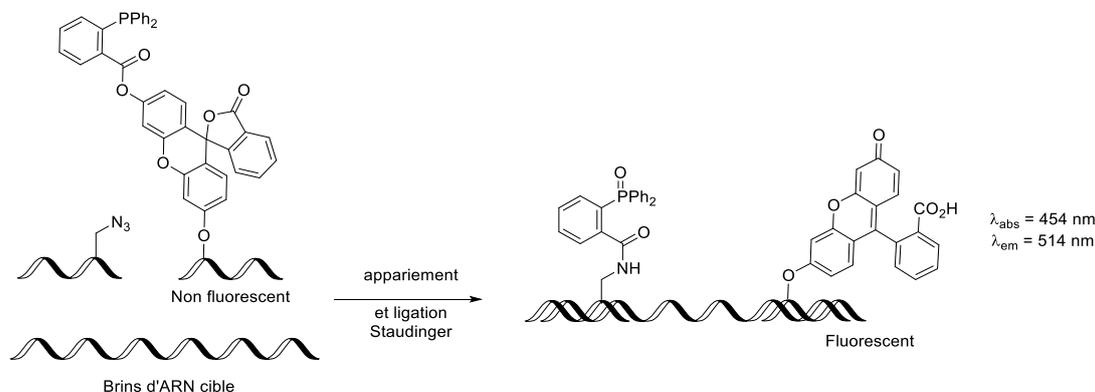


Schéma 20 : Détection spécifique de brin d'ARN par formation d'un fluorophore

Plus tard, en 2010 le groupe de Bertozzi a montré que cette approche peut également s'appliquer à la détection par bioluminescence. Pour cela, une ligation de Staudinger a été réalisée à partir d'un azoture incorporé sur des glycanes de la membrane cellulaire par voie métabolique. Ce dernier réagit dans la réaction de ligation de Staudinger avec un partenaire phosphine lié à la luciférine. Lors de la réaction, le bio-luminophore expulsé peut réagir avec la luciférase, ce qui provoque alors l'émission de photons par bioluminescence permettant de quantifier et de détecter les glycanes dans les cellules vivantes observées^[4] (Schéma 21).

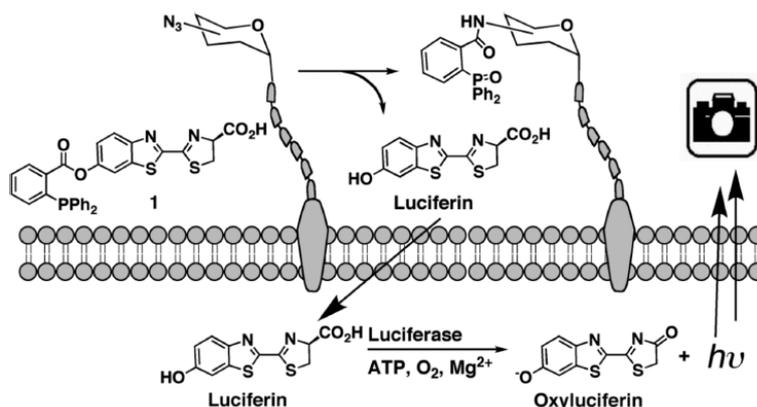


Schéma 21 : Imagerie de membranes cellulaires par libération d'un bio-luminophore (figure extraite de l'article^[4])

2. Les ligations fluorogéniques par effet FRET.

Une seconde approche repose sur l'utilisation d'un effet FRET entre un fluorophore et un « quencher ». La présence d'un « quencher » à proximité d'un fluorophore, permet au « quencher » d'absorber l'énergie émise par le fluorophore, le rendant ainsi non émissif. Ainsi, ce principe a été utilisé de pair avec les réactions de ligation qui conduisent soit : 1) à la rupture de lien covalent unissant le « quencher » au fluorophore (Schéma 22 A), soit 2) à la transformation chimique du

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

« quencher » en un motif n'absorbant plus aussi efficacement l'énergie émise par le fluorophore (Schéma 22 B).

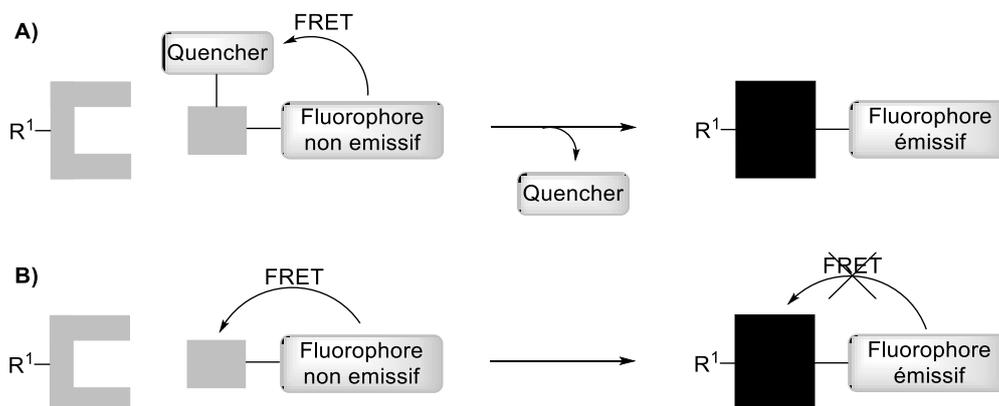


Schéma 22 : Principe de la ligation fluorogénique *via* un processus FRET

La première approche a été utilisée par le groupe de Bertozzi en 2008 afin de rendre fluorogénique la ligation Staudinger. En effet, au cours de cette réaction, l'addition de l'azoture sur la phosphine conduit à l'aminolyse intramoléculaire de l'ester libérant ainsi le fluorophore du quencher. Le retour de fluorescence alors observé a permis d'imager des membranes cellulaires par insertion métabolique d'un mannose modifié par la fonction azote^[5] (Schéma 23). La gamme de fluorophores en principe éligible à cette stratégie est large, mais elle est limitée par l'efficacité du phénomène de FRET et/ou TeP^[6], liée aux propriétés photophysiques du quencher qui doivent coïncider avec celle du fluorophore (Voir page 44).

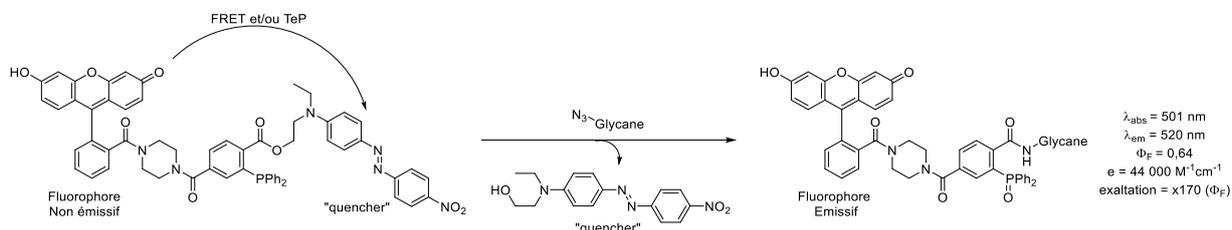


Schéma 23 : Ligation Staudinger fluorogénique.

La seconde approche a été proposée en 2010 par Weissleder, qui a développé une ligation fluorogénique basée sur la paire tétrazine/TCO. Les tétrazines possèdent une bande d'absorption à 520 nm qui leur permet de « quencher » la fluorescence des fluorophores émettant dans cette zone par processus FRET. Ces premières tétrazines fluorogéniques ont permis au groupe de Weissleder de réaliser le suivi de petites molécules, notamment le Taxol, afin d'imager le réseau de microtubules au sein de cellules vivantes^[7] (Schéma 24). L'utilisation de ces propriétés photophysiques particulières des tétrazines sera abordée plus en détail dans le chapitre 3. Cette approche est toutefois limitée aux fluorophores ayant une gamme d'émission compatible avec le spectre d'absorption des tétrazines (environ 520 nm).

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

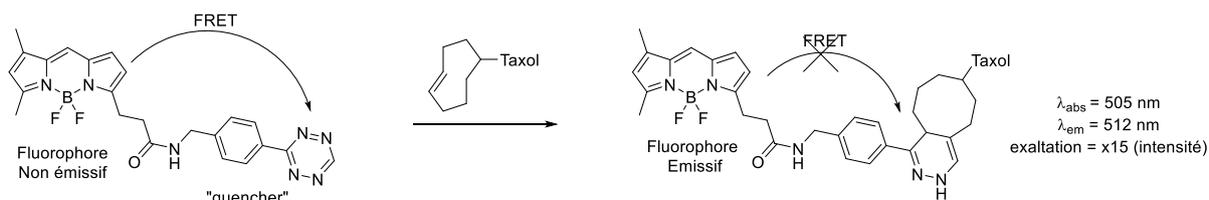


Schéma 24 : iEDDA fluorogénique

En 2014, les groupes de Weissleder et Devaraj ont développés, indépendamment, des tétrazines « ultra » fluorogéniques basées sur un mécanisme de type TBET (voir page 106). Ces nouveaux outils ont permis de réaliser le marquage de biomolécules en milieu biologique, comme le marquage spécifique d'anticorps au sein de cellules vivantes^[8,9].

3. Les ligations fluorogéniques par TeP

Cette stratégie met en œuvre un transfert d'électrons photoinduits entre le fluorophore à l'état excité et une entité chimique spatialement proche, qui a pour conséquence de rendre le fluorophore non émissif. En revanche, lorsque l'entité subit une modification chimique, elle perd cette capacité à échanger des électrons avec le fluorophore, ce qui conduit à une restauration de fluorescence. L'azoture est un bon exemple d'une telle entité chimique, car lorsqu'il réagit avec un alcyne *via* CuAAC ou SPAAC, il conduit à la formation d'une nouvelle entité chimique, le triazole, qui n'a plus la capacité d'induire un phénomène de TeP avec le fluorophore. La fluorescence est alors restaurée (Schéma 25).

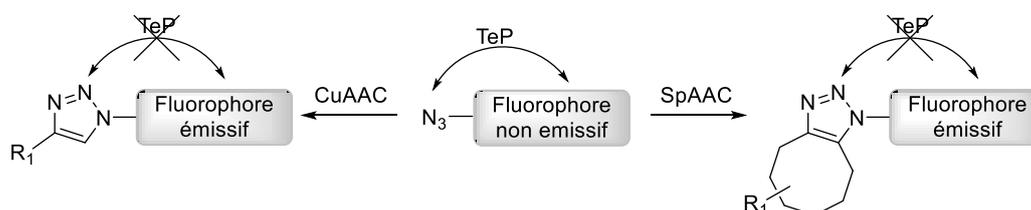


Schéma 25 : Principe des ligations CuAAC et SPAAC fluorogéniques par effet TeP.

Ainsi plusieurs azotures fluorogéniques ont été développés dans les années 2010. Ces dérivés profluorescents basés sur les structures d'anthracène, de fluorescéine, de BODIPY, ou encore de silico-rhodamine ont permis le marquage d'une protéine (BSA), ou encore le marquage de peptidoglycanes présents sur les membranes de cellules ou de bactéries par métabolisation de saccharides modifiés avec une fonction alcyne^[10-13] (Figure 15).

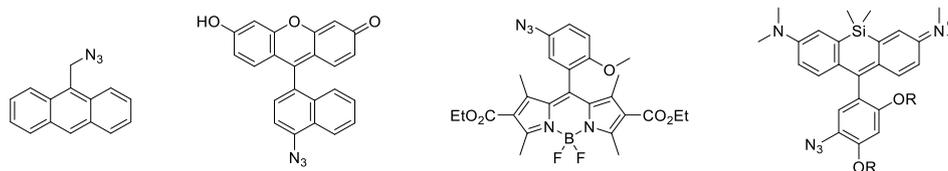


Figure 15 : Structures de quelques azotures fluorogéniques

Toutefois, le motif azoture n'est pas le seul à avoir la capacité de réaliser du TeP oxydatif. En effet, c'est également le cas du motif maléimide qui a la capacité de « quencher » les fluorophores

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

auxquels il est rattaché. Ainsi, en présence de thiols, et suite à une réaction de thio-Michael, le maléimide va perdre sa capacité à réaliser de TeP oxydatif et un retour de fluorescence sera observé. Cette particularité a notamment été utilisée par le groupe de Keillor pour le marquage spécifique de protéines présentant des thiols vicinaux. Ce marquage a pu être réalisé par le développement d'une sonde présentant deux motifs maléimide en son sein^[14] (Schéma 26).

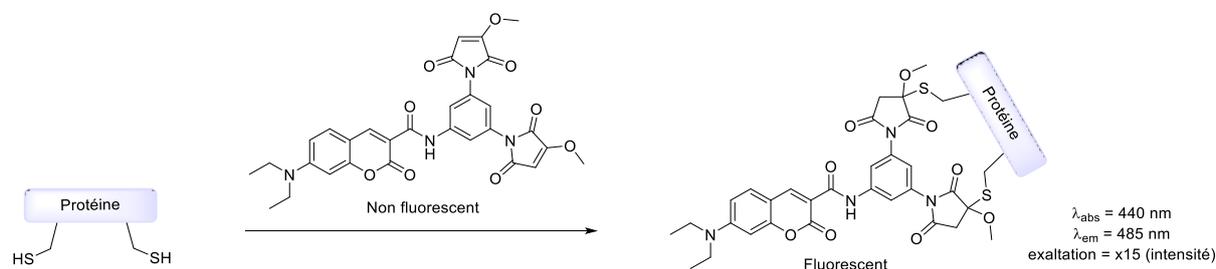


Schéma 26 : Marquage d'une protéine par utilisation d'une sonde TeP oxydatif basée sur le motif tétrazine.

Cette stratégie permet d'utiliser une large variété de fluorophores, avec des longueurs d'ondes d'excitations et d'émissions variées. Or, elle nécessite un « quenching » par TeP très efficace, ce qui n'est pas toujours le cas. De plus, elle est limitée aux réactions de bioconjugaison mettant en jeu des fonctions chimiques éligibles aux phénomènes de TeP, directement greffées sur les fluorophores (principalement azotures et maléimides).

4. Les ligations fluorogéniques par formation d'un motif fluorescent.

La dernière approche présentée ici repose sur un principe plutôt simple. En effet, il s'agit de réaliser une ligation générant un motif présentant des propriétés de fluorescence à partir de partenaires qui en sont dépourvus (Schéma 27). Cette approche présente l'avantage de mettre en œuvre des structures chimiques plus compactes que les approches précédentes, ainsi qu'un caractère « off-on » de la fluorescence très marqué.

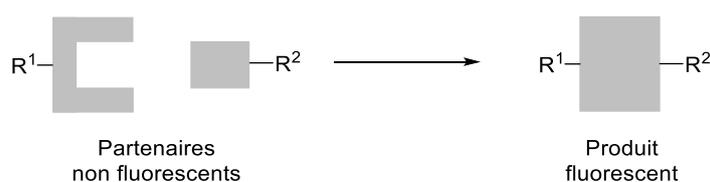


Schéma 27 : Principe de la ligation fluorogénique par formation d'un motif fluorescent

Ce principe plutôt simple présente en réalité un véritable potentiel. En effet, en plus de réaliser un marquage profluorescent, cette approche permet de réaliser une ligation entre deux groupements différents R^1 et R^2 , dont l'un n'est pas nécessairement un fluorophore (éteint ou non), contrairement à l'approche FRET ou libération de fluorophore. De plus, ces réactions sont très utiles puisqu'elles évitent l'utilisation de fluorophores externes dont la synthèse et la fonctionnalisation sont parfois fastidieuses et augmentent la taille des conjugués. La principale limitation que l'on pourrait trouver à cette stratégie réside dans les propriétés photophysiques du fluorophore formé (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission, rendement quantique et brillance), qui sont décrites dans les exemples, comme peu compétitifs avec les fluorophores organiques couramment utilisés.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

Parmi ce type de réaction on peut citer la réaction « photo-click », la plus représentée, qui se réalise entre les tétrazoles et les alcènes sous irradiation lumineuse (cf. chapitre introduction). En 2010 l'équipe de Qing utilise pour la première fois les propriétés de fluorescence de la pyrazoline formée à l'issue de la réaction pour marquer des biomolécules modifiées avec un alcène par voie métabolique et réaliser de l'imagerie *in cellulo*^[15]. En 2013, la même équipe a réalisé un allongement de la conjugaison du tétrazole, ce qui a permis d'avoir un effet bathochrome sur l'émission de la pyrazoline obtenue, passant ainsi de 520 nm à une émission supérieure à 600 nm^[16] (Schéma 28).

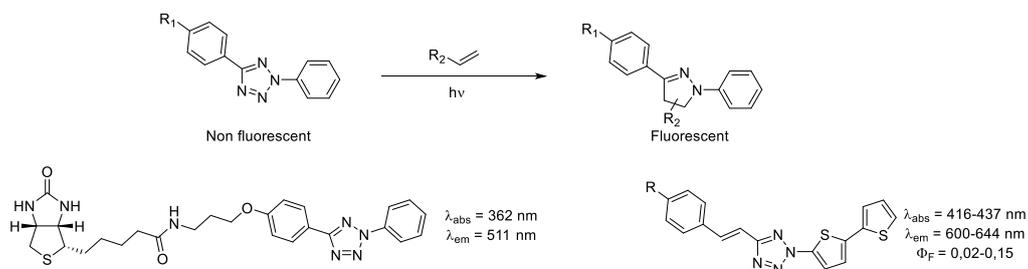


Schéma 28 : Réaction de « photo-click » fluorogénique entre les tétrazoles et les alcènes, structure de quelques tétrazoles utilisés et propriétés photophysiques des pyrazolines obtenues.

La SPAAC a également été utilisée afin de former un motif fluorescent. En effet, en 2012 l'équipe de Boons a développé un cyclooctyne dont le produit de cycloaddition avec un azoture d'alkyle est fluorescent. Cette réaction a permis l'introduction d'un tag fluorescent sur la BSA^[17] (Schéma 29).

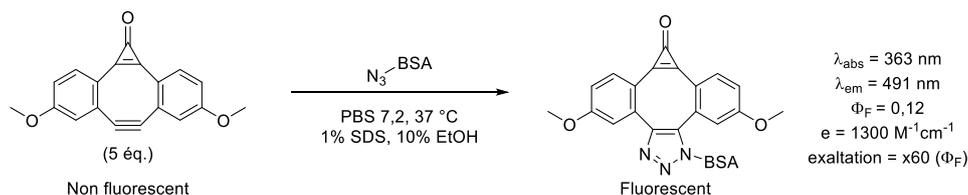


Schéma 29 : SPAAC profluorescente développée par l'équipe de Boons en 2012^[17]

II. Résultats et discussions

1. Développement d'une nouvelle réaction chimiosélective et fluorogénique basée sur la ligation Kondrat'eva

1.1. Présentation de la stratégie mise en œuvre

En 2014, il a été développé dans l'équipe par mon prédécesseur le Dr. Laurie-Anne Jouanno, une nouvelle ligation chimiosélective^[18] entre les 5-alkoxyoxazoles^[19] et les maléimides^[20]. Cette ligation est décrite en détail dans les articles cités, nous ne reviendrons ici que sur ces principales caractéristiques. Elle s'effectue en deux étapes. La première est une cycloaddition de Diels-Alder à demande électronique normale, conduisant à un oxabicycle intermédiaire sous forme d'un mélange de stéréoisomères. Si la réaction est effectuée dans des conditions réactionnelles neutres ou légèrement basiques, cette dernière est stoppée à cette première étape. En revanche, si la réaction est conduite en milieu acide, une réaction d'élimination favorisée par une réaromatisation est

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

observée. Cette dernière permet ainsi de former un azaphthalimide sous la forme d'un seul et unique stéréoisomère. Le milieu acide (tampon acétate, pH 5,0 37°C, ou H₂O -éventuellement avec un solvant organique miscible s'il y a des problèmes de solubilisation des substrats-, avec une quantité catalytique d'acide comme l'acide trifluoroacétique (pH environ 2)) nécessaire à cette réaromatisation peut être une limitation dans certaines applications. Toutefois, il possède l'avantage d'augmenter considérablement la chimiosélectivité de la réaction, en limitant la cinétique de l'addition des nucléophiles (thiols ou amines) sur le maléimide. Cependant, une compétition avec les thiols a toutefois été observée lorsque la réaction est réalisée à pH 5,0^[18]. De plus, Le motif azaphthalimide se révèle être structurellement proche des 4-hydroxyphthalimides fluorescents développés par le groupe de Song en 2015^[21] (Schéma 30 A). Ainsi après une étude photophysique, il s'est avéré que le motif azaphthalimide présentait lui aussi des propriétés de fluorescence intéressantes (Schéma 30 B).

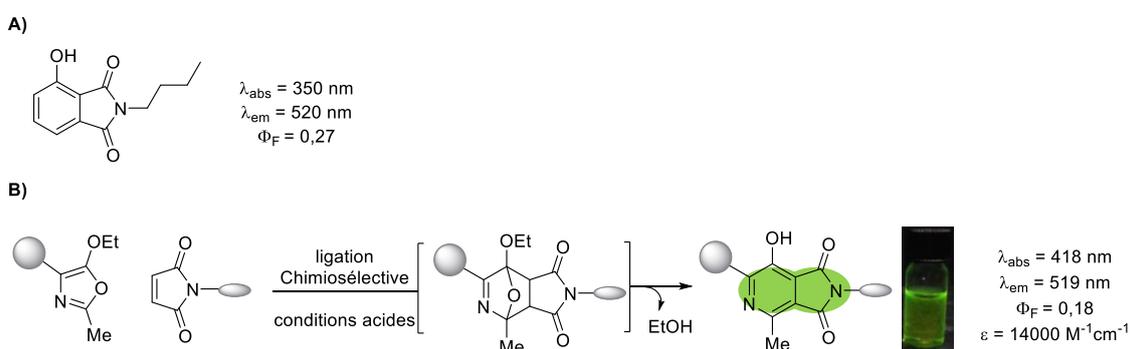


Schéma 30 : A) 4-hydroxyphthalimide développé par Song en 2015^[21]. B) ligation fluorogénique basée sur la réaction de Kondrat'eva.

Suite à cette découverte, une étude photophysique complète a été réalisée sur ces composés, et une relation entre la structure et les propriétés photophysiques ont ainsi pu être rationalisées. De plus, le pKa entre la forme phénol et phénolate de l'azaphthalimide a été déterminé et s'est révélé égal à 6. Ce qui veut dire qu'à pH physiologique le composé est majoritairement sous sa forme phénolate, qui est sa forme fluorescente. Ainsi, quatre applications ont été réalisées avec cette nouvelle ligation fluorogénique : le marquage fluorescent de biomolécules, et les synthèses de trois sondes FRET hydrosolubles, dont une utilisée pour le suivi de l'activité enzymatique et la détection de l'urokinase, qui est une enzyme surexprimée dans le cadre de plusieurs cancers, dont celui de la prostate (Figure 16).

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

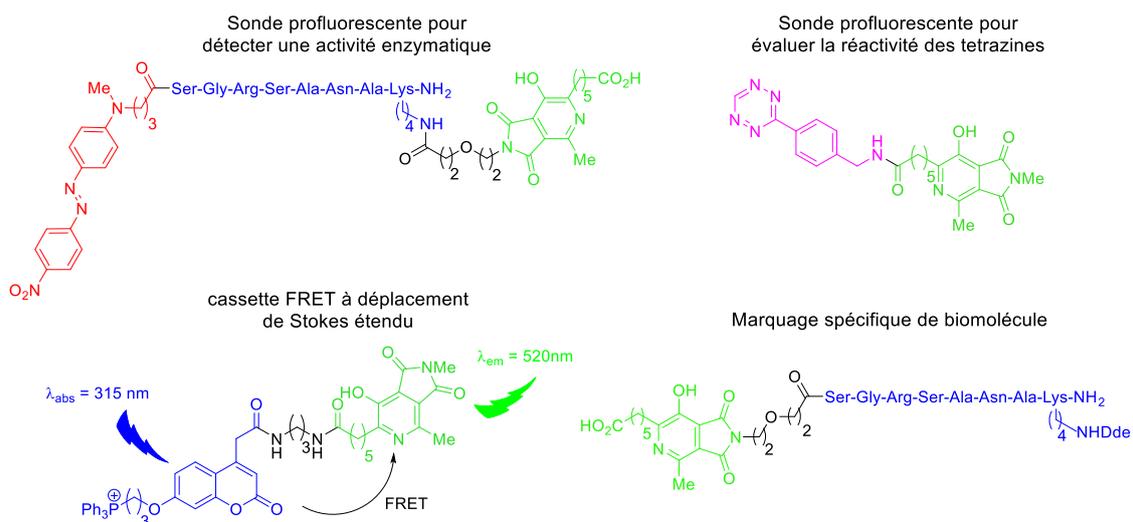


Figure 16 : Applications réalisées avec la ligation Kondrat'eva fluorogénique.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Chemistry, an European Journal* en 2016 (Kévin Renault, Laurie-Anne Jouanno, Antoine Lizzul-Jurse, Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot *Chem. Eur. J.* **2016** 22, 18522 – 18531)^[22].

1.2. Article 1 : Fluorogenic Behaviour of the Hetero-Diels-Alder Ligation of 5-Alkoxyoxazoles with Maleimides and their Applications

Fluorescence Probes

Fluorogenic Behaviour of the Hetero-Diels–Alder Ligation of 5-Alkoxyoxazoles with Maleimides and Applications

Kévin Renault,^[a] Laurie-Anne Jouanno,^[b] Antoine Lizzul-Jurse,^[a] Pierre-Yves Renard,^[a] and Cyrille Sabot^{*[a]}

Abstract: Fluorogenic reactions are largely underrepresented in the toolbox of chemoselective ligations despite their tremendous potential, particularly in chemical biology and biochemistry. In this respect, we have investigated in full detail the fluorescence behaviour of the azaphthalimide, a scaffold which is generated through a hetero-Diels–Alder

reaction of 5-alkoxyoxazole and maleimide derivatives under mild conditions that are compatible with, among others, peptide chemistry. The scope and limitations of such a fluorogenic labelling strategy were examined through four distinct applications, which target enzymatic activities or biorthogonal reactions.

Introduction

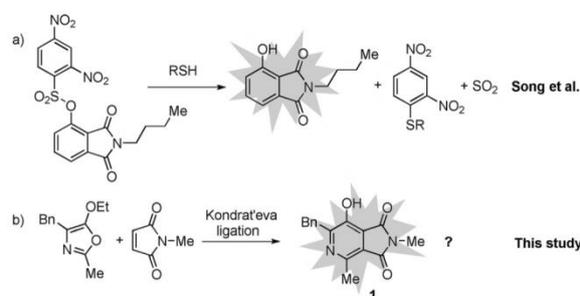
Chemoselective ligation chemistry has dramatically gained importance in recent years, which provides fascinating opportunities in different research fields, including material and life sciences.^[1] It involves reliable covalent bond formation, which takes place specifically between two chemical handles under mild conditions and avoids significant interference with biological functional groups. This strategy enables effective construction of (bio)molecular structures that span from simple scaffolds to complex molecular architectures, which is enabled by, among other characteristics, their broad functional group tolerance and reaction condition tolerability.^[2]

Different ligation strategies have been proposed over the years, and condensation reactions of hydrazines/alkoxyamines with carbonyl derivatives to provide the corresponding hydrazones/oximes were among the first chemoselective ligations to be reported.^[3] Azides have proven to be a particularly effective reaction partner, first with triarylphosphines in the Staudinger ligation,^[4] and then with alkynes in the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC).^[5] Later on, strain-promoted azide–alkyne (SPAAC),^[6] alkyne–sydnone,^[7] and alkyne–cyclic nitron cycloaddition (SPANC)^[8] were developed to circumvent the use of toxic copper catalysts. Several other ligation strategies have been proposed, which include inverse-electron-demand Diels–Alder reactions between tetrazines and strained

alkenes^[9] and between *o*-quinone methides and vinyl thioethers.^[10]

Specifically, some ligation strategies have been used to design molecular biosensors and bioprobes for real-time monitoring of biological events or enzymatic assays suitable for high-throughput screening or biomedical imaging applications.^[11] The preparation of such biomolecular systems mostly relies on a fluorescent labelling step, which involves chemoselective ligation tools. In most cases, a fluorescent dye is required on the ligation partner to label the molecule of interest; however, there are a few scarce examples of fluorogenic reactions^[12] that enable the formation of fluorescent linkages, such as the aldehyde–amino benzamidoxime ligation,^[13] the tetrazole–alkene photoclick chemistry,^[14] or azide–cyclooctyne ligation with specifically designed cyclooctynes.^[15]

We recently reported the Kondrat'eva ligation, an irreversible-based Diels–Alder reaction between 5-alkoxyoxazole and maleimide derivatives, which led to the formation of an azaphthalimide linker.^[16,17] Interestingly, this irreversible two-step reaction, which involves a Diels–Alder reaction followed by an aromatization step with concomitant release of ethanol, occurred in a single-step protocol either in the presence of a few



Scheme 1. Phthalimide and azaphthalimide derivatives.

[a] K. Renault, A. Lizzul-Jurse, Prof. Dr. P.-Y. Renard, Dr. C. Sabot
Normandie University, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen
COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen (France)
E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr

[b] Dr. L.-A. Jouanno
Department of Chemistry and Biomolecular Sciences
University of Ottawa, 10 Marie Curie, Ottawa, Ontario, K1N 6N5 (Canada)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201603617>.

equivalents of trifluoroacetic acid (TFA) in the medium or in a sodium acetate buffer (pH 5.0). Shortly after publishing our article, Song et al. reported a phthalimide-based fluorescent probe for the detection of biothiols (Scheme 1 a).^[18] Their result led us to examine whether the azaphthalimide scaffold that is generated during the ligation process would be fluorescent, and if so, to what extent (Scheme 1 b). Herein, we report the detailed investigation of the photophysical properties of azaphthalimide scaffolds along with their direct applications in the synthesis of biologically relevant fluorogenic probes.

Results and Discussion

Study of photophysical properties of azaphthalimides

The optical behaviour of the azaphthalimide scaffold (i.e., solvent and pH effect) was determined by using the model compound **1**. First, absorption and emission spectra were recorded in various solvents, which ranged from nonpolar aprotic to polar protic medium (Figure 1 a).

In weakly ionizing solvents, such as toluene or dichloromethane, an absorption band at ≈ 350 nm was mainly observed. In contrast, in polar aprotic and polar protic solvents, such as DMF, MeOH, or water, a new absorption peak was detected above 400 nm along with a decrease in the intensity of the band at ≈ 350 nm. From these positive solvatochromic results, it was assumed that the high- and low-energy absorption band could be assigned to neutral and ionized azaphthalimide species, respectively. In fact, polar media would favor the formation of a hydrogen-bonding interaction between the hydroxyl group of the azaphthalimide moiety and the solvent. To further investigate this hypothesis, the influence of the deprotonation of the hydroxyl group of azaphthalimide **1** on the absorption and fluorescence emission spectra was investigated in the nonpolar toluene solvent (Figure 1 b–d). The absorption peak at ≈ 350 nm decreased gradually upon the addition of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), and the appearance of a red-shifted absorption band was observed at ≈ 420 nm. Moreover, the gradual disappearance of the fluorescence emission that corresponded to an excitation in the high-energy absorption band (350 nm) was observed, and a band at ≈ 520 nm appeared. Besides, a noticeable increase in the emission peak intensity at ≈ 520 nm under an excitation wavelength of 430 nm was observed. Collectively, these data suggest that the neutral azaphthalimide species absorbs at 350 nm and emits at 420 nm, and the phenolate species absorbs at 420 nm and emits at 520 nm. These results are also confirmed by the analysis of their excitation spectra recorded at 420 and 520 nm (see the Supporting Information). In most of the aforementioned solvents (except toluene and CH_2Cl_2), both phenol and phenolate species are present in the reaction medium, albeit in different proportions. Furthermore, the phenolic form of the azaphthalimide generally exhibits a significantly weaker fluorescence at 420 nm than its phenolate counterpart at 520 nm. Indeed, deprotonation of the hydroxyl group increases the electron density within the aromatic ring system and then enhances the intramolecular charge transfer

(ITC) process, which is likely responsible for fluorescence emission. Consequently, the absorption and emission behaviour of the azaphthalimide scaffold was investigated in aqueous media at different pH values to determine the suitability of the azaphthalimide scaffold for future fluorescence applications.

The spectroscopic data of compound **1** were recorded in aqueous solutions of pH 1.1–10.9 (Figure 2). A decrease in pH

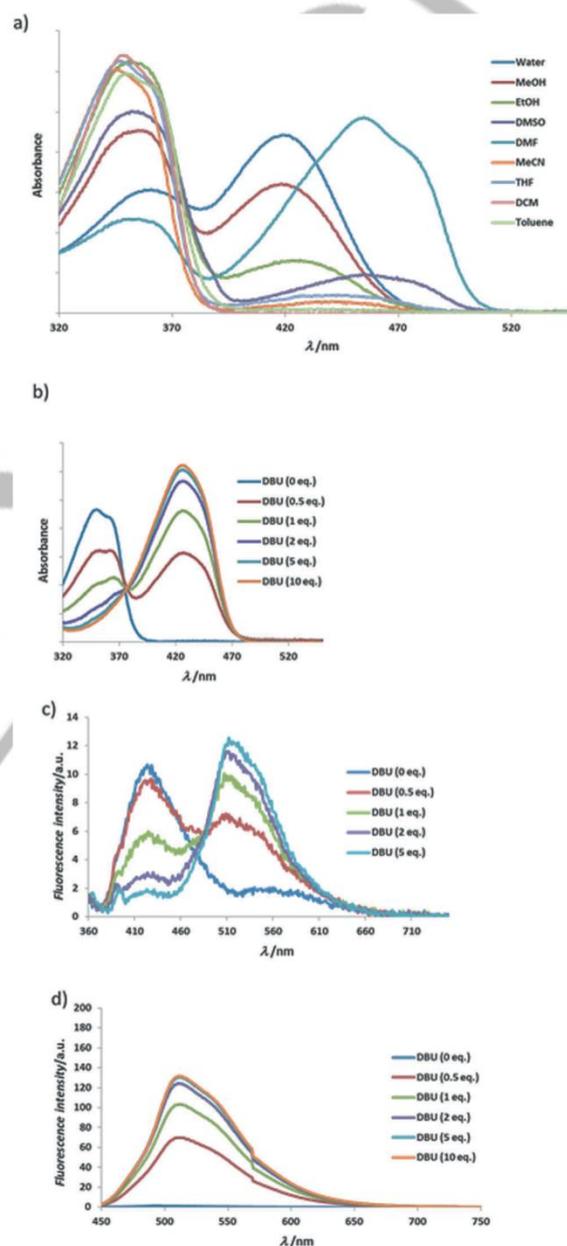


Figure 1. Photophysical behaviour of compound **1**. a) Absorption spectra in different solvents and b) in toluene in the presence of different amounts of DBU at 25 °C. Emission spectra in toluene in the presence of different amount of DBU upon an excitation at c) 350 nm and d) 430 nm at 25 °C.

value resulted in a decrease in intensity of the absorption band at ≈ 420 nm and a concomitant increase in intensity of the absorption band at ≈ 350 nm, with an isosbestic point at 378 nm. Next, the fluorescence spectra were determined at an excitation wavelength of 430 nm for different pH values. As expected from the absorption spectra, the emission intensity decreased as the pH of the solution was lowered. From this study, it appears that the phenolate ion (i.e., the most fluorescent species) is the predominant form at pH values higher than 6.0, which corresponds to the pK_a value that was calculated from the absorbance values at 420 nm at different pH values (see the Supporting Information). To quantify this trend more precisely, the fluorescence quantum yield of compound **1** was measured at different pH values (pH 2.2–10.9, Table 1). Under an excitation wavelength of 430 nm, acceptable quantum yields were observed for pH values higher than 5.6. Following these encouraging results, the photophysical properties of a series of diversely functionalized azaphthalimides were subsequently determined to assess the impact of substituents on the photoluminescence characteristics of the azaphthalimide and thus understand specific requirements for optimal fluorescence emission (entries 10–13). 2-Benzyl-substituted pyridine systems exhibited quantum yields at pH 7.4 that were comparable to that of compound **1** (0.07–0.10, entries 11–13) with the exception of unsubstituted compound **2**, which displayed a markedly lower quantum yield (0.02, entry 10). Accordingly, the presence of an aliphatic group at position 6 of the pyridine ring system is crucial for fluorescence enhancement. Satisfyingly, conjugatable or conjugated hexanoic-acid-based derivatives **6–8** exhibited appreciable quantum yields in the range of 0.15–0.18, which is even higher than those of their 2-benzyl-substituted congeners, but with lower levels of brightness.

Applications of the fluorogenic Kondrat'eva ligation

The scope and limitations of such a fluorogenic labelling strategy were examined through four distinct applications, which are detailed hereafter.

Peptide labelling (Application 1)

The chemical modification of proteins or peptides that are only available in small quantities is generally conducted with an excess of more readily accessible labelling agents to compensate for the dilution conditions. In this context, a fluorogenic ligation reaction would advantageously avoid unwanted fluorescence emission from the unreacted starting material, which was used in excess and may not be easily removed from the product. To illustrate this point, the heptapeptide **9**, prepared through standard solid-phase synthesis, was functionalized with the maleimide **10**. The corresponding maleimide-modified heptapeptide **11** was treated with a three molar excess of oxazole **12** in NMP in the presence of 1 equivalent of TFA (Scheme 2). It is worth noting that, when in aqueous media, the Kondrat'eva ligation could proceed even in the presence of a large excess of TFA owing to the buffering effect

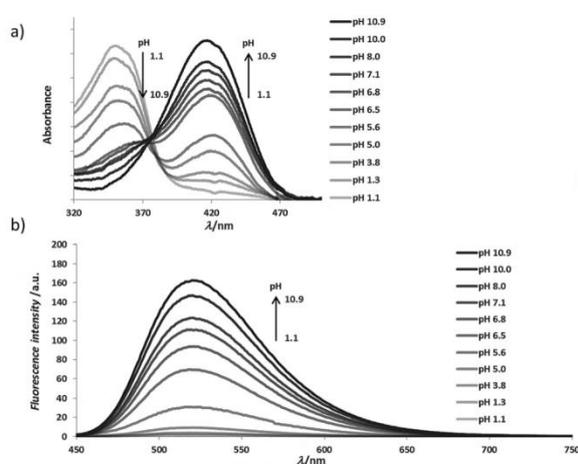


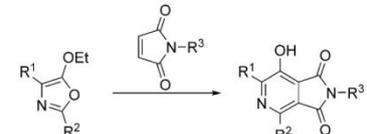
Figure 2. a) Absorption and b) emission spectra of compound **1** at 25 °C upon an excitation at 430 nm at different pH values.

of water; however, in organic media, TFA should not exceed one or two equivalents relative to the oxazole (see the Supporting Information). The resulting RP-HPLC analysis with UV detection of the reaction mixture clearly showed the presence of two close peaks at 9.58 and 9.63 min, which correspond to the excess of starting oxazole **12** and the azaphthalimide product **13**, respectively, and were inseparable by semi-preparative RP-HPLC (Figure 3). Advantageously, in the fluorescence detection mode, only the peak that corresponded to the azaphthalimide conjugate **13** was observed on the chromatogram (along with the peptide product in a different protonation state at 10.29 min), the unreacted oxazole peak being no longer visible.

Synthesis of a coumarin–azaphthalimide-based FRET cassette (Application 2)

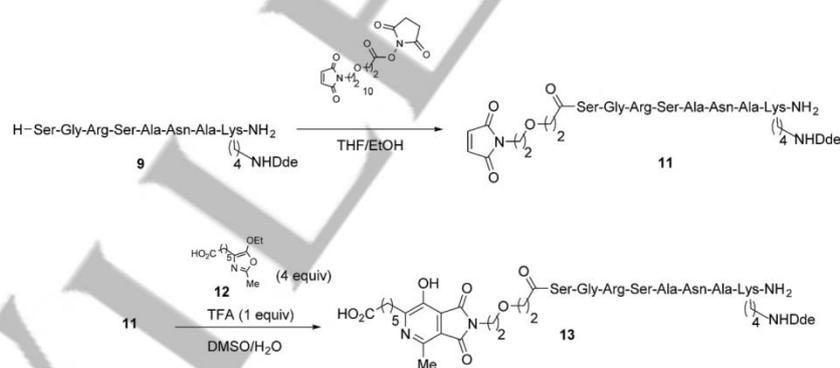
Fluorescent or fluorogenic molecular systems have become very popular chemical tools in diverse fields of research, such as in medicinal chemistry for the determination of enzymatic activity or in chemical biology for real-time monitoring and imaging of biological events. In this respect, the spectrum of use of azaphthalimide dyes for fluorescence applications was explored through the design of three different FRET-based probes. Such molecular systems involve a donor fluorophore, which transfers its excitation energy to a nearby acceptor chromophore (fluorophore or quencher) in a nonradiative manner. To optimize the FRET process, the donor emission spectrum should significantly overlap the acceptor absorption spectrum. Initially, the construction of a FRET cassette was investigated through the covalent attachment of two fluorophores that displayed substantial spectral overlap (see the Supporting Information): a coumarin dye **14** as the donor, recently reported by us,^[19] and an azaphthalimide scaffold **6** as the acceptor (Scheme 3). Complete photophysical properties of the corre-

Table 1. Spectroscopic behaviour of azaphthalimides 1–8.



Entry	Cmpd	R ¹	R ²	R ³	pH	λ _{abs} [nm] ^[a]	λ _{em} [nm] ^[a]	ε [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Φ _F ^[b]
1	1	Bn	Me	Me	2.2	420	522	3300	< 0.01
2					4.5	420	522	6300	0.01
3					5.6	420	522	9400	0.04
4					6.7	417	522	12900	0.08
5					7.0	418	520	14000	0.09
6					7.4	417	520	13700	0.09
7					8.5	417	520	11600	0.11
8					9.9	418	520	12000	0.09
9					10.9	417	521	10700	0.09
10	2	Bn	H	Me	7.4	407	513	[c]	0.02
11	3	Bn	CH ₂ Bn	Me	7.4	418	521	[c]	0.10
12	4	Bn	Me	Ph	7.4	421	521	[c]	0.07
13	5	Bn	Me	(CH ₂) ₅ CO ₂ H	7.4	418	519	[c]	0.10
14	6	(CH ₂) ₅ CO ₂ H	Me	Me	2.2	415	520	1300	0.08
15					4.5	417	518	5000	0.05
16					5.6	417	519	4700	0.07
17					6.7	415	517	5900	0.14
18					7.0	413	521	6000	0.15
19					7.4	416	517	6500	0.15
20					8.5	415	520	6000	0.17
21					9.9	415	518	6400	0.16
22					10.9	415	517	7500	0.16
23	7	(CH ₂) ₅ CONHCHPh(Et)	Me	Me	7.4	416	518	[c]	0.16
24	8	(CH ₂) ₅ CONHCHPh(Et)	Me	(CH ₂) ₅ CONHBn	7.4	418	519	[c]	0.18

[a] λ_{abs} is the maximum of the absorption band responsible for the emission observed at λ_{em}. [b] Measurement determined at 25 °C by a relative method that used Lucifer yellow as standard (Φ_F = 0.21 in water) with excitation at 430 nm. [c] Not determined.



Scheme 2. Synthetic route to fluorescent peptide 13 from peptide 11 and oxazole 12.

sponding FRET pair 16, which was obtained in 90% yield from compound 15, were determined to establish whether the spectral properties of each fluorophore were preserved upon their conjugation. The UV/Vis absorption spectrum of the FRET cassette 16 showed two absorption maxima at 325 and 420 nm, which is in accordance with the sum of absorption bands of the parent dyes (Figure 4).

As expected from the FRET strategy, the azaphthalimide dye could now be selectively excited at 315 nm, while allowing emission in the green region of the spectrum (Figure 4c, dotted curve). Thus, a large pseudo-Stokes shift of 195 nm was observed, which advantageously avoids any self-absorption phenomenon that standard fluorophores may suffer from. Moreover, the energy-transfer efficiency (ETE) was found to be 77%, which demonstrates the successful combination of these

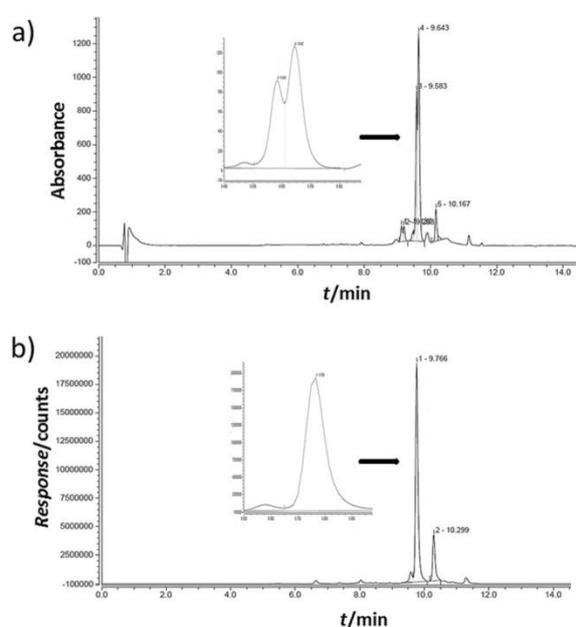
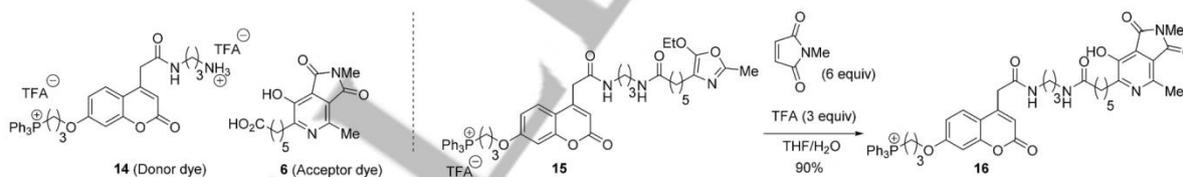


Figure 3. HPLC chromatogram of the ligation step that involves the starting materials **11** and **12** and the product **13**, in the a) UV and b) fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) detection mode.

two fluorophores, although significant residual fluorescence attributed to the coumarin moiety was still observed at 325 nm. This latter result highlights the difference in fluorescence efficiency between those two fluorophores.



Scheme 3. Preparation of the coumarin-azaphthalimide-based FRET cassette **16**.

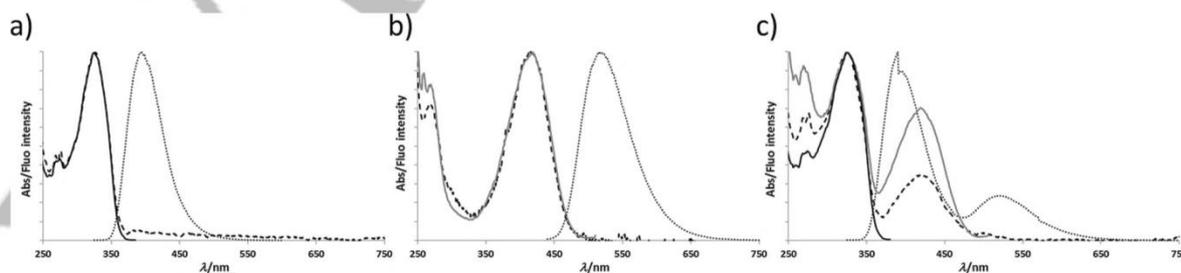
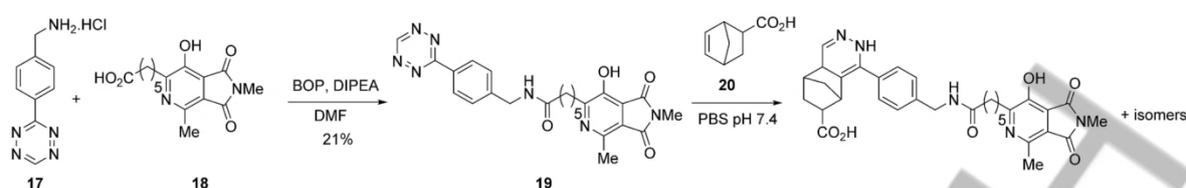


Figure 4. Normalized absorption (dashed line), emission (dotted line, $\lambda_{\text{ex}} = 315 \text{ nm}$ for compounds **14** (a), **16** (c) and $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$ for compound **6** (b)), and excitation spectra (black line, $\lambda_{\text{em}} = 395 \text{ nm}$ for compounds **14** (a), **16** (c); grey line, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ for compounds **6** (b), and **16**) in PBS pH 7.4 at 25 °C.

Synthesis of an azaphthalimide-tetrazine-based smart probe (Application 3)

The preparation of a bioorthogonal smart probe based on a novel fluorophore/quencher FRET pair was envisioned. In this approach, the enhancement in fluorescence emission intensity was selectively triggered through a bioorthogonal process. Accordingly, this recent labelling strategy enabled direct fluorescence imaging of diverse biological targets without the removal of excess unreacted probe by several washing steps. Although significant progress has been made in the development of tetrazine-based smart probes by using BODIPY, coumarin, or fluorescein fluorophores, we seized the opportunity to increase their limited number, specifically by using a readily accessible fluorogenic probe.

Tetrazine **17** displays an absorption maximum of $\approx 521 \text{ nm}$, which also corresponds to the emission maximum of the azaphthalimide ring system. Consequently, a tetrazine-azaphthalimide-based FRET probe was envisioned and achieved through a final amide bond formation step between the amino tetrazine **17** and the carboxylic acid moiety of the azaphthalimide **18** (Scheme 4). With the probe in hand, its fluorogenic behaviour was explored through the inverse-electron-demand Diels-Alder cycloaddition with the strained alkene norbornene **20** in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at room temperature. Satisfyingly, a significant four-fold fluorescence turn-on response was observed at 520 nm within 10 min of the reaction commencement (Figure 5). This result demonstrates that the fluorescence of the azaphthalimide scaffold could be quenched by the tetrazine core, presumably through a FRET mechanism. Thus, reaction of the tetrazine moiety with the strained alkene could be directly followed in real time through the fluorescence recovery of the



Scheme 4. Preparation of the azaphthalimide-tetrazine conjugate 19.

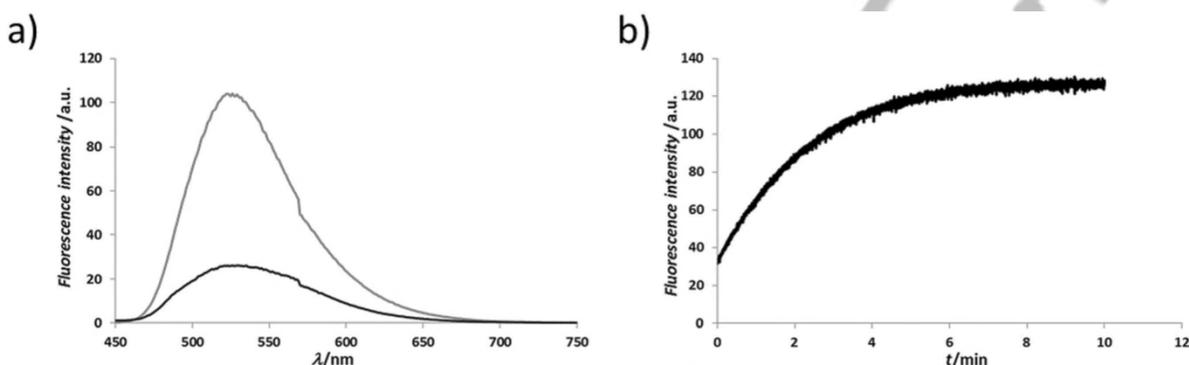


Figure 5. a) Fluorescence emission spectrum ("Scan" mode, $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$) of probe 19 before (black) and after (grey) addition of a 3-fold excess of norbornene. b) Fluorogenic activation time course ("kinetic" mode, $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) of probe 19 in PBS pH 7.4 at 25 °C.

azaphthalimide moiety. Notably, probe 19 could advantageously be used to compare the kinetics of tetrazine-based Diels-Alder reactions with various dienophiles.^[20]

Synthesis of a fluorogenic substrate of urokinase (Application 4)

The final investigation relied upon the preparation of a FRET-based urokinase-plasminogen-activator(uPA)-sensitive probe; uPA is a diagnostically relevant serine protease owing to its overexpression in breast and prostate cancer. Accordingly, the fluorogenic probe 24, which constituted a FRET pair of an azaphthalimide fluorophore and a newly prepared dabcyll-like quencher 21^[21] that were connected at both ends of octapeptide H-Ser-Gly-Arg-Ser-Ala-Asn-Ala-Lys-NH₂ (known uPA substrate),^[16,22] was prepared in three steps from compound 9. During the first two steps, the diazo quencher 21 and the maleimide 10 were consecutively attached at the N- and C-terminal of the octapeptide, respectively. Then, the hetero-Diels-Alder reaction of intermediate 23 with the oxazole 12 afforded the corresponding conjugate in 38% yield. The structure of the resulting probe was unambiguously confirmed by HRMS analysis (Scheme 5).

Results obtained from the proteolysis of the fluorogenic probe 24 with commercial uPA are summarized in Figure 6. Even though an important quenching of fluorescence was observed before the enzymatic digestion, the fluorescence was completely recovered in the presence of uPA within 30 min. The quenching efficiency (QE) was determined to be 93%,

which issued a satisfying ten-fold increase in fluorescence at 520 nm after enzymatic digestion (Figure 6).

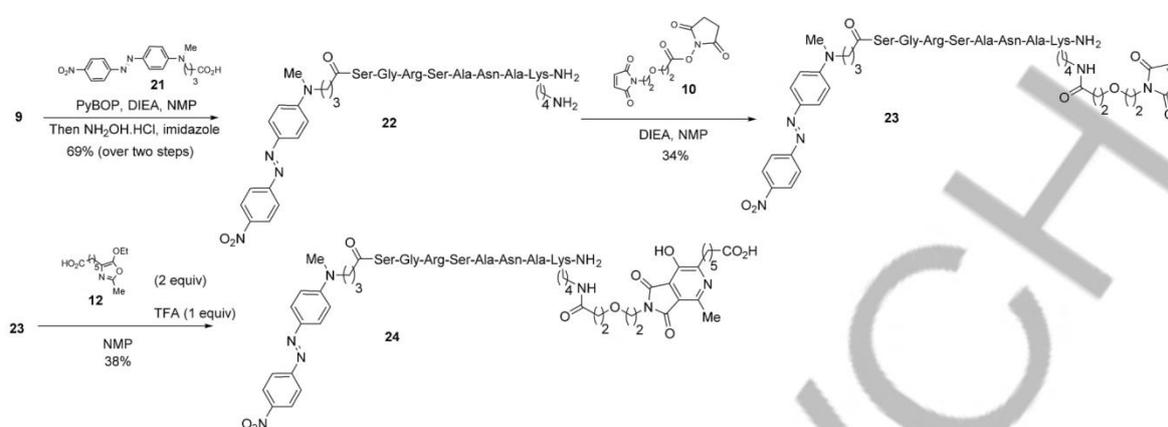
Conclusion

This study reports the detailed photophysical properties of the azaphthalimide, a green-emitting moiety that was generated through the ligation of the nonfluorescent oxazole and maleimide moieties. This work demonstrated that azaphthalimides display solvatochromic character owing to hydrogen-bonding interactions with the solvent, for which the most fluorescent species (i.e., phenolate) is favored in polar or basic media as well as in physiological conditions. Finally, the albeit moderate fluorescence behaviour of azaphthalimides has found useful applications, in particular for the construction of fluorogenic FRET-based probes to target specific enzymatic activities or to evaluate the efficacy of bioconjugate processes, such as the tetrazine ligation. The latter application is currently being investigated in our group.

Experimental Section

General information

Flash column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 mm). Thin-layer chromatography (TLC) were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (at 254/365 nm) and/or staining with KMnO₄ solution. Unless otherwise



Scheme 5. Synthesis of probe 24.

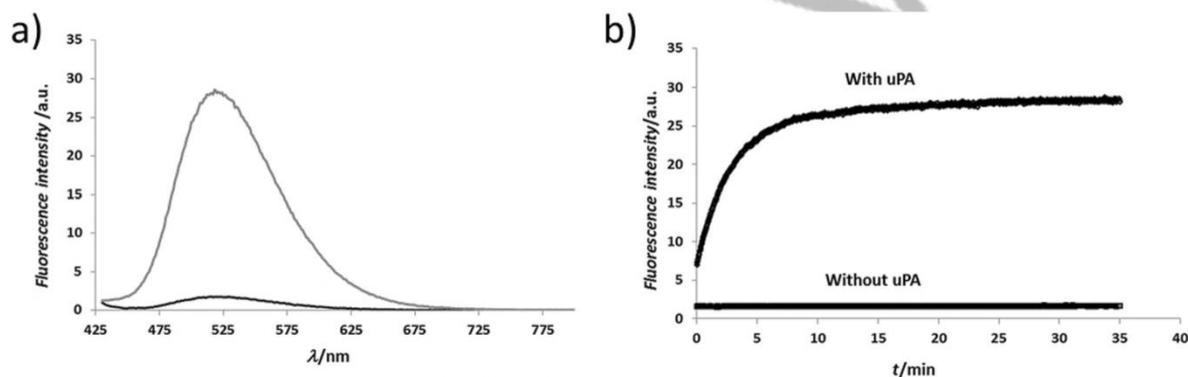


Figure 6. a) Fluorescence emission spectrum ("Scan" mode, $\lambda_{ex}=420$ nm) of probe 24 before (black) and after (grey) incubation with uPA in PBS pH 7.4 at 37 °C. b) Fluorogenic activation time course ("kinetic" mode, $\lambda_{ex}=420$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm) of probe 24 in PBS pH 7.4 at 37 °C.

noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. PBS (pH 7.4, 0.1 M), carbonate buffer (pH 10.89, 0.1 M), and aq. mobile phases for HPLC were prepared with water that was purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 M Ω cm).

Instrument and methods

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million [ppm] by using the residual solvent peak for calibration. J values are expressed in Hz. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive and negative modes. Low resolution mass spectra (LRMS) were obtained with a mass spectrometer equipped with an ESI source. UV/Vis absorption spectra were obtained by using a rectangular quartz cell (standard cell, Open Top, 10 \times 10 mm, chamber volume=3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed by using a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 \times 4 mm, chamber volume=1.4 mL for quantum yields determination, chamber volume=3.5 mL for all other studies). In vitro fluorescence assays and in vitro enzymatic assays were per-

formed by using an ultra-micro quartz cell (Hellma, 105.251-QS, 20 \times 3 mm, chamber volume=45 μL). The absorption spectra of azaphtalimide derivatives were recorded (430–800 nm) in basic conditions or polar and protic solvent at 25 °C. The absorption spectra of azaphtalimide derivatives were recorded (370–800 nm) in acidic conditions or in apolar and aprotic solvent at 25 °C. Excitation/emission spectra were recorded under the same conditions after emission/excitation at the corresponding wavelength (366/430 nm, excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit=2.5 nm). Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method that used Lucifer yellow ($\Phi_F=21\%$ in water, 430 nm) as a standard.^[23] The following Equation (1) was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(X) = (A_s/A_x) (F_x/F_s) (n_x/n_s)^2 \Phi_F(S)$$

in which A is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 a.u.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.337 for PBS, 1.333 for water, 1.362 for EtOH, 1.497 for toluene, 1.424 for CH_2Cl_2 , 1.344 for MeCN

1 ■■■ok?■■■, 1.407 for THF, 1.328 for MeOH, 1.431 for DMF, and
2 1.478 for DMSO.

3 Preparation of the carbonate buffer (pH 10.89, 0.1 M)

4 500 mL of a 0.1 M solution of NaHCO₃ and 500 mL of a 0.1 M solu-
5 tion of Na₂CO₃·10H₂O were prepared. 0.1 M solution of NaHCO₃
6 (50 mL) was added to the 0.1 M solution of Na₂CO₃·10H₂O (450 mL)
7 to give, after the pH value was adjusted by using a pH-meter, the
8 carbonate buffer (pH 10.89, 0.1 M).

9 HPLC systems used for purity control or purification

10 Analytical HPLC

11 **System QC1:** Accucore C18 column (2.1 × 150 mm) with MeCN am-
12 monium acetate buffer (20 mM, pH 7.0) as a linear gradient over
13 35 min from 10–90% of MeCN at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ and
14 injection volume of 1 µL. UV/Vis wavelength used for the absorb-
15 ance detection was performed at 230 nm, and UV/Vis wavelength
16 used for the fluorescent detection was performed at 420 nm for
17 excitation and 520 nm for emission.

18 **System QC:** Thermo Hypersyl GOLD C18 column (5 µm, 2.1 ×
19 100 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
20 5 min followed by 0–100% MeCN for 40 min) at a flow rate of
21 0.25 mL min⁻¹.

22 Semi-preparative HPLC

23 Several chromatographic systems were used for the purification
24 steps:

25 **System A:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 10.0 ×
26 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
27 5 min, 0–30% MeCN for 30 min, an isocratic mixture of 30% MeCN
28 for 15 min, and 30–100% of MeCN for 55 min) at a flow rate of
29 7 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for the detection was per-
30 formed at 465 nm.

31 **System B:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 ×
32 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
33 5 min, 0–100% MeCN for 100 min, and 100% MeCN for 45 min) at
34 a flow rate of 20 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for the detec-
35 tion was performed at 570 and 430 nm.

36 **System C:** RP-HPLC (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 5 µm,
37 10.0 × 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN
38 for 10 min, 0–100% MeCN for 200 min, and 100% MeCN for
39 30 min) at a flow rate of 4 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for
40 the detection was performed at 575 and 390 nm.

41 **System D:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 ×
42 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
43 10 min, 0–100% MeCN for 100 min, and 100% MeCN for 20 min) at
44 a flow rate of 20 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for the detec-
45 tion was performed at 330 and 235 nm.

46 **System E:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 ×
47 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
48 10 min, 0–100% MeCN for 100 min, and 100% MeCN for 20 min) at
49 a flow rate of 20 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for the detec-
50 tion was performed at 365 and 310 nm.

51 **System F:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 ×
52 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
53 10 min, 0–100% MeCN for 200 min, and 100% MeCN for 30 min) at
54 a flow rate of 20 mL min⁻¹. UV/Vis wavelength used for the detec-
55 tion was performed at 355 and 235 nm.

56 **System G:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 ×
57 250 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents (0% MeCN for
58 5 min, 0–20% MeCN for 20 min, 20–60% MeCN for 80 min, and
59 60–100% MeCN for 35 min) at a flow rate of 20 mL min⁻¹. UV/Vis
60 wavelength used for the detection was performed at 340 and
61 240 nm.

62 Synthesis of azaphthalimide peptide conjugate 13

63 **Step 1:** a) *N*-Hydroxysuccinimide (211 mg, 1.83 mmol, 1.1 equiv)
64 and EDCI-HCl (351 mg, 1.83 mmol, 1.1 equiv) were added to a solu-
65 tion of maleimide carboxylic acid **10**^[24] (355 mg, 1.67 mmol,
66 1 equiv) in a mixture of dry THF/EtOH (6 mL, 1:1 v/v). The resulting
67 reaction mixture was stirred at room temperature until reaction
68 completion (cyclohexane/EtOAc 50:50). The solution was quenched
69 with a saturated solution of NaHCO₃, extract with CH₂Cl₂ (2 ×
70 20 mL). The combined organic phases were washed with brine,
71 dried over MgSO₄, concentrated under vacuum, and used in the
72 next step without further purification. b) The TFA salt of the hepta-
73 peptide **9**^[6] (20 mg, 18.7 µmol, 1 equiv) and *N*-hydroxysuccini-
74 mide-activated maleimide **10** (7 mg, 22.5 µmol, 1.2 equiv) were dis-
75 solved in NMP (330 µL). DIEA (2.0 M solution in NMP, 26.1 µL,
76 0.15 mmol, 8 equiv) was added, and the resulting reaction mixture
77 was stirred at RT for 2 h. The reaction progress was monitored by
78 RP-HPLC (System QC). After the reaction was completed, Et₂O was
79 added, and the resulting precipitate was centrifuged. The precipi-
80 tate that contained the maleimide-modified peptide was collected
81 and used without further purification in the next step, because we
82 found that the conjugate was not stable during purification on
83 semi-preparative RP-HPLC

84 **Step 2:** 5-Ethoxyoxazole **12**^[6] (18 mg, 74.8 µmol, 4 equiv) and a so-
85 lution of TFA (1.43 µL, 18.7 µmol, 1 equiv) in water (210 µL) was
86 added to the peptide–maleimide conjugate, which was obtained
87 in Step 1, dissolved in DMSO (420 µL), and the reaction mixture
88 was stirred at RT for 5 h. The reaction progress was monitored by
89 RP-HPLC (System QC). The mixture was diluted with aq. 0.1% TFA
90 and purified by semi-preparative RP-HPLC, and the product-con-
91 taining fractions were lyophilized (System F). To remove the excess
92 oxazole, which was not separable from the azaphthalimide product
93 by semi-preparative RP-HPLC, Et₂O was added to the lyophilisate,
94 the resulting precipitate was centrifuged, and the product-contain-
95 ing fractions were lyophilized to give 10.5 mg (42% yield for the
96 two steps) of the azaphthalimide-labelled peptide **13** as a yellow
97 amorphous powder. UV/Vis (PBS): λ_{max} = 417 nm; HPLC (Sys-
tem QC): t_R = 21.883 min (93% purity).

98 Synthesis of the coumarin FRET pair 16

99 Compounds **14** and **15** were prepared according to a reported
100 procedure.^[24]

101 Compound 16

102 TFA (2.78 µL, 35.9, 3 equiv) and *N*-methylmaleimide (8 mg,
103 72.0 µmol, 6 equiv) were added successively to a solution of azaph-
104 thalimide **15** (11 mg, 12.0 µmol) in a H₂O/THF mixture (72 µL, 1:1).
105 The solution was stirred at RT for 18 h and directly purified by
106 semi-preparative RP-HPLC (System G). The product-containing frac-
107 tions were lyophilized to afford the product (12 mg, 90% yield) as
108 a yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, [D₄]MeOD): δ = 7.95–7.71 (m, 15H),
109 7.69 (dd, *J* = 8.7, 3.9 Hz, 1H), 7.01–6.93 (m, 1H), 6.93–6.86 (m, 1H),
110 6.27 (s, 1H), 4.25 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.75 (s, 2H), 3.68–3.56 (m, 2H),
111 3.25–3.14 (m, 4H), 3.06 (s, 3H), 2.92–3.82 (m, 2H), 2.67 (s, 3H),
112 2.24–2.13 (m, 4H), 1.77–1.55 (m, 6H), 1.41–1.26 ppm (m, 4H);

¹³C NMR (75 MHz, [D₄]MeOD): δ = 176.2, 170.8, 168.7, 163.0, 163.0, 162.9, 156.6, 156.6, 152.2, 146.9, 146.5, 136.4 (d, *J*_{p-c} = 2.9 Hz, 3C), 134.9 (d, *J*_{p-c} = 10.1 Hz, 6C), 131.6 (d, *J*_{p-c} = 12.7 Hz, 6C), 127.6, 122.5, 122.3, 119.7 (d, *J*_{p-c} = 86.9 Hz, 3C), 114.5, 114.5, 113.9, 102.7, 68.5 (d, *J*_{p-c} = 16.5 Hz, 1C), 40.1, 38.1, 37.6, 36.9, 33.2, 30.1, 30.0, 29.0, 26.7, 23.9, 23.5 (d, *J*_{p-c} = 3.0 Hz, 1C), 20.0 (d, *J*_{p-c} = 53.7 Hz, 1C), 19.5 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3363, 2942, 2509, 1672, 1611, 1543, 1438, 1385, 1280, 1201, 1178, 1134, 1114 cm⁻¹; HRMS (ESI⁺): *m/z* calcd for C₅₀H₅₃N₄O₈P: 867.3523 [M]⁺; found: 867.3499; HPLC (System QC): *t*_R = 27.3 min, purity 97.5%.

Synthesis of the fluorogenic tetrazine-based probe 19

Compound 19

BOP ((Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate) (29.2 mg, 0.066 mmol, 1.01 equiv), benzylamine tetrazine **17**^[25] (16.1 mg, 0.00718 mmol, 1.1 equiv), and DIEA (46 μL, 0.26 mmol, 4 equiv) were added to a solution of azaphthalimide **6** (20.0 mg, 0.0653 mmol, 1 equiv) in dry DMF (400 μL), and the reaction was stirred at RT for 2 h. Upon reaction completion, the crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, EtOAc 100% to Acetone 100%). The residue was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System E). The product-containing fractions were lyophilized to give the product (6.6 mg, 21%) as an orange amorphous powder. M.p. 122 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 10.58 (s, 1H), 8.55–8.28 (m, 3H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.39 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 2.97 (s, 3H), 2.87–2.78 (m, 2H), 2.61 (s, 2H), 2.19 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.71–1.51 (m, 4H), 1.42–1.28 ppm (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 172.3, 168.1, 166.6, 165.4, 159.90, 158.1, 145.1, 130.3, 128.1, 128.1, 127.8, 127.8, 121.0, 79.4, 78.9, 78.5, 41.82, 35.3, 32.2, 28.6, 27.3, 25.1, 23.60, 19.6 ppm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3279, 2925, 2852, 1697, 1661, 1607, 1515, 1436, 1348, 1251, 1178 cm⁻¹; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₄H₂₅N₇O₄: 475.1968 [M+H]⁺; found: 476.2045; HPLC (System QC): *t*_R = 23.15 min (96.3% purity).

Preparation of the uPA-responsive probe 24

4-(methyl(4-((4-nitrophenyl)diazanyl)phenyl)amino)butanoic acid 21

NOBF₄ (187.7 mg, 1.59 mmol, 1.1 equiv) was added to a solution of *para*-nitroaniline (200 mg, 1.45 mmol, 1 equiv) in freshly distilled CH₃CN (2 mL) cooled to 0 °C. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 15 min. A solution of 4-(methyl-phenyl-amino)-butyric acid (308 mg, 1.59 mmol, 1.1 equiv) in freshly distilled CH₃CN (1 mL) was added dropwise, and the resulting mixture was stirred for 30 min at RT. Aq. 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) was added slowly until a precipitate appeared. The red solid was recovered by filtration and washed with a mixture of H₂O/CH₃CN (1:1) and Et₂O. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 60:40–40:60–0:100 then EtOAc/MeOH 90:10). The product (108 mg, 22%) was isolated as a red powder. M.p. 194 °C; ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.36 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 3.55–3.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.37–2.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.91–1.67 ppm (q, *J* = 7.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): δ = 174.2, 156.3, 152.6, 146.8, 142.7, 126.0, 125.0, 122.5, 111.6, 50.9, 38.3, 30.7, 21.9 ppm; UV/Vis (DMSO, 25 °C): λ_{max} abs = 500 nm; IR (neat): $\tilde{\nu}$ = 3285, 2921, 2107, 1691, 1601, 1506, 1422, 1289, 1214, 1024, 858, 823, 755, 685, 534, 410 cm⁻¹.

uPA-responsive probe 24

Step 1: The TFA salt of the heptapeptide **9** (20 mg, 18.7 μmol, 1 equiv), the quencher **21** (8 mg, 23.4 μmol, 1.1 equiv), and PyBOP (12.0 mg, 23.4 μmol, 1.1 equiv) were dissolved in NMP (280 μL). DIEA (2.0 M solution in NMP, 18 μL, 104 μmol, 5 equiv) was added, and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 2 h. The reaction completion was checked by RP-HPLC (System QC). Upon reaction completion, Et₂O was added, the resulting precipitate was centrifuged and dissolved in DMF (2 mL). Hydroxylamine hydrochloride (6.8 mg, 104 μmol, 5 equiv) and imidazole (7.2 mg, 104 μmol, 5 equiv) were added, and the reaction mixture was stirred overnight at RT. The reaction progress was monitored by RP-HPLC (System QC). After reaction completion, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System B). The product-containing fractions were lyophilized to give the modified peptide **22** (15.96 mg, 69% overall yield for the two steps) as a red amorphous powder. LRMS (ESI⁺) HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₄₇H₇₂N₁₈O₁₄: 1113.2050 [M+H]⁺; found: 1113.13; UV/Vis (PBS): λ_{max} = 500 nm, HPLC (System QC): *t*_R = 24.48 min (93.6% purity).

Step 2: Peptide **22** (2.78 mg, 2.3 μmol, 1 equiv) and *N*-hydroxysuccinimide activated maleimide **10** (0.85 mg, 2.7 μmol, 1.2 equiv) were dissolved in NMP (40 μL). DIEA (2.0 M solution in NMP, 3.2 μL, 18.2 μmol, 8 equiv) was added, and the resulting reaction mixture was stirred at RT for 2 h 30 min. The reaction progress was monitored by RP-HPLC (System QC). Upon reaction completion, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System A). The product-containing fractions were lyophilized to give the maleimide-functionalized peptide **23** (1.0 mg, 34%) as a red amorphous powder. LRMS (ESI⁺) HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₅₆H₈₁N₁₉O₁₈: 1308.38 [M+H]⁺; found: 1308.47; UV/Vis (PBS): λ_{abs(max)} = 500 nm; HPLC (System QC): *t*_R = 25.63 min (87.8% purity).

Step 3: 5-Alkoxyoxazole **12** (0.80 mg, 3.1 μmol, 2 equiv),^[16] maleimide-modified peptide **23** (2.2 mg, 1.55 μmol, 1 equiv) in NMP (39 μL), and TFA (0.124 μL, 155 μmol, 1 equiv) were combined and stirred at RT for 3 h. The reaction progress was monitored by RP-HPLC (System QC). Upon reaction completion, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System C). The product-containing fractions were lyophilized to give the fluorogenic probe **24** (1.05 mg, 38%) as a red amorphous powder. HRMS (ESI⁺) *m/z* calcd for C₆₆H₉₅N₂₀O₂₁: 1503.6981 [M+H]⁺; found: 1503.7013; UV/Vis (PBS): λ_{max} = 500 nm. HPLC (System QC): *t*_R = 26.026 min (>99% purity).

Fluorogenic bioorthogonal reaction between norbornene and tetrazine–azaphthalimide conjugate 19

A solution of norbornene (5 μL, 360 mM in DMSO) was added to a 10 mM solution of fluorogenic probe **19** in PBS (45 μL, 0.1 M pH 7.4) in the ultra-micro quartz cell. After excitation at the desired wavelength (420 nm), the fluorescence emission at 520 nm was simultaneously monitored over time, with measurements recorded every 0.1 s. Emission spectra of the probe were recorded before and after the reaction to determine the quenching efficiency (QE), which was calculated on the basis of the following equation: QE = 100 × [1 – (fluorescence emission intensity of the probe)/(fluorescence emission intensity of the probe after complete reaction of tetrazine moiety)]

In vitro enzymatic assays - fluorescence bioassays

A 100 μM solution of fluorogenic peptide **24** was prepared in PBS (45 μL , 0.1 M pH 7.4) and transferred into the ultra-micro quartz cell. uPA solution (10 μL , 1.2 U, 25 μg in 100 μL of buffer: 500 mM Tris-HCl+1.0 M NaCl+1% PEG 6000+2.0 M mannitol) was added, and the resulting mixture was incubated at 37.5 °C for 30 min. After excitation at the desired wavelength (420 nm), the fluorescence emission at 520 nm was monitored over time, with measurements recorded every 1 s. Emission spectra of the probe were recorded before and after cleavage to determine the quenching efficiency (QE), which was calculated on the basis of the following equation: $QE = 100 \times [1 - (\text{fluorescence emission intensity of the probe}) / (\text{fluorescence emission intensity of the probe after complete digestion by uPA})]$.

Acknowledgements

We thank the Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN 0001401) for financial support to K.R. This work was also partially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), INSA Rouen, Rouen University, and the Labex SynOrg. We also thank Emilie Petit (INSA de Rouen) and Laetitia Bailly (INSA de Rouen) for HPLC analyses and Albert Marcual (CNRS) for HRMS analyses.

Keywords: azaphthalimide · Diels-Alder · fluorescence spectroscopy · ligation · oxazole

- [1] a) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182–10228; b) S. Liu, K. T. Dicker, X. Jia, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5218.
- [2] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075.
- [3] a) D. Rideout, *Science* **1986**, *233*, 561–563; b) V. W. Cornish, K. M. Hahn, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8150–8151; c) O. El-Mahdi, O. Melnyk, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 735–765; d) S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 34–41.
- [4] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [5] a) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. J. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711.
- [6] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [7] a) S. Wallace, J. W. Chin, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1742–1744; b) L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9376–9378; c) H. Liu, D. Audisio, L. Plougastel, E. Decuypere, D.-A. Buisson, O. Koniev, S. Kolodych, A. Wagner, M. Elhabiri, A. Krzyczmonik, S. Forsback, O. Solin, V. Gouverneur, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 12073–12077; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 12252–12256.
- [8] D. A. MacKenzie, A. R. Sherratt, M. Chigrinova, L. L. W. Cheung, J. P. Pezacki, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 81–88.
- [9] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.
- [10] Q. Li, T. Dong, X. Liu, X. Lei, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4996–4999.
- [11] a) G. Clavé, H. Volland, M. Flaender, D. Gasparutto, A. Romieu, P.-Y. Renard, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4329–4345; b) D. M. Beal, L. H. Jones, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6320–6326; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6426–6432; c) A. Chevalier, M. Dubois, V. Le Joncour, S. Dautrey, C. Lecointre, A. Romieu, P.-Y. Renard, H. Castel, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1119–1133; d) M. Rashidian, S. C. Kumarapperuma, K. Gabrielse, A. Fegan, C. R. Wagner, M. D. Distefano, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16388–16396.
- [12] For a review, see: P. Shieha, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9307–9320.
- [13] P. I. Kitov, D. F. Vinals, S. Ng, K. F. Tjhung, R. Derda, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8149–8152.
- [14] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832–2835; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2874–2877.
- [15] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937–5939.
- [16] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366.
- [17] For peptidic applications of Diels-Alder reactions, see : a) A. Dantas de Araújo, J. M. Palomo, J. Cramer, O. Seitz, K. Alexandrov, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6095–6109; b) T. Pauloehr, G. Delaitre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1071–1074; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1096–1099; c) K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins, A. Madder, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2927–2929; d) O. Brun, X. Elduque, E. Pedrosa, A. Grandas, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6093–6101.
- [18] a) X. Liu, L. Gao, L. Yang, L. Zou, W. Chena, W. Song, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 18177–18182; b) X. Liu, L. Yang, L. Gao, W. Chen, F. Qi, W. Song, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8285–8289.
- [19] A. Lizzul-Jurse, L. Bailly, M. Hubert-Roux, C. Afonso, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7777–7791.
- [20] Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085.
- [21] B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 166–182.
- [22] a) B. Law, A. Curino, T. H. Bugge, R. Weissleder, C.-H. Tung, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 99–106; b) R. Malik, S. Qian, B. Law, *Anal. Biochem.* **2011**, *412*, 26–33.
- [23] P. A. Peixoto, A. Boulange, M. Ball, B. Naudin, T. Alle, P. Cosette, P. Karuso, X. Franck, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15248–15256.
- [24] A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1349–1359.
- [25] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5222–5225; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5312–5315.

Received: July 29, 2016
Published online on ■■■■■, 0000

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

En plus des résultats décrits dans l'article, l'hypothèse selon laquelle les azaphthalimides seraient des fluorophores phénoliques type « *push-pull* », dont la fluorescence dépendrait donc de la déprotonation de son groupement hydroxyle, a été vérifiée par une alkylation de cette fonction phénol du composé modèle **1** avec un rendement de 83%. Ainsi, il a été observé une chute drastique des propriétés de fluorescence du composé que ce soit en termes de longueur d'onde d'émission ou de rendement quantique même à pH 7,4 (tampon PBS). Ainsi, quel que soit le pH, le composé méthylé **2** a les mêmes propriétés d'absorption et d'émission que le composé hydroxyle **1** en pH acide (pH 2,2, $\lambda_{\text{abs}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 422 \text{ nm}$, $\Phi_{\text{F}} = 0,02$). Cette chute est cohérente avec le fait que les azaphthalimides soient des fluorophores dont les propriétés de fluorescence sont directement liées au pKa de la fonction phénol (Schéma 31).

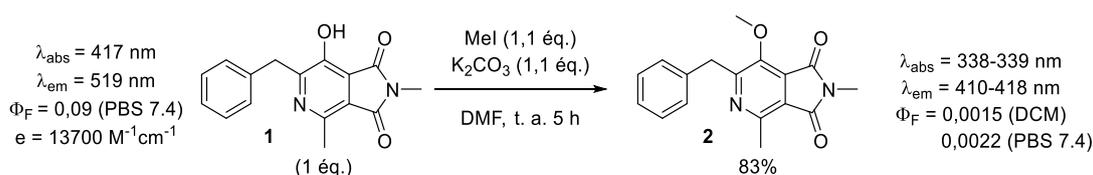


Schéma 31 : Synthèse et propriétés photophysiques du composé **2**

Cependant, la synthèse de l'oxazole **9** bioconjugué (et utilisé dans le cadre de l'article 1) se révèle relativement longue pour un composé dont l'objectif est une utilisation en ligation chimiosélective (14% sur 6 étapes). En effet, il est généralement établi que les partenaires de ligation doivent, autant que faire se peut, être facilement et rapidement synthétisables. C'est pourquoi la synthèse de nouveaux oxazoles a été entreprise. La synthèse de l'oxazole **14** repose sur l'ester diéthylique de l'acide glutamique **11** commercial et peu cher (65 euros les 5 g, chez Sigma-Aldrich), le rendant accessible en seulement trois étapes avec un rendement global de 50% contre six étapes pour l'oxazole **9** avec un rendement global de 14%. De plus, L'oxazole **14** présente un espaceur plus court de trois carbones par rapport au composé **9** ce qui lui permet donc de gagner en hydrosolubilité. Parallèlement, une voie de synthèse a été développée, à partir de l'ester éthylique de la L-tyrosine N-acétylée **16** (74 euros les 5 g, chez Sigma-Aldrich). Cette dernière a permis l'accès à l'oxazole **18** fonctionnalisable en trois étapes avec un rendement global de 43% (Schéma 32). Concernant l'étape de formation du noyau oxazole, la cyclo-déshydratation peut se réaliser en présence de P_2O_5 ou de POCl_3 . Dans un premier temps, la méthode utilisant P_2O_5 a été utilisée. Bien que la conversion observée soit excellente, la difficulté rencontrée dans le traitement de la réaction (extraction) fait chuter les rendements obtenus à l'issue de la réaction. C'est pour cette raison que la méthode utilisant POCl_3 a été privilégiée. En effet, les conversions obtenues sont semblables à celles observées avec P_2O_5 sans les problèmes liés au traitement, et rend par la même occasion la purification sur gel de silice plus aisée.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

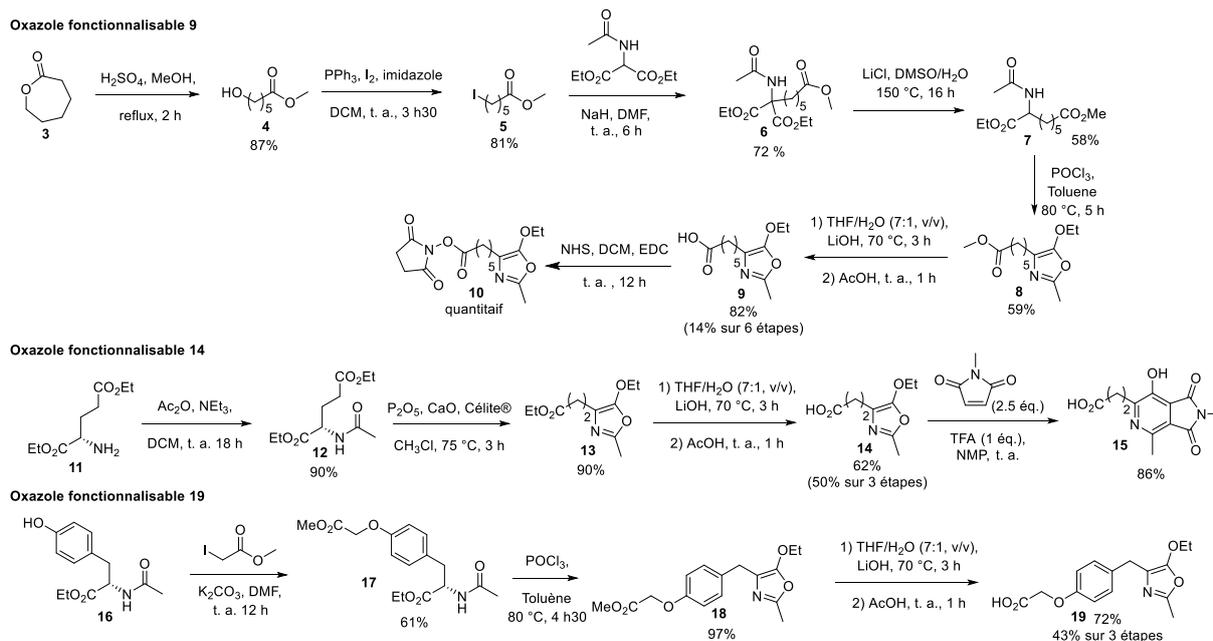


Schéma 32 : Synthèse des oxazoles fonctionnalisables.

Afin de diversifier les applications, une sonde fluorescente amphiphile pour le marquage de membranes cellulaires a également été synthétisée. Cette sonde se compose de deux parties. Une partie hydrophobe constituée de l'oxazole substitué par un cholestérol^[23], et une partie polaire constituée d'un maléimide comportant un acide carboxylique^[24]. Il est important de noter que la substitution nucléophile se réalisant entre la molécule **21** et l'éthylène glycol, permet de générer la molécule **22** avec une rétention de stéréochimie^[25]. Enfin, l'ultime étape de synthèse se réalisant avec la ligation Kondrat'eva a permis la formation de la sonde **28** avec un rendement de 30% (Schéma 33). Cependant, des problèmes liés à sa faible solubilité en milieu aqueux, ne nous ont pas permis de l'utiliser.

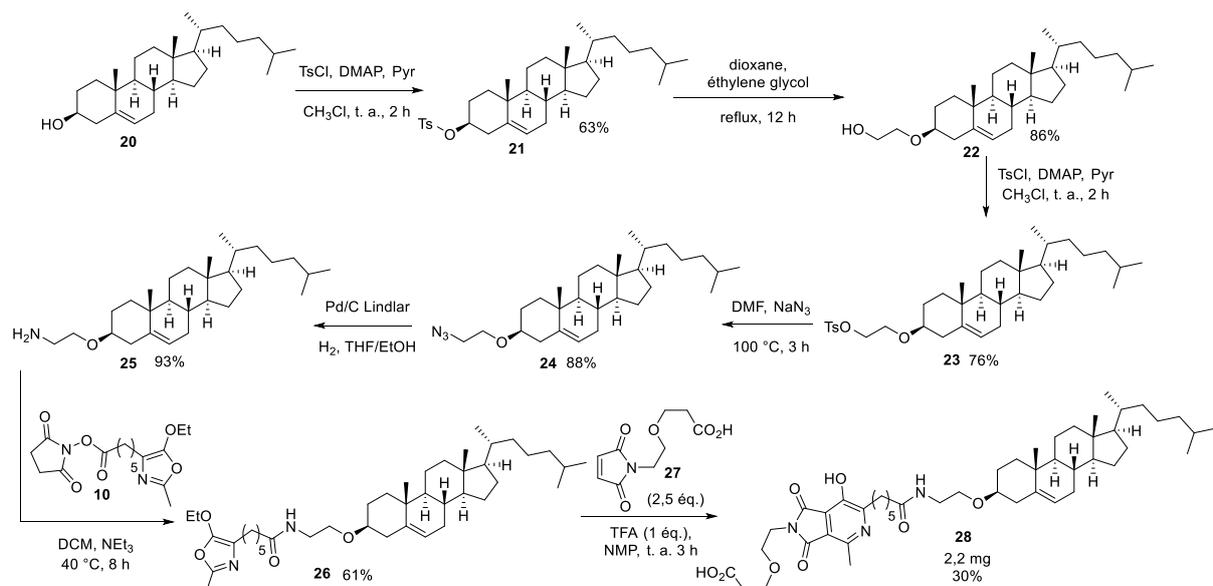


Schéma 33 : Synthèse de la sonde amphiphile **28**

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

2. Etude comparative des différentes ligations chimiosélectives basées sur des réactions de type [4+2] avec le maléimide

Suite aux travaux portant sur le développement la ligation Kondrat'eva, une étude comparative a été réalisée entre les différentes ligations chimiosélectives reposant sur une cycloaddition [4+2] et utilisant le maléimide comme diénophile. Ainsi, plusieurs diènes connus dans la littérature ont été comparés lors de cette étude. On retrouve ainsi un diène carboné linéaire (butadiène), des diènes carbonés cycliques (cyclopentadiène, cyclohexadiène, anthracène) et hétérocycliques (furane, 5-ethoxyoxazole). La comparaison s'est donc réalisée selon les trois points suivant : la cinétique de la réaction, le nombre de molécules formées à l'issue de la ligation et enfin la stabilité du produit formé. Ces travaux ont été réalisés avec Alexis Lossouarn et Axel Frisby, qui sont respectivement, doctorant et stagiaire de Master 2^{ème} année au sein de l'équipe.

2.1. Etude cinétique

La réaction de Diels-Alder à demande électronique normale implique l'utilisation d'oléfines appauvries en électrons, qui sont potentiellement de bons accepteurs de Michael, et donc, susceptibles de donner des réactions non désirées avec les nucléophiles biologiques, principalement les thiols et les amines. Pour que la sélectivité de la réaction de ligation soit bonne, il faut donc que la cinétique de la réaction de Diels-Alder soit plus rapide que la réaction de Michael sur le diénophile. Afin d'avoir une étude comparative rapide et facilement interprétable, nous avons choisi de mesurer l'avancement des réactions de cycloaddition par un suivi cinétique *via* un retour de fluorescence. Pour ce faire, une sonde profluorescente reposant sur un mécanisme de type TeP oxydatif a été utilisée. Un grand nombre de sondes de ce type sont décrites dans la littérature. Ainsi, pour des raisons d'accès synthétique et de propriétés photophysiques, deux sondes se sont naturellement imposées. On retrouve la sonde **30** comportant un motif pyrène^[26] et la sonde **34** comportant le motif dansyl^[27] (Schéma 34).

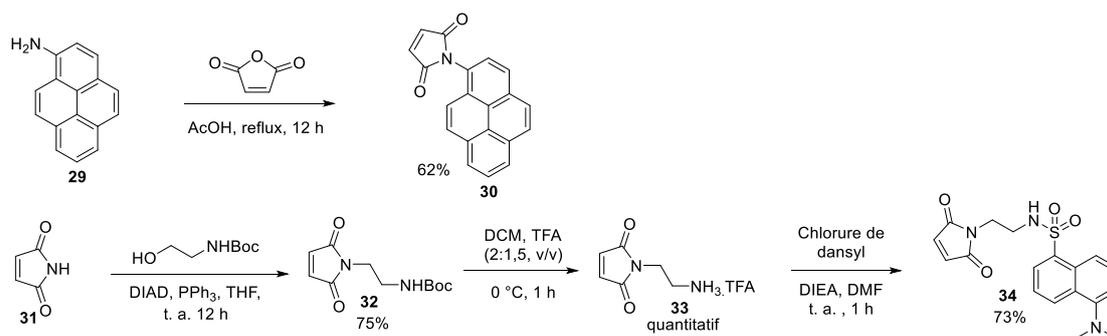


Schéma 34 : Synthèse des sondes profluorescentes basées sur un motif pyrène et dansyl.

Cependant, suite à la trop faible solubilité dans les milieux aqueux observée avec la sonde pyrène, notre choix s'est porté sur la sonde **34** comportant le motif dansyl. En effet, la fluorescence du dansyl est éteinte par le maléimide *via* un phénomène de TeP oxydatif. La disparition de la double liaison du motif maléimide au cours de la réaction de cycloaddition [4+2], provoque une hausse du niveau énergétique de la BV du maléimide ne lui permettant plus de réaliser efficacement le TeP oxydatif. Ainsi, un retour de l'émission de fluorescence du dansyl avec une exaltation maximale d'un facteur 477 est observé et nous permet de caractériser directement la cinétique de la réaction (Schéma 35).

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

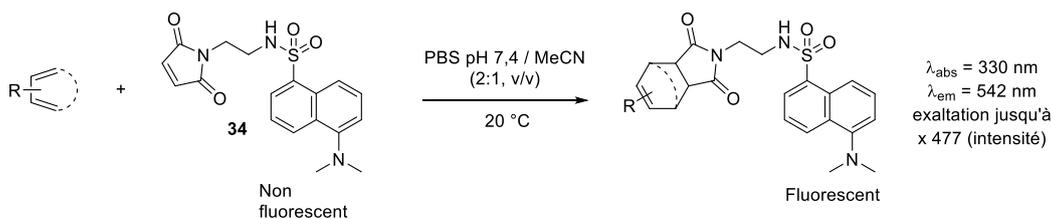


Schéma 35 : Principe de la détection fluorogénique utilisée dans le cadre de l'étude comparative des cinétiques des ligations [4+2]

L'étude comparative de la réactivité des différents diènes a été réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre dans une cuve en quartz (Volume = 3 mL, épaisseur = 1 cm), avec une concentration en sonde **34** de 1 mM dans un mélange PBS/ACN (2:1, v/v) à température ambiante (20 °C). L'intensité de fluorescence à 560 nm (excitation à 330 nm) est mesurée au cours du temps pour chaque diène à une concentration de 5 mM, soit 5 équivalents. On obtient ainsi les courbes de la Figure 17. Il est donc possible de classer les différents diènes en fonction de leur réactivité vis-à-vis du maléimide **34**. On retrouve ainsi du plus rapide au plus lent, le cyclopentadiène, les 5-ethoxyoxazoles, le cyclohexadiène, le butadiène, les furanes, et enfin l'anthracène. Pour les 5-ethoxyoxazoles, les conditions de pH choisies lors de cette étude ne conduisent pas à la réaction d'élimination réaromatisante de la ligation Kondrat'eva, mais uniquement à la formation de l'adduit de Diels-Alder. Il n'y a donc pas d'interférence avec la fluorescence de l'azaphthalimide. De plus, cette étude permet de comparer la cinétique de la réaction initiale du diénophile, potentiellement en compétition avec les réactions de Michael sur le maléimide, afin d'évaluer quelle(s) ligation(s) serai(en)t la ou les plus à même(s) d'être réalisée(s) en milieu physiologique.

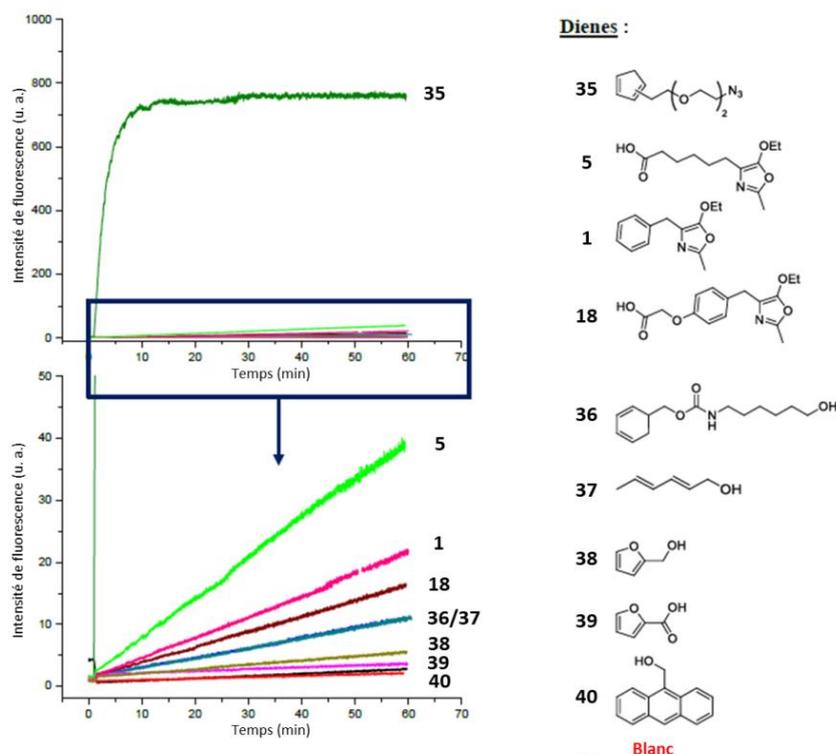


Figure 17 : Etude cinétique des différentes ligations [4+2]. Sonde **34** (1 mM) et diène (5 mM, 5 éq.) dans un mélange PBS/ACN (2:1, v/v) à 20 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$. Spectre d'absorption basé sur le référence^[27].

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

De cette étude, il ressort que le cyclopentadiène est beaucoup plus réactif que les autres partenaires. Ainsi, ce diène a fait l'objet d'une étude un peu plus poussée. L'influence du solvant sur la cinétique de réaction a été étudiée, et il en est ressorti que la présence d'eau améliore drastiquement la vitesse de la ligation. En effet, en milieu aqueux (mélange PBS/ACN 2:1, v/v), il a été observé un retour au plateau après seulement 10 minutes, alors qu'en milieu organique (ACN) le retour est obtenu bien au-delà d'une heure (Figure 18). De plus, les constantes cinétiques du second ordre ont été calculées pour le cyclopentadiène en milieu aqueux et organique. Des valeurs entre 1,12 et 1,37 $M^{-1} s^{-1}$ ont été calculées en milieu aqueux (mélange PBS/ACN 2:1, v/v), contre une valeur de 0,035 $M^{-1} s^{-1}$ en milieu organique (chloroforme), soit 30 fois plus lent. L'accélération des réactions de Diels-Alder, conduite dans l'eau, est connue depuis plusieurs décennies^[27,29], et serait due à des interactions hydrophobes et à la formation de liaisons hydrogènes.

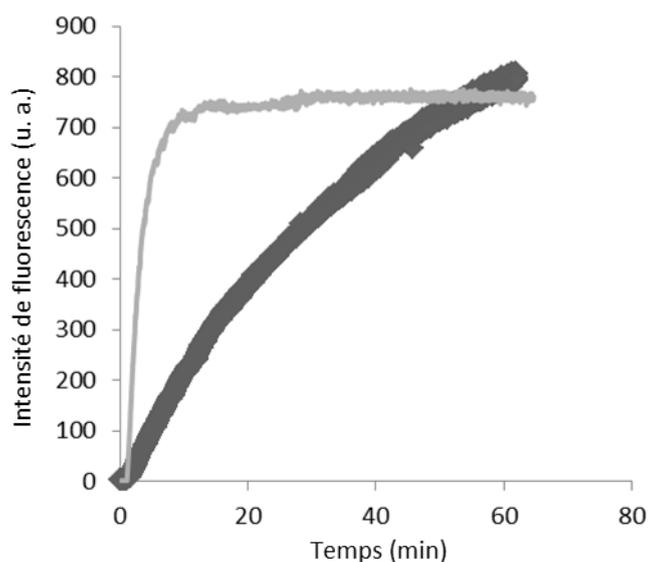


Figure 18 : Etude cinétique de la sonde 34 (1 mM) avec le cyclopentadiène 35 (5 mM) en milieu aqueux (PBS/ACN (2:1, v/v)) (gris clair) et organique (ACN) (gris foncé) à 20 °C. λ_{ex} = 330 nm et λ_{em} = 560 nm.

Toutefois, la cinétique observée pour la réaction entre les maléimides et les thiols est de l'ordre de $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ^[30], ce qui est bien supérieur à la cinétique mesurée avec le cyclopentadiène. Cela rend donc particulièrement difficile l'utilisation de ces ligations chimiosélectives [4+2] à demande électronique normal, en milieu biologique complexe. Néanmoins, bien que la cinétique mesurée pour la ligation Kondrat'eva soit faible ($10^{-3} M^{-1} s^{-1}$ dans le mélange PBS 7,4/ACN, 3:2, v/v), le fait qu'elle se réalise à pH acide (entre 2 et 5) permettrait d'obtenir une certaine orthogonalité vis-à-vis des thiols.

2.2. Comparaison de la stéréosélectivité de la ligation

L'utilisation des réactions de ligation de type cycloaddition [4+2] présente de plus un certain nombre de contraintes : ces réactions conduisent à un mélange de stéréoisomères voire de régiosomères, et la réaction de Diels Alder peut être renversable. Ces limitations ont été illustrées dans plusieurs articles de la littérature :

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

- en ce qui concerne le mélange de stéréoisomères, le groupe d'Hilderbrand a montré en 2008 que la ligation [4+2] à demande électronique inverse entre la tétrazine et le norbornène conduit à la formation d'un mélange de 4 isomères discernables par HPLC^[31] (Schéma 36).

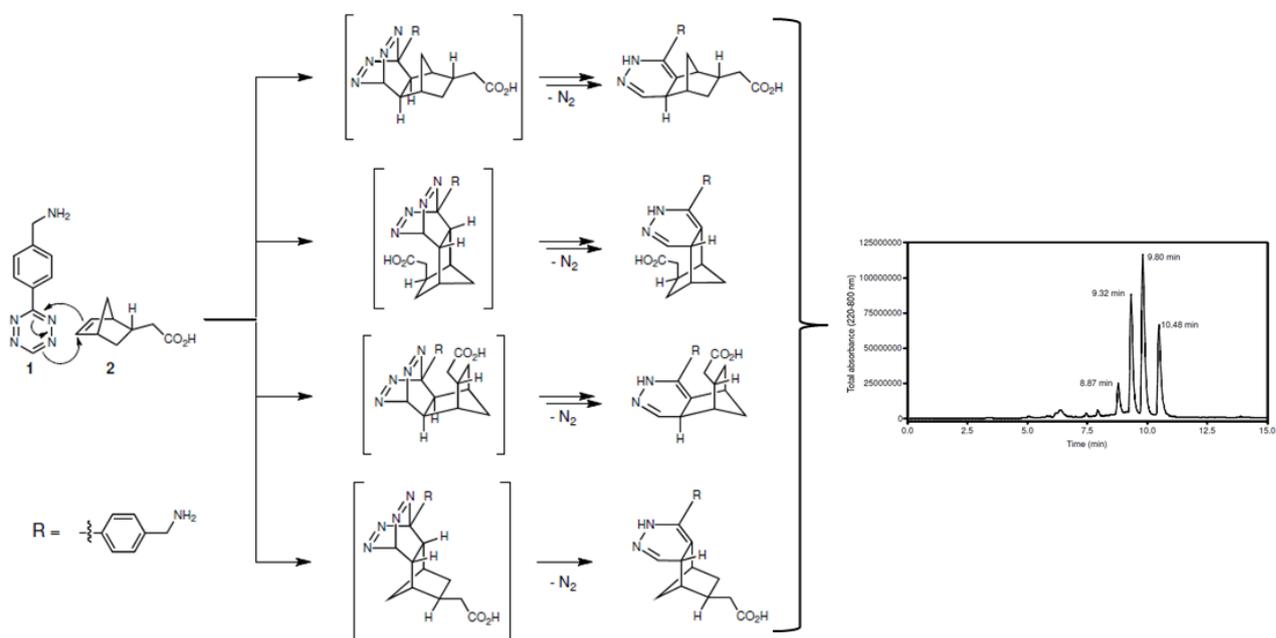


Schéma 36 : Mélange d'isomères issu de la réaction entre une tétrazine et un norbornène observé par le groupe d'Hilderbrand en 2008 (schémas extrait de l'article^[31]).

- en ce qui concerne le mélange de stéréoisomères et la réversibilité des réactions de type [4+2] à demande électronique normale, le groupe de Madder a montré en 2013 que, la réaction entre un furane greffé sur un peptide et le N-phénylmaléimide, conduit à la formation de plusieurs isomères observables en HPLC (Schéma 37 b et c). De plus, il a été montré que la réaction est réversible en condition thermique (70 °C, toluène, 24 h) puisque, dans ces conditions, le peptide comportant le furane est recouvert^[32] (Schéma 37 d). Cependant, la réversibilité de la réaction de type [4+2] à demande électronique normale entre le furane et le maléimide en milieu biologique reste à vérifier. En effet, ces conditions (70 °C, toluène, 24 h) sont assez éloignées des conditions physiologiques (pH ~7, milieu aqueux, 37 °C).

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

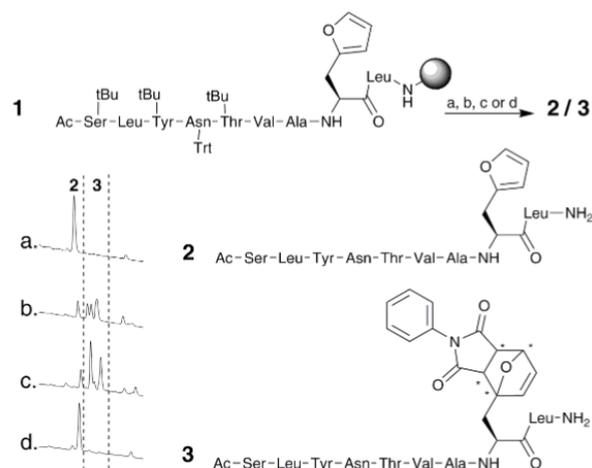
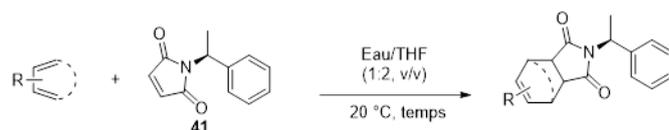


Fig.1 Relevant peptide structures and corresponding HPLC traces of reaction mixtures after cleavage of: a) peptide **1**; b) peptide **1** after treatment with 20 equiv. *N*-phenylmaleimide in toluene, 48h at RT; c) peptide **1** after treatment with 20 equiv. *N*-phenylmaleimide in toluene, 24h at 70°C; or d) retro-Diels-Alder after reaction c by heating the solid supported products mixture in toluene for 24h at 70°C. Each reaction was followed by cleavage and deprotection with TFA/TIS/H₂O (95:2,5:2,5), 2h at RT for HPLC analysis.

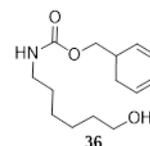
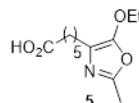
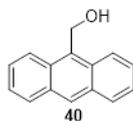
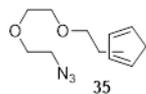
Schéma 37 : Etude de stéréosélectivité et de réversibilité de la ligation [4+2] entre le furane et le maléimide, réalisée par le groupe de Madder en 2013 (schémas extrait de l'article^[32]).

Après avoir étudié les cinétiques de réactions des ligations chimiosélectives utilisant le maléimide, une étude comparative de la stéréosélectivité de ces différentes ligations a été réalisée. Pour ce faire, chaque diène a été mis en réaction avec le maléimide énantiomériquement pur **41**, et les produits isolés issus de la réaction ont été analysés en HPLC et en RMN ¹H, afin de déterminer le nombre d'isomères obtenus à l'issue de la réaction. L'utilisation de ce diénophile chiral, à l'image des biomolécules chirales susceptibles d'être utilisées lors des réactions de ligation, permet d'obtenir un mélange non seulement de régioisomères, mais également de diastéréoisomères, ce qui permettra de conclure quant à la complexité de l'analyse et de la purification de produits issus de ces cycloadditions (Schéma 38)

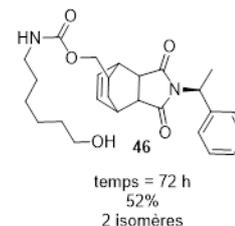
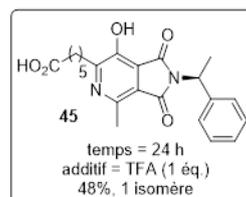
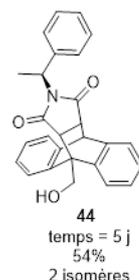
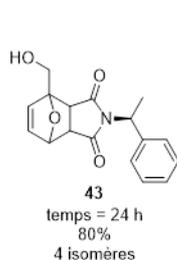
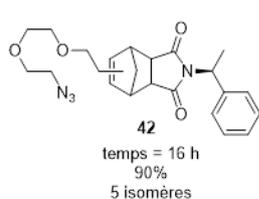
Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides



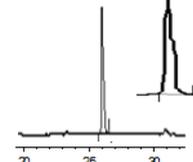
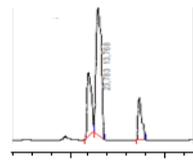
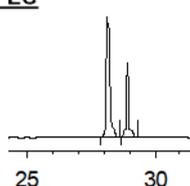
Diènes



Produits



HPLC



RMN

5 isomères

4 isomères

2 isomères

1 isomère

2 isomères

Isomères du produit 43

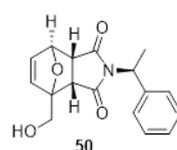
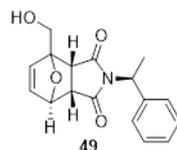
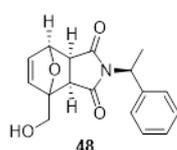
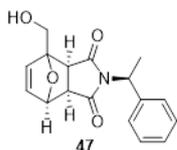


Schéma 38 : Etude de la stéréosélectivité des différentes ligations [4+2]

Une ligation se démarque lors de cette étude, il s'agit de la ligation Kondrat'eva. En effet, cette dernière est la seule ligation à ne former qu'un seul isomère (énantiomère), ce qui en fait donc une excellente candidate pour la ligation avec des molécules chirales de petites tailles ou de tailles moyennes, car la purification est nettement facilitée. , au-delà de quelques milliers de kDa, les mélanges d'isomères des produits formés sont sans doute de moins en moins discernables en HPLC, ou bien d'autres techniques de purifications sont utilisées (filtration sur membrane d'ultrafiltration avec différents seuils de coupure 3, 10, 30, 50 kDa...). Dans ce cas précis, l'impact du nombre d'isomères formés à l'issue de la ligation se révèle négligeable. En revanche, le produit issu de la réaction entre le maléimide et le cyclopentadiène se présente sous la forme de cinq isomères le rendant, malgré sa vitesse, difficilement utilisable pour la modification de petites (bio)molécules.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

2.3. Etude de stabilité

Enfin, la stabilité du produit issu des différentes ligations utilisées a été étudiée en présence de la protéine plasmatique (BSA) ainsi qu'à pH basique. Ainsi, les produits ont été solubilisés dans deux systèmes distincts. Le système A est composé d'une solution contenant de la BSA (0,15 mM) dans le tampon PBS 7,4 à 37 °C. Ce système permet d'appréhender la stabilité des produits dans des conditions mimant le plasma sanguin. Le système B est fait à partir d'une solution tampon à pH 10 (NaHPO₄ 0,05M / NaOH 0,1M) à 37 °C. Ce système permet, quant à lui, d'appréhender la stabilité des produits dans des conditions basiques qui se révèlent importants pour la fonctionnalisation de matériaux devant résister à une large gamme de pH^[33,34]. Chaque produit a été analysé en HPLC après 48 heures, et le pourcentage de dégradation alors observé est mentionné dans la Figure 19. Nonobstant, il est important de noter qu'il s'agit ici de résultats préliminaires puisque cette étude est toujours en cours à l'heure actuelle.

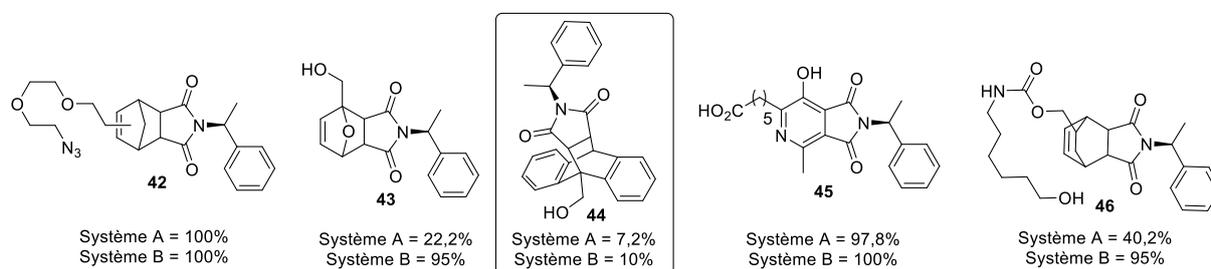


Figure 19 : Pourcentage de dégradation après 48 heures dans les systèmes A et B

Un produit se révèle particulièrement stable quel que soit le système utilisé, il s'agit du produit **44** issu de la réaction entre la maléimide et l'antracène. Cela pourrait être dû à l'encombrement généré par les groupements phényles présents de chaque côté du succinimide formé. A l'inverse, l'azaphthalimide qui est plan est hydrolysé rapidement. Cependant, les produits a priori formés par hydrolyse du motif succinimide, conduisent à la formation d'un acide carboxylique d'une part, et d'un amide d'autre part, le lien covalent entre les deux partenaires n'est donc pas rompu, ce qui n'est pas rédhibitoire pour ces réactions de ligations. Des études réalisées en LC-MS sont actuellement en cours afin de déterminer les produits formés à l'issue des études de stabilité. Enfin, il resterait à étudier la réversibilité thermique de la réaction de Diels-Alder à l'image des travaux de Madder^[32].

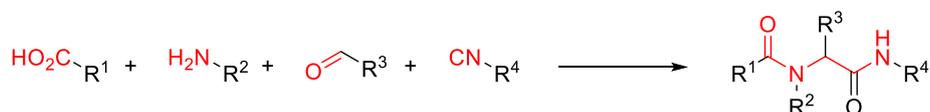
Pour conclure cette étude, on peut dire qu'il n'y a pas de ligation chimiosélective [4+2] à demande électronique normale qui se détache des autres à la fois en termes de cinétique, de facilité de purification du bioconjugué (faible nombre d'isomères formés), et de stabilité. Il convient donc de choisir la ligation la plus adaptée en fonction de l'application envisagée. En effet, pour des applications nécessitant une cinétique de réaction rapide, il convient de choisir le cyclopentadiène. Pour de la construction (bio)moléculaire comme pour la préparation de sondes, par exemple pour l'imagerie *in cellulo*, la ligation Kondrat'eva convient avec son seul isomère formé. Et enfin, pour une application nécessitant une grande stabilité du produit de ligation, il convient de choisir l'antracène.

3. Développement de réactions chimiosélectives tricomposantes.

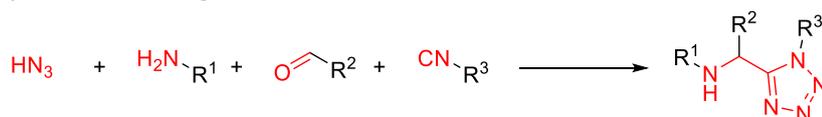
3.1. les réactions multicomposantes en milieu physiologiques : état de l'art

Les réactions multicomposantes (MCR) sont des processus combinant trois réactifs ou plus en une seule réaction, tout en conservant l'ensemble des atomes présents sur chaque réactif. Elles sont donc économes en atomes. Depuis le début des années 2000, ces réactions sont utilisées en temps qu'outils de bioconjugaison. Ainsi, quatre réactions ont été développées. On retrouve la réaction de Ugi^[35] développée en 1959 ainsi que sa variante l'azido-Ugi^[36] (Schéma 39 A et B). Ce sont toutes deux des réactions tétracomposantes reposant sur l'utilisation d'isonitrile. Vient ensuite la réaction de Passerini qui est une réaction tricomposante utilisant également une fonction isonitrile^[37] (Schéma 39 C). Et enfin, la réaction du couplage A₃ nécessitant l'utilisation d'une catalyse métallique^[38] (Schéma 39 D).

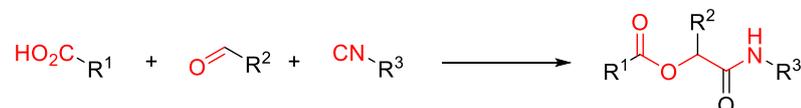
A) la réaction de Ugi



B) la réaction de Ugi-azide



C) la réaction de Passerini



D) la réaction de couplage A₃

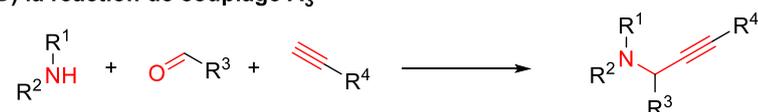


Schéma 39 : Récapitulatif des réactions multicomposantes utilisées en bioconjugaison

Ces réactions présentent l'avantage d'utiliser des fonctions simples, voire, naturellement présentes au sein des biomolécules comme les acides carboxyliques ou encore les amines. Cependant, ces réactions se limitent à une utilisation en bioconjugaison puisque par ces fonctions (acide carboxyliques et amines), elles ne présentent aucune chimiosélectivité. Toutefois, les MCR ont été utilisées dans de multiples applications^[39] comme la conjugaison de biomolécules entre elles (lipide, oligosaccharide^[40], peptide^[41], protéine^[42], stéroïde^[43]), ou encore pour le marquage de protéines^[44,45] comme la BSA par exemple.

3.2. Présentation de la stratégie mise en œuvre

Le développement de réaction chimiosélective est en plein essor, ainsi, il est toujours intéressant de créer des outils de ligations qui soient plus performants, en particulier, pour pouvoir lier entre eux trois partenaires différents. Dans cette optique, le développement d'une réaction chimiosélective

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

tricomposante et séquentielle permettrait de réaliser une triple ligation pour de multiples applications. Les solutions de triple ligation proposées dans la littérature présentent souvent une étape de déprotection entre deux étapes de ligation, ce qui limite la biocompatibilité de ces solutions. Une solution proposée plus récemment, en particulier par le laboratoire, est de synthétiser des réactifs hétérotrifonctionnels, comportant trois fonctions bioconjugables orthogonales entre elles^[46], mais leur synthèse peut être fastidieuse, et le nombre de réactions éligibles est assez limité. Une solution alternative, qui limite drastiquement le nombre de réactions à réaliser, pourrait consister, non pas, à utiliser un réactif hétérotrifonctionnel (ou tripode), mais à lier les deux premiers partenaires par une réaction de ligation qui conduirait à l'obtention d'une nouvelle fonction réactive utilisable pour une seconde ligation. Cette stratégie doit donc se réaliser entre trois partenaires différents P1, P2 et P3. P1 et P2 doivent réagir spécifiquement entre eux afin de former un produit P4 qui réagira à son tour avec le partenaire P3 pour former le bioconjugué entre les trois molécules P5, qui peut être considéré comme une construction « one pot » du tripode. Cependant, pour le bon déroulement de la réaction, il ne faut pas qu'il y ait de réactions parasites entre P1 et P3 ni entre P2 et P3 (Schéma 40 A). Cette stratégie possède de plus l'avantage de limiter les problèmes de solubilité ou d'encombrements supplémentaires liés aux réactifs hétérotrifonctionnels. Elle nécessitera d'ajouter sur chaque partenaire à bioconjuguer (R^1 , R^2 et R^3) les fonctions chimiques éligibles pour ces stratégies, comme dans le cas des réactions bio-orthogonales ou chimiosélectives (Schéma 40 B).

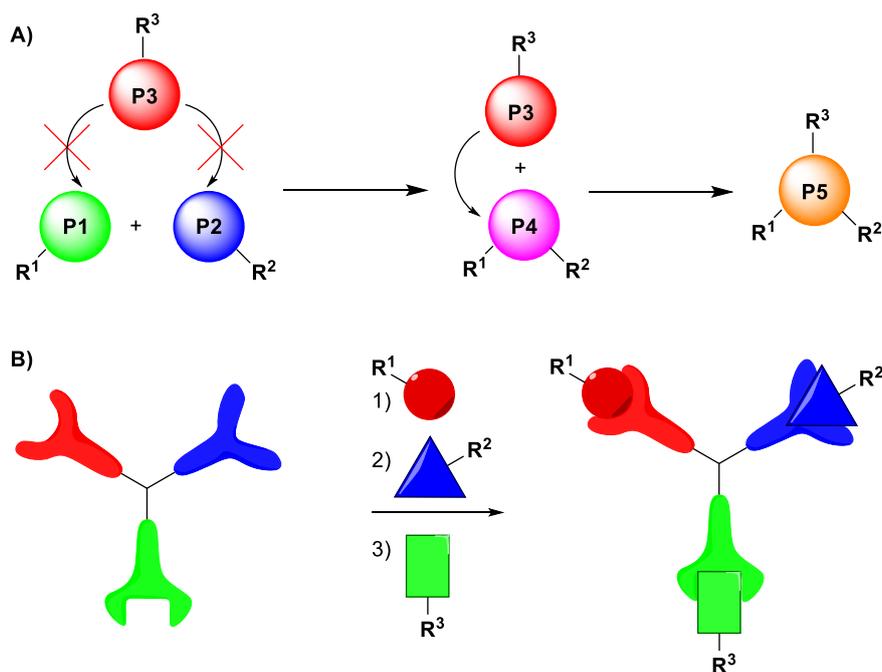


Schéma 40 : A) Principe générale de la ligation chimiosélective tricomposante et séquentielle. B) Principe général d'un réactif hétérotrifonctionnel « classique ».

Grâce aux connaissances acquises lors de l'étude des réactions chimiosélectives [4+2] à demande électronique normale présentées dans le paragraphe précédent, on peut voir que certains cycloadduits issus de la réaction présentent des alcènes tendus susceptibles de réagir dans un deuxième temps avec les tétrazines, dans le cadre d'une réaction de cycloaddition [4+2] à demande électronique inverse (iEDDA), à l'image de la réaction de bioconjugaison tétrazine-norbornène par exemple. Ainsi, trois réactions semblent possibles. On retrouve les couples cyclopentadiène-

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

maléimide, cyclohexadiène-maléimide et furane-maléimide. Malgré cela, des études préliminaires ont montré que le cyclopentadiène se révèle réactif vis-à-vis de la tétrazine, et que l'alcène généré lors de la réaction entre le cyclohexadiène et le maléimide n'est pas assez tendu pour réagir avec la tétrazine. Il nous reste donc le maléimide en partenaire P1, le furane en partenaire P2 et la tétrazine en partenaire P3 (Schéma 41). De plus, la réaction entre la tétrazine et l'oxabicycle formé à partir du furane et du maléimide permettrait de rendre irréversible la ligation [4+2] à demande électronique normale en empêchant toute retro [4+2] potentielle.

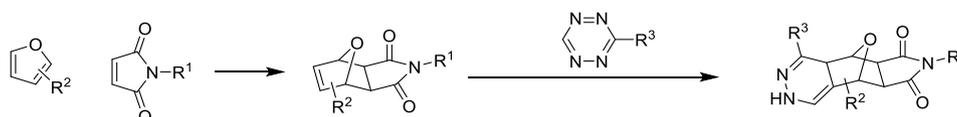


Schéma 41 : Principe de la ligation chimiosélective tricomposante et séquentielle entre le maléimide, le furane et la tétrazine.

3.3. Recherche d'un partenaire furane et tétrazine optimal pour la réaction tricomposante

Ainsi, la réactivité de l'oxabicycle **51**, obtenu à partir du furane et du maléimide correspondant, vis-à-vis de la tétrazine **52** a été investiguée par RMN dans un système aqueux deutéré (D_2O/CD_3CN , 3:1, v/v). La tétrazine **52** a été utilisée puisque les noyaux pyridine lui assurent une bonne stabilité mais également une bonne réactivité (voir page 98). De plus, étant une tétrazine symétrique, le composé **52** est facilement synthétisable. Le produit de cycloaddition issu de la réaction iEDDA est bien observé et le produit correspondant a été isolé avec un rendement de 90%. De plus, l'orthogonalité de la tétrazine vis-à-vis du furane et du N-méthylmaléimide a également été validée puisqu'aucune réaction n'a été observée après trois jours d'agitation dans les mêmes conditions expérimentales (Schéma 42).

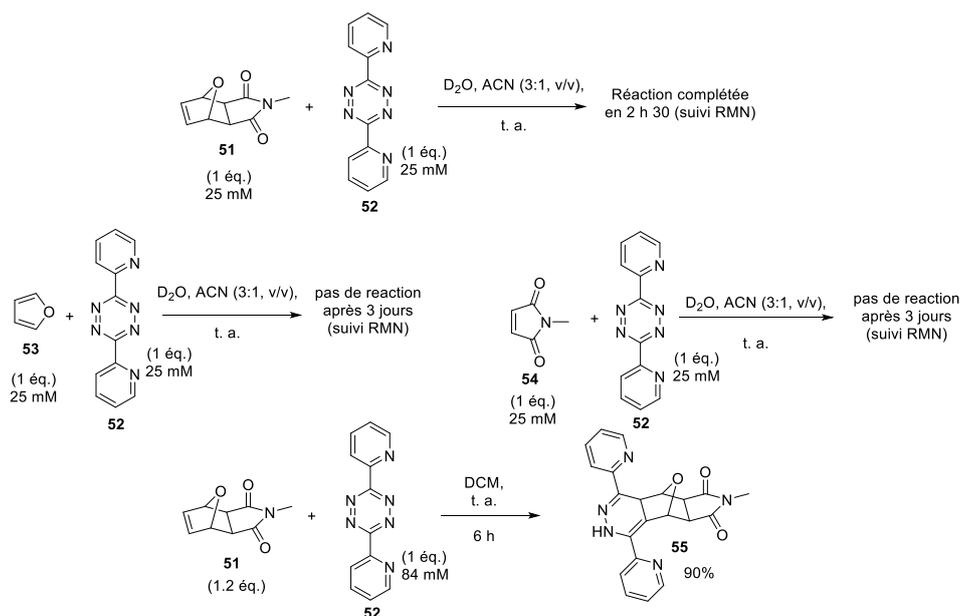


Schéma 42 : Ligation chimiosélective tricomposante à partir du furane.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

Suite à ces résultats encourageants, différents oxabicycles ont été synthétisés à partir de furanes substitués par des groupements méthyles symbolisant de futurs points de fonctionnalisation potentiels pour la bioconjugaison (le méthyle sur le maléimide symbolisant également le futur point de fonctionnalisation sur ce motif). Cependant, après analyse par spectroscopie RMN ^1H , aucun d'entre eux ne s'est révélé réactif vis-à-vis de la tétrazine **52**. L'hypothèse émise alors, est qu'un encombrement stérique dû à la présence des méthyles gênerait l'approche de la tétrazine (Figure 20).

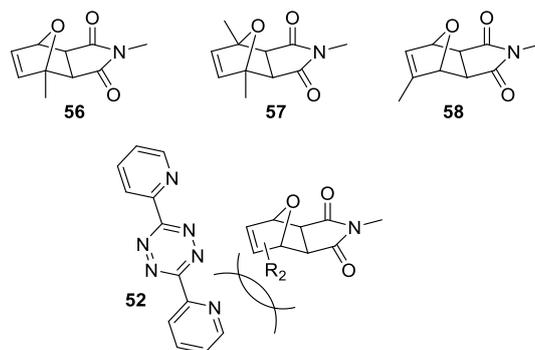


Figure 20 : Furanes méthylés engagés dans la réaction iEDDA avec la dipyridinyltétrazine **52**.

La fonctionnalisation du furane étant essentielle, il a donc fallu travailler sur le motif tétrazine, notamment en utilisant un analogue moins encombré. Ainsi, notre choix s'est porté sur la tétrazine mono-substituée **59**, qui a été testée avec les oxabicycles possédant différentes fonctionnalisations exposés précédemment. La consommation de la tétrazine a ensuite été suivie par HPLC et les résultats obtenus sont présentés dans le Schéma 43.

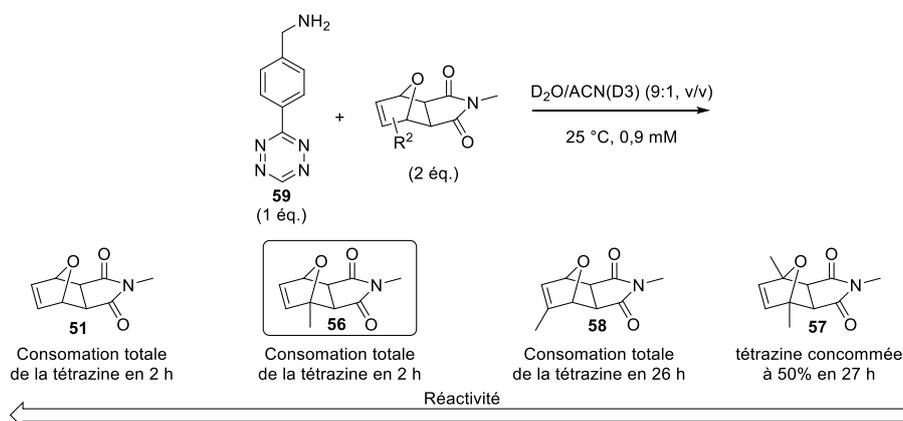


Schéma 43 : Réaction entre la tétrazine **59** et différents oxabicycles substitués.

Ainsi, la tétrazine **59** est donc capable de réagir avec l'ensemble des oxabicycles, avec toutefois des cinétiques différentes. L'oxabicycle **56** issu du 2-méthylfurane réagissant le plus vite (conversion totale en deux heures), il a été conservé pour la suite. A l'issue de cette étude, les trois partenaires P1, P2 et P3 ont été identifiés, à savoir le maléimide (P1), le 2-méthylfurane (P2), et la phényltétrazine (P3).

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

3.4. Etude cinétique

Après avoir trouvé les trois partenaires de réaction, des études cinétiques ont été réalisées afin d'évaluer les vitesses de réaction de la première et de la deuxième étape, ainsi que celle de la réaction tricomposante, afin d'en tirer une cinétique globale. Ainsi, la cinétique de la réaction [4+2] entre le N-méthylmaléimide et les différents furanes a tout d'abord été étudiée par RMN ^1H . En plus d'évaluer l'influence de la substitution de furane sur la cinétique, l'influence du solvant a également été étudiée puisque ces réactions ont été réalisées en milieu aqueux (ACN/D₂O 1:3, v/v) et organique (CDCl₃) (Schéma 44). De cette étude, il en ressort que plus le furane est enrichi électroniquement, plus la cinétique de réaction est élevée. Ainsi, le 2,4-diméthylfurane est plus rapide que le 2-méthylfurane lui-même plus rapide que le furane. Cependant, comme l'adduit issu du diméthylfurane ne réagit pas suffisamment vite avec la phényltétrazine, le 2-méthylfurane a été sélectionné pour la réaction tricomposante.

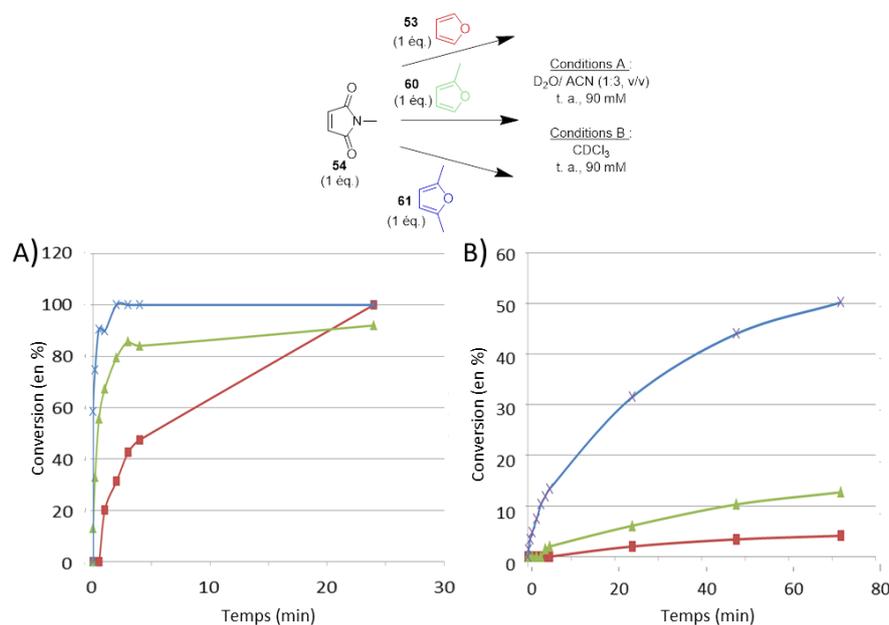


Schéma 44 : Etudes cinétiques réalisées par RMN ^1H (300 MHz, pic résiduel de solvant servant à la calibration, solvant deutéré (A) D₂O/ACN ou B) CDCl₃, unité en ppm) de la réaction entre le maléimide 54 (90 mM) et différents furanes (90 mM)

Ensuite, les cinétiques de la deuxième étape ainsi que la cinétique globale de la réaction tricomposante ont pu être appréhendées *via* un suivi par fluorescence. En effet, dans le cadre des travaux réalisés sur la réaction chimiosélective de Kondrat'eva, une sonde fluorogénique basée sur le motif tétrazine avait été mise au point, rendant possible le suivi de ces réactions en observant le retour de fluorescence dû à la disparition du motif tétrazine. Ainsi, la tétrazine fluorogénique **62** (9 mM) a été mise en réaction avec deux oxabicycles **56** et **63** (2 éq.), issus de réaction [4+2] entre le N-méthylmaléimide et le 2-méthylfurane ou le furfuryl alcool. De plus, la sonde a été mise indépendamment en présence de deux équivalents de N-méthylmaléimide, de 2-méthylfurane ou de furfuryl alcool afin de valider leur orthogonalité. Enfin, la sonde a été mise en présence du N-méthylmaléimide (2 éq.) et du 2-méthylfurane (2 éq.), afin de suivre la cinétique de la réaction tricomposante.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

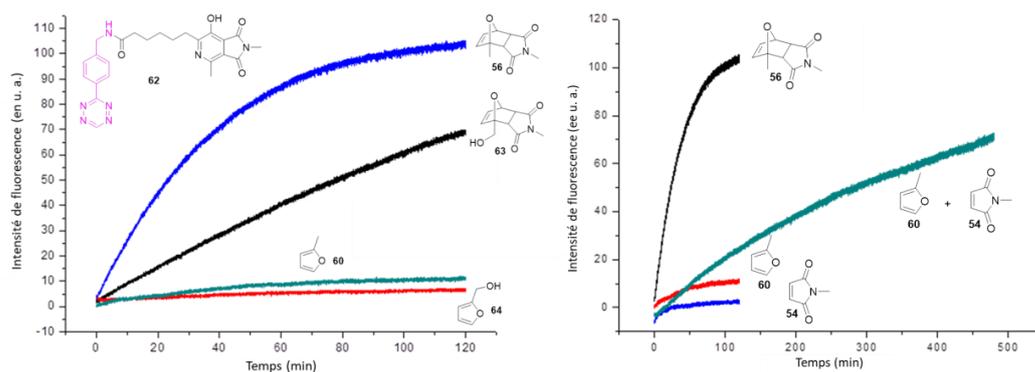


Figure 21 : Etudes cinétiques réalisées par spectroscopie de fluorescence de la réaction de la sonde 62 (9 mM) avec différents analytes (2 éq.) dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C, pendant 12 min (gauche) et pendant 500 min (droite). $\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$

De cette étude cinétique, on peut confirmer l'orthogonalité de la tétrazine avec différents furanes et le N-méthylmaléimide. De plus, l'oxabicycle **63** généré à partir de l'alcool furfurylique **64** fonctionnalisable est légèrement moins réactif que son analogue méthylé. Donc une fonctionnalisation du furane entraîne une baisse de la réactivité du cycloadduit correspondant. Enfin, la cinétique de la réaction de tri-composante avec le 2-méthylfuran et N-méthylmaléimide a été réalisée. On observe une conversion estimée à 70% par fluorescence, après huit heures de réaction. Bien que la cinétique globale soit faible, la réaction tri-composante fonctionne.

Ces résultats préliminaires ont servi de fondation aux travaux d'un développement d'un système de criblage de la réaction de Diels-Alder actuellement réalisé par le Dr. Laura Nogueira de Faria Cardoso dans le cadre d'un stage post-doctoral réalisé au sein du laboratoire.

4. Conclusion et perspectives

En conclusion, une nouvelle ligation chimiosélective et fluorogénique, basée sur la réaction de Kondrat'eva, a été développée et utilisée dans le cadre de diverses applications comme, le marquage fluorescent d'une biomolécule, ou la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une sonde de type FRET pour le suivi d'une activité enzymatique. Les fluorophores azaphthalimides générés lors de la ligation, ont fait l'objet d'investigations poussées puisque des propriétés d'halochromisme et de solvatochromisme ont été découvertes.

Par la suite, une étude comparative des différentes ligations chimiosélectives [4+2] à demande électronique normale à partir de maléimides a été réalisée avec Alexis Lossouarn, doctorant en 2^{ème} année au sein de l'équipe, et Axel Frisby, qui a réalisé son stage de Master 2 au sein de l'équipe. Cette étude avait pour but de comparer les différentes réactions en terme de cinétique de réaction, de facilité de purification des conjugués correspondants, et de stabilité des conjugués. Il en ressort, que la ligation la plus favorable en termes de cinétique est la réaction entre le maléimide et le cyclopentadiène. Ensuite, la ligation Kondrat'eva se démarque, puisqu'il s'agit de la seule ligation de l'étude à ne former qu'un seul et unique isomère, ce qui en fait une excellente candidate pour la

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

modification d'objets moléculaires de petites et moyennes tailles. Et enfin, la ligation formant le produit le plus stable est celui issu de la réaction entre le maléimide et l'antracène.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre a été consacrée à la mise au point d'une ligation chimiosélective tricomposante et séquentielle. La preuve de principe a été démontrée à travers le trio maléimide-furane-tétrazine. Malgré une cinétique globale faible, cette approche permet de s'affranchir des problèmes liés aux réactions de déprotection séquentielle pour libérer les fonctions réactives des réactifs hétérotrifonctionnels ou à l'utilisation de conditions réactionnelles différentes en fonction des ligations étudiées.

En perspective, la ligation de Kondrat'eva pourrait être utilisée de façon orthogonale vis-à-vis des thiols, en utilisant un maléimide protégé sous forme d'oxabicycle. Ce dernier, issu d'une réaction [4+2] avec le 2,4-diméthylfurane, servirait de groupement protecteur vis-à-vis des thiols ; Les thiols pourraient donc réagir dans un premier temps avec un premier maléimide, puis, suite à une activation micro-ondes une rétro [4+2] serait réalisée régénérant le maléimide^[47] qui pourrait alors réagir avec un 5-éthoxyoxazole par ligation Kondrat'eva. Cette approche pourrait être utilisée pour la fonctionnalisation de peptides contenant des résidus cystéines (Schéma 45).

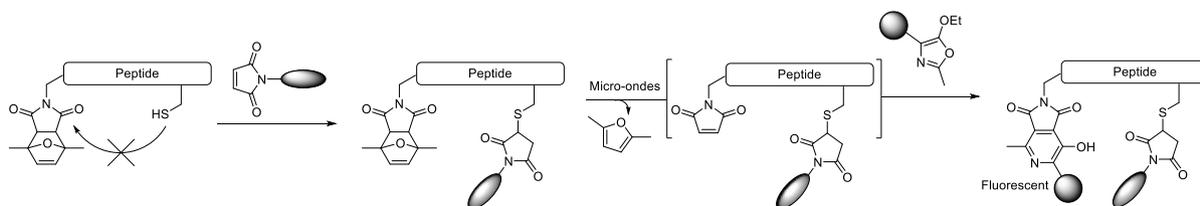


Schéma 45 : Combinaison de la réaction thio-Michael et de la ligation Kondrat'eva

Ensuite, au cours d'une réaction non mentionnée dans ce manuscrit, nous avons observé que l'azaphthalimide réagissait avec l'hydrazine, *via* une réaction d'ouverture/fermeture de cycle. De plus, lors de cette réaction, un effet hypsochrome en émission a été observé puisque l'on passe d'une fluorescence dans le vert à une fluorescence dans le bleu. Ainsi, ce traitement à l'hydrazine pourrait être utilisé pour des applications de déclick en chimie de matériaux^[48], ou encore le motif azaphthalimide pourrait être utilisé comme sonde fluorescente pour la détection d'hydrazine qui est un polluant très toxique (Schéma 46).

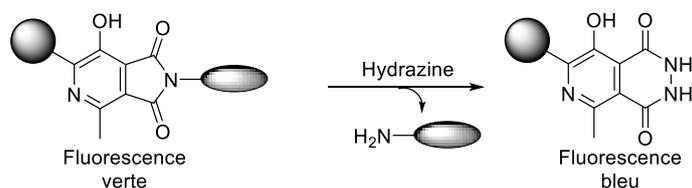


Schéma 46 : Réaction avec effet ipsochrome de la fluorescence entre les azaphthalimides et l'hydrazine

Références: Chapitre 1

- [1] P. Shieh, C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9307–9320.
- [2] A. Chevalier, Y. Zhang, O. M. Khmour, J. B. Kaye, S. M. Hecht, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 12009–12012.
- [3] J. Cai, X. Li, X. Yue, J. S. Taylor, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 16324–16325.
- [4] A. S. Cohen, E. A. Dubikovskaya, J. S. Rush, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 8563–8565.
- [5] M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 2394–2397.
- [6] L.-H. Liu, K. Nakatani, E. Ishow, *New Journal of Chemistry* **2009**, *33*, 1402–1408 [7] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 2869–2872.
- [8] L. G. Meimetis, J. C. T. Carlson, R. J. Giedt, R. H. Kohler, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 7531–7534.
- [9] H. Wu, J. Yang, J. Šečková, N. K. Devaraj, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 5805–5809.
- [10] F. Xie, K. Sivakumar, Q. Zeng, M. A. Bruckman, B. Hodges, Q. Wang, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2906–2914.
- [11] P. Shieh, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17428–17431.
- [12] J.-J. Shie, Y.-C. Liu, Y.-M. Lee, C. Lim, J.-M. Fang, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 9953–9961.
- [13] P. Shieh, M. S. Siegrist, A. J. Cullen, C. R. Bertozzi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 5456–5461.
- [14] Y. Chen, C. M. Clouthier, K. Tsao, M. Strmiskova, H. Lachance, J. W. Keillor, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 13785–13788.
- [15] W. Song, Y. Wang, Z. Yu, C. I. R. Vera, J. Qu, Q. Lin, *ACS Chemical Biology* **2010**, *5*, 875–885.
- [16] P. An, Z. Yu, Q. Lin, *Organic Letters* **2013**, *15*, 5496–5499.
- [17] F. Friscourt, C. J. Fahrni, G.-J. Boons, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 18809–18815.
- [18] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 10353–10366.
- [19] L.-A. Jouanno, K. Renault, C. Sabot, P.-Y. Renard, *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, *2016*, 3264–3281.
- [20] C. Sabot, P.-Y. Renard, K. Renault, J. W. Fredy, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, DOI 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252.
- [21] X. Liu, L. Yang, L. Gao, W. Chen, F. Qi, X. Song, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8285–8289.
- [22] K. Renault, L.-A. Jouanno, A. Lizzul-Jurse, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Chemistry - A European Journal* **2016**, *22*, 18522–18531.
- [23] J. Biswas, S. K. Mishra, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 4600–4613.
- [24] A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 1349–1359.
- [25] M. Berg, S. Nozinovic, M. Engeser, A. Lützen, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015*, 5966–5978.
- [26] J. M. West, H. Tsuruta, E. R. Kantrowitz, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 945–951.
- [27] J. E. T. Corrie, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1994**, 2975–2982.
- [28] D. C. Rideout, R. Breslow, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 7816–7817.
- [29] S. Otto, J. B. F. N. Engberts, *Pure and Applied Chemistry* **2000**, *72*, 1365–1372.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

- [30] J. Guy, R. Castonguay, N. B. Campos-Reales Pineda, V. Jacquier, K. Caron, S. W. Michnick, J. W. Keillor, *Molecular BioSystems* **2010**, *6*, 976-987.
- [31] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 2297-2299.
- [32] K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins, A. Madder, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 2927-2929.
- [33] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, H. A. Claessens, *Journal of Chromatography A* **1997**, *762*, 97-112.
- [34] P. Chevallier, M. Castonguay, S. Turgeon, N. Dubrulle, D. Mantovani, P. H. McBreen, J.-C. Wittmann, G. Laroche, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 12490-12497.
- [35] L. Ugi, *Angewandte Chemie* **1959**, *71*, 386-388.
- [36] I. Ugi, C. Steinbrückner, *Chemische Berichte* **1961**, *94*, 734-742.
- [37] L. Banfi, R. Riva, in *Organic Reactions* (Ed.: John Wiley & Sons, Inc.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2005**, pp. 1-140.
- [38] V. A. Peshkov, O. P. Pereshivko, E. V. Van der Eycken, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 3790-3807.
- [39] L. Reguera, Y. Méndez, A. R. Humpierre, O. Valdés, D. G. Rivera, *Accounts of Chemical Research* **2018**, *51*, 1475-1486.
- [40] K. Pérez-Labrada, I. Brouard, I. Méndez, D. G. Rivera, *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 4660-4670.
- [41] A. Arabanian, M. Mohammadnejad, S. Balalaie, J. H. Gross, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 887-890.
- [42] S. Ranallo, A. Amodio, A. Idili, A. Porchetta, F. Ricci, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 66-71.
- [43] C. Fontana, M. Lundborg, A. Weintraub, G. Widmalm, *Carbohydrate Research* **2012**, *354*, 102-105.
- [44] T. Ziegler, S. Gerling, M. Lang, *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 2109-2112.
- [45] M. Chilamari, L. Purushottam, V. Rai, *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23*, 3819-3823.
- [46] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, **2013**.
- [47] A. Sánchez, E. Pedroso, A. Grandas, *Organic Letters* **2011**, *13*, 4364-4367.
- [48] A. W. Knoll, D. Pires, O. Coulembier, P. Dubois, J. L. Hedrick, J. Frommer, U. Duerig, *Advanced Materials* **2010**, *22*, 3361-3365.

Chapitre 1 : Propriétés photophysiques de la ligation de Kondrat'eva et études comparatives des réactions de Diels-Alder à base de maléimides

**Chapitre 2 : Etude de la réactivité
des tétrazines vis-à-vis de composés
énolisables : application à la ligation
chimiosélective**

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

I. Etat de l'art

Ce chapitre est consacré aux résultats obtenus concernant la recherche de nouveaux réactifs énolisables (voire carbanioniques) capables de réagir avec les tétrazines dans les systèmes aqueux à pH physiologique. En effet, comme nous le verrons par la suite, la plupart des partenaires recensés dans la littérature sont des alcènes sous contraintes de cycle.

Les tétrazines sont des composés hétéroaromatiques comportant quatre atomes d'azotes. Relativement instables et parfois même explosifs, les tétrazines présentent trois isomères possibles. Cependant, seule la 1,2,4,5-tétrazine s'avère intéressante dans le cadre de la conjugaison, puisque c'est la seule connue pour réagir en iEDDA (Figure 22).

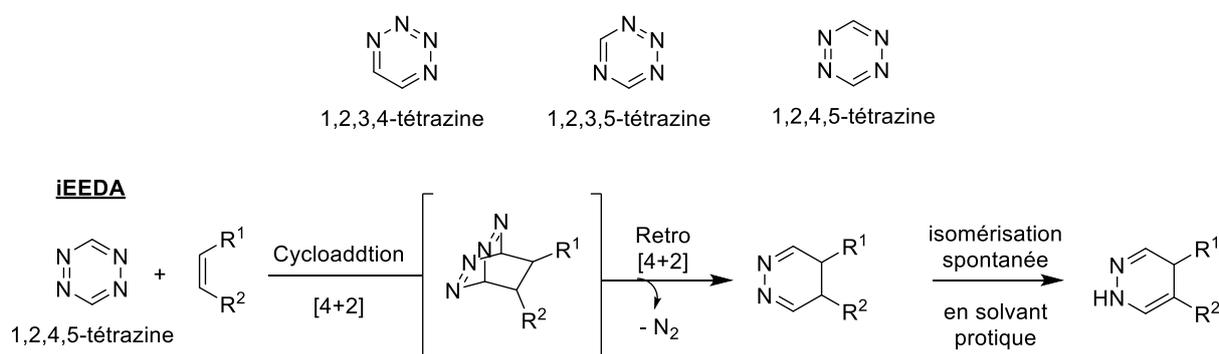


Figure 22 : Structure générale des tétrazines et réactivité des 1,2,4,5-tétrazines en iEDDA.

La ligation tétrazine s'est rapidement imposée comme l'une des réactions bio-orthogonales les plus importantes, grâce à des cinétiques de réaction qui sont les plus élevées observées à ce jour, notamment avec le partenaire TCO. Les tétrazines ont fait et continuent à faire l'objet d'intenses études pour améliorer leur synthèse et leur stabilité tout en conservant une bonne réactivité. Toutes ces études ont permis le développement de nombreuses applications en chimie bio-orthogonale et en « drug delivery »^[1]

1. Synthèse des 1,2,4,5-tétrazines

1.1. Synthèse de tétrazines par condensation d'hydrazines sur les nitriles ou équivalents

La première synthèse de 1,2,4,5-tétrazines connue a été rapportée par Pinner en 1893. La réaction fait intervenir une amidrazone intermédiaire issue de la réaction entre un imidate et l'hydrazine. Un excès d'hydrazine conduit à la formation de la dihydrotétrazine qui sera ensuite oxydée pour donner le noyau tétrazine^[2] (Schéma 47).

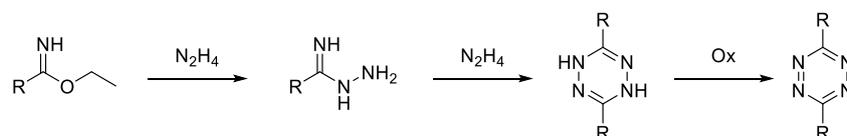


Schéma 47 : Première synthèse de tétrazine développée par Pinner en 1893.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

Depuis le début des années 2000, les méthodes de synthèse des tétrazines sont en pleine expansion. Parmi les méthodes classiques on peut citer la condensation de deux nitriles aliphatiques ou aromatiques en présence d'hydrazine (Schéma 48, conditions a)). Cette stratégie permet la synthèse de tétrazines dissymétriques et a permis d'étendre la diversité structurale de ces dernières. Toutefois, les rendements obtenus à l'issue de la réaction sont plutôt faibles suite à l'obtention de mélanges statistiques, avec notamment, la formation de tétrazines symétriques non désirées. L'obtention de tétrazines monosubstituées est également possible en remplaçant l'un des deux partenaires nitriles par du formamide acétate. Cependant, les rendements obtenus se révèlent très faibles (inférieurs à 22%^[3]).

Il a été observé que la présence d'un catalyseur permet d'améliorer les rendements. Ainsi, Les réactions réalisées en présence de soufre colloïdal conduisent à des rendements compris entre 60 et 70% pour les tétrazines disubstituées symétriques ou non (Schéma 48, conditions b))^[4]. Récemment, le groupe de Devaraj a développé une méthodologie de synthèse reposant sur l'utilisation d'acides de Lewis (Schéma 48, conditions c)). Ainsi, l'utilisation de $Zn(OTf)_2$ ou $Ni(OTf)_2$ a rendu possible l'obtention de tétrazines disubstituées symétriques ou non avec de bons rendements allant jusqu'à 95%. De plus, cette méthode a également rendu possible la synthèse de tétrazines monosubstituées avec des rendements allant de 64 à 75% contre des rendements inférieurs à 20% pour la méthode au soufre colloïdal^[5] (Schéma 48).

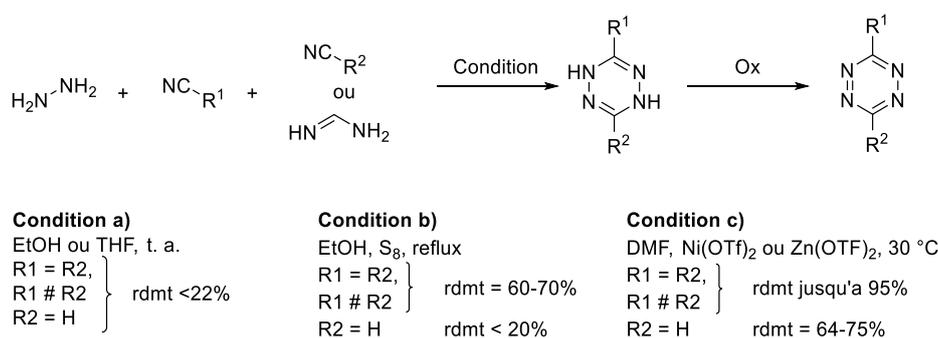


Schéma 48 : Différentes voies de synthèse des tétrazines par condensations de dérivés nitriles avec l'hydrazine.

1.2. Voies de synthèse alternatives de tétrazines

Une méthode alternative a été développée en 2013 par le groupe de Wang. Elle repose sur la formation contrôlée de 1,2-dichlorométhylène-hydrazine. Ces dérivés sont ensuite mis en réaction en présence d'hydrazine sous activation thermique pour conduire à la formation de tétrazines disubstituées symétriques ou non avec de bons rendements allant de 52 à 75%^[6] (Schéma 49). Cette méthode présente l'avantage d'offrir un meilleur contrôle quant à la synthèse de tétrazines dissymétriques. Ainsi, on obtient un contrôle plus fin par rapport aux méthodes reposant sur la condensation de deux dérivés nitriles pouvant générer la formation de tétrazines symétriques à l'issue de la réaction (cf. paragraphe précédent).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

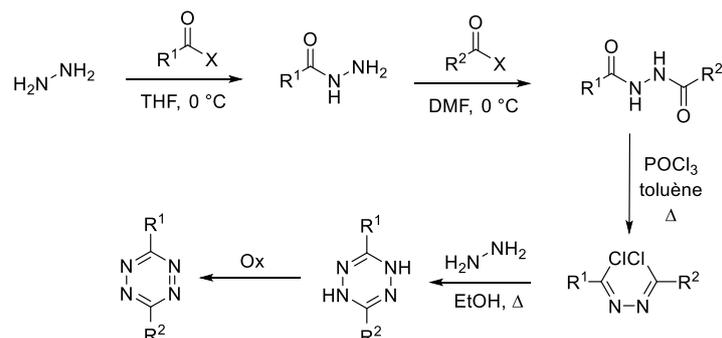


Schéma 49 : Voie de synthèse de tétrazines développée par le groupe de Wang en 2013.

Une autre alternative repose sur l'utilisation de carbothiohydrazide, qui permet d'obtenir la thiométhyle-1,2,4,5-tétrazine avec un rendement global de 27% sur 3 étapes. Si les rendements sont moindres, l'avantage de cette méthode est de pouvoir insérer, une fois la tétrazine formée, divers substituants directement sur le noyau tétrazine par des réactions de $S_NAr^{[7]}$ (Schéma 50).

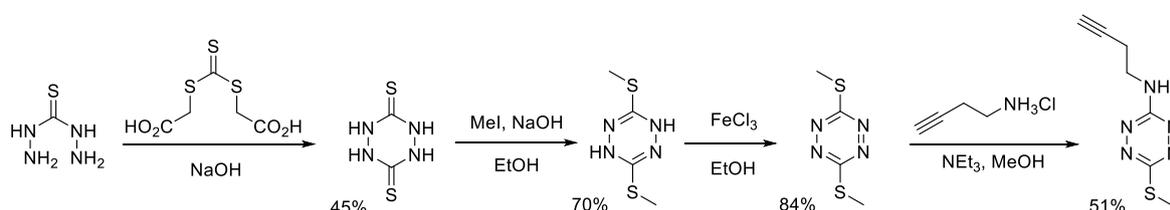


Schéma 50 : Synthèse de la thiométhyle-1,2,4,5-tétrazine.

1.3. Synthèse de tétrazines par voie photochimique et enzymatique

Une des limitations dans la synthèse des tétrazines, est l'oxydation de la dihydrotétrazine, qui est souvent réalisée par du nitrite de sodium en milieu acide. Cette étape génère donc de l'acide nitreux HNO_2 , un gaz qui se décompose à température ambiante. En 2016, le groupe de Fox a développé une méthode d'obtention de tétrazine *in situ* à partir dihydrotétrazine *via* un stimulus enzymatique ou photochimique. En effet, en présence de certaines enzymes oxydantes comme les peroxydases, il est possible d'aromatiser la dihydrotétrazine en tétrazine correspondante. De même, l'utilisation de photosensibilisateurs tels que le bleu de méthylène ou le rose Bengale permet cette aromatisation^[8] (Schéma 51).

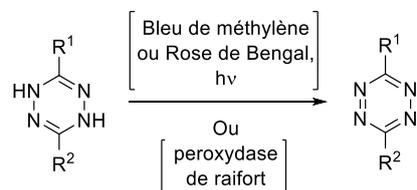


Schéma 51 : Génération de tétrazines *in situ* par voie photo-chimique ou enzymatique

Ces différentes voies de synthèse ont permis l'obtention d'une variété de tétrazines, permettant entre autres, des études de relation structure-réactivité.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

2. Réactivité des tétrazines et de leurs partenaires

Ainsi, au fil des années, de nombreuses tétrazines possédant différents substituants en positions 3 et 6 ont vu le jour. Ces différences structurales ont permis de moduler la réactivité et la stabilité des tétrazines. En effet, plus le noyau tétrazine est appauvri en électrons plus sa cinétique de réaction en iEDDA est grande. Néanmoins, cette augmentation de réactivité va de pair avec une diminution de leur stabilité. Ainsi, en fonction de l'application envisagée, il convient de choisir la tétrazine appropriée^[3,9,10] (Figure 23). Ainsi, la tétrazine substituée par deux noyaux pyridines semble offrir le meilleur compromis entre la réactivité et la stabilité. En effet, cette dernière se révèle relativement réactive ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ avec les TCO), mais également stable puisqu'elle est couramment utilisée pour des applications *in cellulo* voire *in vivo*.

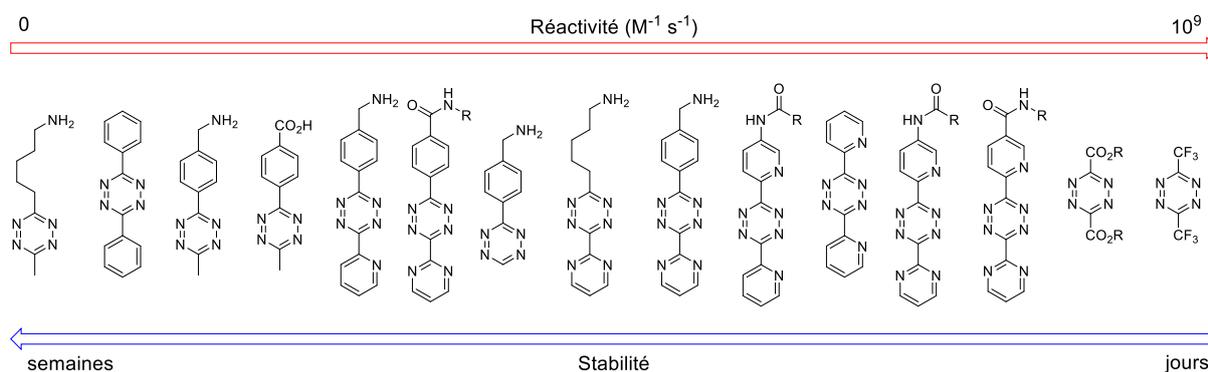


Figure 23 : Réactivité relative estimée des tétrazines pour les réactions de type iEDDA avec le TCO, mise en regard de leur stabilité.

Les diénophiles pouvant réagir avec les tétrazines ont également fait l'objet de nombreuses études. On retrouve essentiellement des alcènes sous contrainte de cycle comme les norbornènes, les cyclopropènes, les TCO ou encore les BCN qui sont des alcynes contraints, initialement utilisés en SPAAC. De plus, on retrouve des oléfines riches en électrons comme les énoles d'éther, les acides vinylboroniques. Les réactivités relatives estimées de ces diénophiles avec la dipyridinyl-tétrazine sont résumées dans la Figure 24^[9,11-16]. Ainsi, il en ressort que les TCO sont les partenaires de réaction de la tétrazine offrant les meilleures constantes cinétiques (entre $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), tout en montrant également une bonne bio-orthogonalité.

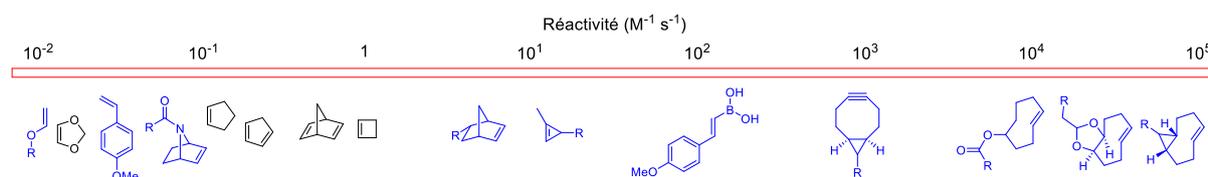


Figure 24 : Réactivité relative estimée de diénophiles pour les réactions de type iEDDA en présence de dipyridinyl-tétrazine. Les principaux diénophiles utilisés en bioconjugaison sont représentés en bleu.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

Par la possible modulation de sa réactivité et le choix du partenaire possible, l'iEDDA a rendu possible le développement de certaines applications jusqu'alors non réalisables par les techniques classiques de conjugaisons telles que la SPAAC ou la CuAAC.

3. Utilisation spécifique de l'iEDDA

Ce qui démarque l'iEDDA des autres réactions bio-orthogonales, c'est essentiellement sa vitesse de réaction, comme nous l'avons mentionné plus haut. Cette réactivité unique (vitesse supérieure à $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) a permis d'améliorer les applications développées, mais également d'en développer de nouvelles. Ainsi, l'iEDDA s'est rendue indispensable dans divers domaines, comme l'imagerie optique et nucléaire, l'étude de systèmes biologiques, et le suivi de petites molécules exogènes (ex. pharmacophores) dans des systèmes biologiques complexes.

3.1. L'iEDDA pour l'imagerie de super-résolution de marquage site-spécifique de protéine

L'approche la plus utilisée à ce jour, pour suivre et imager par microscopie super-résolue les protéines dans les cellules vivantes, est l'incorporation de protéines fluorescentes telle que la GFP par exemple. Or, la grande taille de ces protéines fluorescentes, leurs potentielles interactions avec les autres protéines, et leurs relativement faibles propriétés de fluorescence limitent leurs utilisations pour de la microscopie super-résolue^[17]. Dans ce contexte L'iEDDA permet de lier spécifiquement un fluorophore organique plus brillant, et de petite taille, à une protéine par utilisation de ncAAS. En outre, la ligation tétrazine permet de limiter la distance entre la protéine cible et la sonde, ce qui améliore la résolution spatiale par rapport à l'utilisation de la GFP par exemple^[17]. De plus, cette approche permet d'incorporer des fluorophores synthétiques possédant de bonnes propriétés photophysiques ainsi qu'une bonne photo-stabilité. Ainsi en 2015, le groupe de Chin rapporte l'imagerie de super-résolution de filament d'actine nucléaire par STORM (de l'anglais « STochastic Optical Reconstruction Microscopy »). Le principe du STORM repose sur le fait que, l'état activé d'une molécule photosensible doit conduire à l'émission consécutive de suffisamment de photons pour permettre une localisation précise avant qu'elle ne sombre dans un état non luminescent ou ne soit désactivée par photoblanchiment. De plus, les molécules fluorescentes faiblement activées doivent être séparées d'une distance supérieure à la limite de diffraction d'Abbe (supérieure à environ 250 nanomètres) pour permettre l'enregistrement en parallèle de nombreux émetteurs individuels. Pour ce faire, la production de protéines du cytosquelette a été réalisée avec un ncAA portant un TCO ou un BCN. Les images obtenues par STORM ont été comparées aux images obtenues par imagerie de fluorescence à champ large^[18], et on observe une meilleure résolution spatiale des images issues du STORM (Figure 25).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

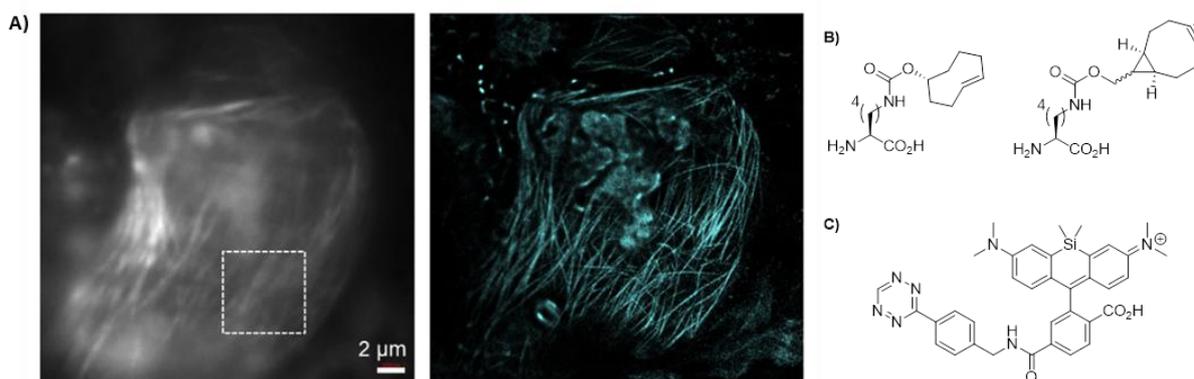


Figure 25 : A) Images de filaments d'actine nucléaire en imagerie classique à champ large (gauche) et microscopie super-résolue (droite) réalisées à la même échelle (2 μm) (figure extraite de l'article^[18]). B) Structure des ncAA TCO et BCN. C) Structure de la tétrazine portant un fluorophore (silico rhodamine) utilisée.

3.2. L'iEDDA pour l'étude de processus dynamiques rapides dans les cellules vivantes

Au VI^e siècles Sun Tzu a dit : « La rapidité est l'essence même de la guerre. »^[19]. Cela se révèle également vrai pour l'étude de systèmes dynamiques rapides au sein de cellules vivantes. En effet, pour pouvoir observer de tels processus, il faut une ligation bio-orthogonale qui soit très rapide par rapport aux processus biologiques. C'est le cas de la réaction iEDDA TCO/tétrazine utilisée notamment par l'équipe de Hang en 2016, afin de suivre pour la première fois, le trafic dynamique d'IFITM3 dans des cellules de mammifères vivants. L'IFITM3 est une petite protéine membranaire associée aux vésicules qui est impliquée dans l'inhibition de l'entrée de virus dans la cellule hôte, tel que le virus de la grippe et de nombreux autres virus pathogènes. Cette protéine a été modifiée avec un ncAA comportant un TCO. De plus, de nombreux conjugués tétrazine-fluorophore ont été testés afin d'obtenir les meilleures propriétés possibles en termes de pénétration de membrane cellulaire, de distribution et rétention intracellulaire, autant de paramètres qui se révèlent importants pour optimiser le marquage^[20] (Figure 26).

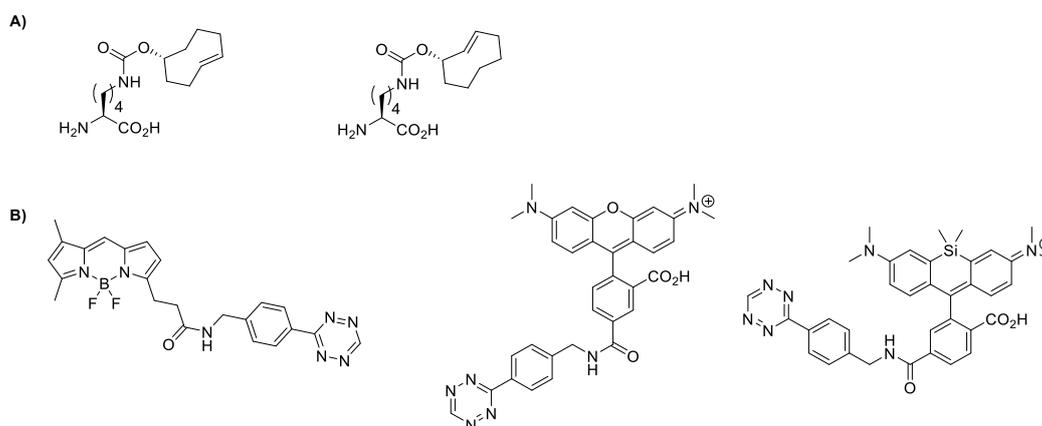


Figure 26 : ncAAs A) et conjugués tétrazine-fluorophore B) utilisés par l'équipe de Hang en 2016^[20].

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

3.3. L'iEDDA pour le suivi de molécules biologiquement actives dans les cellules vivantes

Le suivi de petites molécules biologiquement actives dans le milieu cellulaire se révèle être particulièrement important. En effet, cela permet de mettre en évidence les interactions entre la molécule à marquer avec sa cible biologique, de comprendre le ou les modes d'actions du composé ou encore, d'apporter des informations nécessaires pour améliorer le design de la molécule^[21], dans le cas de candidats à un potentiel médicament.

A l'image de ce qui a été réalisé précédemment avec des sondes clickables fondées sur la réaction CuAAC ou SPAAC^[22], en 2016, l'équipe de Bantscheff a développé des études d'identification de cibles, de localisation cellulaire, ou encore du taux d'occupation de cibles en utilisant l'iEDDA (Figure 27)^[23].

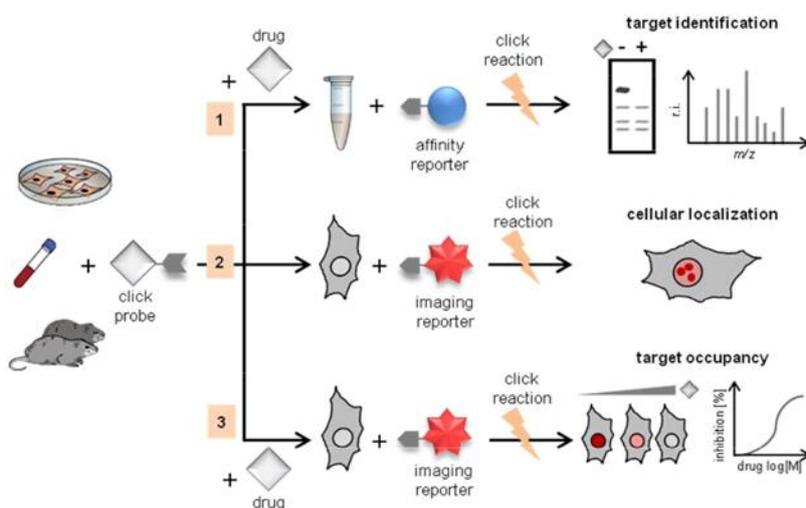


Figure 27 : Principe de la localisation de composés actifs, identification de cibles biologiques et de mesure de l'occupation de la cible au niveau d'une cellule unique, reposant sur la réaction iEDDA, études réalisées par le groupe de Bantscheff en 2016 (Figure extraite de l'article^[23]).

Ces tests ont été réalisés avec de l'Olaparid modifié par un TCO, un BCN, azoture ou un alcyne vrai, ainsi que le composé non modifié. L'Olaparid est un anticancéreux de la classe des inhibiteurs de PARP1, une enzyme nucléaire surexprimée dans le cadre du cancer de l'ovaire^[24]. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'iEDDA réalisé avec l'Olaparid-TCO (comparativement à la SPAAC et CuAAC) pour les études d'identification de la cible et de visualisation du composé (Figure 28).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

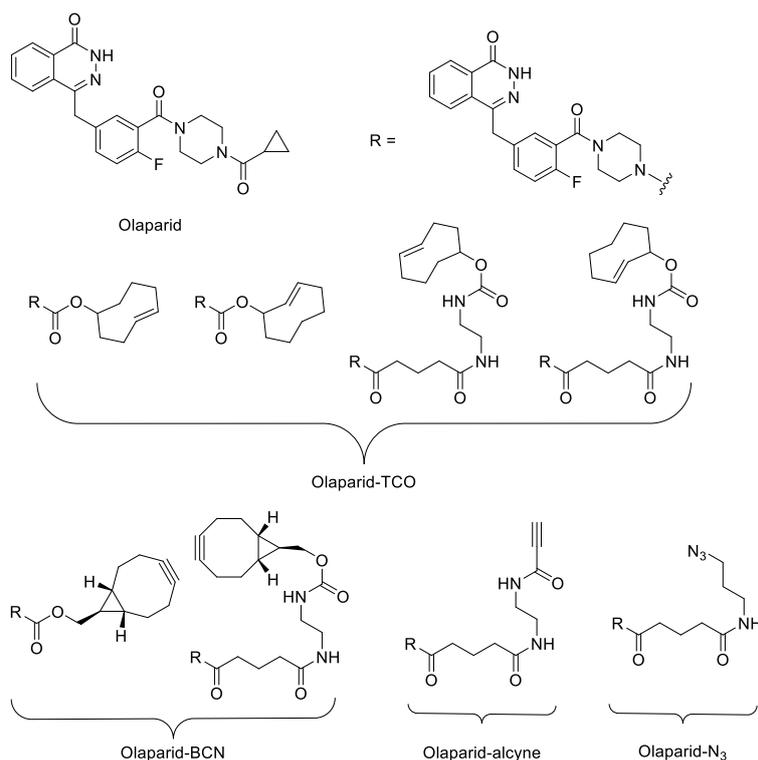


Figure 28: Structure de l'Olaparid et des Olaparid modifiés avec des fonctions bio-orthogonales (TCO, BCN, alcyne et azoture) utilisés par l'équipe de Bantscheff.

Ainsi par des tests protéomiques, l'affinité des médicaments (Olaparid) modifiés avec le *reporter* a pu être évaluée par compétition avec le médicament non modifié, *via* une analyse par spectrométrie de masse (Figure 27 (1)). De plus, l'utilisation d'une tétrazine portant un fluorophore a rendu possible la localisation de la molécule bioactive à l'intérieur des noyaux cellulaires par microscopie confocale (Figure 27 (2)). Enfin, le taux d'occupation de la cible (pEC_{50} qui est le logarithme négatif de la concentration efficace médiane (EC_{50})) a pu être obtenu en mesurant la diminution du signal de fluorescence après addition du médicament non modifié. Ainsi, un pEC_{50} de 8,8 a été mesuré avec l'Olaparid-TCO, contre 9,2 pour l'Olaparid non modifié (Figure 27 (3)) ce qui montre que la modification de l'Olaparid avec un *reporter* ne génère pas une gêne importante quant aux capacités d'inhibition du composé.

Une approche similaire à celle présentée dans la figure 27 (2) a été utilisée par le groupe de Weissleder afin d'imager par fluorescence l'aurora Kinase A, en utilisant l'inhibiteur MLN8054 conjugué au TCO. L'introduction dans un deuxième temps d'une tétrazine couplée à un fluorophore a permis d'imager la localisation de ces kinases^[25].

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

3.4. L'iEDDA pour le marquage par radioactivité

L'imagerie nucléaire est une technique de visualisation reposant sur l'utilisation d'isotopes radioactifs comme agent de contraste. Elle se divise en deux catégories. L'imagerie TEMP (Tomographie par émission monophotonique) dont l'isotope majoritairement utilisé pour l'imagerie médicale est le Technétium-99 métastable (^{99m}Tc), et la TEP (Tomographie par émission de positron) avec son représentant le plus célèbre le fluor-18 (^{18}F). Ces radiotraceurs présentent l'avantage d'être très sensibles et permettent des détections à de très faibles concentrations de radiotraceurs, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-12} M^[26,27]. Une des propriétés majeures des isotopes radioactifs est leur temps de demi-vie, qui est le temps au bout duquel la moitié des noyaux radioactifs d'une source s'est désintégrée. Pour le ^{99m}Tc , ce temps est de 6,01 heures, tandis que pour le ^{18}F , elle n'est seulement que de 109 min.

Pour que cette technique soit compatible en conjugaison, il faut que la réaction soit très rapide comparativement au temps de demi-vie des radioéléments. Ainsi, depuis une dizaine d'années, la chimie de conjugaison associée à des isotopes radioactifs est en pleine expansion^[28-30]. Les premiers tests ont été réalisés avec CuAAC^[31,32] puis avec la SpAAC^[33-35]. Cependant, ces deux types de réactions présentent des rendements radiochimiques (RCY) parfois faibles (entre 54 et 99% pour la CuAAC et entre 19 et 98% pour la SPAAC), mais surtout des temps de réaction trop élevés par rapport au temps de demi-vie des isotopes (entre 10 et 30 min pour la CuAAC et entre 15 et 30 min pour la SPAAC). Afin de pallier ces problèmes, le groupe de Fox rapporte pour la première fois en 2010, la possibilité de faire un marquage radioactif entre une tétrazine et un TCO marqué avec du ^{18}F . La réaction a été réalisée sur des partenaires de réactions non bioconjugués, à une concentration de l'ordre du micromolaire avec un RCY de 98% en moins de dix secondes, en condition aqueuse et à température ambiante (Schéma 52). Ces excellents résultats font de l'iEDDA, une réaction de choix pour le marquage bio-orthogonal radioactif^[36].

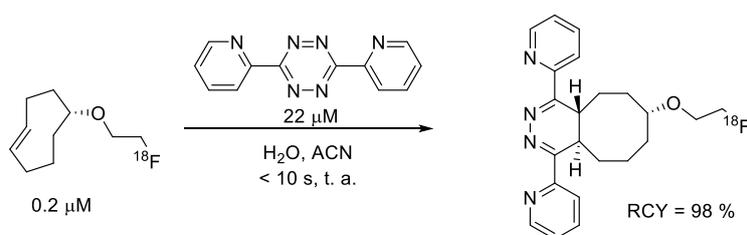


Schéma 52 : Premier exemple d'iEDDA avec un *reporter* radioactif développé par Fox en 2010^[36].

L'utilisation de l'iEDDA associée à l'imagerie nucléaire a, depuis ces travaux pionniers de Fox, permis la modification d'anticorps^[37-41] ou de peptides en SPPS^[42], qui ont rendu possible l'imagerie de tumeurs^[43], de sites de remodelage osseux actifs^[44] ou encore l'observation du système digestif^[45] *in vivo* chez le petit animal.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la libération chimiosélective

3.5. L'iEDDA pour les réactions de clivage bio-orthogonales

Les réactions de clivage bio-orthogonales offrent une voie alternative pour délivrer des pro-médicaments ou des pro-fluorophores (voire les deux dans le cas d'outils théranostiques) *in cellulo* ou *in vivo*. Les applications de libération contrôlée nécessitent que la réaction soit biocompatible, rapide, ne nécessitant pas de catalyseur^[46]. Cela fait donc de l'iEDDA la réaction idéale pour ce type de réactions.

Ainsi, en 2013, le groupe de Robillard a montré pour la première fois que l'iEDDA peut être utilisée pour de la libération contrôlée « ultra-rapide » ($58 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) d'une molécule portant une amine ou une aniline. En effet, il montre que les TCO substitués par un groupement carbonate en position allylique, subissent une élimination lors de la réaction avec une tétrazine, selon le mécanisme présenté dans le Schéma 53^[47].

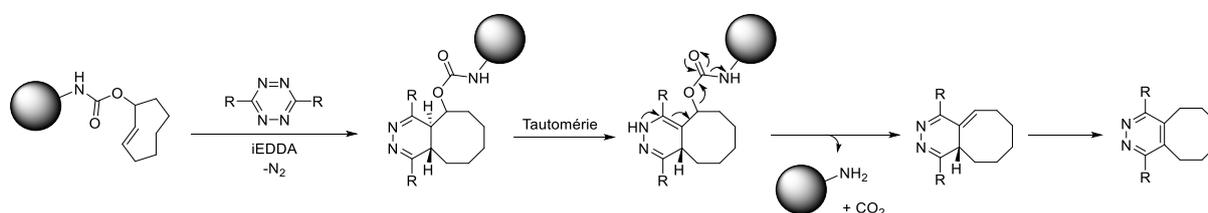


Schéma 53 : Mécanisme de la réaction de clivage d'iEDDA avec les allyles carbonate TCO.

Cette découverte a permis en 2016 au même groupe de réaliser la libération d'un anticancéreux (la doxorubicine) près d'une tumeur par pré-ciblage avec un anticorps spécifique d'un marqueur tumoral (le TAG72) portant un groupement TCO-doxorubicine. L'ajout dans un deuxième temps d'une tétrazine a permis d'initier *in vivo* la libération du médicament au niveau des cellules cancéreuses. L'efficacité de la libération du médicament et la rétention de la doxorubicine aux seins des tumeurs a été validée par RP-HPLC à détection de fluorescence^[48].

Par la suite en 2016, le groupe de Chen a réalisé une étude structure-réactivité sur le motif tétrazine, afin d'accélérer les réactions de libération avec les TCO substitués en position β . Pour ce faire, un TCO fluorogénique a été préparé, dont le retour de fluorescence en présence de différentes tétrazines a permis de déterminer leur vitesse de relargage. A la suite de l'évaluation d'une vingtaine de tétrazines, il a été constaté que les tétrazines dissymétriquement substituées de part et d'autre par un groupement électroattracteur et un groupement électrodonneur présentent les meilleures cinétiques de libération du fluorophore. En effet, le groupement électroattracteur permet d'accélérer l'iEDDA, tandis que le groupement électrodonneur permet d'accélérer la réaction d'élimination^[49] (Schéma 54).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

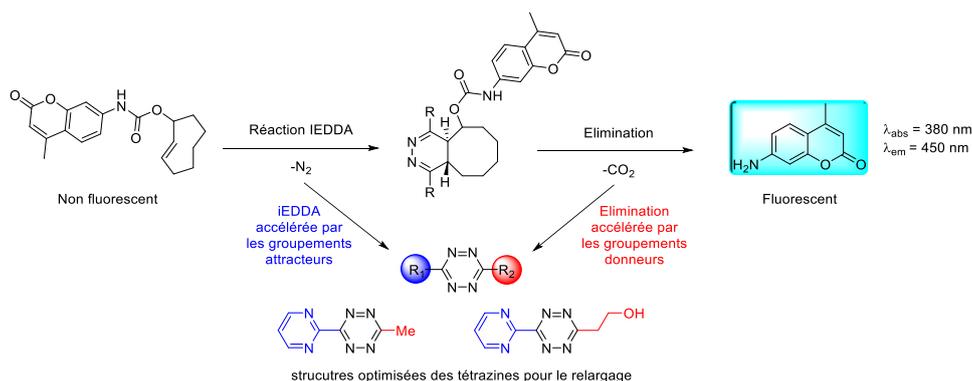


Schéma 54 : Optimisation du partenaire tétrazine pour les réactions de libération contrôlée avec les TCO

Bien que les réactions entre les tétrazines et les éthers de vinyle soient connues depuis longtemps^[50], leurs premières utilisations pour des applications de libération contrôlée ne date que de 2016. Ainsi, le groupe de Devaraj a rapporté la structure d'un profluorophore dérivé de cyanine Cy 7.0, dont la fluorescence est déclenchée par réaction entre la tétrazine et une fonction éther de vinyle, libérant une cyanine 7.0 émettant dans le proche infra-rouge (Schéma 55). Cette réaction, dont l'exaltation de fluorescence est de 70, a permis la détection d'ARNm *in cellulo*^[51]. Ainsi, deux brins d'ARN complémentaires à la séquence cible ont été synthétisés respectivement avec une tétrazine et le conjugué éther de vinyl-cyanine. Ensuite, en présence de la séquence cible, un appariement des brins a lieu, ce qui rapproche spatialement les partenaires et amorce la réaction. Le rapprochement spatial entre les deux partenaires de réaction a permis une accélération de la cinétique et ainsi une diminution de la température de réaction à 37 °C au lieu de 65 °C.

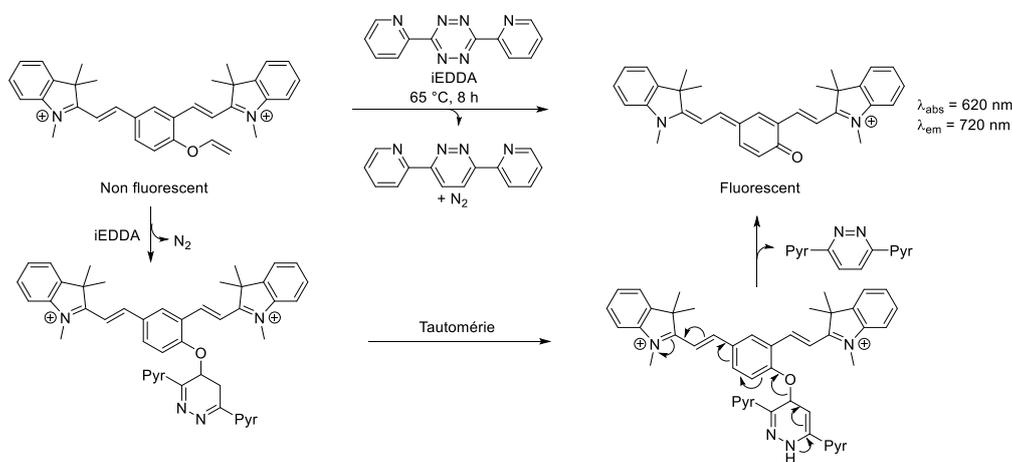


Schéma 55 : Libération contrôlée d'un fluorophore développée par le groupe de Devaraj en 2016^[51].

En 2016 le groupe de Bradley a associé la libération contrôlée d'un anticancéreux par la réaction tétrazine-éther de vinyle associée à un bras auto-immolable de type para-hydroxybenzyle phénol. Ce bras auto-immolable est accroché à un copolymère comportant une partie PEG qui augmente la pénétration cellulaire du composé. Ensuite, en présence de tétrazine, l'auto-immolation est activée, ce qui permet la libération d'une molécule de doxorubicine *in cellulo* (Schéma 56). Cette stratégie a permis d'observer un taux de mortalité cellulaire de 80% en 48 heures pour le polymère (1 μM), sur la lignée observée^[52], contre 93% pour la doxorubicine seule (5 μM).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

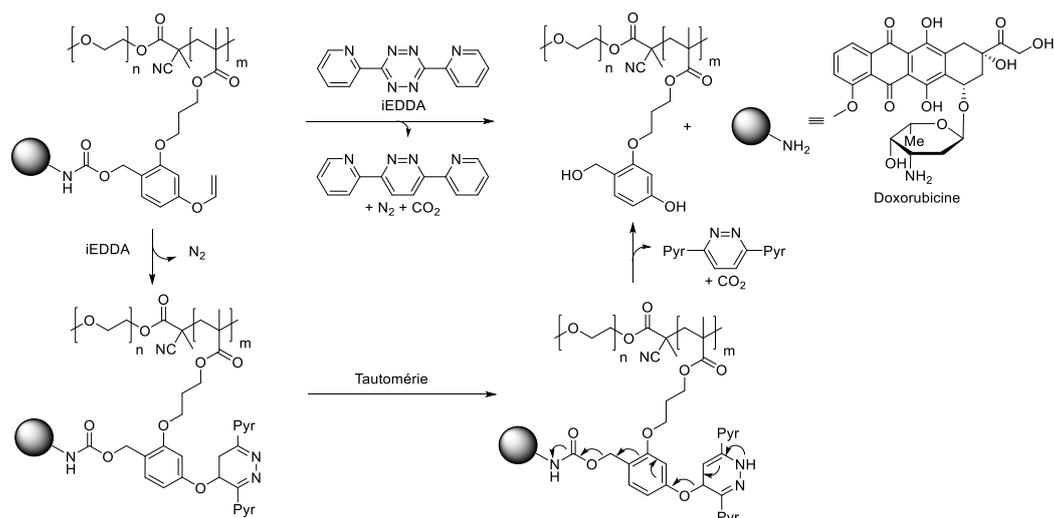


Schéma 56 : Réaction d'auto-immolation déclenchée par le motif tétrazine, développée par le groupe de Bradley en 2016^[52].

Enfin en 2017, le groupe de Bernades a décrit la libération contrôlée *in cellulo* d'un médicament modifié par un éther de vinyle. En effet, après réaction avec la tétrazine, le pro-médicament subit une réaction de spirocyclisation de Winstein afin de générer la molécule bioactive (N-Ac-CBI) souhaitée^[53] (Schéma 57).

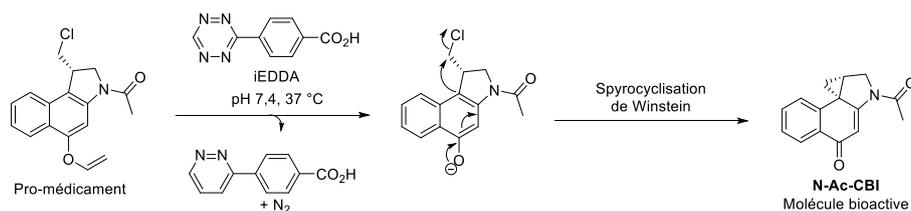


Schéma 57 : Stratégie de libération de molécule biologiquement active *in situ* développée par le groupe de Bernades en 2017^[53].

3.6. L'IEDDA pour le développement de ligation fluorogénique

Le motif tétrazine est un chromophore qui possède une bande d'absorption caractéristique à environ 520 nm. Cette particularité lui permet de « quencher » par FRET, la fluorescence des fluorophores ayant une longueur d'onde d'émission maximale aux alentours de 520 nm comme la fluorescéine par exemple^[54]. En effet, la tétrazine a la capacité de dissiper l'énergie transférée par le fluorophore par des relaxations non radiatives probablement *via* une transition de type $\pi-\pi^*$ ^[55] (tandis que les tétrazines présentant des propriétés de fluorescence passent par une transition $n-\pi^*$). Cette approche est très utilisée pour l'imagerie optique et le marquage d'analytes biologiques. En effet, lorsque la tétrazine, liée au fluorophore, réagit avec un alcène contraint, la bande d'absorption à 520 nm disparaît, ce qui conduit à un retour de l'émission de fluorescence du fluorophore (Schéma 58).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

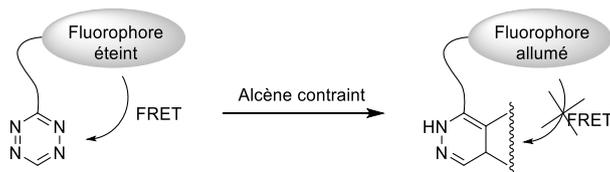


Schéma 58 : Principe de la réaction profluorescente basée sur la réaction tétrazine-alcène

Lorsque la longueur d'onde d'émission du fluorophore partenaire s'éloigne de la zone de la longueur d'onde d'absorption de la tétrazine, on observe une diminution de l'efficacité du FRET, jusqu'à n'obtenir aucune atténuation de la fluorescence, notamment pour les fluorophores émettant dans le NIR comme le VT680 par exemple^[56,57] (Figure 29), dont l'exaltation de fluorescence après réaction avec le TCO n'est que de 1.

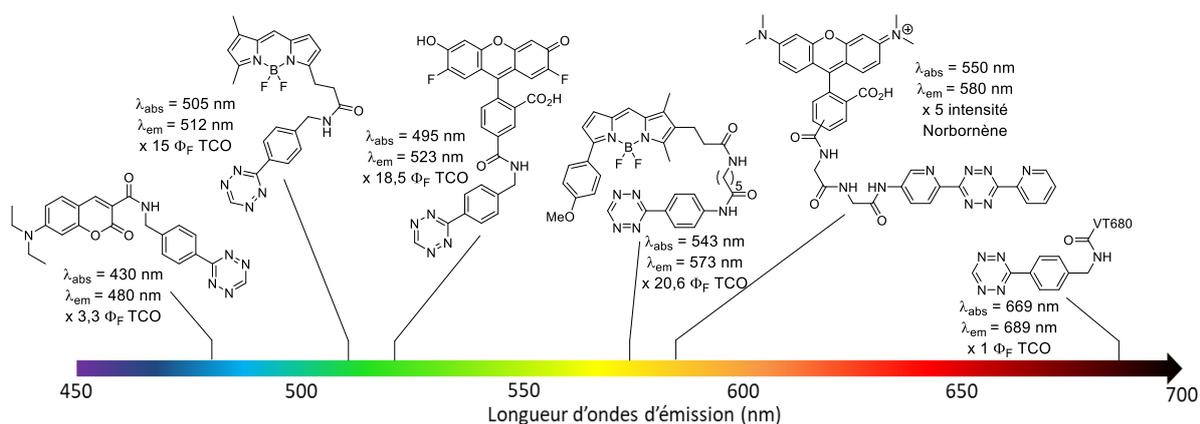


Figure 29 : Différentes tétrazines fluorogéniques de type FRET.

Ces sondes fluorogéniques comportent principalement deux limitations. Premièrement, la longueur d'onde d'émission du fluorophore choisie doit être idéalement comprise entre 500 et 540 nm pour maximiser le transfert d'énergie, ce qui ne permet pas une utilisation *in vivo* puisque les tissus absorbent les longueurs d'ondes inférieures à 650 nm (voir page 41). Deuxièmement, les exaltations de fluorescence de ces sondes avant et après la réaction de ligation se révèlent relativement faibles, ce qui est lié au coefficient d'absorption molaire modeste de la tétrazine (entre 400 et 2000 $M^{-1}cm^{-1}$)^[55], et au mécanisme de désexcitation non radiatif par transition $\pi-\pi^*$. Le transfert d'énergie du fluorophore à la tétrazine est donc non optimal. Afin de contourner ces limites, Devaraj^[58] et Weissleder^[59] ont développé indépendamment, en 2014, des tétrazines réalisant un « quenching » de fluorescence par un mécanisme de type TBET (*through bond energy transfer*), qui permettent d'une part de réduire drastiquement l'émission de fluorescence. D'autre part, d'élargir la gamme de fluorophores utilisables puisque le transfert d'énergie ne se réalise plus, spatialement, mais directement *via* la délocalisation par les liaisons π , ce qui permet de se passer de la bande d'absorption de la tétrazine à 520 nm. Ainsi, il est possible d'utiliser des fluorophores possédant d'excellentes propriétés photophysiques mais possédant également une émission qui se situe dans le proche infra-rouge, tels que des BODIPY^[60], des rhodamines^[61], des silico-rhodamines^[62] ou encore des cyanines^[63]. Différentes sondes de type TBET possédant de très bonnes exaltations de fluorescence sont référencées dans la Figure 30 et classées par longueur d'onde d'émission croissante^[64,65].

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

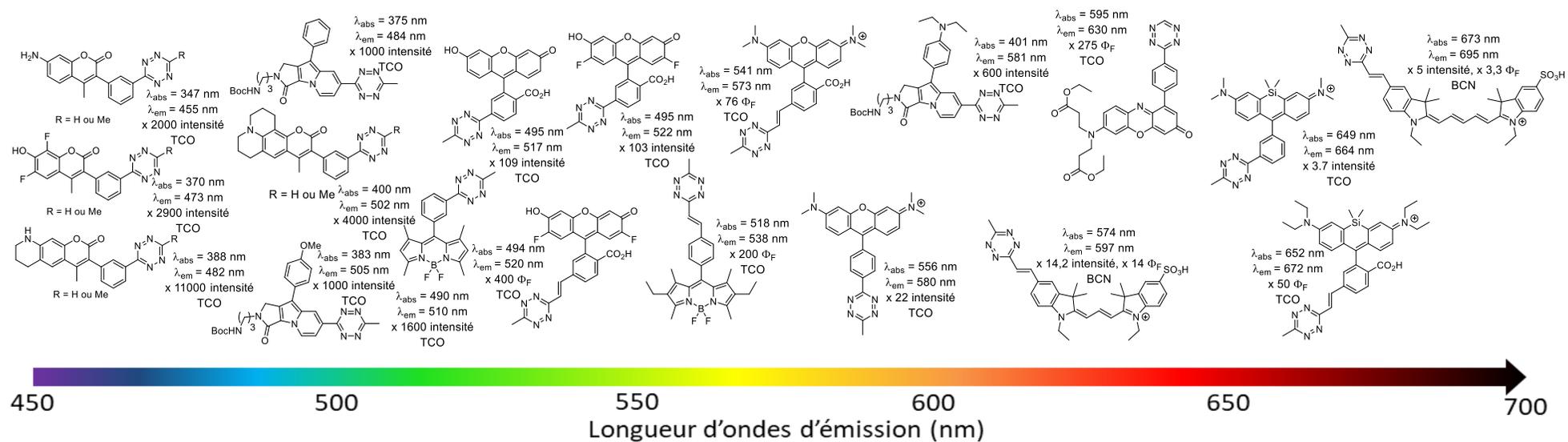


Figure 30 : Différentes tétrazines fluorogénique fondées sur un mécanisme de quenching de type TBET.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

Ces diverses sondes de type FRET ou TBET également qualifiées d'ultra-fluorogéniques, ont été utilisées afin d'optimiser différentes applications. Depuis leur découverte, ces sondes ont été utilisées en microscopie super-résolutive sans lavage^[63,66], pour la détection spécifique de séquences d'ADN et d'ARNm dans les systèmes vivants^[67], ou encore pour le marquage de protéines^[68].

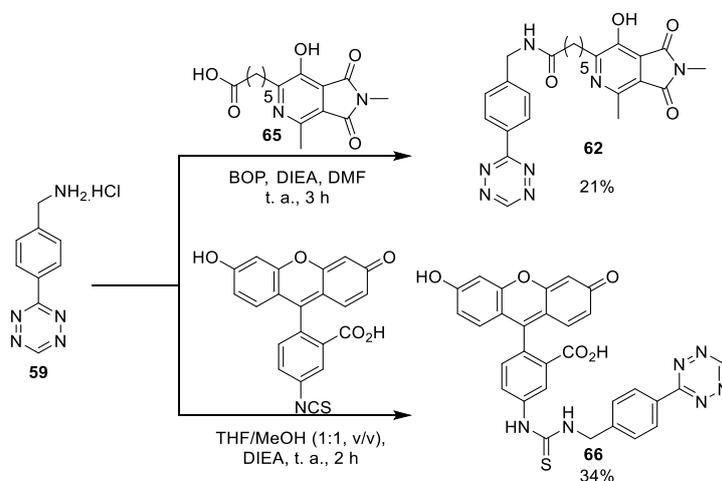
L'iEDDA utilisant des tétrazines, a permis le développement de nombreuses applications jusqu'alors difficiles voire impossibles à réaliser. Toutefois, ce type de réaction est limité à l'utilisation conjointe d'alcènes contraints. Bien que largement représentés, ils possèdent des limitations comme le fait que ce soient des composés carbonés peu solubles en milieu aqueux, ou encore le fait de générer un mélange d'isomères difficilement séparables, même par HPLC. Ainsi, afin de diversifier les formidables propriétés du noyau tétrazine (bio-orthogonalité et propriétés fluorogéniques par exemple), la recherche de nouveaux partenaires de réaction permettrait d'élargir l'utilisation des tétrazines à de nouvelles applications^[42]. Ce chapitre est dédié à nos efforts en ce sens.

II. Résultats et discussions

1. Recherche de nouveaux partenaires réactionnels de tétrazines

1.1. Présentation de la stratégie mise en œuvre

Lors de l'étude des propriétés de profluorescence de la réaction de Kondrat'eva, une sonde profluorescente comportant un motif tétrazine a été synthétisée (cf. chapitre 1). Néanmoins, cette sonde possède des propriétés photophysiques assez modestes (faible exaltation de fluorescence (x5), hydrosolubilité modeste, nombreuses étapes de synthèse requises). La synthèse d'une sonde plus performante a donc été entreprise, basée sur l'utilisation de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) connue pour réagir facilement avec les amines. De plus, la fluorescéine possède de bonnes propriétés photophysiques, une bonne stabilité vis-à-vis du photoblanchiment, et est relativement hydrosoluble (300 mg/L à 20 °C, source : société Laurylab) (Schéma 59).



Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

	62	66
λ_{abs} (nm)	418	490
λ_{em} (nm)	520	520
QE et (e) avec le norbornène	78% (x5)	86% (x8)
Φ_f (fluorophore seul) (PBS 7,4)	0,18	0,85
Nombre d'étapes de synthèse	11	4
Nombre de purifications RP-HPLC	2	1
Concentration d'utilisation	5 mM (minimum)	2,5 mM (jusqu'à 10 μ M)
hydrosolubilité	Mauvaise	Bonne

Schéma 59 : Etude comparative entre Tet-H-aza 62 et Tet-H-FITC 66 (QE = « Quenching efficiency », efficacité d'extinction, e = exaltation en intensité de fluorescence à 520 nm).

Partant de l'observation que les diénophiles enrichis en électrons avaient été décrits comme de bons partenaires pour la réaction iEDDA avec la tétrazine, nous avons criblé une chimiothèque de composés facilement énolisables dans des conditions aqueuses à pH physiologique, avec cette sonde optimisée, par criblage par fluorescence (réalisé au lecteur de plaques). Ce criblage nous a conduits à identifier la pyrazolone comme partenaire potentiel de la tétrazine (Schéma 60), mais suivant un mécanisme inédit et totalement différent de l'iEDDA que nous n'avions pas anticipé. En effet, la réaction conduit à une double addition de pyrazolone sur chacun des deux carbones de la tétrazine, et à l'élimination d'une molécule de diazote et d'hydrazine, *via* une addition de Michael de la pyrazolone 68 sur la tétrazine 67.

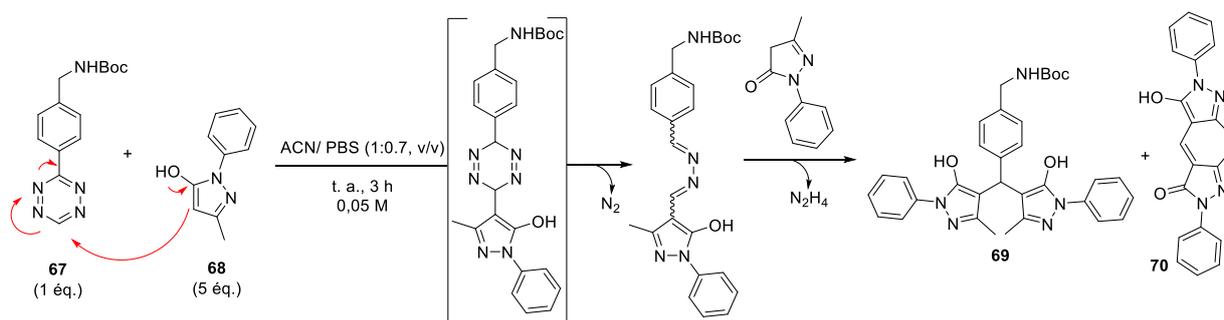


Schéma 60 : Réaction entre la benzylamine tétrazine 67 et la pyrazolone 68

A la suite de ces résultats, une étude de relation structure-réactivité a été réalisée afin d'identifier les sites fonctionnalisables de la pyrazolone en vue d'une application en ligation chimiosélective. Cette nouvelle ligation chimiosélective a notamment été utilisée pour la modification d'un peptide. De plus, le fait de pouvoir insérer deux motifs identiques (les pyrazolones) sur un unique point d'ancrage (la tétrazine), nous a permis d'optimiser le marquage d'une protéine (le lysozyme humain) dont la fonctionnalisation est réputée difficile (Schéma 61)^[69-70]. En effet, il a été montré que le lysozyme ne présente qu'un résidu lysine (K33) réactif à pH physiologique. De plus, elle ne possède aucun résidu cystéine libre.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

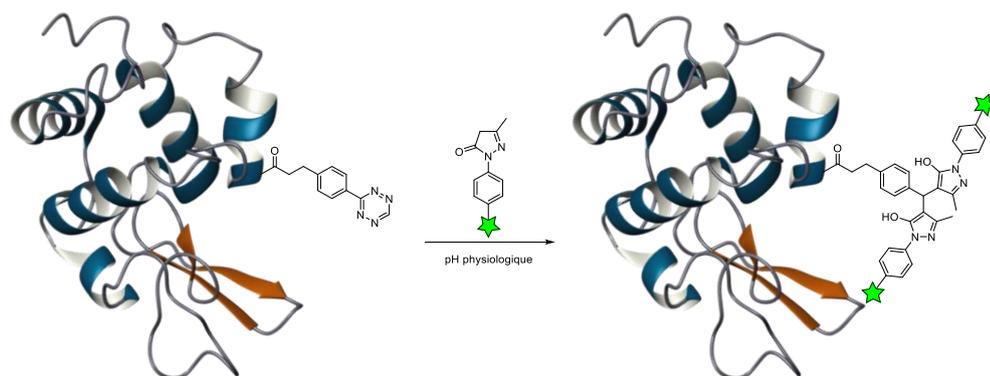


Schéma 61 : Principe du marquage du lysozyme humain réalisé avec la ligation tétrazine-pyrazolone

Les différents résultats obtenus font l'objet d'un article qui vient d'être soumis à la revue *Org. Biomol. Chem.* (Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules Kévin Renault, Clément Guillou, Pierre-Yves Renard and Cyrille Sabot).

1.2. Article 2 : Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules + criblage des composés énolisable extrait du SI.



Journal Name

ARTICLE

Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

Kévin Renault,^a Clément Guillou,^b Pierre-Yves Renard,^a and Cyrille Sabot^{*a}

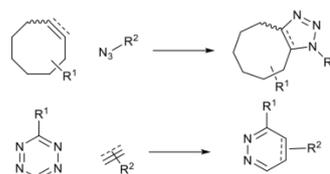
DOI: 10.1039/x0xx00000x

Chemoselective, biocompatible ligation reactions are the key components for efficient and modular access to biomolecular scaffolds. Tetrazine ligation leads to the formation of a mixture of isomers, which results in troublesome reaction monitoring, purification and characterization of conjugates. We report herein a modified tetrazine ligation strategy based on the use of pyrazolone coupling partner, which provides a single molecule conjugate

www.rsc.org/

Introduction

In our ongoing efforts to develop biocompatible ligation tools that provide single molecule conjugates in terms of regio- and stereoisomers to simplify product isolation,^{1, 2} we focused our attention towards the use of established bioorthogonal handles which display attractive features. In fact, bioorthogonal chemistry enables the chemoselective and efficient labelling or detection of (bio)molecules in complex aqueous media such as cells and living organisms. In order to be used in different biologically representative contexts, such bioorthogonal reactions need to be highly chemoselective, fast, biocompatible and catalyst-free. Due to this wide range of demanding criteria that must be fulfilled, only a handful of transformations have been reported to date.^{3,4} Most prominent bioorthogonal reactions include strained-promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC)⁵ and tetrazine ligation.^{6,7} However, despite the aforementioned attractive features of these reactions, their lack of regio- and stereoselectivity or the use of racemic bioorthogonal handles which leads to the formation of a mixture of diastereoisomeric products, prevent their widespread use for the site-specific modification of small biomolecules such as peptides.⁷⁻⁹ In fact, mixtures of isomeric products require challenging analysis and induce separation issues (Scheme 1).



Scheme 1. Bioorthogonal reactions leading to mixture of isomeric products.

Herein, a modified tetrazine ligation approach for facile preparation and purification of corresponding conjugates is reported. In contrast to most of tetrazine-based reactions,¹⁰ this method has been shown to lead to a single molecule conjugate.¹¹

Results and discussions

Tetrazines react through inverse electron-demand Diels-Alder (IeDDA) reactions with strained alkenes/alkynes or electron-rich olefins to yield a mixture of isomers. In contrast, carbanions and enol species have not been fully investigated as reaction partners, despite their nucleophilic potential under physiological conditions. Accordingly, we selected a small library of compounds which were susceptible to readily form the corresponding enol or enolate in aqueous solution such as 1,3-dicarbonyles and analogues (see the ESI). Their reactivity screening towards tetrazine derivatives was carried out in physiological condition (PBS buffer, pH 7.4) with the fluorogenic tetrazine-fluorescein conjugate **1**, whose fluorescence emission is quenched by a Förster resonance energy transfer (FRET) which occurs between the fluorescein donor and tetrazine acceptor.^{12,13} Upon reaction with either a nucleophile or a dienophile, the tetrazine ring transformation would lead to the restoration of the fluorescence of the fluorogenic probe **1**. From a preliminary screening (see the ESI), the pyrazolone scaffold was identified as a potent chemical reactive partner of tetrazine.

^a Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen (France). E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr

^b PISSARO Proteomics Platform, IRIB, Normandie University, 76000 Rouen (France). Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

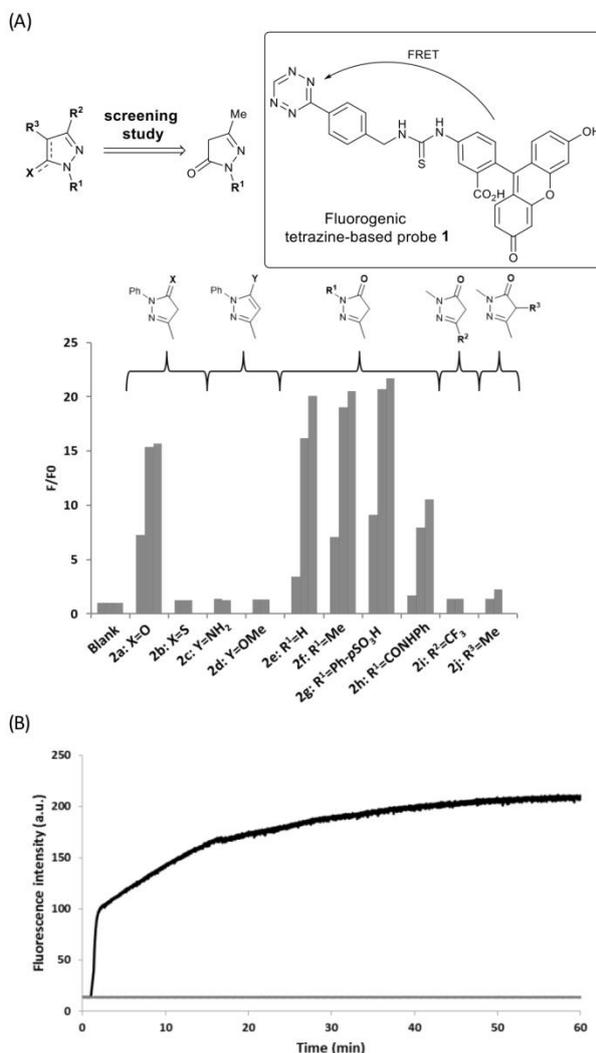
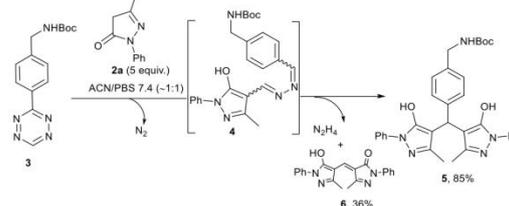


Figure 1. (A) Screening study: fluorescence responses of tetrazine-based probe **1** (2.5 mM) at 2 (blue), 60 (red) and 120 min (green) after the addition of pyrazolone derivatives (10 mM, 4 equiv.) in PBS 7.4 at 25 °C at λ_{ex} 470 nm and λ_{em} 520 nm; (B) Time-dependent fluorescence intensity changes of probe **1** in the absence (grey) or in the presence of N-phenyl pyrazolone **2a** (black) in PBS 7.4 at 25 °C, at λ_{ex} 470 nm and λ_{em} 520 nm.

Then, the pyrazolone was subject to structural optimization by modifying either X, Y, R^1 , R^2 or R^3 (Figure 1A). This structure–reactivity relationship study aims at improving the reactivity of pyrazolones towards tetrazine, but also at highlighting the positions on the pyrazolone suitable for the introduction of the bioconjugation handle, and thus positions where modifications do not significantly alter the reactivity of pyrazolones. First, the carbonyl group at position 5 (X=O) proved essential to the reactivity. In fact, neither pyrazol-5-thione, 5-amino-, or 5-methoxypyrazole scaffolds did trigger fluorescence emission. Modification of the pyrazolone scaffold at the C3 position (compound **2i**, R^2 =CF₃) or C4 position (compound **2j**, R^3 = Me) led to a dramatic loss of reactivity. Eventually, only modifications at the nitrogen position (by an hydrogen, only modifications at the nitrogen position (by an hydrogen, an alkyl or phenyl derivative, R^1 = H, Me, Ph or Ph p-

SO_3H were well tolerated, the pyrazolone bearing an electron-withdrawing moiety on this position (**2h**) did display an acceptable reactivity towards tetrazine, albeit at a slower rate. Taken together, these results indicate that only derivatization of the pyrazolone moiety at the nitrogen position did not significantly alter its reactivity, and thus this position has to be used for the addition of the bioconjugation handle. Moreover, substitution at the nitrogen position with a phenyl ring bearing a water solubilizing moiety (pSO₃H) displayed the highest pyrazolone reactivity towards tetrazine.



Scheme 2. Pyrazolone-tetrazine chemical ligation.

Next, the reaction was investigated by identifying the products/intermediates formed from the model reaction of five-fold molar equivalents of 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one **2a** with benzyl tetrazine **3**. The coupling product dipyrazolone **5** was obtained in 85% yield along with 36% of the by-product dipyrazolymethane **6** (Scheme 2). By using a five-fold molar excess of tetrazine **3** with respect to pyrazolone **2a**, we succeeded in isolating the monoaddition intermediate **4** in 94% yield, which upon subsequent treatment with the pyrazolone **2a** provided the product **5**. This tetrazine ligation presumably involves a first step of Michael addition of the enolate species on the tetrazine scaffold followed by the release of nitrogen gas to afford the intermediate **4**. In contrast to other tetrazine-based ligation reactions, this transformation does not lead to the formation of stereogenic centers or isomers, which facilitates the purification of corresponding conjugates as shown in Figure 2.

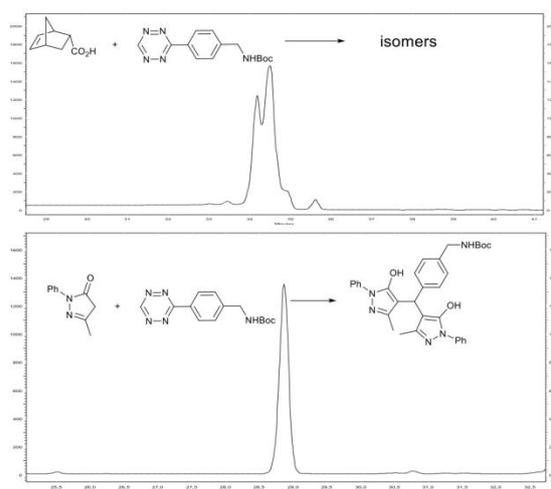
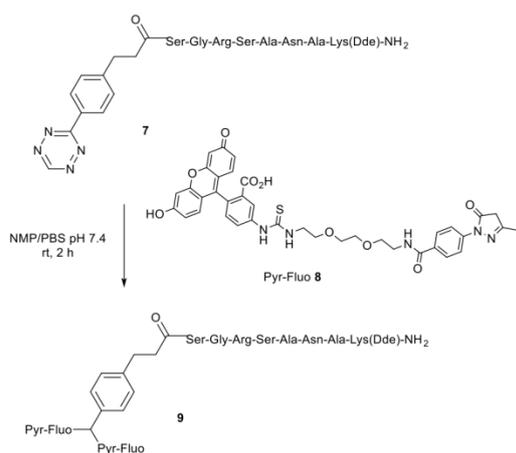


Figure 2. Comparative RP-HPLC chromatograms of the reaction product obtained by the reaction of benzyl-tetrazine **3** with (A) 5-Norbornene-2-carboxylic acid; (B) N-phenylpyrazolone **2a**.

The biocompatibility of tetrazine and pyrazolone scaffold being already established,¹⁴⁻¹⁶ the chemical stability of the intermediate **4** and products **5** and **6** were evaluated in PBS pH 7.4 at 37 °C in the presence of bovine serum albumin (BSA), a plasmatic protein which contains 30-35 accessible lysine residues and one free cysteine. From this study, we observed that only the intermediate **4** showed some decomposition (10% of decomposition after 9h, see the ESI).

From these encouraging results and as a first application of this ligation, the fluorescence labelling of the octapeptide **7** was undertaken. This compound is constituted of a peptide substrate of urokinase, which was prepared through standard solid phase synthesis. The corresponding peptide was then functionalized on the N-terminal position by a tetrazine scaffold. Finally, the fluorescence labelling of **7** with two fluorescein units, was carried out in aqueous media by the fluorescein-based pyrazolone Pyr-Fluo **8** to afford **9**, a structure which was confirmed by HRMS analysis (See the ESI).



Scheme 3. Preparation of fluorescent peptide **9**.

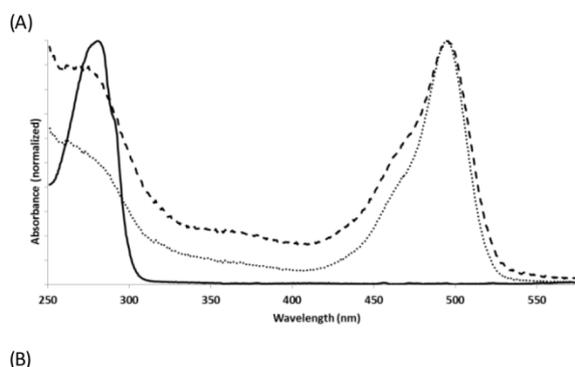
Table 1 displays the absorption and emission wavelengths and quantum yields of commercially available fluorescein and compounds **8** and **9**, which were determined in PBS pH 7.4 at 25 °C (entries 1-3). The substantially lower quantum yields of fluorescence measured for **8** and **9** relative to that of fluorescein may be attributed to the formation of non-emissive dye aggregates and/or a photo-induced electron transfer (PeT)-mediated fluorescence quenching of the fluorescein by the electron-rich pyrazolone scaffold.

Table 1 Spectroscopic data of fluorescein-containing compounds^a

Entry	Cmpd	λ_{abs} (nm) ^b	λ_{em} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_{F} ^c
1	Fluorescein	490	513	66965	0.85
2	Pyr-Fluo 8	495	518	50887	0.20
3	9	496	520	83190	0.09
4	Lyso-Fluo	495	518	N.D. ^d	0.04

^a All measurements were taken in PBS (0.1 M, pH 7.4) at 25 °C. ^b λ_{abs} is the maximum of the absorption band responsible for the emission observed at λ_{em} . ^c Fluorescein was used as the standard ($\Phi_{\text{F}} = 0.91$ in NaOH 0.1 M)¹⁷ with excitation at 470 nm. ^d Not determined.

Finally, the fluorescence labelling of human lysozyme (h-Lyso), a protein which exhibits important antibacterial activity, was investigated. Among the various applications of lysozyme (such as in food, pharmaceutical and medical industries), fluorescein-modified lysozyme has been used in particular as a tool for the specific detection of Gram-positive bacteria.¹⁸ However, although this protein has six lysine residues, only Lys33 is reactive under physiological conditions, thus limiting the number of protein/dye (P/D) ratio to about one.^{19,20} Accordingly, this single-step double fluorescence labelling strategy was exploited for the preparation of fluorescent h-Lyso. First, the antimicrobial protein was modified by a tetrazine chemical handle (see the ESI), which was then treated by the fluorescein-pyrazolone conjugate **8** in PB 0.1 M pH 7.4 at room temperature for 12 h. The resulting fluorescein-lysozyme conjugate Lyso-Fluo was dialyzed by using an ultra centrifugal filter unit with a 10 kDa molecular weight cut-off to remove the excess of unreacted fluorescent pyrazolone **8** and by-product. The D/P ratio was determined by UV-vis spectroscopy using a reported method, and found to be 1.6 (Figure 3A). In addition, the quantum yield of fluorescence was determined to be slightly lower than that of compound **9** (Table 1, entries 3 and 4), which may be due to autoquenching induced by interactions between fluorophores and aromatic rings on the side chain of amino acids (tryptophan or phenylalanine).²¹ The successful labelling of h-Lyso was further confirmed by denaturing SDS-PAGE. Native and modified lysozyme was successively revealed by fluorescence and silver nitrate staining (Figure 3B).



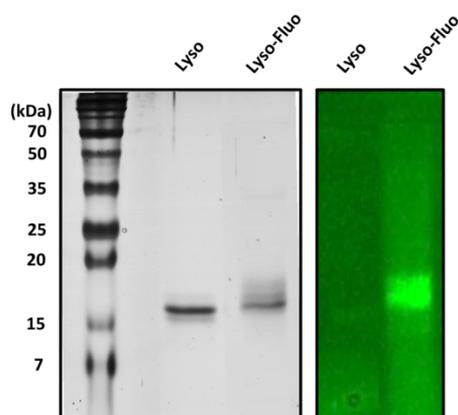


Figure 3. A) Normalized absorption of h-Lyso (black line), FITC-pyrazolone conjugate **8** (dotted line), and FITC-modified h-Lyso (dashed line) in PBS (pH 7.4) at 25 °C; (B) SDS-PAGE analysis of native h-Lyso (0.5 µg) and FITC-modified h-Lyso (~2 µg) (left: silver nitrate staining; right: fluorescence detection).

Bruker DPX 300 (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent peak for calibration. J values are expressed in Hz. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive and negative modes.

Instruments and methods

Protein samples were concentrated using a Millipore Spin-X UF ultracentrifugal filter device with a 10 kDa cutoff and a volume of 500 µL. UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, 10 × 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 × 4 mm, Chamber volume 3.5 mL). Fluorescence screening studies were performed by using an ultra-micro quartz cell (Hellma, 105.251-QS, 20 × 3 mm, chamber volume = 45 µL). The absorption spectra were recorded (220-800 nm) in PBS (100 mM, pH 7.4) at 25 °C. Excitation/emission spectra were recorded under the same conditions after emission/excitation at the corresponding wavelength (470/540 nm, excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit=2.5 nm). Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method that used Lucifer yellow ($\Phi_F = 91\%$ in NaOH 0.1 M, 470 nm)¹⁷ as a standard. The following Equation (1) was used to determine the relative fluorescence quantum yield in which A is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 a.u.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25°C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.337 for PBS and 1.357 for NaOH 0.1 M.

$$\Phi_f(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2\Phi_f(s)$$

HPLC systems used for purity control or purification

System QC: was used for analytical experiments (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 × 100 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min. Several chromatographic systems were used for the purification steps (by semi-preparative HPLC):

System A: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 × 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 370 and 470 nm. **System B:** RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 × 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (200 min) of ACN and followed

Conclusions

Herein, we have developed a peptide modification tool based on the widely used tetrazine chemical function, which rapidly reacts with pyrazolones to provide a single molecule conjugate. Additionally, this ligation enables the covalent attachment of two fluorophores in a single step process. This reaction presumably involves at first a conjugate addition rather than a cycloaddition of pyrazolone-based C-nucleophiles to tetrazines.

Ultimately, in this study, the tetrazine scaffold may be seen as a bioorthogonal aldehyde protecting group, which reacts specifically with pyrazolones. The reaction of such aldehydes with pyrazolones has recently been reported by Rabuka and showed promising applications in the field of biopharmaceuticals.¹⁵

Finally, in the context of spatial and temporal control of substrate modification,²² this study suggests that 5-alkoxy-pyrazoles which are unreactive towards tetrazines, should be convenient precursors of reactive pyrazol-5-ones under appropriate stimuli (light, enzyme...).

Experimental

General

Flash column chromatography purifications were performed on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 mm) from Merck. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (at 254/365 nm) and/or staining with KMnO₄ solution. Unless otherwise noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. Phosphate buffer (PB, 100 mM, pH 7.4), Phosphate buffer saline (PBS, 100 mM, pH 7.4) and aq. mobile phases for HPLC were prepared with water purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 MU cm). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded with a

100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 15 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was adapted to the chromophore analyzed.

Synthesis

Pyrazolone **2a**, **2c**, **2g** and **2i** are commercially available. Pyrazolone **2b**,²³ **2d**,²⁴ **2e**,²⁵ **2f**,²⁶ **2h** and **2j**²⁷ were prepared according reported procedures.

Fluorogenic tetrazine probe (1). To a solution of (4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanaminium chloride²⁸ (25.2 mg, 0.141 mmol, 1 equiv.) in a 3 mL solution of THF/MeOH (1:1, v/v) was added the commercially available fluorescein isothiocyanate (40 mg, 0.128 mmol, 1 equiv.) and DIEA (72 μ L, 0.412 mmol, 4 equiv.). The reaction was stirred for 3 h at room temperature. After the reaction was completed (monitored by RP-HPLC, system QC), the crude product was evaporated under vacuum and the residue diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). The product-containing fractions were lyophilized to give 25.2 mg (34% yield) of the product as an orange amorphous powder. m.p. 196 °C (degradation); IR (neat cm^{-1}) 1672, 1592, 1539, 1455, 1435, 1386, 1348, 1270, 1177, 1118, 850, 797, 721, 598, 571; ¹H NMR (300 MHz, MeOD-[D4]) δ 10.28 (s, 1H), 8.51 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.86 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.72 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 2H), 4.99 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, MeOD-[D4]) δ 183.5, 169.9, 167.6, 165.1, 159.2, 156.3, 145.4, 142.8, 132.2, 131.6, 130.8, 130.2, 129.5, 129.3, 127.7, 122.53, 116.1, 113.8, 103.5; HRMS (ESI) exact mass calcd for C₃₀H₂₁N₆O₅S m/z 577.1294 found m/z [M+H]⁺ 577.1300; HPLC (system QC): t_R = 27.433 min (95 % purity).

tert-Butyl 4-(((3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methylene)hydrazono)methyl)benzylcarbamate (4).

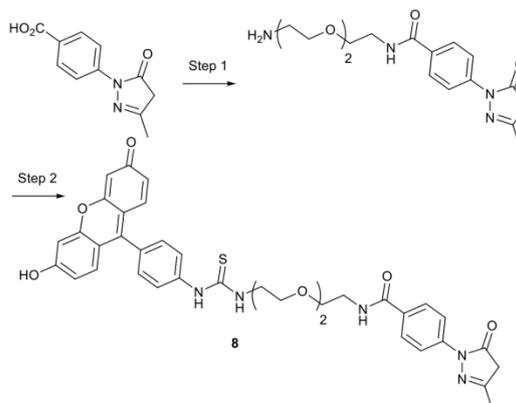
To a solution of tert-butyl (4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)carbamate (106 mg, 0.369 mmol, 5 equiv.) in a mixture of ACN/PBS (7.6 mL, 4.8:2.8, v/v) was added 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one (13 mg, 0.074 mmol, 1 equiv.). The reaction was stirred for 2 h at room temperature. Then, the crude product was diluted with AcOEt and washed with deionized water. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by preparative TLC (2 mm, AcOEt/Cyclohexane, 1:1, v/v) to give the product (30.1 mg, 0.069 mmol, yield 94%) as pale yellow amorphous powder. M.p. 96 °C; IR (neat cm^{-1}) 3473, 3333, 2973, 2913, 2860, 1669, 1597, 1525, 1497, 1268, 1248, 1162, 1085, 1055, 956; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 8.02–7.92 (m, 3H), 7.63 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.38 (dt, J = 13.0, 6.8 Hz, 4H), 7.15 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.97 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.34 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 2.27 (s, 13H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 156.0, 149.9, 148.3, 146.6, 142.7, 138.9, 131.8, 128.9, 128.1, 127.9, 124.6, 118.9, 101.2, 79.9, 44.5, 28.5, 12.8; HRMS (ESI)

exact mass calcd for C₂₄H₂₈N₅O₃ m/z 434.2192 found m/z 434.2197 [M+H]⁺.

(E)-4-((5-Hydroxy-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylene)-3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5(4H)-one (5) and tert-butyl 4-(bis(3-methyl-5-oxo-1-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl)benzylcarbamate (6).

To a solution of tert-butyl (4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)carbamate **3**²⁸ (25.6 mg, 0.089 mmol, 1 equiv.) in a mixture of ACN/PBS (1.7 mL; 1:07, v/v) was added commercially available 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one (77.6 mg, 0.445 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 3 h at room temperature. Then, the crude product was diluted with AcOEt and washed with deionized water. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, AcOEt/Cyclohexane from 1:9 to 7:3, v/v). The product **5** was obtained as a pale yellow amorphous powder (42.7 mg, 0.076 mmol, yield 85%) and compound **6** was isolated as a yellow amorphous powder (11.4 mg, 0.032 mmol, yield 36%). Compound **5**: m.p. 137 °C; IR (neat cm^{-1}): 2921, 1705, 1596, 1499, 1365, 1412, 1272, 1164, 1023, 751. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (d, J = 7.6 Hz, 4H), 7.25 (t, J = 9.4 Hz, 4H), 7.10 (m, 6H), 4.88 (s, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.16 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 2.09 (s, 6H), 1.41 (s, 9H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.9, 156.2, 146.6, 140.2, 137.2, 136.9, 129.0, 127.6, 127.5, 126.3, 121.4, 105.9, 79.7, 44.4, 33.6, 28.5, 11.8; HRMS (ESI) exact mass calcd for C₃₃H₃₆N₅O₄ m/z 566.2767 found m/z 566.2770 [M+H]⁺. Compound **6**:²⁹ m.p. 173 °C; IR (neat cm^{-1}): 2921, 2855, 161, 1584, 1547, 1488, 1324, 1172, 1091, 1059, 1005, 891, 814, 750. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.96 – 7.83 (m, 4H), 7.50 – 7.38 (m, 4H), 7.32 – 7.26 (m, 3H), 2.38 (s, 6H); exact mass calcd for C₂₁H₁₉N₄O₂ m/z 359.1508 found m/z 359.1501 [M+H]⁺.

N-(2-(2-(3-(4-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)phenyl)thioureido)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzamide (8)

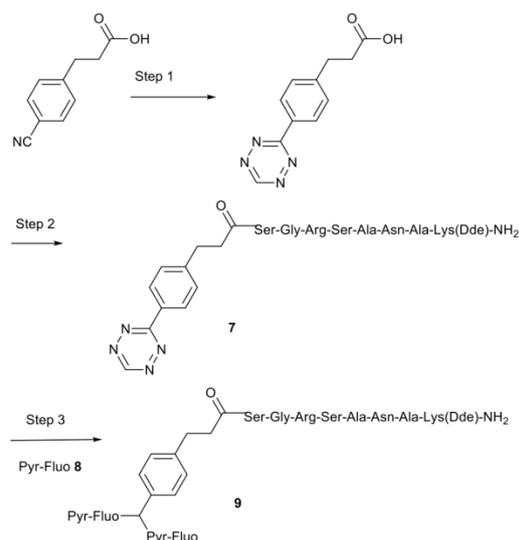


Step 1: To a solution of 4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoic acid³⁰ (1.0 g, 4.58 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (25 mL) was added N-hydroxysuccinimide (580 mg, 5.04

mmol, 1.1 equiv.) and EDCI. HCl (965 mg, 5.04 mmol, 1.1 equiv.). The reaction was stirred for 8 h at room temperature. Then, the crude product was diluted with AcOEt and washed with a solution of saturated aq NH_4Cl ($\times 3$), and brine. The organic layer was concentrated under vacuum to give 1.276 g (4.033 mmol, 88% raw yield) of the product as a pale brown amorphous powder. The crude product was directly used without further purification. To a solution of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoate (200 mg, 0.634 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (5 mL) was added 2,2'-(ethane-1,2-diylbis(oxy))bis(ethan-1-amine) (465 μL , 3.17 mmol, 5 equiv.) and DIEA (439 μL , 2.536 mmol, 4 equiv.). The reaction was stirred for 4 h at room temperature. After the reaction was completed, the crude product was evaporated under vacuum and purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/MeOH, from 1:0 to 1:1, v/v). The product was obtained as an orange oil (217.7 mg, 6.24 mmol, yield 99%). IR (neat cm^{-1}) 2966, 2919, 1723, 1595, 1490, 1130, 730; ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.95 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.86 – 7.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 3.70 – 3.42 (m, 14H), 2.09 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 169.9, 165.7, 163.9, 152.2, 144.8, 129.6, 128.8, 120.5, 71.2, 70.6, 41.1, 40.7, 14.6; HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$ m/z 349.1876; found m/z 349.1888 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Step 2: To a solution of commercially available fluorescein isothiocyanate (40 mg, 0.103 mmol, 1 equiv.) in a 2 mL solution of dry MeOH/THF (1:1, v/v) was added N-(2-(2-aminoethoxy)ethyl)ethyl-4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzamide (39.4 mg, 0.113 mmol, 1.1 equiv.) and DIEA (72 μL , 0.412 mmol, 4 equiv.). The reaction was stirred for 2 h at room temperature. After the reaction was completed (monitored by RP-HPLC, system QC), the crude product was evaporated under vacuum and the resulting residue was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system B). The product-containing fractions were lyophilized to give 28.3 mg (37% yield) of the product as an orange amorphous powder. m.p. 169 °C (degradation); IR (neat cm^{-1}) 3060, 2862, 1598, 1455, 1539, 1276, 1177, 1118, 850, 764; ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.30 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.97 – 7.87 (m, 2H), 7.79 (m, 3H), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.77 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 2H), 3.79 (s, 2H), 3.75 – 3.61 (m, 9H), 3.58 (m, 2H), 2.19 (d, $J = 28.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 182.9, 173.5, 169.9, 169.3, 165.4, 161.2, 160.2, 156.5, 152.1, 142.9, 142.3, 140.7, 132.9, 131.8, 131.19, 130.2, 129.4, 129.1, 127.8, 121.6, 118.9, 116.3, 113.9, 103.4, 71.4, 71.3, 70.6, 70.2, 45.4, 40.9, 16.8, 12.9; HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$ m/z 738.2234; found m/z 738.2236 $[\text{M} + \text{H}]^+$; HPLC (system QC): $t_R = 25.063$ min (>99 % purity).

Procedure for the preparation of fluorescein-peptide (9)



Step 1: To a solution of 3-(4-cyanophenyl)propanoic acid (175.2 mg, 1 mmol) in dry DMF (2.4 mL) in a 25 mL sealed round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, was successively added formamidine acetate (3.240 g, 30 mmol, 30 equiv.), hydrazine monohydrate (7.36 mL, 50 mmol, 50 equiv.) and zinc trifluoromethanesulfonate (546 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv.). The vessel was degassed with argon, sealed and the mixture was stirred at 40 °C for 36 h. The consumption of 3-(4-cyanophenyl)propanoic acid was monitored by HPLC (system QC). The reaction solution was cooled to room temperature and the seal removed. Sodium nitrite (1.38 mg, 20 mmol, 20 equiv.) in water (20 mL) was slowly added to the solution, followed by a slow addition of a solution of aq HCl (1M) during which the solution turned bright red in color and gas evolved. Addition of the solution of aq HCl (1M) continued until gas evolution ceased and the pH value is 3. (Caution! This step generates a large amount of toxic nitrogen oxide gases and should be performed in a well-ventilated fume hood). The mixture was extracted with EtOAc and the organic phase dried over magnesium MgSO_4 . The layer containing EtOAc was removed using rotary evaporation and the residue purified using silica column chromatography (MeOH/DCM, 1:15, v/v) to give 20 mg of product as a pink solid (yield 9%). m.p. 157 °C; IR (neat cm^{-1}) 3206, 2951, 2919, 2624, 1695, 1608, 1555, 1434, 1376, 1349, 1217, 1185, 1141, 896, 845, 805; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.29 (s, 1H), 8.65–8.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H), 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 3H), 3.05 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 177.5, 167.7, 159.2, 148.4, 131.3, 130.5, 129.3, 37.1, 32.4; HRMS exact mass calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2$ m/z 229.0726; found m/z 229.0726 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Step 2: To a solution of the substrate peptide of urokinase³¹ (10 mg, 0.0105 mmol, 1 equiv.) in NMP (140 μL) was added 3-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl) propanoic acid (2.9 mg, 0.0126 mmol, 1.2 equiv.), HBTU (4.77 mg, 0.0126 mmol, 1.2 equiv.) and DIEA (9 μL , 0.0525 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 2.5 h at room temperature. After the reaction was completed (monitored by RP-HPLC, system QC), the crude

product was diluted with a solution of aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system B). The product-containing fractions were lyophilized to give 4.6 mg (38% yield) of the product as a pink amorphous powder. HRMS (ESI) exact mass calcd for $C_{51}H_{77}N_{18}O_{14}$ m/z 1165.5867; found m/z 1165.5875 $[M+H]^+$; HPLC (system QC): t_R 21.767 = min (97 % purity).

Step 3: to a solution of tetrazine-modified peptide **7** (3.6 mg, 0.0034 mmol, 1 equiv.) in a 0.5 mL solution of NMP/PBS pH 7.4 (1:1, v/v) was added 2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-5-(3-(2-(2-(4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)thioureido)benzoic acid **8** (12.7 mg, 0.0172 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 2 h at room temperature. After the reaction was completed (monitored by RP-HPLC, system QC), the crude product was diluted with a solution of aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system B). The product-containing fractions were lyophilized to give 3.0 mg (38% yield) of the product as a yellow amorphous powder. HRMS (ESI) exact mass calcd $C_{126}H_{146}N_{24}O_{32}S_2$ m/z 1285.4988; found m/z 1285.4957 $[M+2H]^+$; HPLC (system QC): t_R =26.217 min (99 % purity).

Procedure for the preparation of fluorescein-human lysozyme conjugate

Step 1: To a solution of the aforementioned 3-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)propanoic acid (20 mg, 0.087 mmol, 1 equiv) in dry DCM (0.5 mL) was added N-hydroxysuccinimide (20 mg, 0.174 mmol, 2 equiv.) and EDCl.HCl (33.3 mg, 0.147 mmol, 2 equiv.). The reaction was stirred for 6 h at room temperature. After the reaction was completed, the crude product was diluted with DCM and washed with a solution of saturated aq NH_4Cl (3 ×). The organic layer was concentrated under vacuum to give 23.8 mg (4.033 mmol, 84% raw yield) of the product as a pink amorphous powder. The crude product was directly used for the next step without further purification. To a solution of lysozyme human protein (2.0 mg, 136 nmol, 1 equiv) in PB (0.1 M, pH 7.4, 200 μ L) was added tetrazine-NHS ester (0.22 mg, 679 nmol, 5 equiv) dissolved in DMSO (8 μ L). The reaction mixture was left at room temperature for 6 h. Thereafter, the reaction mixture was filtered directly on an ultracentrifugal filter device with a 10 kDa cutoff to remove the excess of unconsumed cross-linker reagent. The modified human lysozyme was washed first with 5 × 200 μ L of a solution of PB/DMSO (9:1, v/v) and then with PB (4 × 200 μ L).

Step 2: To a solution of tetrazine-modified lysozyme (~2 mg, nmol) in PB (0.1 M, pH 7.4, 500 μ L) was added fluorescein-pyrazolone **8** (25 mg, 3.4 mmol, 25 equiv) dissolved in DMSO (100 μ L). The resulting reaction mixture was then left at room temperature for 12 h. The reaction mixture was then filtered directly on an ultracentrifugal filter device (10 kDa cutoff, 500 μ L) to remove the excess of unconsumed pyrazolone. The lysozyme was washed first with 4 × 200 μ L of a solution of PBS/DMSO (9:1, v/v) and then with PBS (3 × 200 μ L). F/P molar ratios were estimated from the relative intensities of the

labelled protein and fluorescein-pyrazolone dye **8** absorption at 494 nm (see SI).

Procedure for SDS-PAGE analysis

For the protein gel, lysozyme coupled with fluorescein (~0.5 μ g or ~2 μ g) was mixed with Laemmli buffer (Tris- NH_2 0.15 M, SDS 4%, glycerol 17%, Bromophenol blue 0.008% and DTT 0.1 M), heated for 5 min at 95 °C and then centrifuged for 15 seconds at 2500 g. Non coupled-lysozyme (0.5 μ g or 2 μ g) was used as control. Proteins were separated by SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel (acrylamide/bis-acrylamide 30% [29:1], Sigma) with 0.05% of SDS. Molecular masses were estimated using Serva Dual Color Protein Standard III (SERVA). After migration (10 mA/gel) and fixation (H_2O 50%, EtOH 40% and acetic acid 10%), proteins were revealed successively by fluorescence and by silver nitrate staining. In a first time, the fluorescence was directly estimated using a Typhoon FLA 9500 laser scanner (GE Healthcare). Fluorescein images were obtained with a 473 nm laser and an LPB510LP emission filter. In a second time, the gel was stained with nitrate silver. Briefly, the gel was sensitized 1 min with 0.02% sodium thiosulfate (Sigma). Then, the gel was stained for 20 min with 0.1% silver nitrate solution (Sigma). Finally, the gel was developed in a specific buffer (formaldehyde 0.0037%, sodium carbonate 1.2% and sodium thiosulfate 0.00008% in distilled water). The development was stopped after sufficient staining with 5% acetic acid. Silver nitrate coloration was read using a conventional scanner (Image Scanner III, GE Healthcare).

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This work was supported by the Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN 0001401) and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-16-CE07-0004, "Click_and_Fish"). This work was also partially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), INSA Rouen, Rouen University, and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029). We also thank and Albert Marcual (CNRS) for HRMS analyses.

The PISSARO proteomics facility is supported by European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF, PACT-CBS).

Notes and references

- 1 L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* 2014, **79**, 10353.
- 2 K. Renault, J. W. Fredy, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.*, 2018, **29**, 2497.
- 3 M. King, A. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, 2014, **25**, 825.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énoles : application à la ligation chimiosélective

Please do not adjust margins

ARTICLE	Journal Name
4	O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, <i>Chem. Rev.</i> 2015, 115 , 2174.
5	N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2004, 126 , 15046.
6	M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2008, 130 , 13518.
7	N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, <i>Bioconjugate Chem.</i> 2008, 19 , 2297.
8	C. Ornelas, J. Broichhagen, M. Weck, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2010, 132 , 3923.
9	P. Kele, G. Mezö, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 2009, 48 , 344.
10	B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, <i>Chem. Soc. Rev.</i> , 2017, 46 , 4895.
11	H. Stöckmann, A. A. Neves, S. Stairs, K. M. Brindle, F. J. Leeper, <i>Org. Biomol. Chem.</i> 2011, 9 , 7303.
12	K. Renault, L.-A. Jouanno, A. Lizzul-Jurse, P.-Y. Renard, C. Sabot, <i>Chem. Eur. J.</i> 2016, 22 , 18522.
13	Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, <i>Chem. Commun.</i> 2014, 50 , 13085.
14	R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, D. Rabuka, <i>Chem. Biol.</i> , 2015, 22 , 293.
15	R. A. Kudirka, R. M. Barfield, J. M. McFarland, P. M. Drake, A. Carlson, S. Bañas, W. Zmolek, A. W. Garofalo, D. Rabuka, <i>ACS Med. Chem. Lett.</i> , 2016, 7 , 994.
16	J. Yu, D. Shen, H. Zhang, Z. Yin, <i>Bioconjugate Chem.</i> , 2018, 29 , 1016.
17	A. M. Brouwer, <i>Pure Appl. Chem.</i> 2011, 83 , 2213.
18	M. Arabski, I. Konieczna, E. Tusińska, S. Wąsik, I. Relich, K. Zajęc, Z. J. Kamiński, W. Kaca, W. <i>Microbiol. Res.</i> , 2015, 170 , 242.
19	M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, P. M. S. D. Cal, J. Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins, J. Howard, M. J. Deery, et al. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2018, 140 , 4004.
20	R. F. Chen, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 1970, 40 , 1117.
21	H. Kobayashi, P. L. Choyke, <i>Acc. Chem. Res.</i> , 2011, 44 , 83.
22	P. Kumar, T. Jiang, S. Li, O. Zainul, S. T. Laughlin, S. T., <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2018, 16 , 4081.
23	N. J. Parmar, B. D. Parmar, T. R. Sutariya, R. Kant, V. K. Gupta, <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2014, 55 , 6060.
24	N. Polkam, V. R. Ramaswamy, P. Rayam, T. R. Allaka, H. S. Anantaraju, S. Dharmarajan, Y. Perumal, D. Gandamalla, N. R. Yellu, S. Balasubramanian, et al. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2016, 26 , 2562.
25	E. M. Bowers, G. Yan, C. Mukherjee, A. Orry, L. Wang, M. A. Holbert, N. T. Crump, C. A. Hazzalin, G. Liszczak, H. Yuan et al., <i>Chem. Biol.</i> , 2010, 17 , 471.
26	F. Lehmann, M. Holm, S. Lauffer, <i>J. Comb. Chem.</i> , 2008, 10 , 364.
27	E. Gould, D. M. Walden, K. Kasten, R.-C. Johnston, J. Wu, A. M. Z. Slawin, T. J. L. Mustard, B. Johnston, T. Davies, P. Ha-Yeon Cheong, et al., <i>Chem. Sci.</i> 2014, 5 , 3651.
28	J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , 2012, 51 , 5222.
29	F. F. Wong, Y.-Y. Huang, <i>Tetrahedron</i> 2011, 67 , 3863.
30	R. Bianchini, M. Bonanni, M. Corsi, A. S. Infantino, <i>Tetrahedron</i> 2012, 68 , 8636.

Please do not adjust margins

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

Screening of potential carbanions/enolizable species in PBS 7.4 by fluorescence spectroscopy

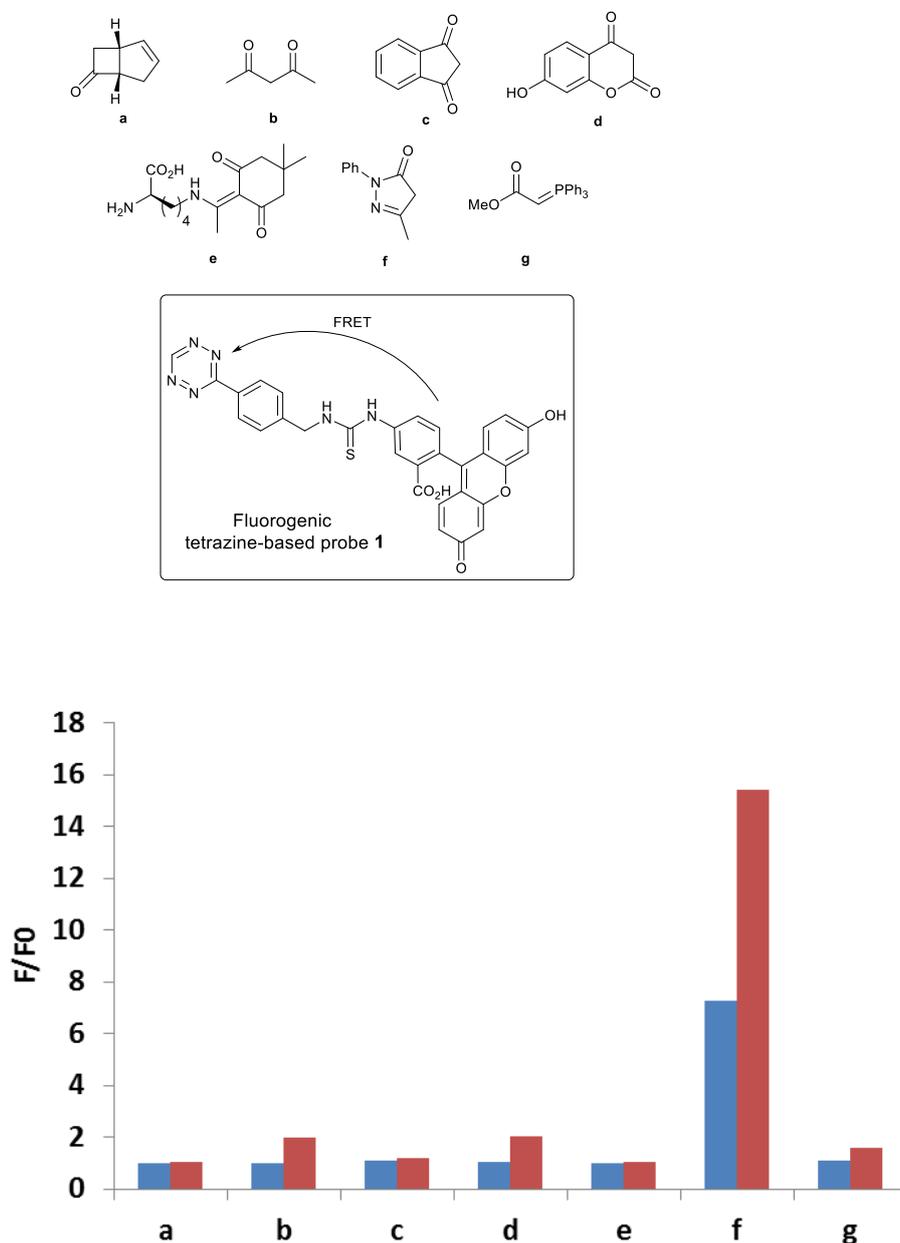


Figure S1: Screening study: fluorescence responses of tetrazine-based probe 1 (2.5 mM) at 2 (blue) and 60 min (red) after the addition of carbanions/enolizable species (10 mM, 4 equiv.) in PBS 7,4 at 25 °C at λ_{ex} 470 nm and λ_{em} 520 nm.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

En plus des résultats présents dans l'article, une palette plus large de réactifs, pas uniquement limitée aux dérivés énolisables, a été également testée en tant que partenaire possible de la tétrazine. En effet, à la suite de l'étude réalisée en 2016 par le groupe de Bongers montrant la forte réactivité des acides vinyl-boroniques avec les tétrazines^[16], quelques dérivés comportant un tel acide boronique ont été testés. Malgré cela, aucuns de ces dérivés ne s'est révélés réactifs vis-à-vis de notre sonde. De plus, le dérivé de 1,2-oxazol-5(4H)-one **73** a été mis en réaction avec la sonde. Bien que de structure assez proche des pyrazolones, celui-ci ne se révèle pas aussi réactif (Figure 31). Le composé le plus réactif obtenu lors de la totalité de cette étude reste la sulfo pyrazolone **72**.

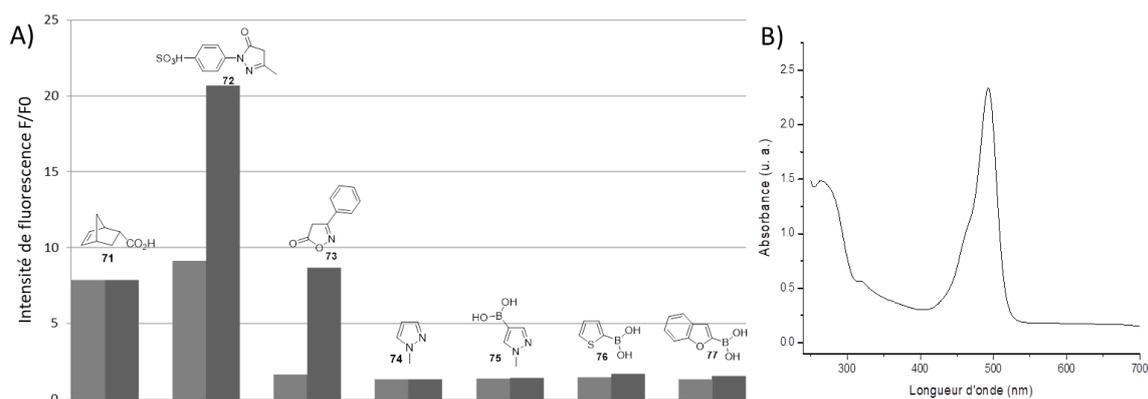


Figure 31 : A) Retour de fluorescence de la sonde 66 (2,5 mM) observé en présence de différents analytes (4 éq.) après 2 min (gris clair) et 60 min (gris foncé), dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C. $\lambda_{ex} = 470$ nm et $\lambda_{em} = 520$ nm. B) Spectre d'absorption de la sonde 66 dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C.

Après avoir déterminé le composé le plus réactif, un criblage de différentes tétrazines a été réalisé avec la sulfo pyrazolone **72**. Le fluorimètre du laboratoire étant en maintenance lors de la réalisation de cette expérience, la disparition de la bande d'absorption à 520 nm caractéristique du noyau tétrazine a été suivie au cours du temps à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis (Figure 32).

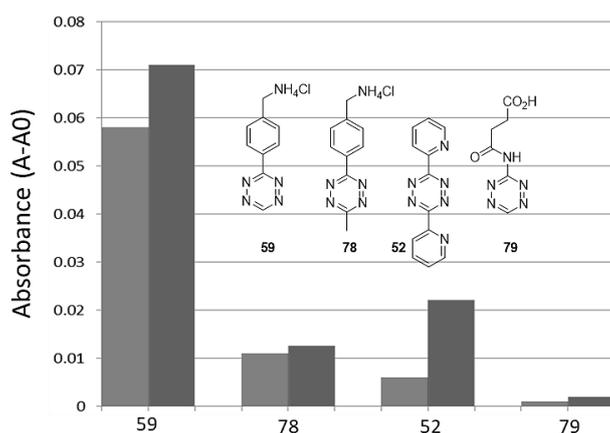


Figure 32 : Valeur absolue de la différence d'absorbance observée à 520 nm avec différentes tétrazines (500 μM) en présence de la sulfo-pyrazolone 66 (4 éq.) entre t=0 et t=2 min (gris clair) et entre t=0 et t=20 min (gris foncé), dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C.

De cette étude, il résulte que la tétrazine mono-substituée **59** est significativement plus réactive que les autres tétrazines vis-à-vis de la pyrazolone. En théorie, il serait donc possible de faire réagir sélectivement la tétrazine monosubstituée **59** avec la pyrazolone en présence d'une des trois autres

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

tétrazines **78**, **52** ou **79**, puis d'utiliser une des autres tétrazines dans le cadre d'une ligation de type iEDDA. Afin de vérifier cette sélectivité, la synthèse d'un peptide comportant deux tétrazines différemment substituées, **59** et **78**, a été entreprise afin de pouvoir fonctionnaliser la tétrazine **59** puis **78** *via* la pyrazolone et le norbornène, respectivement (Schéma 62).

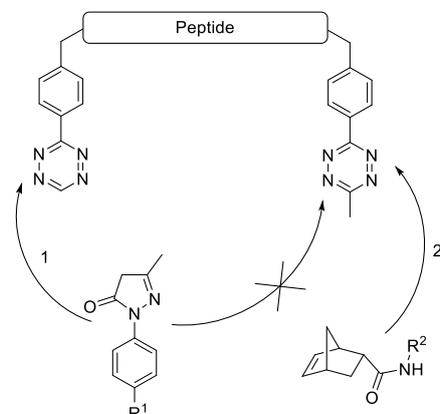


Schéma 62 : Stratégie envisagée pour différencier la réactivité de deux tétrazines avec la pyrazolone.

Pour ce faire, la synthèse d'un peptide modèle, substrat de l'urokinase, comportant les deux tétrazines a été réalisée en quatre étapes. Ce peptide **84** a ensuite été mis en réaction avec la pyrazolone hydrosoluble comportant une chaîne PEG à deux unités. Cependant, le produit souhaité n'a pas été obtenu, en revanche, le produit de diaddition de la pyrazolone sur chacune des deux tétrazines a été observé par analyse HPLC et par spectrométrie de masse. Alors que dans notre réaction modèle réalisée à partir de la tétrazine méthylée **78** (0,05M) et la pyrazolone phényle (5 éq.) dans le tampon PBS à température ambiante, aucune réaction n'avait été observée après douze heures (Schéma 63).

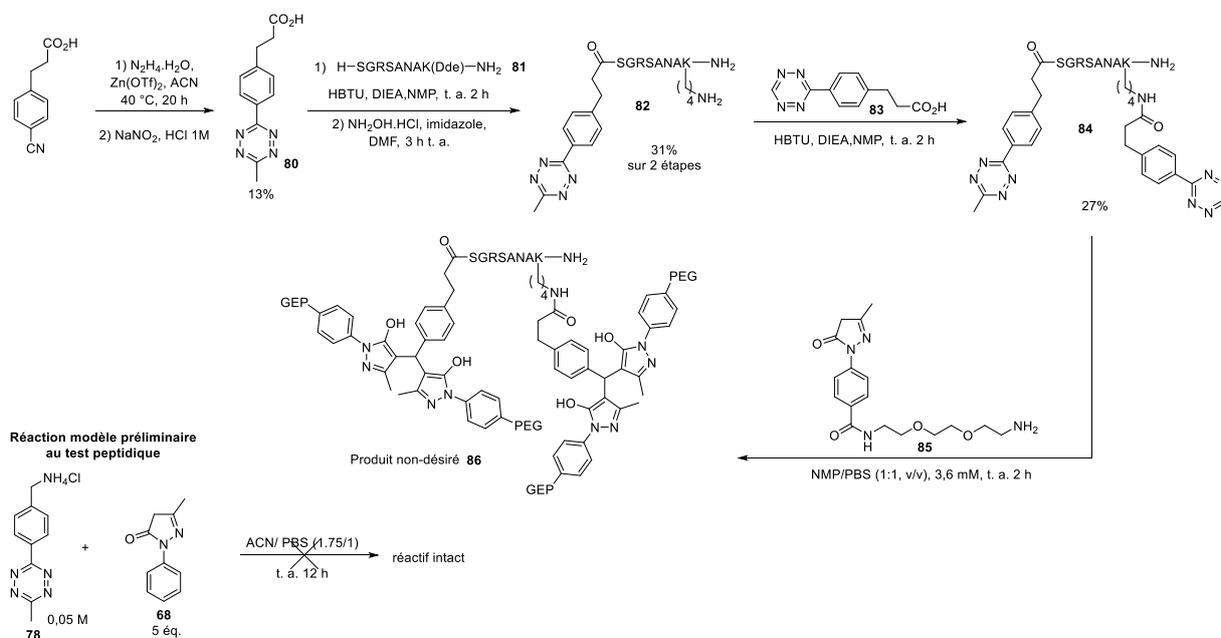


Schéma 63 : Synthèse et modification du peptide bis-tétrazine **89**.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

La sélectivité souhaitée n'a donc pas été observée, la différence de réactivité entre les deux tétrazines n'est sans doute pas suffisante. Il serait intéressant de recommencer cette expérience avec deux tétrazines possédant une plus grande différence de réactivité pour la pyrazolone, comme la tétrazine **59** et la tétrazine **79**.

1.3. Génération de pyrazolones *in situ*

1.3.1. Principe des « propyrazolones »

Comme l'a montré le résultat du criblage de pyrazolones précédent, la O-alkylation^[71] de la fonction hydroxyle du 5-hydroxypyrazole (en équilibre avec la pyrazolone) inhibe toutes réactions avec la tétrazine. Compte tenu du mécanisme d'addition proposé, de la pyrazolone sur la tétrazine, l'absence de l'équilibre cétoénolique serait responsable de la perte de réactivité observée. Aussi, ce résultat pourrait être mis à profit dans la préparation d'une série de précurseurs du motif pyrazolone. Une O-alkylation (ou O-acylation) de la pyrazolone conduirait au 5-alkoxy-pyrazole correspondant, incapable de réagir avec la tétrazine profluorescente. La formation de la pyrazolone pourrait être alors déclenchée *in situ via* un stimulus d'origine biologique par exemple, libérant l'hydroxyle du 5-hydroxypyrazole, et donc la pyrazolone réactive.

1.3.2. Propyrazolone pour la détection sélective de cystéine et homocystéine

Ainsi une preuve de principe a été réalisée à l'image des sondes fluorogéniques des cystéines et homocystéines décrites par Zhang en 2015. Ces dernières reposent sur un mécanisme séquentiel d'addition de thio-Michael sur une acroléine, suivie d'une aminolyse intramolécule de l'ester, libérant le fluorophore^[72] (Schéma 64 A). Ainsi, une réaction d'acylation de la pyrazolone avec le chlorure d'acryloyle a été réalisée en vue de détecter sélectivement les cystéines et homocystéines. Cette « propyrazolone » a été obtenue avec un rendement de 73% (Schéma 64 B).

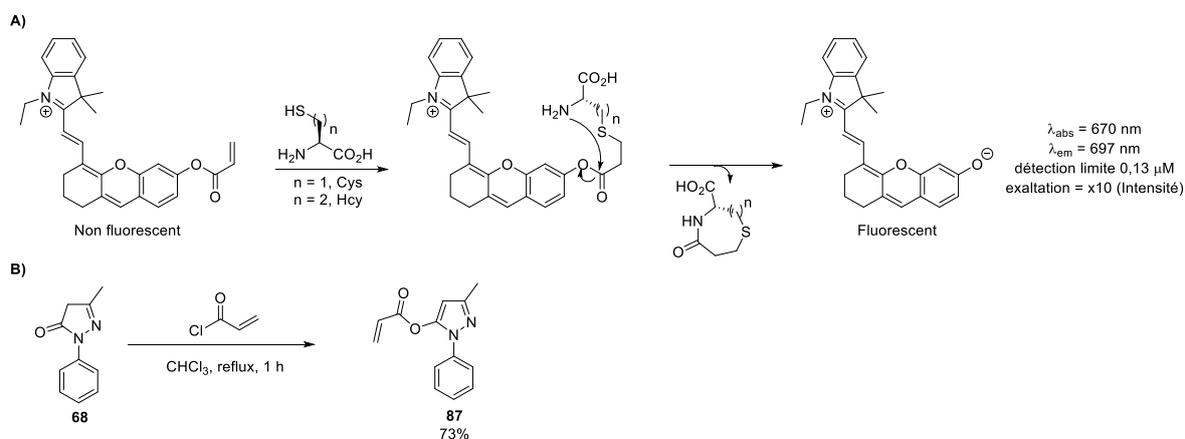


Schéma 64 : A) Sonde profluorescente pour la détection de cystéine et d'homocystéine développée par Zhang en 2015^[72]. B) Synthèse de la « propyrazolone » **87** sensible aux cystéines et homocystéines.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

Une fois cette propyrazolone **87** en mains, elle a été mise en réaction (4 éq.) avec la cystéine (4 éq.) en présence de la tétrazine fluorogénique (2,5 mM dans le PBS 7,4, 1 éq.). Comme on peut le constater sur le suivi cinétique, une forte augmentation de fluorescence a été observée suite à l'addition de cystéine dans le milieu; alors que dans la réaction de contrôle réalisée sans la propyrazolone **87**, le retour de fluorescence est beaucoup plus faible. Cette dernière proviendrait, vraisemblablement, de la thiolysse de la tétrazine par la cystéine. Ce résultat montre toutefois la viabilité de notre approche (Schéma 65).

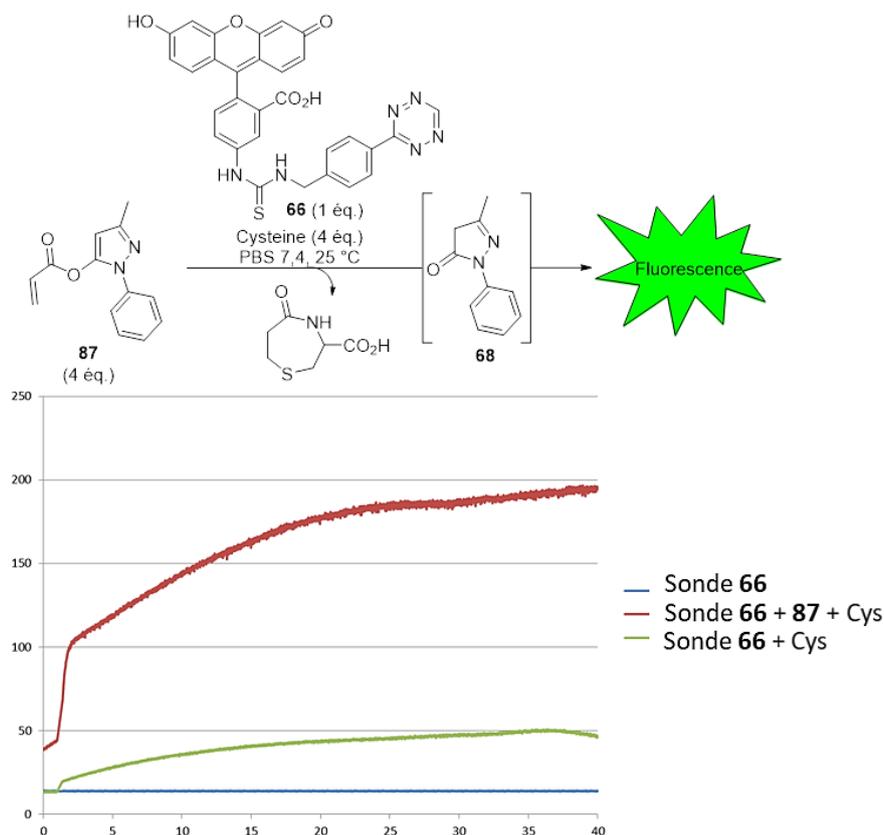


Schéma 65 : Preuve de principe de détection de cystéine par utilisation d'un système propyrazolone/tétrazine. Sonde 66 (2,5 mM) plus « propyrazolone » **87** (4 éq.) et cystéine (4 éq.), dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C. $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

Cette preuve de principe nous permet effectivement de démontrer la potentielle utilisation de ce principe de propyrazolone. Cependant, cette étude doit être complétée par une réaction entre la propyrazolone **87** seule et la tétrazine fluorogénique **66** afin d'évaluer l'hydrolyse spontanée de la propyrazolone. De plus, il faudrait également réaliser une étude comparative de la réaction de la propyrazolone **87** avec différents thiols pour évaluer la réaction de thiolysse de la propyrazolone par rapport à la réaction d'addition de Michael – aminolyse intramoléculaire. Cependant, la réaction compétitive d'addition de la cystéine sur la tétrazine ne permet pas d'envisager l'utilisation de cette sonde sans avoir trouvé un moyen de limiter cette réaction parasite.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

1.3.3. Autres « propyrazolones » synthétisées

Suite à ce résultat encourageant, l'acétyl-pyrazolone **88** a été synthétisée afin de déclencher la formation de la pyrazolone par des estérases^[73]. Néanmoins, l'acétyl-pyrazolone **88** se révèle instable et s'hydrolyse spontanément en milieu aqueux. Ainsi, l'incorporation d'un phénol acétylé plus résistant à l'hydrolyse, a été réalisée par un bras auto-immolable *via* réaction de Mitsunobu conduisant à la propyrazolone **90**. Cette dernière s'est révélée être effectivement stable en milieu aqueux. Enfin, l'utilisation d'une réaction de Mitsunobu a également permis la synthèse de la propyrazolone **92** en vue de vérifier sa sensibilité aux nitro-réductases.

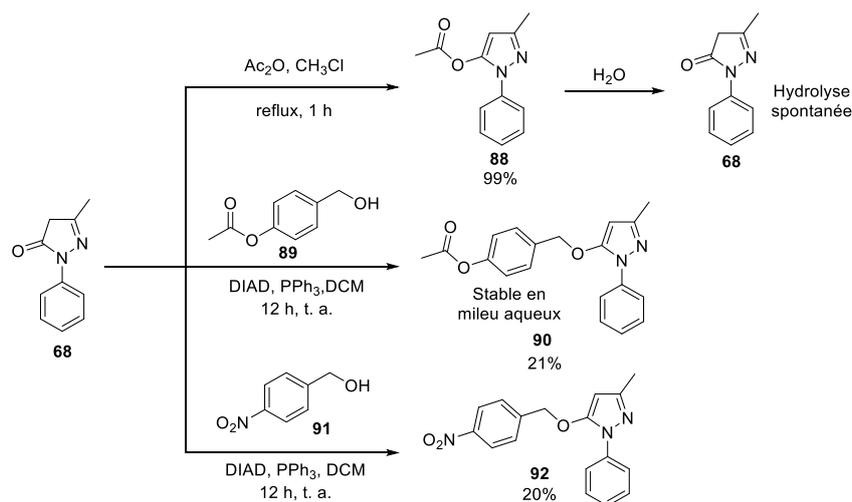


Schéma 66 : Synthèse des « propyrazolones »

Les propyrazolones **90** et **92** ont été testées afin de permettre respectivement une détection par fluorescence d'estérases et de nitro-réductases. Toutefois, lors de ces essais, aucun retour de fluorescence n'a pu être observé. Cela serait dû à un phénomène de dilution. En effet, les tests de criblage ou de détection de cystéine ont été réalisés à une concentration en sonde **66** de 2,5 mM et avec quatre équivalents de propyrazolones et d'analytes. Les tests enzymatiques sont réalisés, quant à eux, à des concentrations beaucoup plus basses en sonde **66** (10 μM) et quatre équivalents de propyrazolones. A ces concentrations, la réaction de ligation est sans doute trop lente dans la gamme de temps observée, fait qui est confirmé par le fait qu'à une concentration de 10 μM il est nécessaire d'ajouter 100 équivalents de pyrazolone pour conduire à un retour de fluorescence (Figure 33).

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

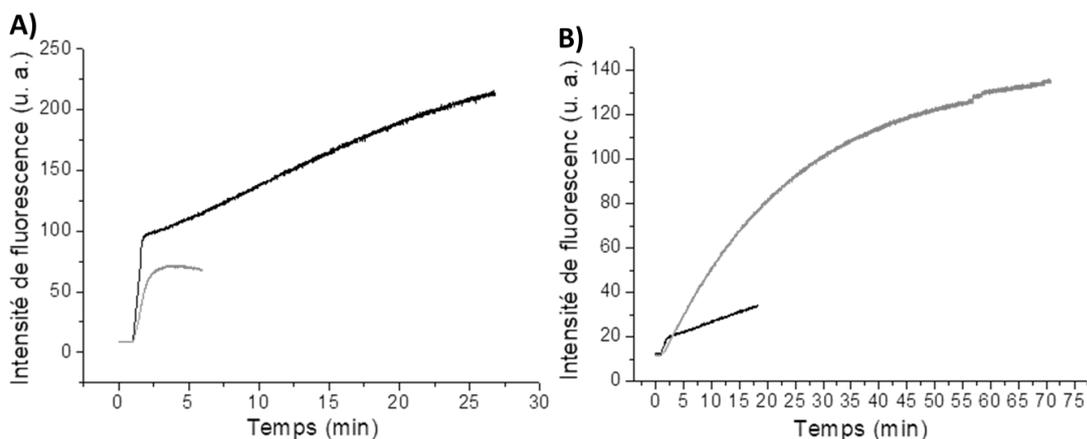


Figure 33 : Cinétique de réaction entre la sonde fluorogénique 66 et l'édaravone 68 (noir) ou le norbornène (gris) dans le tampon PBS 7,4 à 25 °C à différentes concentrations ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$). A) sonde 66 (2,5 mM) plus 4 équivalents d'édaravone ou le norbornène (fentes à 5 nm). B) sonde 66 (10 μM) plus 100 équivalents d'édaravone ou le norbornène (fentes à 10 nm).

Note : Au cours de travaux sur la réactivité des pyrazolones sur la tétrazine, la 4-bromo-pyrazolone a été synthétisée par bromation de l'édaravone en présence de dibrome dans l'acide acétique à -10 °C^[74]. Bien que cette pyrazolone ce soit révélée non réactive vis-à-vis des tétrazines, elle s'est montrée réactive vis-à-vis des cystéines, puisqu'elle permet leur oxydation en cystine.

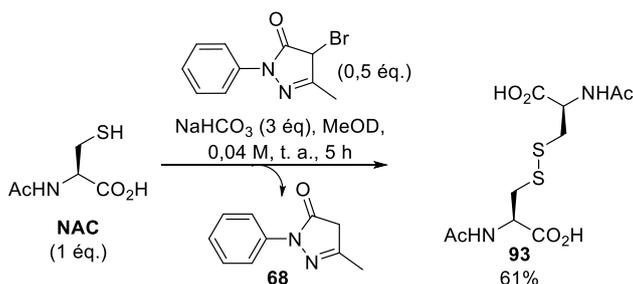


Schéma 67 : Formation de pont disulfure 93 à partir de la 4-bromo-pyrazolone

Les connaissances acquises sur les pyrazolones au cours de ces travaux ont été extrêmement précieuses pour l'étude de la réactivité des pyrazolones vis-à-vis des accepteurs de Michael, ainsi que dans la conception d'une sonde profluorescente pour la détection de biothiols. L'ensemble de ces travaux fait l'objet du chapitre suivant.

2. Conclusion

La synthèse d'une tétrazine fluorogénique performante basée sur la fluorescéine a permis de réaliser le criblage d'une famille de molécules énolisables à pH physiologique susceptible de réagir avec la tétrazine. De cette étude, il en est ressorti un partenaire en particulier, il s'agit de l'édaravone qui est un composé faisant partie de la famille des pyrazolones, qui réagit suivant un processus de quadruples additions nucléophiles sur le système tétrazine. Suite à cette découverte, un deuxième criblage plus fin a mis en lumière la relation entre la structure et la réactivité des différentes

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

pyrazolones étudiées. L'étude du mécanisme de la réaction a montré que la pyrazolone réaliserait une première addition de Michael sur la tétrazine, puis trois autres équivalents de pyrazolones réagiraient à leur tour, afin d'incorporer deux pyrazolones identiques en lieu et place de la tétrazine de départ. Cette réaction se révèle intéressante puisqu'elle est chimiosélective et le produit de ligation se révèle facilement isolable. De plus, cette réaction ne conduit pas à la formation d'un mélange d'isomères. L'utilité de cette stratégie a été illustrée par la modification d'un peptide et le marquage par fluorescence d'une protéine dont la fonctionnalisation est réputée difficile, le lysozyme humain.

Enfin, une série de précurseurs de pyrazolones dont la transformation en pyrazolones réactives serait déclenchée par un stimulus externe chimique ou enzymatique a été réalisée (voir page 125). La validité de ces « propyrazolones » a été montrée *via* une sonde sensible aux cystéines. Cependant, les sondes à nitroréductase et estérase n'ont pas conduit à un déclenchement de fluorescence significatif, vraisemblablement suite à une cinétique de ligation trop lente dans les conditions de dilutions imposées par les enzymes.

Références: Chapitre 2

- [1] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chemical Society Reviews* **2017**, *46*, 4895–4950.
- [2] A. Pinner, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1893**, *26*, 2126–2135.
- [3] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 2263–2270.
- [4] P. Audebert, S. Sadki, F. Miomandre, G. Clavier, M. Claude Vernières, M. Saoud, P. Hapiot, *New J. Chem.* **2004**, *28*, 387–392.
- [5] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 5222–5225.
- [6] a) D. Wang, W. Chen, Y. Zheng, C. Dai, L. Wang, B. Wang, *Heterocyclic Communications* **2013**, *19*, DOI 10.1515/hc-2013-0072.
b) G. Clavier, P. Audebert, *Chemical Reviews* **2010**, *110*, 3299–3314.
- [7] S. G. Tolshchina, G. L. Rusinov, V. N. Charushin, *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2013**, *49*, 66–91.
- [8] H. Zhang, W. S. Trout, S. Liu, G. A. Andrade, D. A. Hudson, S. L. Scinto, K. T. Dicker, Y. Li, N. Lazouski, J. Rosenthal, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 5978–5983.
- [9] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 5131–5142.
- [10] R. D. Row, J. A. Prescher, *Accounts of Chemical Research* **2018**, *51*, 1073–1081.
- [11] W. Chen, D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg, B. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1736–1738.
- [12] M. King, A. Wagner, *Bioconjugate Chemistry* **2014**, *25*, 825–839.
- [13] D. L. Boger, M. Zhang, in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* (Ed.: John Wiley & Sons, Ltd.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2001**.
- [14] Y.-J. Lee, Y. Kurra, Y. Yang, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13085–13088.
- [15] F. Karaki, K. Ohgane, H. Imai, K. Itoh, H. Fujii, *European Journal of Organic Chemistry* **2017**, *2017*, 3815–3829.
- [16] S. Eising, F. Lelivelt, K. M. Bongers, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 12243–12247.
- [17] K. M. Dean, A. E. Palmer, *Nature Chemical Biology* **2014**, *10*, 512–523.
- [18] C. Uttamapinant, J. D. Howe, K. Lang, V. Beránek, L. Davis, M. Mahesh, N. P. Barry, J. W. Chin, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 4602–4605.
- [19] T. Sun, *L'art de la guerre: nouvelle traduction*, Mille Et Une Nuits, Paris, **2013**.
- [20] T. Peng, H. C. Hang, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 14423–14433.
- [21] M. Schürmann, P. Janning, S. Ziegler, H. Waldmann, *Cell Chemical Biology* **2016**, *23*, 435–441.
- [22] T. Cañeque, S. Müller, R. Rodriguez, *Nature Reviews Chemistry* **2018**, *2*, 202–215.
- [23] A. Rutkowska, D. W. Thomson, J. Vappiani, T. Werner, K. M. Mueller, L. Dittus, J. Krause, M. Muelbauer, G. Bergamini, M. Bantscheff, *ACS Chemical Biology* **2016**, *11*, 2541–2550.
- [24] C. C. Gunderson, K. N. Moore, *Future Oncology* **2015**, *11*, 747–757.
- [25] K. S. Yang, G. Budin, T. Reiner, C. Vinegoni, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 6598–6603.
- [26] R. Weissleder, M. J. Pittet, *Nature* **2008**, *452*, 580–589.
- [27] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiological Reviews* **2012**, *92*, 897–965.
- [28] D. Zeng, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, C. J. Anderson, *Journal of Nuclear Medicine* **2013**, *54*, 829–832.
- [29] J. Y. Choi, B. C. Lee, *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2015**, *49*, 258–267.
- [30] J.-P. Meyer, P. Adumeau, J. S. Lewis, B. M. Zeglis, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 2791–2807.
- [31] J. Marik, J. L. Sutcliffe, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 6681–6684.
- [32] H. S. Gill, J. Marik, *Nature Protocols* **2011**, *6*, 1718–1725.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

- [33] M. E. Martin, S. G. Parameswarappa, M. S. O'Dorisio, F. C. Pigge, M. K. Schultz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 4805–4807.
- [34] L. S. Campbell-Verduyn, L. Mirfeizi, A. K. Schoonen, R. A. Dierckx, P. H. Elsinga, B. L. Feringa, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 11117–11120.
- [35] K. Sachin, V. H. Jadhav, E.-M. Kim, H. L. Kim, S. B. Lee, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, D. W. Kim, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1680–1686.
- [36] Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti, J. M. Fox, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 8043–8045.
- [37] B. M. Zeglis, P. Mohindra, G. I. Weissmann, V. Divilov, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, J. S. Lewis, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 2048–2059.
- [38] H. L. Evans, Q.-D. Nguyen, L. S. Carroll, M. Kaliszczak, F. J. Twyman, A. C. Spivey, E. O. Aboagye, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9557–9560.
- [39] A. Kumar, G. Hao, L. Liu, S. Ramezani, J.-T. Hsieh, O. K. Öz, X. Sun, *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26*, 782–789.
- [40] J.-P. Meyer, P. Kozlowski, J. Jackson, K. M. Cunanan, P. Adumeau, T. R. Dilling, B. M. Zeglis, J. S. Lewis, *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 8201–8217.
- [41] X. Shi, K. Gao, H. Huang, R. Gao, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 250–254.
- [42] B. M. Zeglis, F. Emmetiere, N. Pillarsetty, R. Weissleder, J. S. Lewis, T. Reiner, *ChemistryOpen* **2014**, *3*, 48–53.
- [43] E. M. F. Billaud, E. Shahbazali, M. Ahamed, F. Cleeren, T. Noël, M. Koole, A. Verbruggen, V. Hessel, G. Bormans, *Chemical Science* **2017**, *8*, 1251–1258.
- [44] A. Yazdani, H. Bilton, A. Vito, A. R. Genady, S. M. Rathmann, Z. Ahmad, N. Janzen, S. Czorny, B. M. Zeglis, L. C. Francesconi, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 9381–9389.
- [45] J. C. Knight, S. Richter, M. Wuest, J. D. Way, F. Wuest, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3817.
- [46] J. Li, P. R. Chen, *Nature Chemical Biology* **2016**, *12*, 129–137.
- [47] R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 14112–14116.
- [48] R. Rossin, S. M. J. van Duijnhoven, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, L. H. J. Kleijn, F. J. M. Hoeben, R. M. Versteegen, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 1697–1706.
- [49] X. Fan, Y. Ge, F. Lin, Y. Yang, G. Zhang, W. S. C. Ngai, Z. Lin, S. Zheng, J. Wang, J. Zhao, et al., *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 14046–14050.
- [50] D. L. Boger, S. M. Sakya, *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 1415–1423.
- [51] H. Wu, S. C. Alexander, S. Jin, N. K. Devaraj, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 11429–11432.
- [52] K. Neumann, S. Jain, A. Gambardella, S. E. Walker, E. Valero, A. Lilienkampf, M. Bradley, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 91–95.
- [53] E. Jiménez-Moreno, Z. Guo, B. L. Oliveira, I. S. Albuquerque, A. Kitowski, A. Guerreiro, O. Boutureira, T. Rodrigues, G. Jiménez-Osés, G. J. L. Bernardes, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 243–247.
- [54] E. Kozma, O. Demeter, P. Kele, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 486–501.
- [55] Y.-H. Gong, F. Miomandre, R. Méallet-Renault, S. Badré, L. Galmiche, J. Tang, P. Audebert, G. Clavier, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009*, 6121–6128.
- [56] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 2869–2872.
- [57] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 298–304.
- [58] H. Wu, J. Yang, J. Šečutě, N. K. Devaraj, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 5805–5809.

Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables : application à la ligation chimiosélective

- [59] L. G. Meimetis, J. C. T. Carlson, R. J. Giedt, R. H. Kohler, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 7531–7534.
- [60] J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6917–6920.
- [61] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chemical Science* **2017**, *8*, 1506–1510.
- [62] E. Kozma, G. Estrada Girona, G. Paci, E. A. Lemke, P. Kele, *Chemical Communications* **2017**, *53*, 6696–6699.
- [63] G. Knorr, E. Kozma, J. M. Schaart, K. Németh, G. Török, P. Kele, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29*, 1312–1318.
- [64] Y. Lee, W. Cho, J. Sung, E. Kim, S. B. Park, *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 974–983.
- [65] G. Knorr, E. Kozma, A. Herner, E. A. Lemke, P. Kele, *Chemistry - A European Journal* **2016**, *22*, 8972–8979.
- [66] I. Nikić, E. A. Lemke, *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, *28*, 164–173.
- [67] J. Šečkutè, J. Yang, N. K. Devaraj, *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, e148–e148.
- [68] A. Wieczorek, T. Buckup, R. Wombacher, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4177–4185.
- [69] M. J. Matos, B. L. Oliveira, N. Martínez-Sáez, A. Guerreiro, P. M. S. D. Cal, J. Bertoldo, M. Maneiro, E. Perkins, J. Howard, M. J. Deery, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *140*, 4004–4017.
- [70] R. F. Chen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 1117–1124.
- [71] N. Polkam, V. R. Ramaswamy, P. Rayam, T. R. Allaka, H. S. Anantaraju, S. Dharmarajan, Y. Perumal, D. Gandamalla, N. R. Yellu, S. Balasubramanian, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *26*, 2562–2568.
- [72] J. Zhang, J. Wang, J. Liu, L. Ning, X. Zhu, B. Yu, X. Liu, X. Yao, H. Zhang, *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 4856–4863.
- [73] H. Maruoka, K. Yamagata, F. Okabe, Y. Tomioka, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2006**, *43*, 859–865.
- [74] A. Akbarzadeh, R. Soleymani, M. Taheri, M. Karimi-Cheshmeh ali, *Oriental Journal Of Chemistry* **2012**, *28*, 153–164.

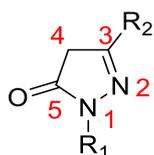
**Chapitre 2 : Etude de la réactivité des tétrazines vis-à-vis de composés énolisables :
application à la ligation chimiosélective**

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

I. Etat de l'art

Dans le chapitre précédent, la tétrazine réagissait vraisemblablement comme un accepteur de Michael avec la pyrazolone. Ce chapitre est donc consacré à l'étude plus large d'autres accepteurs de Michael en vue d'établir une nouvelle ligation chimiosélective voire bio-orthogonale.

Comme nous avons pu le voir précédemment, les pyrazol-5-ones sont des hétérocycles de cinq atomes comportant une fonction carbonyle ainsi que deux atomes d'azotes adjacents (Figure 34). Le terme de pyrazolone a été donné à ces hétérocycles par Knorr en 1883^[1].



Pyrazolone

Figure 34 : Structure générale et numérotation des pyrazolones

Cette même année, un dérivé de pyrazolone nommé Antipyrine ou Phénazone a été synthétisé par Knorr et, pour la première fois rapporté, pour une utilisation clinique pour ses propriétés analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire^[2]. Depuis lors, les pyrazolones ont été largement utilisées pour leurs propriétés bioactives^[3]. En modulant leur structure chimique, il est possible d'obtenir des molécules ayant un large spectre d'activités biologiques. On retrouve ainsi une activité analgésique^[4], antituberculeuse^[5], antibactérienne^[6], anti-tumorales^[7], anti-cancéreuse^[8], anti-ischémique^[9], ou encore inhibitrice de VIH-intégrase^[10]. Quelques-unes de ces pyrazolones à propriétés pharmacologiques sont représentées dans la Figure 35.

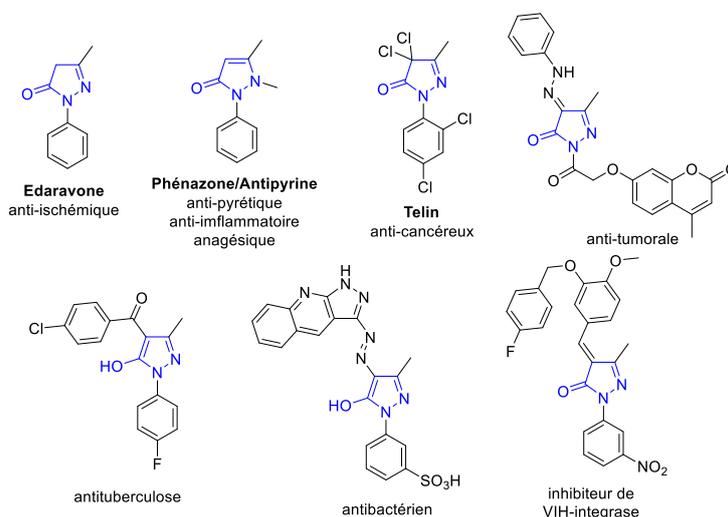


Figure 35 : Structures de quelques pyrazolones bioactives

De par un large spectre d'activités biologiques, la chimie des pyrazolones s'est développée que ce soit en termes de synthèse ou bien dans la compréhension de leur réactivité.

1. Synthèse des pyrazolones

La synthèse des pyrazolones est restée inchangée depuis sa première obtention. En effet, leur obtention repose sur la condensation d'un dérivé d'hydrazine sur un dérivé de β -cétoester^[11]. Cette réaction se réalise, la plupart du temps, sous activation thermique, mais les conditions peuvent être modulées en fonction des substituants présents sur les différents partenaires. L'incorporation de différents substituants sur l'hydrazine ou le β -cétoester a permis d'obtenir, au fil des années, un très grand nombre de pyrazolones substituées en position 1, 3 et/ou 4 (Schéma 68).

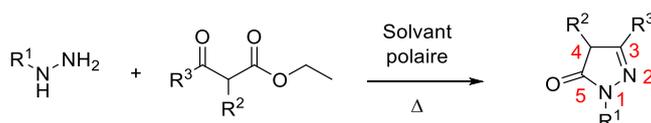


Schéma 68 : Voie de synthèse générale des pyrazolones

En 2015, le groupe de Raju rapporte la synthèse de pyrazolones par une catalyse au bismuth. Cette méthode a permis l'obtention de deux dérivés comportant un chlore méthylénique en position 5 avec des rendements de 52 et 62%. Cette approche a également rendu possible la synthèse de quinze composés comportants une fonction éther toujours en position 5 avec des rendements compris entre 35 et 58%. Ces deux approches utilisent les mêmes conditions expérimentales à l'exception du solvant. La réaction réalisée dans un alcool permet d'obtenir la pyrazolone portant la fonction éther qui est issue d'une réaction de substitution nucléophile entre le solvant et le composé chloré. En revanche, lorsque la réaction est réalisée dans le THF, la fonction chlorure est préservée^[12] (Schéma 69).

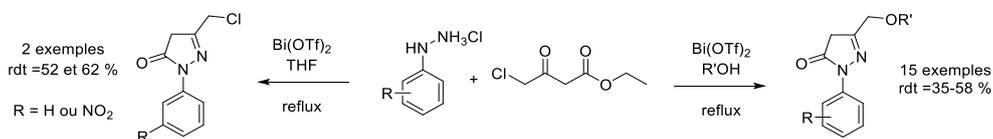


Schéma 69 : Synthèse de pyrazolones catalysée au bismuth développée par le groupe de Ma en 2015^[12]

En 2017, le groupe Xi décrit la formation de pyrazolones bicycliques « one-pot ». Cette synthèse se réalise entre diverses hydrazines et des dérivés de β -cétoester fonctionnalisés par un atome d'iode. La réaction est réalisée dans le dioxane en présence d'acide acétique et d'acétate de sodium, à une température de 10 °C, pendant 12 heures. Suite à la première étape de condensation de l'hydrazine sur la cétone, l'atome l'azote de l'hydrazone nouvellement formée réalise une substitution nucléophile intramoléculaire sur l'iode permettant la formation du bicyclic (Schéma 70). Cette méthodologie a permis la synthèse d'une chimiothèque de 48 composés obtenus avec des rendements allant de 17 à 93%^[13].

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

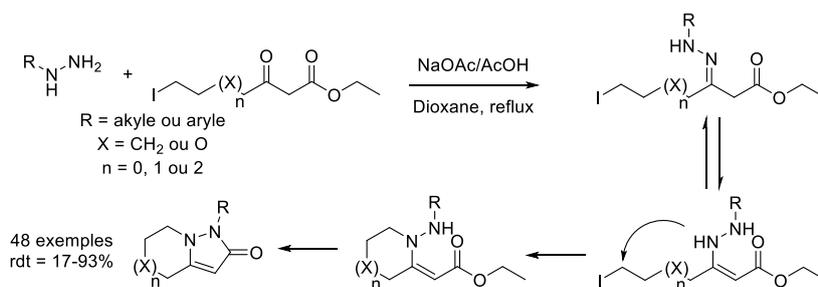


Schéma 70 : Méthodologie de synthèse de pyrazolones bicycliques développée par le groupe de XI en 2017^[13].

Suite à leur synthèse, la réactivité des pyrazolones a été étudiée afin d'illustrer leur utilisation en synthèse organique.

2. Réactivité des pyrazolones

La C-nucléophilie des pyrazolones vient du fait qu'elles présentent un équilibre céto-énolique dont le pKa a été mesuré égal à 7,0 pour l'édaravone^[14,15] (Schéma 71).

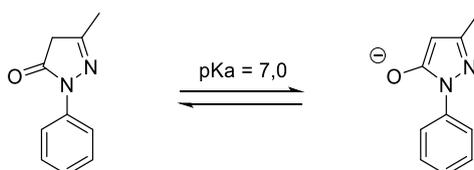


Schéma 71 : Équilibre céto-énolique de l'édaravone^[14]

Cette nucléophilie de la position C-4, permet aux pyrazolones de réagir particulièrement bien avec différents électrophiles comme les sels de diazonium, les aldéhydes ou encore les accepteurs de Michael.

2.1. Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des sels de diazonium

En effet, les pyrazolones ont la capacité de s'additionner spontanément sur les sels de diazonium aromatiques à basse température (0-5 °C). Le produit ainsi formé se présente sous deux formes, la forme hydrazone et la forme diazo.^[16] (Schéma 72).

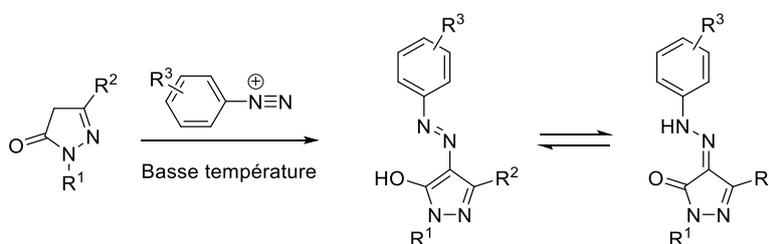


Schéma 72 : Synthèse et tautomérie des diazo-pyrazolones

Cette méthode a notamment été utilisée dans la synthèse de pigments, pour lesquels l'influence du groupement R³ sur leurs propriétés optiques a été étudiée^[17,18]. En 2002, le groupe de Jens rapporte une méthode de synthèse de ces pigments dite « propre » car la synthèse ne produit pas de déchets

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

(la réaction se fait sans solvant), par couplage en phase solide entre le sel de diazonium et le dérivé de pyrazolone^[19]. Ces composés ne sont pas seulement utilisés pour leur qualité de pigment mais aussi pour leurs propriétés biologiques. Ils ont notamment un rôle de mime de l'activité de la thrombopoïétin dans les cellules^[20] ou encore des propriétés anti-cancéreuses^[21].

2.2. Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des aldéhydes

Les pyrazolones ont également la capacité de réagir sur d'autres espèces électrophiles. C'est le cas des aldéhydes. En effet, par le biais d'une activation thermique, les pyrazolones sont capables de réagir avec ces dernières *via* une réaction de Knoevenagel. Ainsi en 1983, l'équipe de Tomasik décrit la réaction entre le 2-aminobenzaldéhyde et la 1,3-diméthylpyrazolone, sous activation thermique à 150 °C, sans solvant^[22] (Schéma 73).

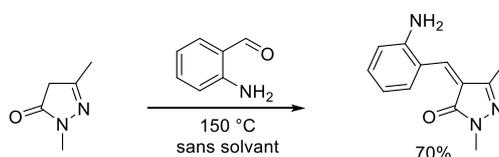


Schéma 73 : Réaction de Knoevenagel avec un aldéhyde aromatique décrite par Tomasik en 1983^[22].

La réaction de Knoevenagel entre les pyrazolones et les aldéhydes aromatiques a été utilisée par la suite dans la conception de pigments^[23] ou d'inhibiteurs de protéases^[24]. Toutefois, il faut noter que la stéréochimie de la double liaison de ces pigments n'est pas discutée dans la littérature.

En 2012, le groupe de Saraf a développé une méthodologie permettant de réaliser la réaction de Knoevenagel entre l'édaravone et des aldéhydes aromatiques substitués par des groupements électrodonneurs ou électroattracteurs. Cette méthodologie permet de remplacer les conditions thermiques habituelles (150-160 °C pendant 3-4 heures), par une activation micro-ondes (480 W, 2-4 minutes). Cette méthode a permis d'obtenir une série de dix composés présentant des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires, avec des rendements identiques à ceux obtenus en condition thermique (77-84%)^[25] (Schéma 74 A). En 2013, l'approche par micro-ondes a été utilisée par le groupe de Navale pour la réalisation de réaction tandem Knoevenagel/hétéro-Diels-Alder intramolécule. Lors de cette étude, douze composés tétracycliques ont été synthétisés avec des rendements de 79 à 84%^[26] (Schéma 74 B). Aucune information n'est donnée quant à la stéréochimie du groupement R³ (qui est en fait contrôlée par la réaction de Knoevenagel car la DA est stéréospécifique).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

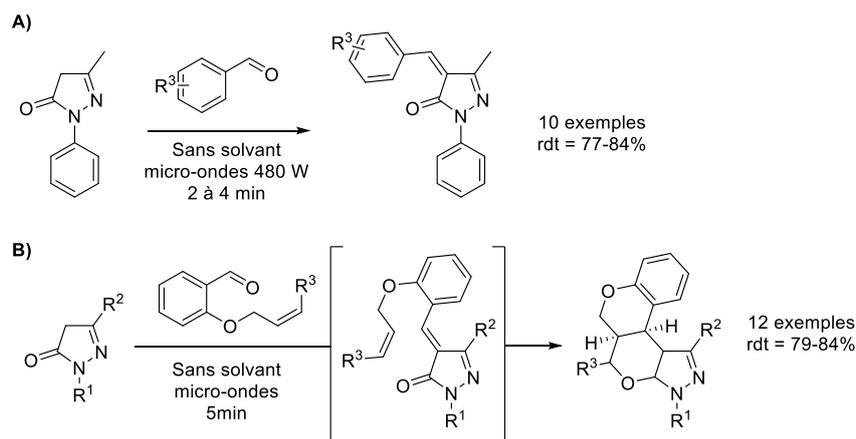


Schéma 74 : Condensation de Knoevenagel assistée par irradiation micro-ondes développée par le groupe de Saraf en 2012^[25] (A), et le groupe de Navale en 2013^[26] (B).

2.3. Réactivité des pyrazolones vis-à-vis des accepteurs de Michael

En 1998, lors d'une étude portant sur la réactivité des pyrazolones en phase solide, le groupe de Meng rapporte que le composé issu de la condensation de Knoevenagel entre une pyrazolone et un aldéhyde aromatique forme un accepteur de Michael, qui peut réagir avec un second équivalent de pyrazolone, lorsque cette dernière est présente en excès (3 éq.). Cette étude a permis l'obtention en phase solide, sans solvant, à température ambiante pendant 20 à 40 minutes, de onze composés avec des rendements compris entre 43 et 78%. Tandis que les mêmes réactions réalisées en solution dans le chloroforme à température ambiante pendant 48 heures, n'ont conduit qu'à la formation de cinq produits (sur les onze réactions testées) avec des rendements plus faibles allant de 25 à 45%^[27] (Schéma 75).

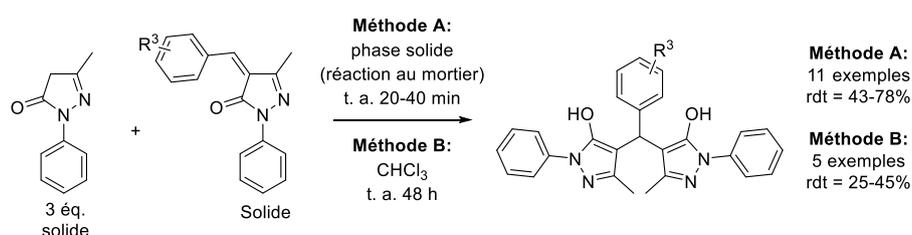


Schéma 75 : Réaction des pyrazolones en phase solide développée par le groupe de Meng en 1998^[27].

Par la suite, des études ont été réalisées afin d'améliorer les rendements obtenus en solution. Ainsi en 2010, le groupe de Li rapporte que l'utilisation d'un surfactant, le bromure d'hexadecyl-triméthylammonium (HTMAB) en système aqueux à 80 °C pendant 30 à 90 minutes, permet d'obtenir une série de onze composés avec des rendements compris entre 58 et 94%^[28]. Par la suite, en 2015, l'équipe d'Elinson montre que la même réaction peut être conduite sans catalyseur. En effet, seule une activation thermique suffit, puisque la réaction réalisée à 78 °C dans l'éthanol conduit à la préparation d'une librairie de neuf composés obtenus avec d'excellents rendements compris entre 93 et 99%^[29].

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

La réactivité des pyrazolones a été étendue à d'autres accepteurs de Michael. On retrouve ainsi, en 2016, une méthodologie d'addition de pyrazolones sur des (2-nitrovinyl) benzènes pro-chiraux. Cette réaction, conduite dans le dichlorométhane à température ambiante, permet, en présence d'un organo-catalyseur chiral de type squaramide et d'une base, d'obtenir une chimiothèque de 18 composés avec des rendements de 36 à 88% et des excès énantiomériques compris entre 86 et 97%^[30] (Schéma 76).

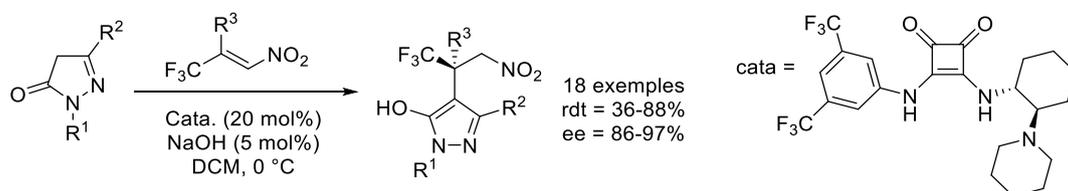


Schéma 76 : Réaction de Michael organocatalysée développée par Shen en 2016^[30].

En 2015, le groupe de Wang décrit une addition de Michael de pyrazolones sur des aldéhydes vinyliques suivie d'une cyclisation intramoléculaire pour conduire aux lactols correspondants. En effet, à l'issue de la première réaction d'addition de Michael, le groupement hydroxyle du pyrazol-5-ol (en équilibre avec la pyrazol-5-one), s'additionne sur l'aldéhyde afin de former le composé bicyclique correspondant. Cette réaction se déroule dans le DCE à 0 °C en présence d'une quantité catalytique d'acide benzoïque. L'utilisation d'un catalyseur organique chiral a permis l'obtention d'une série de 14 composés avec des rendements allant de 71 à 91% et des excès énantiomériques allant de 74 à 99%^[31] (Schéma 77 A). En 2017, la même stratégie a été utilisée par l'équipe de Qin pour obtenir des sultones bicycliques par addition de pyrazolones sur des fluorures de sulfonyle vinyliques. Cette réaction est réalisée dans le dichlorométhane à température ambiante avec du NaHCO₃ et en présence d'une quantité catalytique de DBU. Cette méthodologie de synthèse a permis la synthèse de 22 composés racémiques avec des rendements allant de 62 à 97%^[32] (Schéma 77 B).

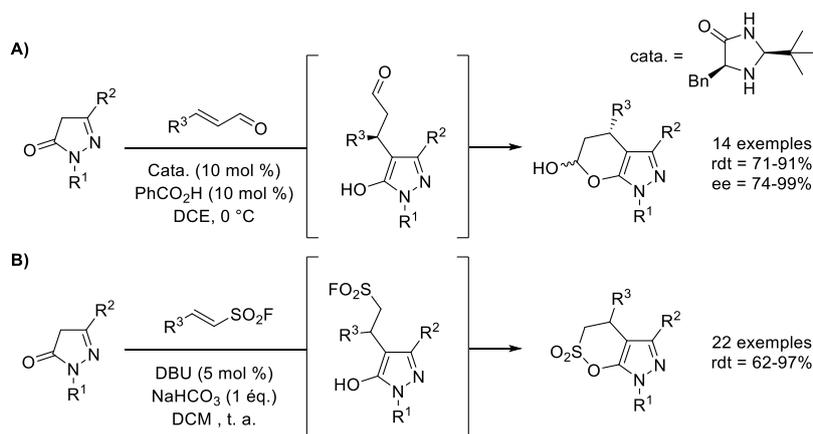


Schéma 77 : Réactions cascades d'addition de Michael/cyclisation intramoléculaire développées en 2015 par Wang^[31] et 2017 par Qin^[32].

3. Utilisation des pyrazolones en bioconjugaison

La grande réactivité des pyrazolones a conduit les chimistes à s'intéresser à cet hétérocycle pour une utilisation en bioconjugaison. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, le pKa de la pyrazolone est d'environ 7,0, ce qui signifie, qu'à pH physiologique, cette dernière est déprotonée et présente donc un caractère nucléophile.

La première utilisation de pyrazolone en bioconjugaison a été réalisée par le groupe de Honda en 1993. Dans cette étude la pyrazolone a été utilisée pour la détection et quantification spécifique d'acide hyaluronique par HPLC. En effet, après digestion enzymatique de cet oligosaccharide par la 4-glycanohydrolase, le dérivé de pyrazolone appelé MPMP (1-(4-méthoxy) phenyl-3-méthyl-5-pyrazolone) peut réagir sur la position C-1' terminale de chaque fragment de type polysaccharidique et ainsi, permettre leur identification par HPLC, couplée à la spectrométrie de masse. Il est important de noter qu'ici, la pyrazolone ne réagit, *a priori*, pas spontanément sur les carbohydrates puisqu'une activation thermique (70 °C) en milieu basique est nécessaire pour réaliser la réaction de dérivatisation^[33] (Schéma 78).

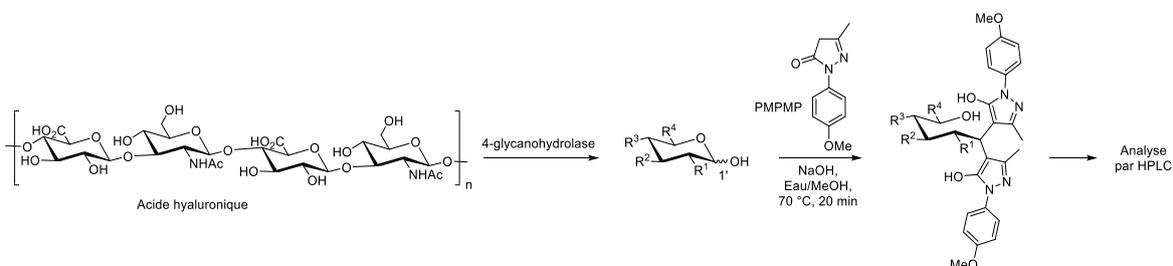
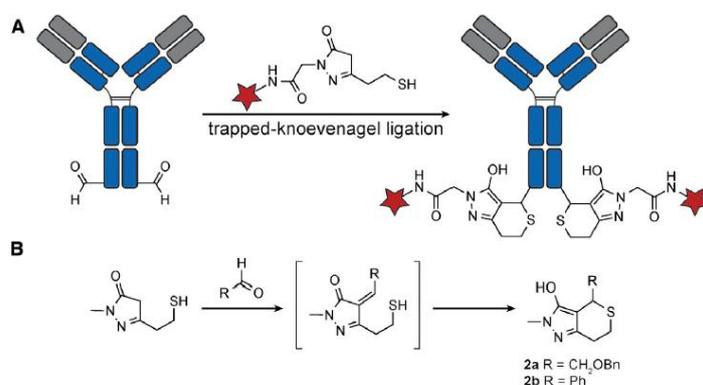


Schéma 78 : Dérivatisation de carbohydrates par la MPMP utilisée pour leur analyse par HPLC^[33].

En 2015 le groupe de Rabuka a développé la première ligation entre une pyrazolone et un aldéhyde dans des conditions douces. Cette approche, reposant sur l'utilisation d'une pyrazolone comportant une fonction thiol libre, a permis le développement d'un nouvel outil de conjugaison contrôlé entre les anticorps modifiés sur leur extrémité C-terminale de la chaîne lourde par un aldéhyde et des médicaments (Schéma 79 A). Le mécanisme de cette réaction fait intervenir une première réaction de condensation de Knoevenagel entre la pyrazolone et l'aldéhyde. L'accepteur de Michael ainsi formé subit une addition intramoléculaire de la fonction sulfhydryle portée par la pyrazolone, afin de former un lien stable et non-hydrolysable^[34] (Schéma 79 B).



Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Schéma 79 : Ligation chimiosélective de Rabuka utilisant une pyrazolone portant une fonction thiol (Schéma extrait de l'article^[34]).

Fort de ces résultats, le même groupe a utilisé, en 2016, une approche tandem condensation de Knoevenagel/addition de Michael décrite par l'équipe de Meng en 1998. *In fine*, cette réaction permet l'introduction de deux motifs pyrazolones identiques sur un aldéhyde. Cette approche a rendu possible le développement d'un conjugué anticorps-médicament comportant donc deux fois plus de molécules biologiquement actives que dans leur étude précédente^[35] (Schéma 80).

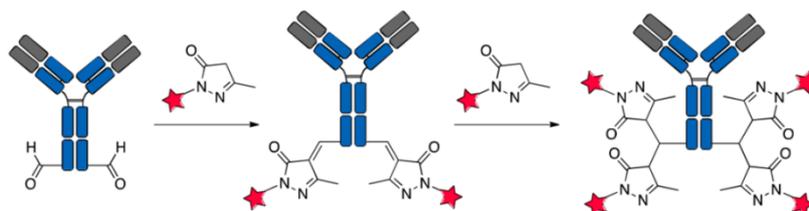


Schéma 80 : Ligation chimiosélective tandem condensation de Knoevenagel/addition de Michael de Rabuka (Schéma extrait de l'article^[35])

S'inspirant de la première approche développée par le groupe de Rabuka en 2015, l'équipe de Yin a réalisé en 2018 une modification stœchiométrique et site-spécifique d'une protéine (la myoglobine) comportant une fonction aldéhyde. Cette étude a permis de montrer que les pyrazolones substituées en position 2 par un groupement aromatique étaient sensiblement plus réactives que les pyrazolones aliphatiques utilisées par le groupe de Rabuka. De plus, la présence d'un groupement électroattracteur sur cet aromatique permet d'accroître encore leur réactivité. La modification d'une protéine (myoglobine) et l'imagerie de la membrane cellulaire (cellules mammifères RD) a été rendue possible en générant des fonctions aldéhydes par oxydation *in situ* au NaIO_4 ^[36] des acides sialiques présents sur la surface de cellules (Schéma 81).

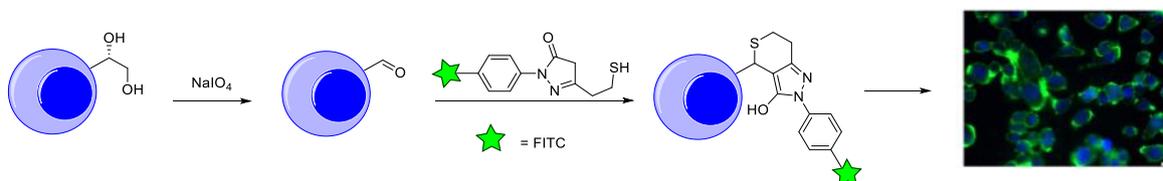


Schéma 81 : Modification de la membrane cellulaire par réaction tandem condensation de Knoevenagel/addition intramoléculaire de Michael, de Yin en 2018^[36].

La grande réactivité des pyrazolones et leur utilisation récente en conjugaison a été un moteur pour l'étude de leur réactivité vis-à-vis des accepteurs de Michael en vue d'une application en conjugaison chimiosélective voire bio-orthogonale. L'utilisation de l'addition des pyrazolones sur des accepteurs de Michael devrait permettre de s'affranchir de l'utilisation d'aldéhydes, fonctions très réactives qui se révèlent sensibles, entre autres, vis-à-vis des amines. Restera à contrôler la réactivité des pyrazolones en addition de Michael par rapport aux autres nucléophiles biologiques comme les thiols. L'ensemble de ces travaux sont présentés dans la suite de ce chapitre.

III. Résultats et discussions

1. Recherche d'un accepteur de Michael comme partenaire réactionnel de la pyrazolone.

De l'étude bibliographique précédente, il en ressort que les pyrazolones sont des composés particulièrement réactifs vis-à-vis d'électrophiles carbonylés, ainsi que des accepteurs de Michael (c.f. deuxième approche de l'équipe de Rabuka^[35]). Les aldéhydes ne présentant pas un caractère biocompatible suffisant (très réactif avec les lysines notamment), nous nous sommes tournés vers l'étude d'accepteurs de Michael dont la réactivité pourrait être modulée en modifiant la nature de R et du GEA (groupement électroattracteur), en vue d'être suffisamment réactif avec les pyrazolones, tout en conservant une orthogonalité suffisante vis-à-vis, notamment, des fonctions amines et thiols des biomolécules (Schéma 82).

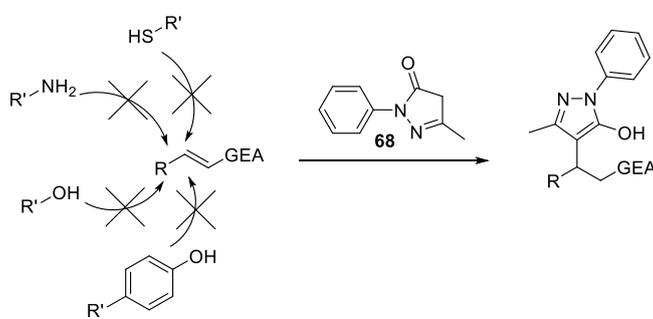


Schéma 82 : Principe d'un accepteur de Michael modulable et orthogonal aux fonctions nucléophiles biologiques

Tout d'abord, la réaction des pyrazolones sur des accepteurs de Michael a été envisagée. Pour ce faire, l'hémicyanine **94**, qui possède un système polyénique pouvant réagir en tant qu'accepteur de Michael, a été mise en réaction avec un léger excès d'édaravone (1,5 éq.) dans l'éthanol. Il a été observé ici un changement de couleur quasi immédiat après l'addition de la pyrazolone, attestant qu'une réaction a eu lieu à température ambiante. Après dix minutes, la réaction n'évolue plus, avec la formation d'un produit violet très coloré. Le produit obtenu est en fait la mérocyanine dissymétrique **95**, qui a été isolée avec un rendement de 31%. Elle est issue d'une condensation de la pyrazolone sur l'imine, suivie de l'élimination de l'aniline, et non d'une addition de Michael comme nous l'avions imaginé. Malheureusement, ce colorant ne présente pas de propriétés de fluorescence mais un fort pouvoir colorant confirmé par un coefficient d'absorption molaire particulièrement élevé de $122\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour une absorbance maximale à 573 nm dans le tampon PBS 0,1 M, pH 7,4.

Bien que les propriétés de fluorescence, que l'on aurait pu attendre de tels composés hybrides de mérocyanines, ne soient pas observées, leur obtention dans des conditions douces a suffisamment attiré notre attention pour pousser notre étude plus loin. Tout d'abord, l'étude de la réactivité entre la phényle-pyrazolone **68** (édaravone) et des analogues de l'hémicyanine **94** a été réalisée. Ainsi, notre choix s'est porté sur la cyanine Cy5.0 symétrique **96** présentant un système polyénique susceptible de réagir en tant qu'accepteur de Michael. Les cyanines sont des fluorophores

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

couramment utilisés pour de l'imagerie *in cellulo* et *in vivo*, possédant donc, une relativement bonne stabilité dans les systèmes biologiques. Il a été observé après 2 heures, une consommation totale de la Cy5.0 et la formation de mérocyanine **95** issue de l'addition de la pyrazolone (Schéma 83).

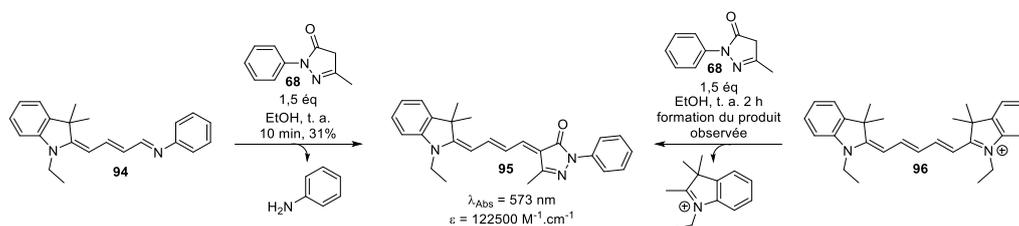
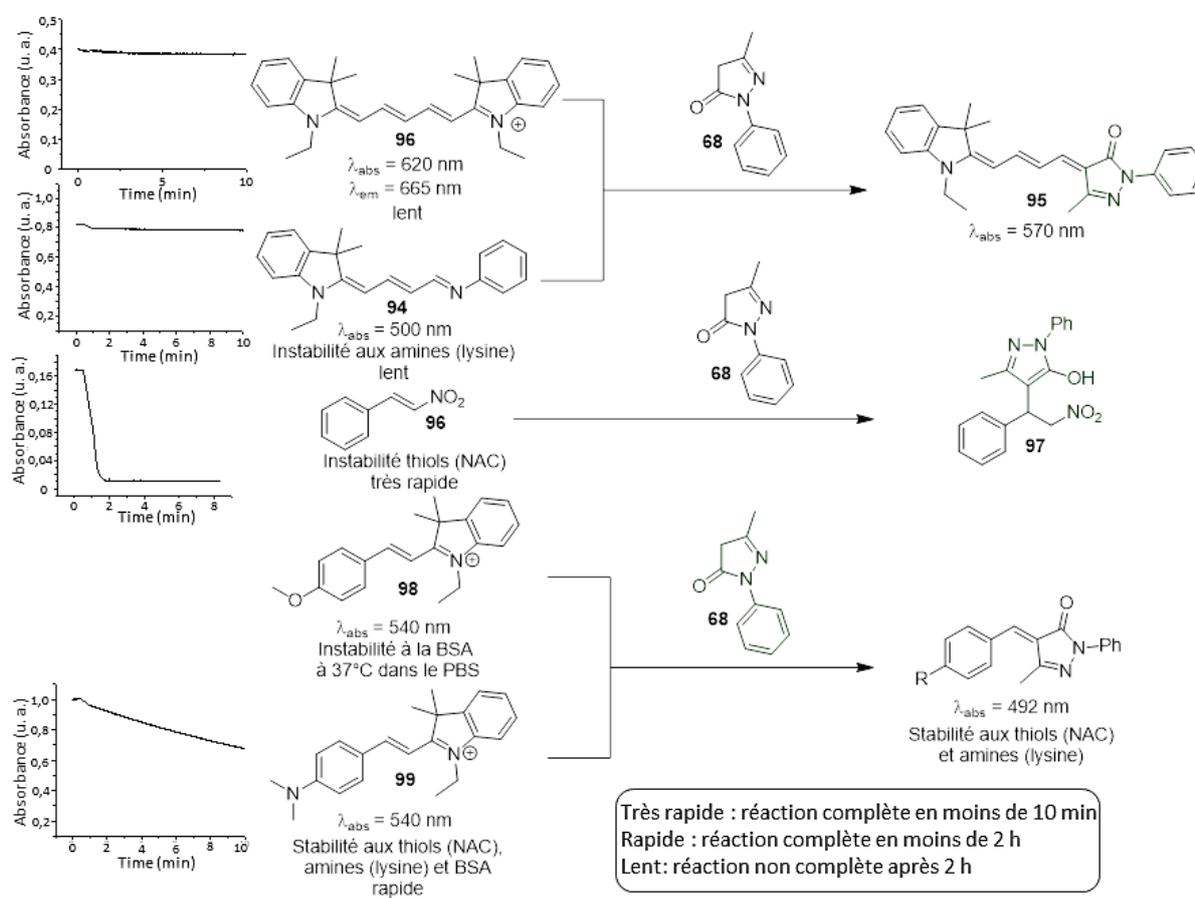


Schéma 83 : Synthèse de la mérocyanine 95

Cependant, les cinétiques de réaction observées avec l'hémicyanine **94** et la cyanine Cy5.0 **96** se sont révélées particulièrement faibles. Ainsi, la réactivité de la phényle-pyrazolone (édaravone) a été évaluée avec d'autres accepteurs de Michael et électrophiles apparentés. Pour ce faire, la disparition de la bande d'absorption caractéristique de l'accepteur de Michael, suite à l'addition de la pyrazolone (500 équ.), a été suivie au spectromètre UV-Vis à la longueur d'onde d'absorption maximum de chaque composé, dans le tampon PBS 7,4 pour chaque accepteur de Michael étudié (10 μM). De plus, la stabilité des différents accepteurs de Michael utilisés ainsi que celles des produits obtenus à l'issue de la réaction, ont été évaluées en présence d'un excès de lysine, de N-acétylcystéine (NAC) (500 équ., PBS 7,4, 2 h) et/ou en présence de BSA (1 équ., PBS 7,4, 37 °C, 24 h). L'ensemble des résultats obtenus est récapitulé dans le Schéma 84.



Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Schéma 84 : Etude de réactions de la pyrazolone 68 avec différents accepteurs de Michael. L'étude cinétique a été réalisée pour chaque système électrophile (10 μ M) en présence d'édaravone (500 μ eq.). La cinétique a été suivie par spectrométrie UV par diminution à l'absorbance maximale de chaque système électrophile sur 10 min dans le PBS 7,4 à 25 °C.

De cette étude il ressort que le partenaire offrant le meilleur compromis réactivité/stabilité est la mérocyanine diméthylamine 99^[37], porteuse d'un groupement fortement électrodonneur sur l'aromatique. La réaction mise en jeu est une réaction d'addition de Michael suivie d'une élimination de la partie indolique, rendant cette addition irréversible, comme observé pour la cyanine 96. De plus, la mérocyanine et le produit d'addition-élimination obtenu présentent une bonne stabilité vis-à-vis des thiols (pas de réaction détectée en présence de 500 μ eq. de NAC ou de lysine pendant au moins 2 h) et de la BSA (1 μ eq., PBS 7,4, 37 °C, 24 h).

2. Etude de la réactivité entre les mérocyanines et les pyrazolones.

Suite à la mise en évidence d'une réactivité possible entre la pyrazolone et la mérocyanine 99 porteuse d'un groupement électrodonneur, plusieurs stratégies ont été mises au point dans le but de développer une nouvelle ligation chimiosélective, voire bio-orthogonale. Les trois stratégies développées, ainsi que les difficultés rencontrées, sont présentées ci-dessous dans l'ordre chronologique.

2.1. Stratégie N°1 : Utilisation d'une « pince » pour des réactions de piégeage intramoléculaire.

La première stratégie envisagée est inspirée des travaux de Rabuka de 2015, dans lesquels le partenaire pyrazolone réalise une réaction de Knoevenagel sur un aldéhyde suivie par un piégeage de l'intermédiaire formé par une addition de thio-Michael intramoléculaire^[34]. Ainsi, la synthèse d'une « pince » comportant une pyrazolone ainsi qu'une fonction thiol pour le piégeage intramoléculaire a été étudiée (Schéma 85).

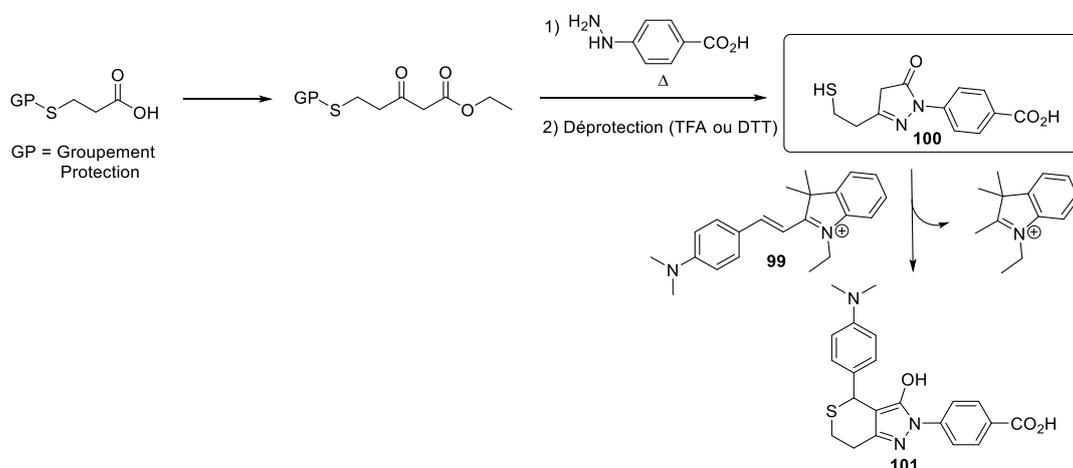


Schéma 85 : Principe et voies de synthèse générales de la « pince » comportant une fonction thiol libre.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Ainsi, la pyrazolone **105** est obtenue en quatre étapes à partir de l'acide 3-(tritylsulfanyl)proponique commercial, comme décrit par Rabuka^[34]. Cette synthèse a été parfaitement reproduite au laboratoire. Toutefois, cette méthode ne permet la synthèse que de pyrazolones présentant des groupements alkyles en position 1, alors qu'un groupement aromatique, appauvri en électron, est nécessaire pour accroître la réactivité de la pyrazolone vis-à-vis des mérocyanines. Dans ce but, lors de l'étape de formation de la pyrazolone, la méthylhydrazine utilisée par Rabuka a été remplacée par l'acide 4-hydrazinobenzoïque. Cela a permis d'obtenir le composé **106** avec un rendement de 42% contre 77% pour le composé **104** issu de la synthèse de Rabuka. Néanmoins, lors de l'étape de déprotection finale, le composé désiré n'a été obtenu qu'avec un rendement de seulement 12%, soit 10 mg de produit isolé en partant de 287 mg d'acide 3-(tritylsulfanyl)proponique coûtant 80 euros le gramme chez Sigma-Aldrich (Schéma 86).

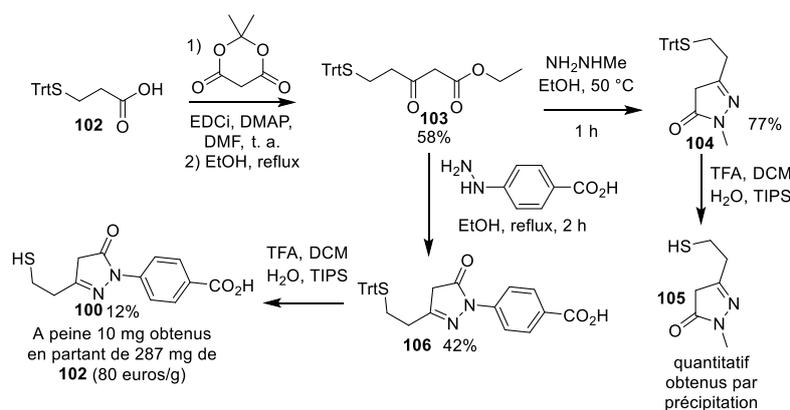


Schéma 86 : Voie 1 : « pince » comportant une fonction thiol libre à partir de l'acide 3-(tritylsulfanyl)proponique

La voie de synthèse, précédemment décrite, a donc été abandonnée car trop coûteuse. Une approche alternative reposant sur l'utilisation de l'acide 3,3-dithiodipropionique 200 fois moins cher (21 euros les 50 grammes) et, plus économe en atomes, a ainsi été investiguée. En effet, la déprotection finale ne génère pas de sous-produits contrairement au trityle utilisé dans la voie de synthèse précédente, qui en plus nécessite l'utilisation de triisopropyl silane (TIPS) pour piéger le cation généré lors de la déprotection du trityle. Dans cette optique, le β-cétoester **108** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 21% sur deux étapes. Ce β-cétoester **108** a été mis en réaction avec l'acide 4-hydrazinobenzoïque et a permis d'obtenir quantitativement la di pyrazolone protégée **109**. Cependant, lors de l'étape de coupure du pont dissulfure de cette dernière, la totalité du produit **109** engagée dans la réaction a été perdue lors de l'étape de purification sur gel de silice. Alternativement, la synthèse a été réalisée en utilisant la phényle hydrazine. La di pyrazolone, protégée sous forme de disulfure **110**, a ainsi été obtenue avec un rendement de 52% bien que ce rendement n'ait jamais pu être reproduit par la suite. Malgré cela, seulement 4,3 mg du produit final **111** ont pu être obtenus purs avec un faible rendement de 8%, suite à l'étape de réduction du pont disulfure (Schéma 87).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

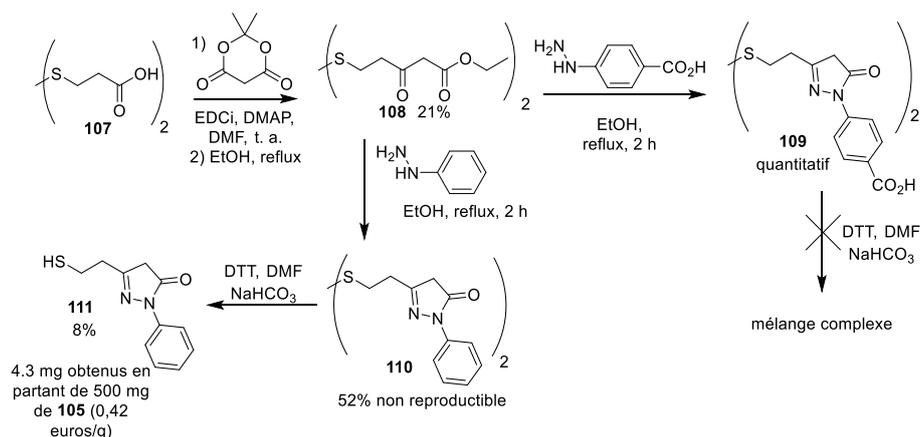


Schéma 87 : Voie 2 : « pince » comportant une fonction thiol libre à partir de l'acide 3,3-dithiodipropionique

Comme on peut le voir sur les deux approches réalisées pour obtenir les pinces pyrazolone-thiol, c'est l'étape finale de libération du thiol (par déprotection ou coupure du pont dissulfure) qui pose le plus de difficulté. C'est pourquoi en 2018, le groupe de Yin a publié une synthèse de pyrazolone thiol reposant sur la même stratégie que celle que nous avons envisagée dans le Schéma 87, dans laquelle il réalise la réduction du pont disulfure *in situ*, évitant ainsi la purification extrêmement délicate des composés portant une fonction thiol libre^[36].

Suite aux échecs survenus dans l'obtention de « pinces » comportant une fonction thiol, une autre approche a été envisagée. Toujours sur le principe de développement d'une pince, le remplacement de cette fonction thiol par une deuxième pyrazolone permettrait également de réaliser ce même piégeage intramoléculaire. La base de cette approche repose sur la formation d'une pyrazolone comportant en position 3, un β -cétoester (molécule **114**). Cette dernière pourra être obtenue à partir d'une pyrazolone substituée en position 3 par un méthyle (molécule **112**) ou une fonction permettant d'obtenir le β -cétoester désiré (fonction acide carboxylique de la molécule **113** ou ester de la molécule **119**). Le β -cétoester **114** pourra ensuite être utilisé pour générer un deuxième motif pyrazolone. (Schéma 88).

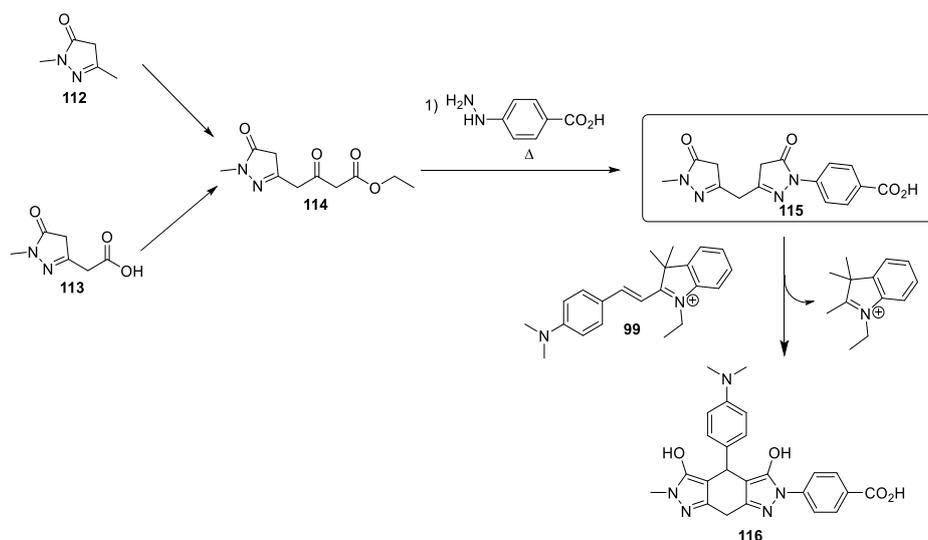


Schéma 88 : Principe et voies de synthèse testées pour l'obtention de « pinces » dipyrazolone.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Plusieurs voies de synthèse ont été évaluées pour tenter d'obtenir cette pince dipyrazolone. Toutefois, aucune d'entre elles n'a permis d'obtenir le produit souhaité. La première tentative a été basée, à l'instar de ce qui est réalisé avec les β -cétoesters, sur une stratégie de double déprotonation en position α et γ (composé **117**) de la pyrazolone méthylée **112**. En présence de (chloroformyl) acétate d'éthyle, le dianion de la pyrazolone permettrait la formation un β -cétoester en position 3 de la pyrazolone, conduisant à la formation de la pince dipyrazolone après condensation avec l'acide 4-hydrazinobenzoïque. Néanmoins, il semblerait qu'une seule déprotonation ait eu lieu puisque seule une très faible quantité du produit **118** issue d'une acylation en position 4 de la pyrazolone a été obtenue avec un rendement de 4% (Schéma 89).

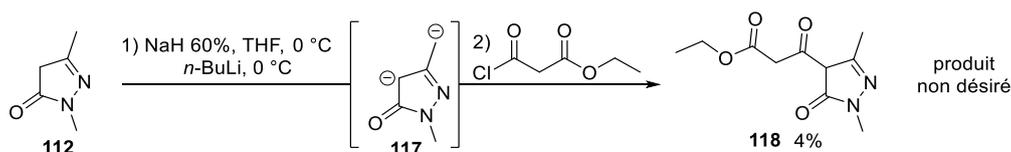


Schéma 89 : Voie 3 : « pince » dipyrazolone par double déprotonation de la pyrazolone **112**.

Toujours dans le but d'obtenir un β -cétoester en position 3 de la pyrazolone, deux pyrazolones comportant une fonction ester éthylique et acide carboxylique en position 3 ont respectivement été obtenues en une et deux étapes à partir du 1,3-acetonedicarboxylate de diéthyle **118** commercial. Ces deux composés ont été respectivement engagés dans des condensations de Claisen et dans un couplage avec l'acide de Meldrum. Malgré cela, de ces deux voies de synthèse, aucune formation du dérivé pyrazolone- β -cétoester n'a été observée par analyse RMN du proton du brut réactionnel, seuls des mélanges complexes ont été obtenus (Schéma 90).

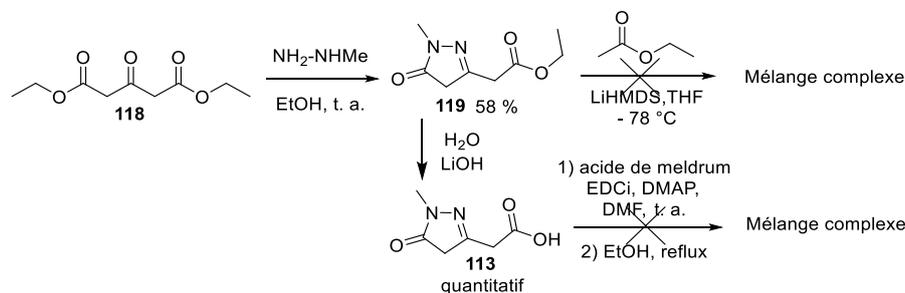


Schéma 90 : Voie 4 : « pince » dipyrazolone par formation d'un β -cétoester par condensation de Claisen ou couplage avec l'acide de Meldrum.

La dernière approche testée consiste à générer un double β -cétoester symétrique à partir de la dicétone **121** comportant un point de fonctionnalisation en position β . Ce double β -cétoester permettrait la formation d'une pince comportant deux pyrazolones identiques. Pour ce faire, la 3-méthyl-2,4-pentanedione a été alkylée par du bromure de propargyle en position β ^[38], puis le produit ainsi obtenu a été mis en réaction avec du carbonate de diéthyle en milieu basique. Cependant, le produit souhaité n'a pas pu être observé, seul un mélange complexe a été obtenu (Schéma 91).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

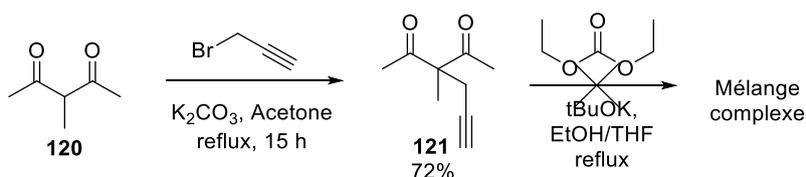


Schéma 91 : Voie 5 : « pince » dipyrazolone symétrique.

Cette stratégie mériterait d'être évaluée avec d'autres nucléophiles internes, comme des alcools ou des amines en lieu et place du thiol, si la réaction d'addition intramoléculaire est assez rapide. Toutefois, la synthèse d'une « pince » telle que nous l'avions envisagée se révélant délicate, une autre stratégie a été mise en place.

2.2. Stratégie N°2 : Addition de deux pyrazolones par réactions successives d'addition de Michael/élimination/addition de Michael.

Suite aux difficultés rencontrées avec la stratégie 1, une nouvelle stratégie a donc été abordée. Cette dernière, s'inspirant des travaux de Meng de 1998 et de Rabuka de 2016, repose non pas, sur un tandem Knoevenagel/addition de Michael entre une mérocyanine et un excès de pyrazolone, mais sur deux additions de Michael successives entrecoupées par une élimination. Dans cette stratégie, la mérocyanine joue le rôle du *reporter* chimique présent sur la biomolécule cible tandis que la pyrazolone joue le rôle du partenaire de réaction ajouté dans un second temps (Schéma 92). L'ajout d'un second équivalent de pyrazolone permettra de bloquer l'accepteur de Michael obtenu suite à l'addition de la première pyrazolone.

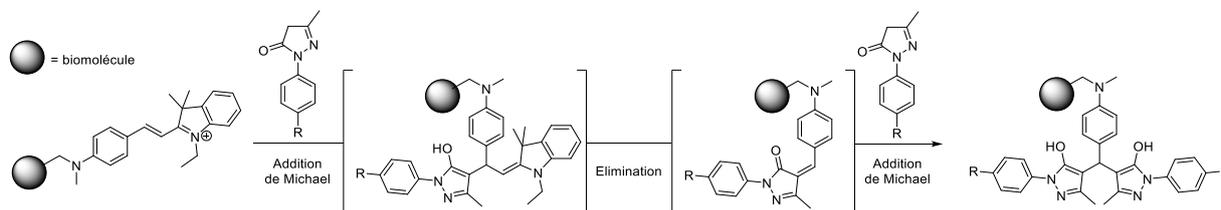


Schéma 92 : Principe général de la stratégie 2.

Dans un premier temps, afin de valider la stratégie évoquée ci-dessus, la N-diméthylmérocyanine **99** a été mise en réaction avec l'édaravone (3 éq.) dans un mélange NMP/PBS 7,4 (1 :1, v/v), à une concentration de 0,01 M et à température ambiante. Après deux heures, la réaction n'évolue plus, et le brut réactionnel est extrait à l'aide de DCM. L'analyse par RMN du proton de ce brut réactionnel, montre la présence du composé désiré **123** issu de deux additions d'édaravone sur une mérocyanine. Néanmoins, lors de la purification de ce produit alors incolore sur gel de silice, un composé rouge se forme peu à peu sur la colonne. Après analyse, le composé rouge se révèle être le composé **122** intermédiaire obtenu après élimination de la partie indolique lors de la première étape^[25]. Le produit **123** issu d'une di-addition serait donc instable et conduirait à une élimination d'une des deux pyrazolones introduites, *via* une réaction d'élimination. Cette élimination de pyrazolone serait probablement due à l'acidité de la silice qui favoriserait la réversibilité de la réaction (Schéma 93).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

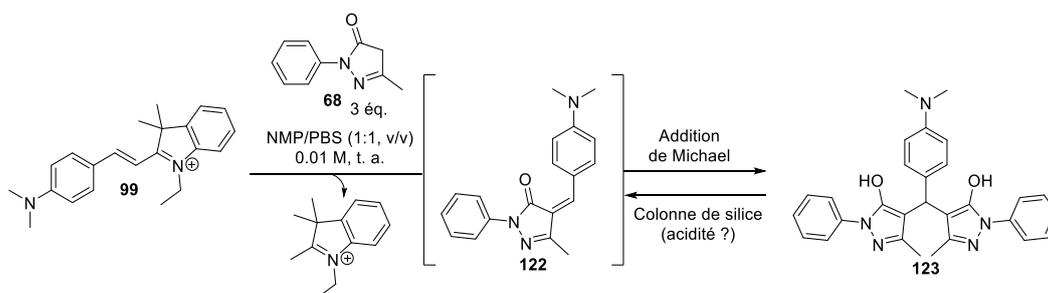
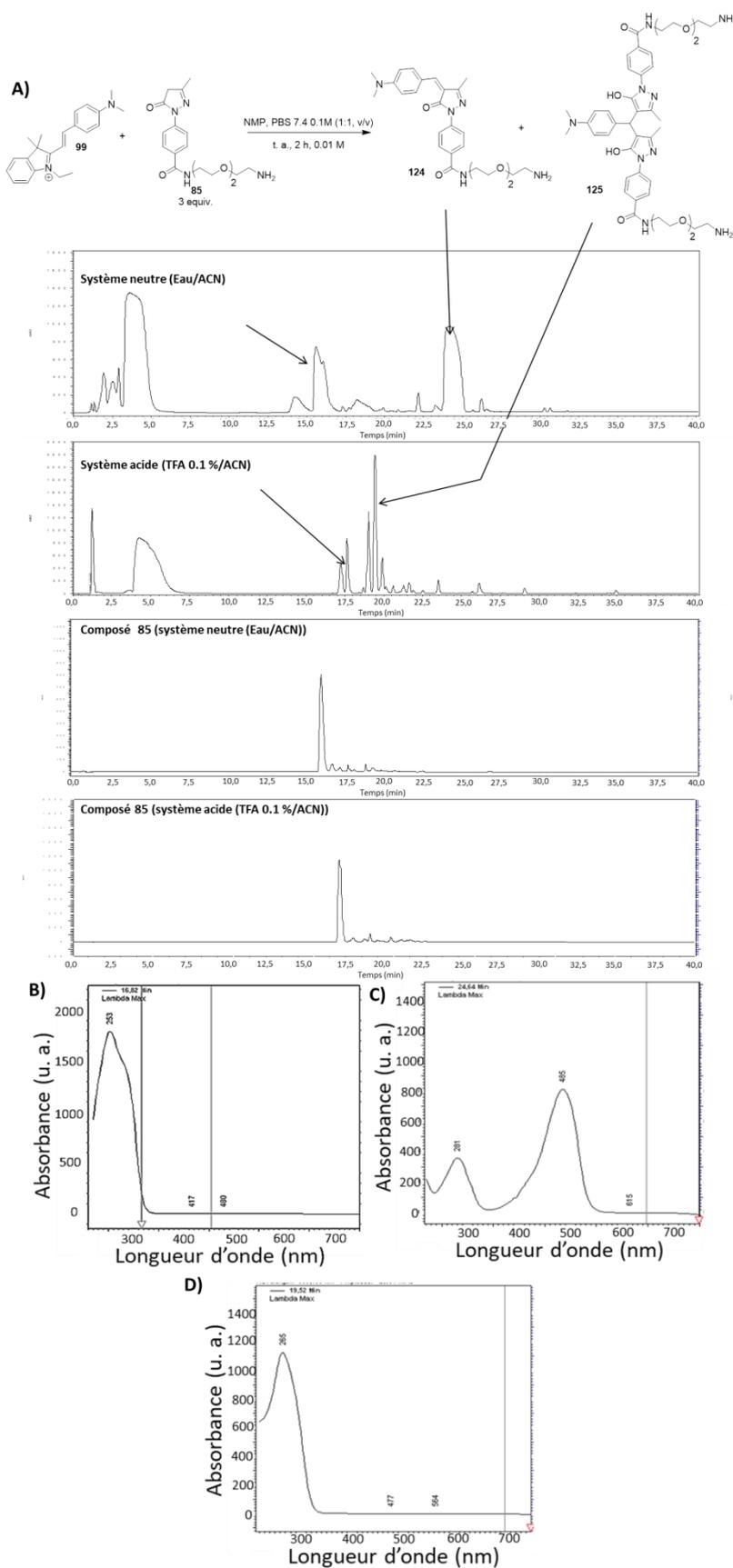


Schéma 93 : Réaction entre le mérocyanine **99** et l'édaravone

Afin de vérifier l'hypothèse de la réversibilité en milieu acide, la réaction entre la mérocyanine **99** et la pyrazolone **85** a été suivie par RP-HPLC. Cette réaction a été réalisée dans les mêmes conditions que la réaction présentée dans le Schéma 93. Malgré cela, pour le bon déroulement du suivi HPLC, la pyrazolone hydrosoluble **85** comportant une chaîne PEG a été utilisée. La réaction réalisée à une concentration de 0,01 M a été suivie en HPLC en phase inverse avec deux systèmes différents. Le premier est un système neutre composé d'un gradient utilisant de l'ACN et de l'eau Milli Q. Tandis que le deuxième est un système acide utilisant de l'ACN et une solution de TFA 0,1% ayant un pH de 1,88. L'utilisation de ces deux systèmes (pH acide et pH neutre), nous permet de voir l'impact de l'acidité sur le déroulement de la réaction. Les chromatogrammes issus de cette étude sont représentés dans le Schéma 94.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone



Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Schéma 94 : A) Etude de la réaction par RP-HPLC et chromatogrammes du composé 85 en milieu neutre et acide. Système HPLC neutre (H₂O/ACN) et acide (TFA 0,1%/ ACN) Gradient 0 à 100% en 45 min. Détection à toutes les longueurs d'ondes en modes « Max Plot ». B) Spectre d'absorption du composé 85 (Thermo Finnigan Surveyor UV-VIS Plus Detector). C) Spectre d'absorption du composé 124 (Thermo Finnigan Surveyor UV-VIS Plus Detector). D) Spectre d'absorption du composé 125 (Thermo Finnigan Surveyor UV-VIS Plus Detector).

L'hypothèse selon laquelle des conditions acides rendraient la réaction réversible se révèle être fautive. En effet, c'est dans le système acide qu'on observe vraisemblablement le produit de di-addition **125**, alors que dans le système neutre on observe vraisemblablement la formation du produit d'élimination **124** et non le produit de di-addition **125**. La formation potentielle des produits **124** et **125** peut être proposée grâce à leur signature UV (spectres d'absorption) mais également grâce à des analyses des bruts réactionnels par spectrométrie de masse. L'hypothèse la plus probable semble donc être un déplacement de l'équilibre thermodynamique lié à la concentration. En effet, lorsque la réaction est réalisée à une concentration de 0,01 M, l'excès de pyrazolone présent dans le milieu suffit à déplacer l'équilibre vers la formation du produit de di-addition **125** de manière prédominante. Or, lors de l'analyse en RP-HPLC, les échantillons sont à une concentration de 10⁻⁴ M, soit cent fois plus dilués que le milieu réactionnel. A cette concentration, l'excès de pyrazolone présent dans le milieu ne suffit plus à déplacer l'équilibre vers la formation du produit de di-addition **125**. Le produit de mono-addition **124** est alors observé. C'est le même phénomène qui a lieu lors de la purification de la réaction présentée dans le Schéma 93. En effet, lors de la purification le produit de di-addition se retrouve séparé de l'excès de pyrazolone et l'équilibre est donc déplacé vers la formation du produit de mono-addition (Schéma 95).

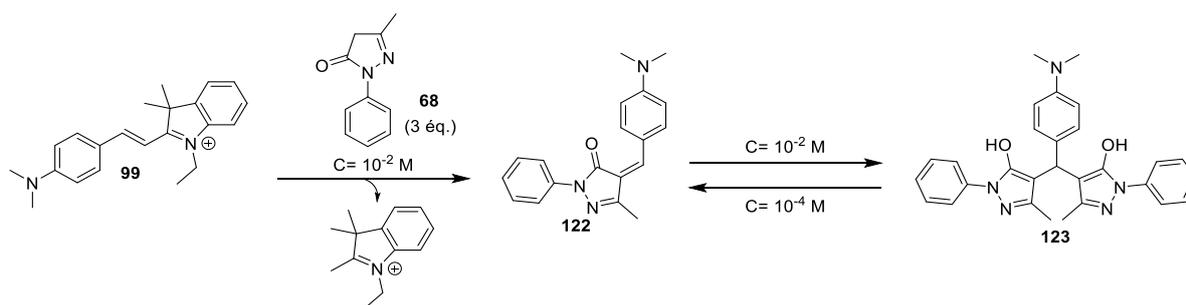


Schéma 95 : Relation en produit formé et concentration en pyrazolone

Cependant, lorsque la RP-HPLC a été réalisée en milieu acide (TFA aq. 0,1%, pH ~2) le produit de di-addition **125** a été obtenu majoritairement, bien que la concentration soit de 10⁻⁴ M. Cela s'explique par le fait qu'à ce pH, l'aniline est protonée sous forme d'ammonium, perdant tout caractère donneur, ce qui limite fortement la réaction d'élimination d'une des deux pyrazolones (Schéma 96). La stabilité de ce système est donc étroitement liée au pKa de l'aniline.

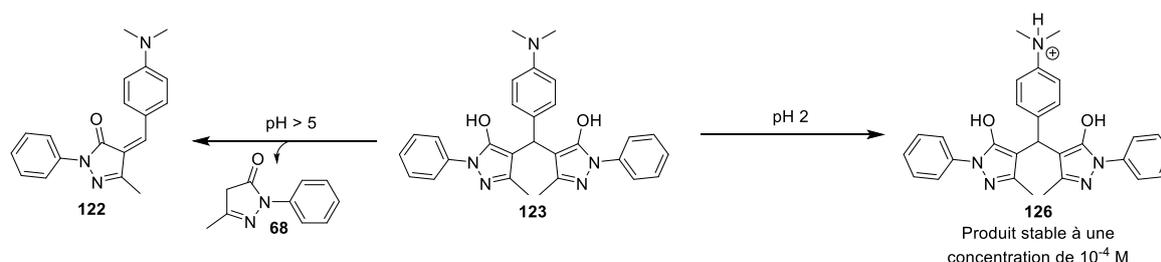


Schéma 96 : Protonation de l'aniline à pH acide

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Bien que les conditions de formation de l'un ou de l'autre des produits soient mises en évidence, il est toutefois très difficile de contrôler parfaitement l'obtention exclusive d'un des deux produits. Une aniline avec un caractère fortement électrodonneur sur la mérocyanine est nécessaire pour que la première addition se fasse avec des cinétiques et une bio-orthogonalité acceptables, mais cette aniline rend la seconde étape réversible. Une utilisation pour des applications de bioconjugaison se révèle donc délicate, et cette stratégie 2 a été abandonnée au profit d'une troisième stratégie.

2.3. Stratégie N°3 : Utilisation de la pyrazolone comme *reporter chimique* au sein de la bio-molécules.

Alors que dans la stratégie N°2 la mérocyanine est présente sur la biomolécule cible et la pyrazolone est utilisée en excès, cette stratégie repose, quant à elle, sur une utilisation de la pyrazolone comme *reporter chimique*, elle sera donc présente sur la biomolécule. La mérocyanine sera introduite en excès, ce qui devrait empêcher la formation du produit de diaddition de pyrazolone, dont nous avons montré l'instabilité (Schéma 97).

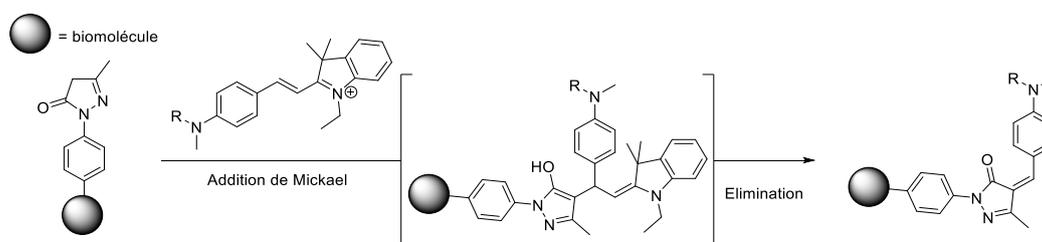


Schéma 97 : Principe général de la stratégie 3.

Suite à cela, la synthèse d'une biomolécule comportant un motif pyrazolone a été réalisée. Le choix de la biomolécule s'est porté sur le peptide model **81**, substrat de l'urokinase. Toutefois, la fonction acide carboxylique portée par la pyrazolone **127**, étant faiblement réactive, un espaceur de type glycine a été envisagé. Dans un premier temps, l'acide carboxylique de la pyrazolone **127**^[16] a été transformé en ester de NHS, puis mis en réaction en présence de glycine. Néanmoins, aucune formation du produit souhaité n'a été observée. Suite à cela, la pyrazolone **127** a été engagée avec le glycinat d'éthyle en présence d'un agent de couplage peptidique plus efficace, le HBTU. Cette approche a permis l'obtention du composé **128** avec un rendement de 68%. Ce dernier a été engagé dans une réaction de saponification afin de former quantitativement la pyrazolone **129** pouvant être alors liée au peptide **81**. Cette pyrazolone a donc été mise en réaction avec le peptide substrat de l'urokinase **81** en utilisant le PyBOP comme agent de couplage. Malgré cela, uniquement le sel de phosphonium **130** non désiré a été observé en HPLC et par spectrométrie de masse suite à sa purification en phase inverse, correspondant à une addition nucléophile de l'énol de la pyrazolone sur l'agent de couplage. Les agents de couplages de type phosphonium ne semblant pas être compatibles avec les pyrazolones, la réaction a été relancée en utilisant le HBTU qui a déjà fait ses preuves précédemment. Cette voie de synthèse a permis d'obtenir le peptide **131** comportant une pyrazolone avec un rendement de 27% (Schéma 98).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

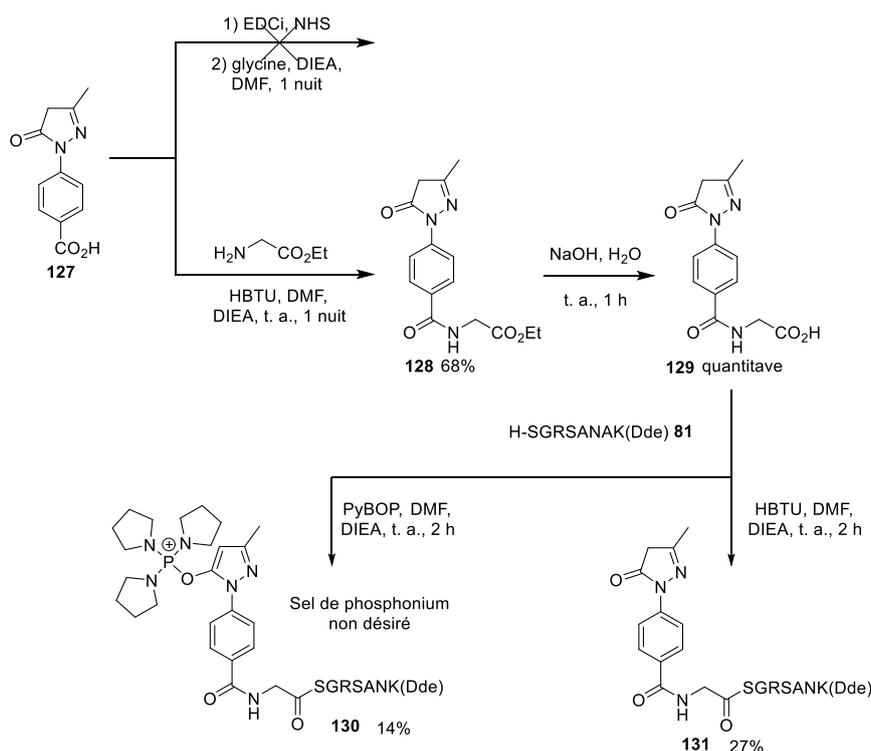
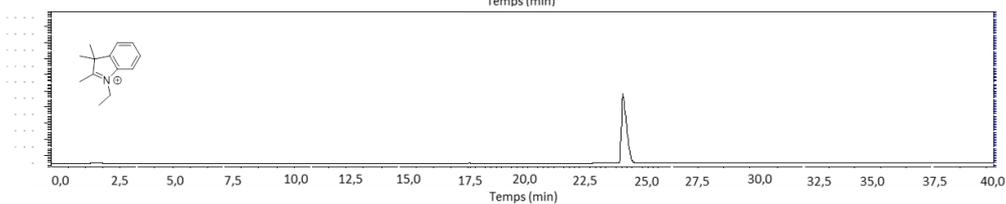
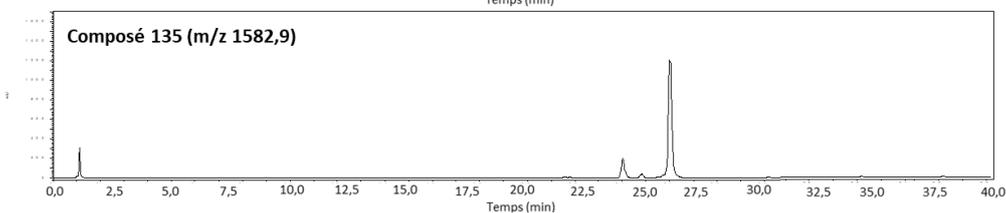
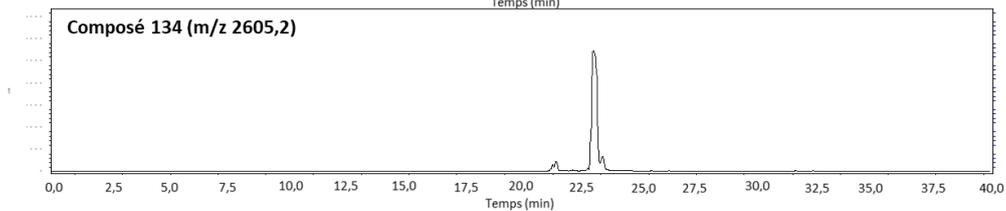
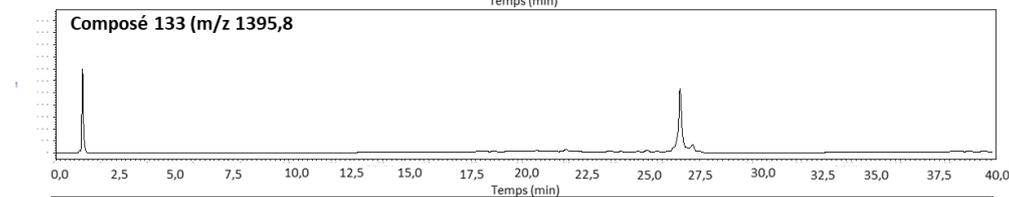
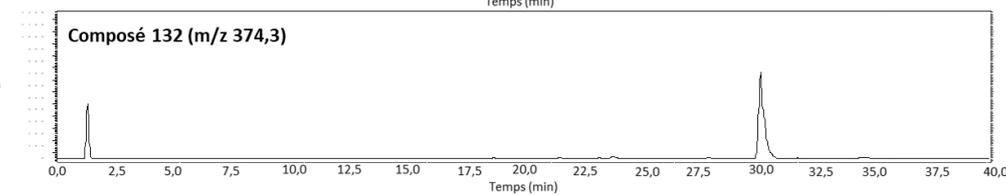
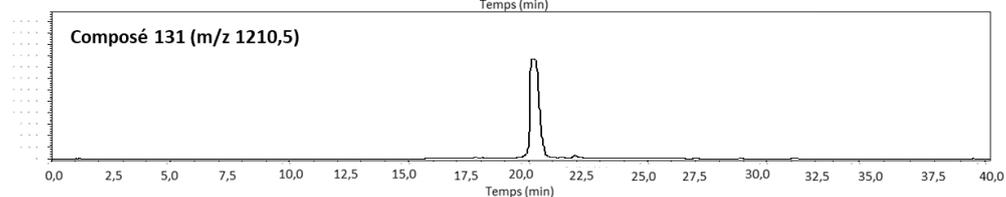
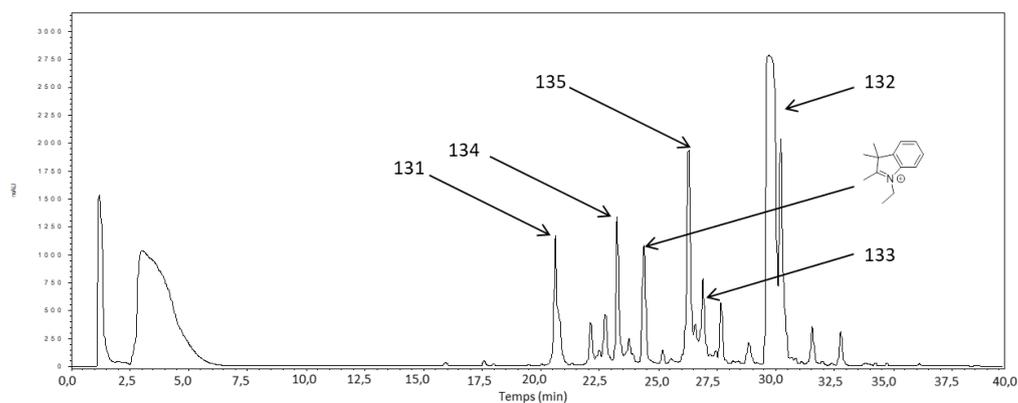
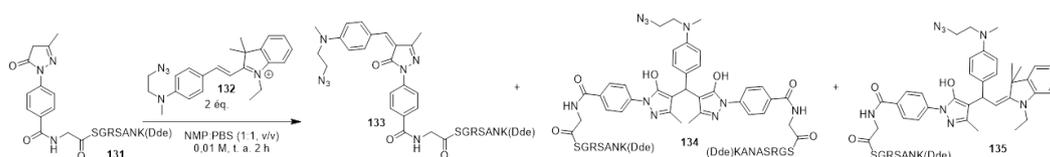


Schéma 98 : Chemin réactionnel pour l'obtention du peptide-pyrazolone 131.

Le peptide **131** a alors été mis en réaction avec deux équivalents de la mérocyanine **132**, dans un mélange NMP/PBS (1:1, v/v), à une concentration de 0,01 M. Après deux heures de réaction, l'avancement a été suivi par RP-HPLC (système acide (TFA 0,1% pH ~2) afin de figer le système), montrant la formation de nombreux produits. Afin d'en comprendre les raisons, ce mélange complexe a été séparé par RP-HPLC semi-préparative. Chaque pic important a été analysé en HPLC et spectrométrie de masse. Il en est ressorti que le produit désiré **133**, est largement minoritaire. On observe tout de même, malgré l'excès de la pyrazolone **132** dans le milieu, bien la formation du produit issu d'une di-addition **134**. Cependant, il a été observé majoritairement la présence du produit **135** pour lequel l'étape d'élimination de la partie indolique ne s'est pas réalisée. C'est la première fois que ce type de produit est observé malgré toutes les études menées en amont. L'hypothèse que nous pouvons émettre alors, serait que l'encombrement stérique généré par la biomolécules rend particulièrement difficile l'élimination de la partie indolique (Schéma 99).

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone



Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

Schéma 99 : Analyse en RP-HPLC du brut réactionnel de la réaction entre la pyrazolone **131** et la mérocyanine **132** et chromatogrammes des composés **131**, **132**, **133**, **134** et **135**. Système HPLC : TFA 0,1%/ ACN Gradient 0 à 100% en 45 min. Détection à toutes les longueurs d'ondes en modes « Max Plot »

La présence de meilleurs groupements électrodonneurs sur le partenaire mérocyanine pourrait permettre de faciliter l'étape d'élimination, même en présence d'une gêne stérique importante qui serait due à la présence d'une biomolécule. De plus, la présence de meilleurs groupements électrodonneurs devrait, par la même occasion, augmenter la stabilité du produit de mono-addition formé après l'étape de réaromatisation. Pour valider cette hypothèse le pigment **136** représentant le produit formé à l'issue de la réaction de la pyrazolone avec une mérocyanine portant une julolidine a été synthétisé, et sa stabilité, étudiée. Cependant, il s'est avéré que ce composé **136**, bien que présentant une unité julolidine, connue pour son caractère fortement électrodonneur, est bien moins stable en présence de BSA à 37 °C. En effet, près de 40 % de dégradation ont été observées après 12 heures d'incubation pour le composé **136**, tandis que le même pourcentage avait été obtenu après 24 heures pour le composé **122** (Figure 36).



Figure 36 : Structures et stabilités relatives en présence de BSA à 37 °C dans le tampon PBS 7,4, 0,1 M des composés de couplage entre une mérocyanine et la pyrazolone.

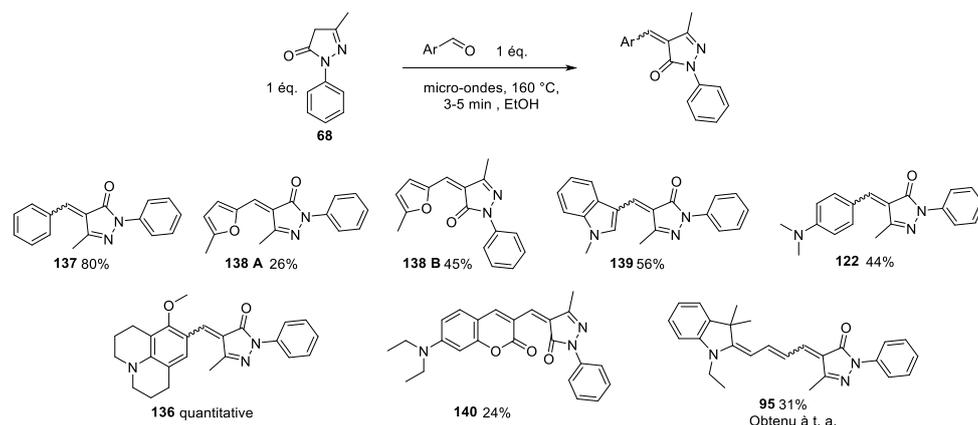
Bien qu'il ait été trouvé des conditions permettant d'accrocher la pyrazolone sur une biomolécule, ainsi qu'une série de composés réagissant facilement et rapidement avec cet hétérocycle dans des milieux physiologiques, cette étude, sur l'utilisation de la pyrazolone comme partenaire dans des réactions de bioconjugaison reste donc à finaliser

3. Synthèse et évaluation *in vitro* d'une sonde profluorescente basée sur un pigment pyrazolone pour la détection de biothiols.

3.1. Présentation de la stratégie mise en œuvre

Outre les composés présentés au paragraphe précédent, de nombreux autres pigments basés sur la pyrazolone ont été synthétisés *via* une étape d'aldolisation-crotonisation assistée aux micro-ondes (Schéma 100). Bien que la plupart de ces pigments possède une π -conjugaison étendue, ainsi qu'un système donneur/accepteur de type *push-pull* (dont la pyrazolone joue le rôle de l'accepteur), aucune des molécules isolées ne présente des propriétés de fluorescence. Même les pigments comportant un fluorophore, comme la coumarine **140**, se révèlent « éteints » une fois liée à la pyrazolone. Une telle extinction de fluorescence pour les coumarines substituées, *via* une double liaison en position 3 à un groupement électroattracteur a déjà été observée, et est liée à un effet ICT^[39] ou une photoisomérisation de la double liaison^[40]. De plus, ces molécules ont été obtenues sous la forme d'un seul isomère sauf pour le cas du composé **138** portant un motif furane.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone



Le pigment pyrazolone **140** comportant une partie coumarinique se révèle particulièrement instable en présence de thiols. En effet, en présence d'un excès de NAC en milieu aqueux, une décoloration instantanée de la solution est observée. Celle-ci passe d'un violet profond à une solution incolore. De plus ce phénomène de décoloration s'accompagne d'une intense émission de lumière suite à une exposition sous une lampe UV à 365 nm. Cette émission de lumière bleue/cyan semble coïncider avec la couleur d'émission de la DEAC (7-diaminoethylcoumarine). Cependant, ce composé est hydrophobe, ce qui rend les études en systèmes aqueux complexes. Pour pallier cette limitation, l'ajout d'un groupement sulfonate a permis de rendre hydrosoluble la sonde profluorescente **142** (Schéma 101). Cette sonde facile d'accès a été synthétisée en une étape *via* une condensation de Knoevenagel réalisée aux micro-ondes avec un rendement de 52%. De plus, l'addition des thiols sur cette dernière est particulièrement réversible à pH basique (entre 7 et 8). Cette particularité permet donc à notre sonde de pouvoir détecter plus efficacement les biothiols à pH modérément acide (~5) bien que la nucléophilie des ces derniers en soit amoindri.



L'étude de cette sonde profluorescente qui a été utilisée pour la détection spécifique de biothiols a fait l'objet d'une étude *in vitro* complète, qui vient d'être publiée en 2018 dans le journal : *European Journal of Organic Chemistry*, sélectionné par l'éditeur comme « *very important paper* ». Fast Responsive and Water Soluble Pyrazolone based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols. Kévin Renault, Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot* *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, DOI: 10.1002/ejoc.201801157 ("Very Important Paper").

3.2. Article 3 : Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols

Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols

Kévin Renault,^[a] Pierre-Yves Renard,^[a] and Cyrille Sabot^{*[a]}

Abstract: Non-protein thiols such as GSH, Hcy, or Cys, are present at different concentration levels in the body depending on the thiol species and their localization (plasma, cell, urine etc...). They play vital roles in controlling redox-mediated biological processes, and abnormal levels of biothiols are related to a variety of syndromes. In few years, fluorometric methods have gain increasing attention enabling a rapid, sensitive and spatiotemporal detection of biothiols. Herein, is reported a novel two-step access to a water-soluble fluorogenic probe based on the 7-aminocoumarin dye conjugated to a pyrazolone moiety. Upon the addition of biothiols, the fluorescence is turned-on at 485 nm by a reversible thio-Michael addition process, which enables the detection of biothiols in the low nanomolar range.

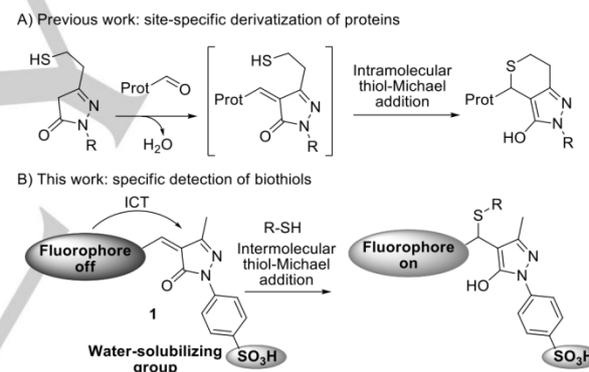
Introduction

Non-protein biothiols such as cysteine (Cys), homocysteine (Hcy) or glutathione (GSH), are crucial biological compounds that contribute to many physiological processes such as detoxification. However, a small variation in their concentration may be associated with pathological disorders^[1,2]. A low level of Cys can be responsible for haematopoiesis reduction, retarded growth, hair depigmentation, liver damage, skin lesion development, and cancer^[3]. Furthermore, GSH is the most abundant intracellular thiol, and deregulation of its concentration can decrease the cell resistance to oxidative damages^[4].

The detection and quantification of biothiols being of crucial importance, different analytical techniques have been developed, including liquid and gas chromatography,^[5–7] capillary electrophoresis, electrochemical or colorimetric assays. UV-vis and fluorescence spectrometric methods have gained considerable attention due to manifold advantages such as their high sensitivity, low cost, and ease of use. Notably, this approach has recently enabled to monitor biothiol dynamics in live-cells^[8–13]. In fact, the high binding affinity of thiols towards metal ions, and their strong reductive or nucleophilic character was leveraged to design reaction-based fluorescence probes for the selective detection of biothiols^[1]. Fluorescence sensing mechanisms include specific thiol-based reactions such as disulfide bridge reduction,^[14] S_NAr ,^[15] cyclisation with aldehydes^[16] and Michael addition with maleimides,^[17,18]

hydroquinone,^[19] enones^[20] or acrylates^[21].

Rabuka and co-workers have recently reported site-specific derivatization of aldehyde-modified proteins with pyrazolones through a tandem reaction involving a Knoevenagel condensation followed by a fast intramolecular thio-Michael addition (Scheme 1A).^[22,23] Inspired by this work, we designed a pyrazolone-based Michael acceptor **1** as a fluorogenic probe, composed of a coumarin dye whose fluorescence would be quenched by an intramolecular charge transfer (ICT) and/or photoisomerization process (Scheme 1B). Upon conjugate addition of environmental thiols to **1**, a disruption of this fluorescence quenching mechanism would be expected, restoring thus the fluorescence of the coumarin dye.



Scheme 1. A) chemoselective reaction developed by Rabuka's group. B) Our approach to develop new probe for biothiols detection.

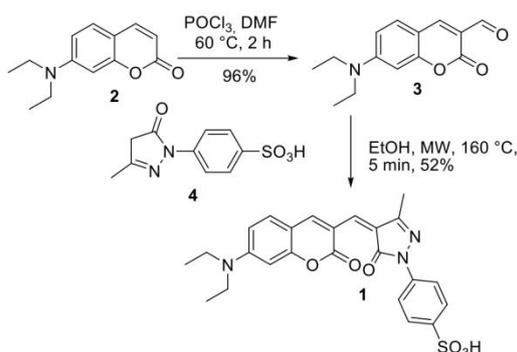
We report herein the synthesis, fluorescence and UV-visible behaviour of a novel water-soluble coumarin-based pyrazolone probe towards biothiols, for which detection limits as low as 19 nM were recorded.

Results and Discussion

Probe **1** was prepared in two steps and 50% overall yield from 7-(diethylamino)coumarin **2** (Scheme 2). First, coumarin **2** underwent formylation under Vilsmeier–Haack conditions to furnish 7-diethylamino-3-formylcoumarin ^[24] **3** in 96% isolated yield. Then, Knoevenagel condensation between the active methylene of commercially available pyrazolone **4** and aromatic aldehyde **3** provided the corresponding probe **1** in moderate, but useful 52% yield.

[a] Kévin Renault, Prof. Dr. Pierre-Yves Renard, Dr. Cyrille Sabot. Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen (France). E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.



Scheme 2. Preparation of probe 1.

Satisfyingly, probe **1** was found to be highly water-soluble (up to 12.5 mg/mL) due to the presence of the sulfonate group, and weakly fluorescent upon an excitation at 410 nm in PBS pH 7.4, which is in sharp contrast to the parent dye **2**, whose good fluorescence properties are well-established.^[25] Accordingly, the introduction of the pyrazolone moiety on the coumarin core quenched the fluorescence, and this, presumably through an intramolecular charge transfer (ICT)^[26] or photoisomerization process^[27].

Next, the chemosensing ability of probe **1** towards different (bio)analytes was investigated (Figure 1A). First, treatment of a 10 μ M solution of **1** in PBS pH 7.4 at 25 °C with N-acetyl cysteine (NAC) (50 equiv.) resulted in a rapid and significant increase in fluorescence signal with a remarkable 15-fold enhancement within the first minutes (Figure 1B). Following this encouraging preliminary result, other biologically relevant thiol-containing species were also examined (GSH, Hcy, Cys), and results indicate that fluorescence of probe **1** is also effectively turned on in their presence. The fluorescence detection limits were determined to be 38, 33, 19, and 26 nM for GSH, NAC, Hcy, and Cys, respectively, which are in the range of best values reported to date with turn-on fluorescent probes^[28–32]. The chemoselectivity being another important parameter to assess the performance of the probe, fluorescence response of probe **1** was investigated towards various sulfhydryl groups free biologically relevant species such as reductive or oxidative species, a series of metal ions, and amino acids bearing nucleophilic side chains (His, Gly, Met, Lys, Tyr, Ser), as well as a model protein (human lysozyme). Satisfyingly, no significant fluorescence enhancement was observed in their presence (Figure 1).

Next, the chemical mechanism responsible for fluorescence recovery was investigated by ¹H NMR spectroscopy analysis. Upon the addition of NAC (5 equiv.), the singlet signal at 7.21 ppm corresponding to the vinylic proton of **1**, downshifted to 5.05 ppm (see the Supporting Information). This result is consistent with a Michael addition of NAC to the vinylic position of **1**. Besides, the difference in fluorescence response observed between thiol derivatives is at first sight somewhat surprising as hindered GSH produced more

fluorescence than Cys or Hcy^[33]. This result could be explained by the fact that thio-Michael reactions involving compound **1** are likely reversible, and therefore that the composition of the system at equilibrium is governed by relative pKa values RSH/RS⁻ of biothiols: GSH (9.2) > NAC (9.0) > Hcy (8.8) > Cys (8.3). To probe the hypothesis of reversibility, a non-fluorogenic competing Michael acceptor (N-methylmaleimide, 50 equiv.) was added to a solution of probe **1**, whose fluorescence was beforehand triggered with NAC (50 equiv.). When a solution of maleimide was added to scavenge NAC, a dramatic decrease in fluorescence intensity was observed at 488 nm, as expected. Moreover, reformation of probe **1** via a retro-Michael process was further confirmed by RP-HPLC experiments (see the Supporting Information). It is worth noting that probes based on reversible thio-Michael additions have recently been reported to monitor dynamic biological processes, but such probes are still rare in the literature^[9–13].

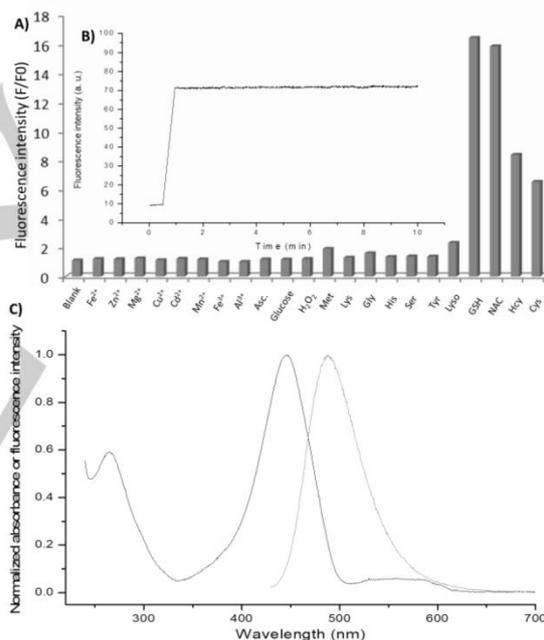


Figure 1. A) Fluorescence responses (area under the curve) of probe **1** (10 μ M) one minute after the addition of biologically relevant nucleophilic species (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm. B) Time course of fluorescence change of probe **1** upon the addition of NAC (50 eq.) in PBS pH 7.40 at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm. C) Normalized absorption (in black), emission spectra (in red, λ_{ex} 410 nm) of probe **1** (10 μ M) in the presence of NAC (50 equiv.) in PBS pH 7.40 at 25 °C.

While probe **1** in PBS is deep purple, the solution becomes colourless in the presence of thiol species. This drastic colour change prompted us to further investigate its colorimetric behaviour. In fact, upon successive addition of NAC (0.1 equiv.), the absorption peak at 528 nm is hypsochromically shifted to

446 nm (Figure 2A), which may be rationalized by the loss of pi-conjugated system between the coumarin and pyrazolone core. From the emission point of view, a concomitant gradual fluorescence recovery was observed at 488 nm upon successive addition of NAC (Figure 2B). Of note, similar results were obtained with the other biothiols Cys, GSH (see the Supporting Information).

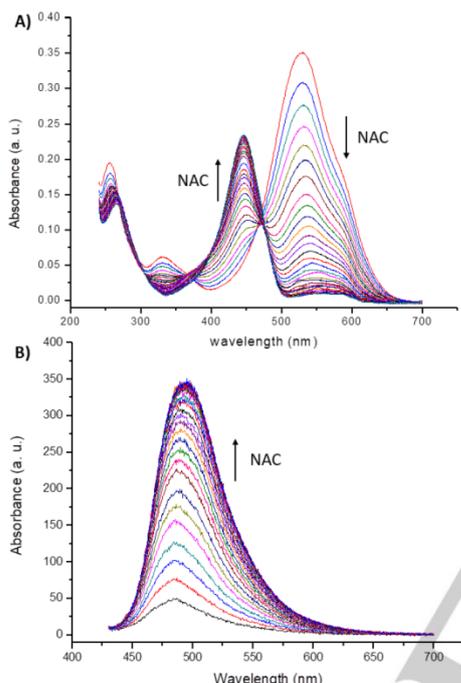


Figure 2. A) UV/Vis absorption spectra of the probe **1** (10 μ M) upon addition of increasing quantities of NAC (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}$ C. B) Fluorescence response of the probe **1** (10 μ M) upon addition of increasing quantities of NAC (0.1 equiv. from 0 to 3 eq), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}$ C, at λ_{ex} 410 nm.

A number of reported probes lose their fluorogenic properties under weakly acidic environments^[34–37] due to the predominance of the thiol form over thiolate anion.³⁸ It is, however, of interest to have probes that are fluorescent over the entire biologically relevant pH range from 4 to 8. This is particularly true for the fluorescence labelling of endocytic compartments, which are intracellular acidic organelles whose internal pH is around 5–6. Thus, the fluorescence properties of **1** were examined at different pH values from \sim 4 to 9, and results obtained are summarized in Figure 3. GSH, NAC and Hcy triggered significant increase in fluorescence intensity as the pH of the solution decreases from 8.47 to 5.01 to reach a maximum of \sim 30–45-fold fluorescence enhancement. In fact, as the pH decreases, the pyrazolon-5-olate moiety in the thio-Michael adduct becomes O-protonated, which prevents the β -elimination process in the retro-Michael reaction. Besides, the fluorescence

response is almost constant in the presence of Cys over the same range of pH. The detection limits were determined at pH 5.01, and found to be 159, 43, 147, and 198 nM for GSH, NAC, Hcy, and Cys, respectively. Lower detection limits observed at this pH value may be ascribed to the lower concentration of thiolate ions. Besides, at pH 3.95 a drop in fluorescence intensity was observed for all biothiols, due to the absence of nucleophilic thiolate species under these acidic conditions. Finally, an important fluorescence recovery was observed at pH 9.49 in the absence of analytes, which presumably results from the conjugate addition of water to the vinyl moiety of the probe (see the Supporting Information).

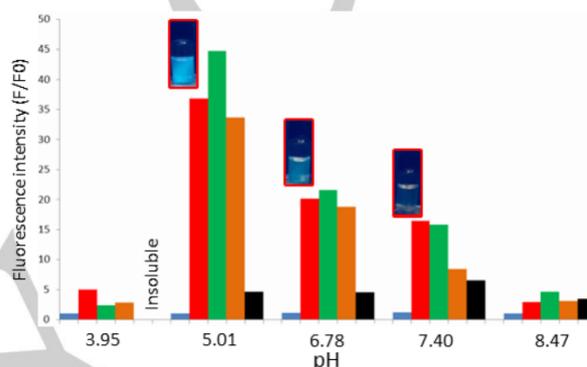


Figure 3. pH-dependent fluorescence (area under the curve) ratio F/F_0 changes of probe **1** without analyte (in blue), and in the presence of 50 equiv. of GSH (in red), NAC (in green), Hcy (in orange), or Cys (in black) at 25 $^{\circ}$ C, at λ_{ex} 410 nm.

Conclusions

This article reports a two-steps access to a water-soluble coumarin-pyrazolone-based probe, along with its photophysical properties, which have been proven suitable for the specific detection of biothiols. In fact, this probe showed detection limits at pH 7.4 in PBS in the range of 19 and 38 nM for NAC, GSH, Hcy, and Cys, and negligible fluorescence emission in the presence of other biologically relevant non-thiol nucleophilic functional groups. The fast and reversible Michael addition of thiols to **1** proposed on the basis of a NMR spectroscopy analysis, resulted in a dramatic change in colour from purple to blue.

Experimental Section

General Methods: Flash column chromatography purifications were performed on Geduran® Si 60 silica gel (40–63 mm) from Merck. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (at 254/365 nm) and/or staining with $KMnO_4$ solution. Unless otherwise noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. Phosphate buffer saline (PBS, 100 mM, pH 7.4), acetate buffer (100 mM, pH 5.01) and aq. mobile phases for HPLC were

prepared with water purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 M Ω . cm). ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker DPX 300 (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent peak for calibration. J values are expressed in Hz. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained by using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive and negative modes. UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, 10 \times 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission spectra and time course) were performed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 \times 4 mm, Chamber volume 3.5 mL). The absorption spectra of probes derivatives were recorded (220–800 nm) in PBS (100 mM, pH 7.4) at 25 $^\circ\text{C}$. Emission spectra were recorded under the same conditions after emission at the corresponding wavelength (410 nm, excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit: 5 nm). Quenching efficiency (QE) of probe **1** was measured as the difference in fluorescence (area under the emission curve) of the probe before and after addition of a large excess of analytes (50 equiv) in phosphate buffer (PBS, pH 7.4, 0.1 M), and expressed as a percentage (QE = 100 \times [1 - I0(em)/I(em)]).

Preparation of the PBS buffer (pH 7.4, 0.1 M): 500 mL of a 0.1 M solution of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 500 mL of a 0.1 M solution of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ were prepared. 0.1 M solution of NaHCO_3 (400 mL) was added to the 0.1 M solution of $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (100 mL), and NaCl (2.93 g) was added to give, after the pH value was adjusted by using a pH-meter, the PBS buffer (pH 7.4, 0.1 M).

Preparation of the acetate buffer (pH 5.01, 0.1 M): To a solution of sodium acetate (5.522 g) in water (1000 mL) was added acetic acid (1.921 g) to give, after the pH value was adjusted by using a pH-meter, the acetate buffer (pH 5.01, 0.1 M).

HPLC system used for purity control: System QC was used for analytical experiments (Thermo Hypersyl GOLD C₁₈ column, 5 μm , 2.1 \times 100 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min.

Procedure for the synthesis of coumarin (3): This procedure is based on a literature report.^[24] Under nitrogen atmosphere, POCl_3 (0.4 mL, 4.2 mmol, 1.4 eq.) was carefully added to anhydrous DMF (4 mL) and the mixture was stirred at 50 $^\circ\text{C}$ for 45 min. Then, 7-diethyl amino coumarin (650 mg, 3 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous DMF (3 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 2 h at 60 $^\circ\text{C}$. After completion, 100 mL of iced water was added and the mixture was stirred for 1 h until an orange precipitate appeared. The precipitate was filtered and washed twice with water. The crude product was co-evaporated under vacuum twice with Et_2O , to give the product as an orange amorphous powder (703 mg, 2.88 mmol, 96%). The ^1H NMR spectral data are consistent with the values reported in the literature.^[24] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.09 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.62 (dd, J = 9.0, 2.4 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.46 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

Procedure for the synthesis of probe (1): To a solution of 7-(diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carbaldehyde **3** (75 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.) in EtOH (2 mL) was added 4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzenesulfonic acid (78 mg, 0.31 mmol, 1 equiv.) in a microwave sealed tube. The reaction was irradiated for 5 min at 160 $^\circ\text{C}$, and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel (MeOH/DCM 1:9), to give the product as a dark purple amorphous powder (0.16 mmol, 76 mg, 52%). IR (neat cm^{-1}) ν = 2966, 2919, 1723, 1595, 1490, 1130. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.21 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 7.64 (m, 3H), 6.85 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.54 (q, J = 6.9 Hz, 4H), 2.29 (s, 3H), 1.17 (t, J = 6.9 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.2, 160.9, 158.1, 153.8, 151.4, 148.9, 144.3, 140.6, 138.2, 133.0, 126.2, 123.2, 117.0, 111.1, 111.0, 108.6, 96.8, 44.7, 12.9, 12.4. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ m/z 481.1229

found m/z 481.1231 [M-H]. HPLC (system QC): t_R = 27.57 min (97.5 % purity). Mp = 285 $^\circ\text{C}$ (degradation)

Acknowledgements

We thank the Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN 0001401) for financial support to K.R. This work was also partially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), INSA Rouen, Rouen University, and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029). We also thank and Albert Marcual (CNRS) for HRMS analyses.

Keywords: fluorescence • fluorogenic • Michael addition • pyrazolone • coumarin • biothiols •

- [1] a) X. Chen, Y. Zhou, X. Peng, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2120–2135; b) L.-Y. Niu, Y.-Z. Chen, H.-R. Zheng, L.-Z. Wu, C.-H. Tung, Q.-Z. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6143–6160.
- [2] J. Bouffard, Y. Kim, T. M. Swager, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 37–40.
- [3] H. Wu, C. Huang, T. Cheng, W. Tseng, *Talanta* **2008**, *76*, 347–352.
- [4] J. Liu, C. Bao, X. Zhong, C. Zhao, L. Zhu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2971–2973.
- [5] J. Ogonny, S. Mare, W. Wu, N. Ercal, *J. Chromatogr. B* **2006**, *843*, 57–62.
- [6] K. Bertil, M. Källberg, M. Johannes, *J. Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications* **1984**, *311*, 170–175.
- [7] W. Wu, G. Goldstein, C. Adams, R. H. Matthews, N. Ercal, *Biomed. Chromatogr.* **2006**, *20*, 415–422.
- [8] J. Chen, X. Jiang, S. L. Carroll, J. Huang, J. Wang, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5978–5981.
- [9] J. Chen, X. Jiang, C. Zhang, K. R. MacKenzie, F. Stossi, T. Palzkill, M. C. Wang, *J. Wang, ACS Sens.* **2017**, *2*, 1257–1261.
- [10] K. Umezawa, M. Yoshida, M. Kamiya, T. Yamasoba, Y. Urano, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 279–286.
- [11] X. Jiang, J. Chen, A. Bajić, C. Zhang, X. Song, S. L. Carroll, Z.-L. Cai, M. Tang, M. Xue, N. Cheng, C. P. Shaaf, F. Li, K. R. MacKenzie, A. C. M. Ferreol, F. Xia, M. C. Wang, M. Maletic-Savatic, J. Wang, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 16087–16099.
- [12] X. Jiang, Y. Yu, J. Chen, M. Zhao, H. Chen, X. Song, A. J. Matzuk, S. L. Carroll, X. Tan, A. Sizovs, N. Cheng, M. C. Wang, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 864–874.
- [13] D. Lee, G. Kim, J. Yin, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6518–6520.
- [14] B. Roubinet, A. Chevalier, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 166–182.
- [15] a) W. Lin, L. Long, W. Tan, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1503–1505; b) L.-Y. Niu, Y.-S. Guan, Y.-Z. Chen, L.-Z. Wu, C.-H. Tung, Q.-Z. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18928–18931; c) M.-Y. Jia, L.-Y. Niu, Y. Zhang, Q.-Z. Yang, C.-H. Tung, Y.-F. Guan, L. Feng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 5907–5914; d) Xue-Liang Liu, Li-Ya Niu, Yu-Zhe Chen, Yunxu Yang, Qing-Zheng Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 403–409.
- [16] K.-S. Lee, T.-K. Kim, J. H. Lee, H.-J. Kim, J.-I. Hong, *Chem. Commun.* **2008**, 6173–6175.
- [17] J. E. T. Corrie, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 2975–2982.
- [18] Z. Chen, Q. Sun, Y. Yao, X. Fan, W. Zhang, J. Qian, *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *91*, 553–559.
- [19] A. Agostini, I. Campos, M. Milani, S. Elsayed, L. Pascual, R. Martínez-Máñez, M. Licchelli, F. Sancenón, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1871–1874.
- [20] X. Chen, S.-K. Ko, M. J. Kim, I. Shin, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2751–2753.
- [21] J.-T. Hou, J. Yang, K. Li, K. K. Yu, X.-Q. Yu, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *214*, 92–100.
- [22] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 293–298.
- [23] J. Yu, D. Shen, H. Zhang, Z. Yin, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1016–1020.

- [24] H. Tateishi, A. B. Tsuji, K. Kato, H. Sudo, A. Sugyo, T. Hanakawa, M.-R. Zhang, T. Saga, Y. Arano, T. Higashi, *Bio. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4893–4897.
- [25] T. Hinohara, K. Amano, K. Matsui, *NIPPON KAGAKU KAISHI* **1976**, 1976, 247–247.
- [26] B. Babür, N. Seferoğlu, M. Öcal, G. Sonugur, H. Akbulut, Z. Seferoğlu, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 4498–4502.
- [27] M.-S. Tsai, C.-L. Ou, C.-J. Tsai, Y.-C. Huang, Y.-C. Cheng, S.-S. Sun, J.-S. Yang, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 8031–8039.
- [28] B. Tang, L. Yin, X. Wang, Z. Chen, L. Tong, K. Xu, *Chem. Commun.* **2009**, 5293–5295.
- [29] B. Han, J. Yuan, E. Wang, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5569–5573.
- [30] H. Li, J. Xu, H. Yan, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, *139*, 483–487.
- [31] H. S. Jung, J. H. Han, Y. Habata, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5142–5144.
- [32] L. Yi, H. Li, L. Sun, L. Liu, C. Zhang, Z. Xi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4034–4037; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4094–4097.
- [33] For selected examples of probes exhibiting a stronger fluorescence response for Cys or Hcy than GSH, see : a) Y. Liu, X. Lv, M. Hou, Y. Shi, W. Guo, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11475–11483; b) Y.-F. Kang, H.-X. Qiao, Y.-L. Meng, Z.-H. Xin, L.-P. Ge, M.-Y. Dai, Z. He, C.-H. Zhang, *Aust. J. Chem.* **2017**, *70*, 952–956; c) Y.-F. Kang, H.-X. Qiao, Y.-L. Meng, Z.-H. Xin, L.-P. Ge, M.-Y. Dai, J.-J. Xu, C.-H. Zhang, *Anal. Methods* **2017**, *9*, 1707–1709; d) H. Qiao, Y. Meng, Y. Zhang, J. Sun, T. Wang, X. Zhang, F. Wang, Y.-F. Kang, *Chem. Pap.* **2018**, *72*, 1461–1466.
- [34] O. Rusin, N. N. St. Luce, R. A. Agbaria, J. O. Escobedo, S. Jiang, I. M. Warner, F. B. Dawan, K. Lian, R. M. Strongin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 438–439.
- [35] J. Zhang, J. Wang, J. Liu, L. Ning, X. Zhu, B. Yu, X. Liu, X. Yao, H. Zhang, *Anal. Ch.* **2015**, *87*, 4856–4863.
- [36] S.-Y. Na, S. Park, M.-Y. Yun, H. Kwon, H.-J. Kim, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *174*, 109–113.
- [37] L. Long, L. Zhou, L. Wang, S. Meng, A. Gong, F. Du, C. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 8214.
- [38] K. Renault, J. W. Frey, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 2497–2513.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

En plus des différents biothiols présentés dans l'article, la sonde **142** est également capable de détecter du sulfure d'hydrogène qui est un gasotransmetteur, mais aussi un poison issu de la fermentation des algues vertes responsables d'empoisonnements sur les plages bretonnes. La sonde présente une exaltation de fluorescence d'un facteur 15 en présence de 50 équivalents de sulfure d'hydrogène à un pH de 7,4. De plus, une limite de détection de 20 nM a été mesurée à pH 7,4. Enfin, l'influence du pH sur la détection de ce gaz par la sonde a été étudiée et une bonne détection est obtenue pour un pH de 6,8 et 7,4. En dehors de cette gamme de pH (5-8), une chute drastique de la réponse lumineuse de la sonde est observée (Figure 37).

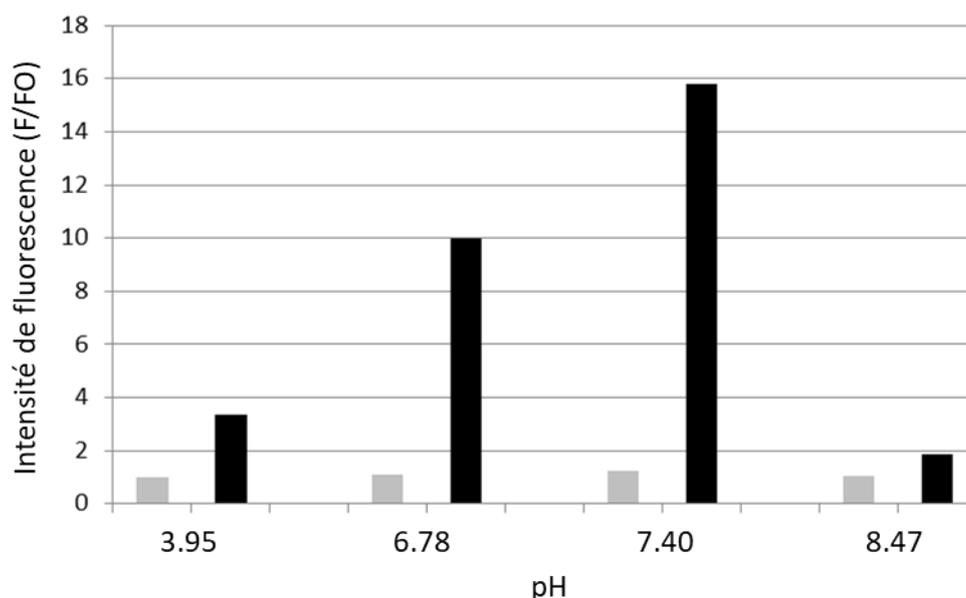


Figure 37 : Rapport des intensités de fluorescence de la sonde **142** (10 μ M) à T=0 et T=1 min en absence (bleu) et présence (rouge) de 50 équivalents de sulfure d'hydrogène à différent pH (tampon acétate (pH 3,95 et 6,78) tampon PBS (pH 7,4) et tampon borate (pH 8,47)). $\lambda_{\text{ex}} = 410$ nm.

4. Conclusion et perspectives

Ce chapitre a été consacré à l'étude de la réactivité des pyrazolones sur différents électrophiles, dont des accepteurs de Michael. Un partenaire offrant une excellente biocompatibilité mais également une réactivité satisfaisante avec les pyrazolones a été mis en évidence, il s'agit de la N-diméthylamino-mérocyanine **99**. Une fois ce criblage terminé, trois stratégies ont été développées dans le but d'obtenir une ligation chimiosélective biocompatible entre les pyrazolones et les mérocyanines. Chaque nouvelle stratégie a été développée afin de pallier les problèmes rencontrés lors du développement de la stratégie précédente. Toutefois, malgré les efforts déployés, les difficultés de synthèses ou de stabilité rencontrées n'ont pas permis d'aboutir à des résultats satisfaisants.

Néanmoins, les connaissances acquises lors de cette étude, notamment sur les pigments comportant une partie pyrazolone ont permis le développement d'une sonde pro fluorescente et hydrosoluble pour la détection spécifique de biothiols. Cette sonde permet de détecter les biothiols à un pH modérément acide (pH 5) avec une exaltation de fluorescence bien plus élevée qu'à pH 7,4 (fois 45 à pH 5 contre fois 15 à pH 7,4). Malgré cela, il serait intéressant d'étudier l'influence du TCEP sur la

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

sonde **142**. En effet, le TCEP est couramment utilisé pour la réduction de ponts disulfures lors du traitement de protéine. Ainsi, une compatibilité de notre sonde **142** avec le TCEP permettrait d'utiliser cette dernière pour l'étude structurale de protéine par exemple. Une autre perspective d'utilisation de cette sonde serait une détection de biothiols comme le glutathion, par exemple, aux seins des lysosomes cellulaires. En effet, dans les lysosomes le pH est aux alentours de 5, ce qui devrait donc se traduire par une très bonne exaltation de fluorescence de la sonde. De plus, l'incorporation d'un motif morpholine sur notre sonde, devrait permettre de cibler précisément les lysosomes par rapport aux autres organites cellulaires comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique rugueux par exemple. En effet, l'amine tertiaire de la morpholine de par sa basicité augmente la pénétration des composés portant une telle entité au travers des membranes des lysosomes. Une fois entrée au sein des lysosomes, le pH suffisamment acide conduit à une protonation du motif morpholine ($pK_a = 7,4$) ce qui aura pour effet d'empêcher l'expulsion du composé hors des lysosomes^[41,42] (Schéma 102). Donc, *in fine*, une accumulation lysosomale des composés portant une morpholine.

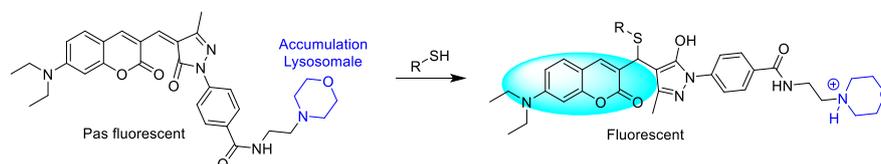


Schéma 102 : Perspective pour l'obtention d'une sonde profluorescente pour la détection de biothiols au sein de lysosome.

De plus, la ligation aldéhyde/pyrazolone pourrait être rendue fluorogénique par l'utilisation de fluorophores comportant une fonction aldéhyde responsable d'un « quenching » de sa fluorescence^[43,44]. Ainsi, après réaction avec les pyrazolones, la fonction aldéhyde disparaît et un retour de fluorescence devrait être observé (Schéma 103), surtout après une double addition de pyrazolone (une photoisomérisation de la double liaison exocyclique, ou un phénomène d'ICT seraient toujours possible si la double liaison issue de la réaction de Knoevenagel est présente).

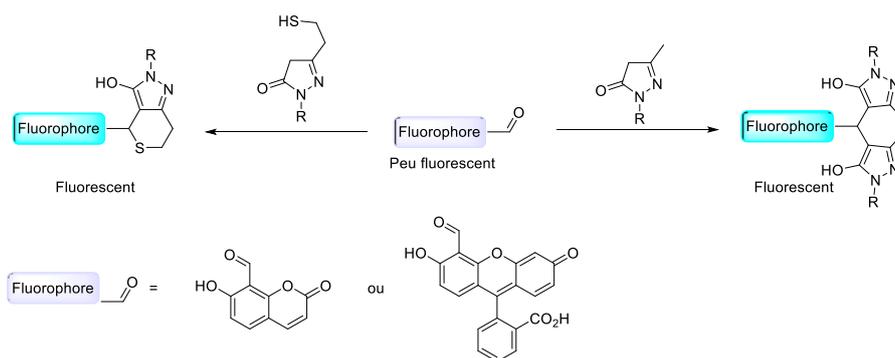


Schéma 103 : Principe d'une ligation fluorogénique basée sur les réactions entre les aldéhydes et les pyrazolones.

Références: Chapitre 3

- [1] P. Gupta, J. K. Gupta, A. K. Halve, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2015**, 6, 2291–2310.
- [2] M. Levy, *Thorax* **2000**, 55, 72–74.
- [3] K. Lalit, T. Chandresh, S. Vivek, *IJRPS* **2012**, 2, 13–22.
- [4] A. Gürsoy, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 35, 359–364.
- [5] D. Castagnolo, A. De Logu, M. Radi, B. Bechi, F. Manetti, M. Magnani, S. Supino, R. Meleddu, L. Chisu, M. Botta, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16, 8587–8591.
- [6] N. Parekh, K. Maheria, P. Patel, M. Rathod, *International Journal of PharmTech Research* **2011**, 3, 540–548.
- [7] P. Manojkumar, T. Ravi, G. Subbuchettiar, *Acta Pharmaceutica* **2009**, 59, 159–170.
- [8] Y. Kakiuchi, N. Sasaki, M. Satoh-Masuoka, H. Murofushi, K. Murakami-Murofushi, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 320, 1351–1358.
- [9] T.-W. Wu, L.-H. Zeng, J. Wu, K.-P. Fung, *Life Sciences* **2002**, 71, 2249–2255.
- [10] V. Hadi, Y.-H. Koh, T. W. Sanchez, D. Barrios, N. Neamati, K. W. Jung, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 20, 6854–6857.
- [11] J. Kang, X. Yue, C. Chen, J. Li, H. Ma, *Molecules* **2015**, 21, 39–50.
- [12] C. Dayakar, D. Jyothi, P. Suman, B. C. Raju, *Synthetic Communications* **2015**, 45, 1642–1651.
- [13] X. Feng, M. A. Xi, Y. Wu, X. Wang, N. Xi, *Tetrahedron Letters* **2017**, 58, 46–49.
- [14] N. Polkam, V. R. Ramaswamy, P. Rayam, T. R. Allaka, H. S. Anantaraju, S. Dharmarajan, Y. Perumal, D. Gandamalla, N. R. Yellu, S. Balasubramanian, et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 26, 2562–2568.
- [15] T. Watanabe, M. Tahara, S. Todo, *Cardiovascular Therapeutics* **2008**, 26, 101–114.
- [16] R. Bianchini, M. Bonanni, M. Corsi, A. S. Infantino, *Tetrahedron* **2012**, 68, 8636–8644.
- [17] A. Singh, R. Choi, B. Choi, J. Koh, *Dyes and Pigments* **2012**, 95, 580–586.
- [18] O. T. Gunkara, E. Bagdatli, N. Ocal, *Journal of Chemical Research* **2013**, 37, 227–231.
- [19] G. Kaupp, A. Herrmann, J. Schmeyers, *Chemistry - A European Journal* **2002**, 8, 1395–1406.
- [20] K. J. Duffy, M. G. Darcy, E. Delorme, S. B. Dillon, D. F. Eppley, C. Erickson-Miller, L. Giampa, C. B. Hopson, Y. Huang, R. M. Keenan, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, 3730–3745.
- [21] M. Stornaiuolo, G. La Regina, S. Passacantilli, G. Grassia, A. Coluccia, V. La Pietra, M. Giustiniano, H. Cassese, S. Di Maro, D. Brancaccio, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 2135–2148.
- [22] D. Tomasik, P. Tomasik, R. A. Abramovitch, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1983**, 20, 1539–1543.
- [23] S.-Y. Park, S.-W. Oh, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2003**, 24, 569–572.
- [24] V. Kumar, K.-P. Tan, Y.-M. Wang, S.-W. Lin, P.-H. Liang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2016**, 24, 3035–3042.
- [25] R. Verma, P. Chawla, S. K. Saraf, *Der Pharmacia Sinica* **2012**, 3, 546–55.
- [26] M. M. V. Ramana, V. V. Kenkare, D. N. Navale, *J. Chem. Pharm. Res.* **2013**, 5, 71–75.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

- [27] X.-L. Li, Y.-M. Wang, B. Tian, T. Matsuura, J.-B. Meng, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1998**, 35, 129–134.
- [28] A.-Q. Wang, T.-S. Jin, Z.-L. Cheng, T.-S. Li, *Asian J. Chem.* **2010**, 22, 1973–1976.
- [29] M. N. Elinson, O. O. Sokolova, R. F. Nasybullin, *Heterocyclic Communications* **2015**, 21, 97–101.
- [30] X. Lai, G. Zha, W. Liu, Y. Xu, P. Sun, T. Xia, Y. Shen, *Synlett* **2016**, 27, 1983–1988.
- [31] Y. Zhang, S. Wu, S. Wang, K. Fang, G. Dong, N. Liu, Z. Miao, J. Yao, J. Li, W. Zhang, et al., *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015, 2030–2037.
- [32] X. Chen, G.-F. Zha, G. A. L. Bare, J. Leng, S.-M. Wang, H.-L. Qin, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2017**, 359, 3254–3260.
- [33] K. Kakehi, M. Ueda, S. Suzuki, S. Honda, *J. Chromatogr.* **1993**, 630, 141–146.
- [34] R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, et al., *Chemistry & Biology* **2015**, 22, 293–298.
- [35] R. A. Kudirka, R. M. Barfield, J. M. McFarland, P. M. Drake, A. Carlson, S. Bañas, W. Zmolek, A. W. Garofalo, D. Rabuka, *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, 7, 994–998.
- [36] J. Yu, D. Shen, H. Zhang, Z. Yin, *Bioconjugate Chemistry* **2018**, 29, 1016–1020.
- [37] L. Wang, Y. Hao, J. Huang, Y. He, K. Zeng, J. Li, J. M. Chabu, W. Chen, M. Yang, L. Deng, et al., *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 9136–9142.
- [38] S. Kallepu, K. K. Gollapelli, J. B. Nanubolu, R. Chegondi, *Chemical Communications* **2015**, 51, 16840–16843.
- [39] B. Babür, N. Seferoğlu, M. Öcal, G. Sonugur, H. Akbulut, Z. Seferoğlu, *Tetrahedron* **2016**, 72, 4498–4502.
- [40] M.-S. Tsai, C.-L. Ou, C.-J. Tsai, Y.-C. Huang, Y.-C. Cheng, S.-S. Sun, J.-S. Yang, *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, 82, 8031–8039.
- [41] C. L. Andrew, A. R. Klemm, J. B. Lloyd, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1997**, 1330, 71–82.
- [42] X. Liu, Y. Su, H. Tian, L. Yang, H. Zhang, X. Song, J. W. Foley, *Analytical Chemistry* **2017**, 89, 7038–7045.
- [43] K.-S. Lee, T.-K. Kim, J. H. Lee, H.-J. Kim, J.-I. Hong, *Chemical Communications* **2008**, 6173–6175.
- [44] W. Wang, O. Rusin, X. Xu, K. K. Kim, J. O. Escobedo, S. O. Fakayode, K. A. Fletcher, M. Lowry, C. M. Schowalter, C. M. Lawrence, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 15949–15958.

Chapitre 3 : Etude d'accepteurs de Michael en réaction avec la pyrazolone

**Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès
aux 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones
et étude de leurs propriétés
photophysiques**

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

I. Etat de l'art

Ce chapitre est consacré à l'ensemble des travaux réalisés sur le motif quinoxalin-2(1H)-one à savoir le développement d'une nouvelle méthodologie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones, l'évaluation des propriétés de fluorescence des dérivés obtenus, ainsi qu'au développement de différentes applications comme la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une sonde profluorescente pour la détection de biothiols. La mise au point de la synthèse de motifs 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones a été réalisée en collaboration avec Hasan Mtiraoui (Thèse de l'Université de Monsatir sous la direction du Pr. Msaddeck) dans le cadre d'un stage de quelques mois au laboratoire.

Les quinoxalin-2(1H)-ones sont des dérivés hétérocycliques aromatiques comportant deux atomes d'azote (Figure 38).

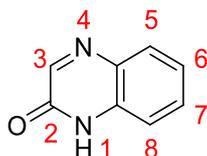


Figure 38 : Structure générale des quinoxalin-2(1H)-ones

Elles possèdent un large spectre d'activités biologiques comme des activités anticancéreuses^[1,2] ou antimicrobiennes^[3]. Certaines quinoxalin-2(1H)-ones curatives sont mêmes commercialisées, à l'instar de l'ataquimast et du panadiplon pour leur activité antiasthmatique et anti-inflammatoire, respectivement^[4] (Figure 39).

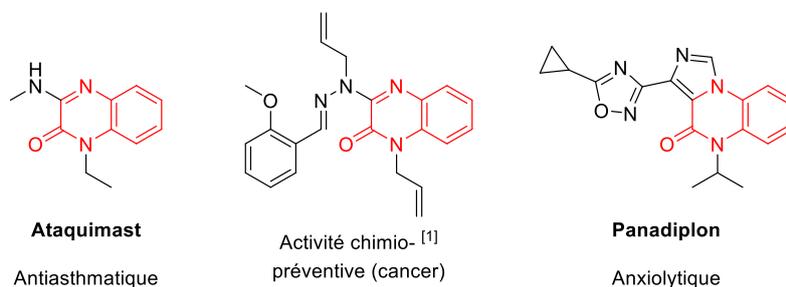


Figure 39: Exemples de dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones bioactives

Outre leur activité biologique, ces hétérocycles possèdent des propriétés photophysiques intéressantes mais relativement peu explorées comparativement aux coumarines^[5], qui sont leurs analogues oxygénés en position 1, et possédant un atome de carbone en position 4. Dans la littérature, différentes voies de synthèse de quinoxalin-2(1H)-ones ont été développées ainsi que des stratégies de modifications post-synthétiques.

1. Synthèse des quinoxalin-2(1H)-ones

Depuis plus d'une décennie, les voies de synthèse conduisant au motif quinoxalin-2(1H)-one sont en pleine expansion. En effet, la découverte de leurs nombreuses activités biologiques a conduit à une

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

demande de diversification structurelle afin de moduler leurs effets thérapeutiques. Les chimistes ont donc développé différentes voies synthétiques permettant d'accroître la diversité structurelle des quinoxalin-2(1H)-ones^[6,7]. Ces voies d'accès peuvent être divisées en sept catégories résumées dans le Schéma 104.

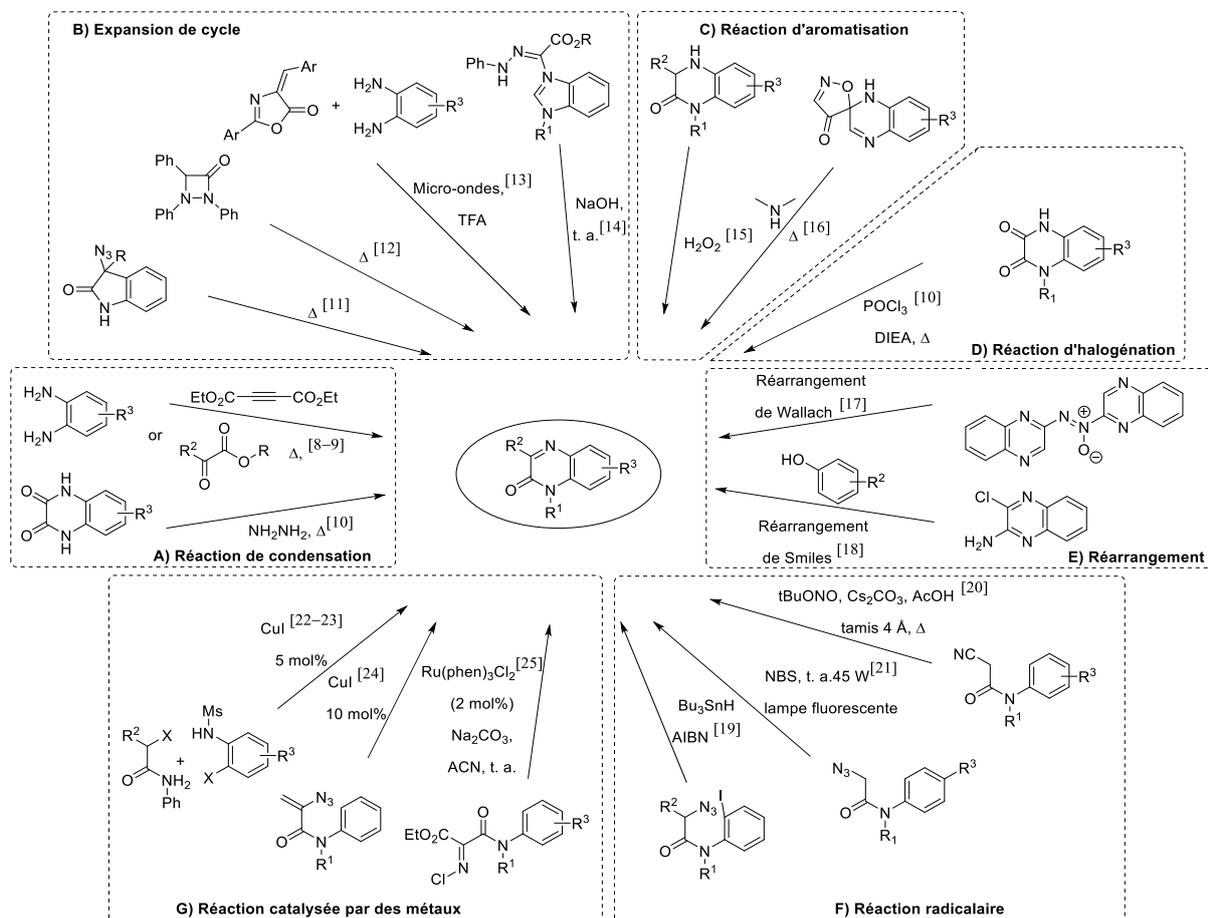


Schéma 104 : Différentes voies de synthèse de quinoxalin-2(1H)-ones

On retrouve ainsi les réactions de condensation reposant essentiellement sur l'utilisation d'*o*-phénylènediamine^[8-10] (Schéma 104 A). Bien que très représentée, cette approche conduit à la formation de deux régioisomères lorsque l'*o*-phénylènediamine possède des substituants non identiques sur son noyau aromatique. D'autres voies de synthèse ont donc été élaborées permettant l'obtention d'un unique isomère comme les réactions d'expansion de cycles reposant sur une activation thermique et/ou acido-basique^[11-14] (Schéma 104 B). Viennent ensuite les réactions d'aromatisation^[15,16] (Schéma 104 C), d'halogénéation^[10] (Schéma 104 D) et les réactions de réarrangement avec notamment les réarrangements de Wallach^[17] et de Smiles^[18] (Schéma 104 E). On retrouve également des réactions radicalaires dont le radical peut être généré par un amorceur radicalaire chimique ($tBuONO$, ou le tandem $Bu_3SnH/AIBN$), ou encore *via* une excitation lumineuse^[19-21] (Schéma 104 F). Enfin la dernière catégorie est représentée par les réactions catalysées par les métaux et en particulier le cuivre (I) ou le ruthénium (II). Ces réactions reposant sur l'utilisation d'anilines fonctionnalisées, permettent d'obtenir des quinoxalin-2(1H)-ones facilement substituées aux positions R^1 , R^2 et R^3 ^[22-25] (Schéma 104 G).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Malgré toutes ces voies d'accès, il est parfois nécessaire de devoir réaliser des modifications post-synthétiques impliquant le noyau quinoxalin-2(1H)-one lui-même.

2. Modification chimique du noyau quinoxalin-2(1H)-ones

Des modifications post-synthétiques peuvent être apportées au noyau quinoxalin-2(1H)-one afin de créer de la diversité structurale supplémentaire et de moduler les propriétés de ces composés aromatiques. Plusieurs positions peuvent ainsi être modifiées, notamment les positions 1, 3, 6 et 7.

Peu de réactions sont engagées avec l'atome d'azote de la position 1, en raison de sa faible nucléophilie, qui s'explique par le fait qu'il s'agisse d'un amide ayant un caractère aromatique sous sa forme tautomère, donc appauvri en électrons. Ainsi, seules des réactions d'acylation en présence d'anhydride acétique^[26], ou d'alkylation avec de bons agents alkylants comme l'iodure de méthyle, le bromure de benzyle ou encore le chloroacétate d'éthyle, sont rapportées^[26,27]. Il est important de noter que toutes ces réactions nécessitent une activation thermique pour être menées à bien. En 2000, l'équipe du Pr. Taylor met au point une méthode originale pour la mono-méthylation sélective d'amide. Cette réaction utilisant du chlorure de chlorométhyltriméthylsilyle en présence d'HMDS, repose sur la formation d'une espèce penta-coordonnée du silicium qui peut être désilylée par la suite avec du fluorure de césium^[28] (Schéma 105).

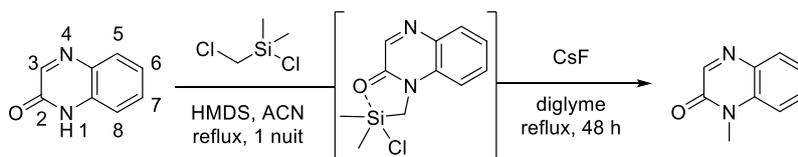


Schéma 105 : Méthode d'alkylation en position 1 de quinoxalin-2(1H)-ones développée par Taylor en 2000^[28]

La position 3 du noyau quinoxalin-2(1H)-one est celle qui recense le plus de modifications. En effet, cette position s'avère très réactive dans des conditions radicalaires car, lorsque les espèces radicalaires réagissent sur l'imine de la quinoxalin-2(1H)-one, le radical formé sur l'atome d'azote est stabilisé par le noyau aromatique. Il est alors possible de former, *via* cette méthode, une liaison carbone-carbone ou carbone-azote comme indiqué dans le Schéma 106.

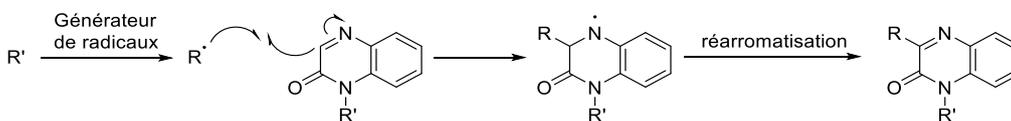


Schéma 106 : Réaction des quinoxalin-2(1H)-ones avec les radicaux

Ces méthodologies ont permis l'incorporation d'une variété de fonctions et ainsi d'améliorer la diversité structurale des quinoxalin-2(1H)-ones. Cette méthode a rendu possible l'insertion de cétones, d'aromatiques et même du groupement persulfate en position 3 de la quinoxalin-2(1H)-one. Le mécanisme radicalaire de ces réactions a été vérifié par ajout de TEMPO ou de BHT. En présence de ces pièges à radicaux, aucune réaction n'est observée. L'ensemble de ces réactions est récapitulé dans le Tableau 2.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Réactif	R'	Conditions	R'	Produit	rendement	réf
		AgNO ₃ (0,1 éq.), K ₂ S ₂ O ₈ (2 éq.), ACN/eau (1:1, v/v), 100 °C, 3 h			34-88%	[29]
		TBHP (4 éq.), DCE, 70 °C, 5 h			35-88%	[30]
		Cs ₂ CO ₃ (3 éq.), ACN (0,1 M), t. a. 72 h			37-90%	[31]
		PhIO (1,5 éq.), ACN, t. a. 9 h			50-86%	[32]
		tBuONO (1,2 éq.), CH ₃ SO ₃ H (1 éq.), acétone, t. a. 1 h 30			46-86%	[33]
		Mn(OAc) ₃ .2H ₂ O (3 éq.), ACN, 120 °C, 12 h tube scellé			70-88%	[34]
		K ₂ S ₂ O ₈ (2 éq.), ACN, 60 °C, 16 h			19-99%	[35]

Tableau 2 : Exemples récents de réactions radicalaires en position 3 du noyau quinoxalin-2(1H)-one

De façon complémentaire, la fonctionnalisation des quinoxalin-2(1H)-ones en position 3 peut également se faire *via* une réaction de C-H activation avec un dérivé aromatique d'acide boronique, en présence de Pd(OAc)₂ (5 mol%) et de 1,10-phénanthroline (7,5 mol%) à 100 °C^[36] (Schéma 107).

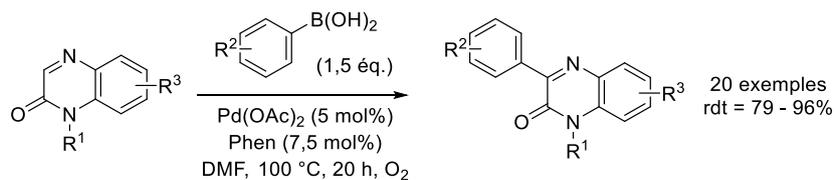


Schéma 107 : Insertion d'aryles en position 3 par CH activation développée par le groupe d'Alami en 2013^[36].

L'incorporation d'amines en position 3 est également possible par l'utilisation de conditions oxydantes^[37,38], ou par réaction de type S_NAr si la quinoxalin-2(1H)-one de départ comporte un atome de chlore en position 3. Il faut noter que cette dernière approche rend également possible l'insertion de thiols^[39] (Schéma 108).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

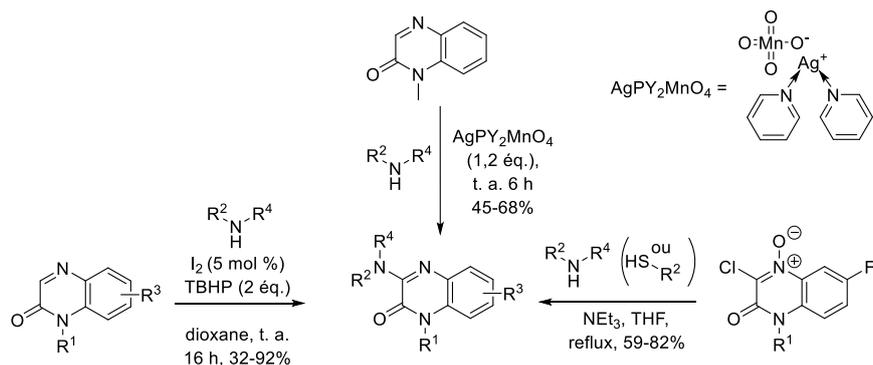


Schéma 108 : Insertion d'amines (ou de thiols) en position 3 du noyau quinoxalin-2(1H)-one

Enfin, les positions 6 et 7 sont fonctionnalisables uniquement lorsqu'un atome de brome est présent sur une de ces deux positions. Cela permet l'incorporation de divers groupements à l'aide de couplages pallado-catalysés tels que les couplages de Heck ou de Suzuki. Ces réactions ont permis l'élaboration de nouveaux pigments^[40,41] ou encore de nouvelles molécules biologiquement actives^[42,43].

Ces synthèses et modifications post-synthétiques ont permis l'utilisation des quinoxalin-2(1H)-ones dans divers domaines de recherche et, plus particulièrement, pour la préparation de sondes fluorescentes.

3. Propriétés de fluorescence des quinoxalin-2(1H)-ones

Bien que structurellement proches, les quinoxalin-2(1H)-ones sont moins représentées pour leurs propriétés de fluorescence que leurs homologues, les coumarines. Cependant, au milieu des années 1980, les chimistes se sont toutefois intéressés au développement de quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes portant des groupements électrodonneurs alkoxy identiques en position 6 et 7 afin de faciliter leur synthèse en évitant la présence de régioisomères. L'amide joue alors le rôle de groupement électroattracteur, à l'image de la lactone des 7-alkoxy (ou 7-amino) coumarines. Différentes quinoxalin-2(1H)-ones présentant des systèmes *push-pull* améliorant leurs propriétés de fluorescences, modifiées en position 3 sont disponibles commercialement et sont connues sous les noms de Br-DMEQ, Br-MMEQ, DMEQ-COCl ou DMEQ-TAD (Figure 40).

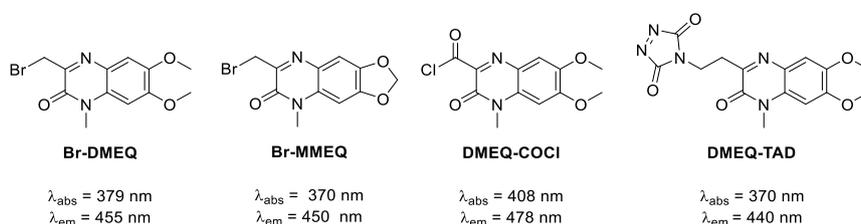


Figure 40 : Dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones fluorescents commerciaux

Ces dérivés sont essentiellement utilisés pour l'étude d'analytes spécifiques par HPLC à détection de fluorescence. Ainsi le Br-DMEQ et le Br-MMEQ, peuvent créer un lien covalent avec les carboxylates grâce à leurs unités bromométhyle en position 3^[44,45]. Ces composés ont été utilisés pour déterminer

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

la présence d'oligosaccharides^[46] ou d'acide phénylacétique dans le plasma humain^[47], de peptides^[48,49] ou d'analogues de drogues dans l'urine humaine^[50], de prostaglandine dans du fluide séminal humain^[51], ainsi que la présence d'enzymes dans le sérum de souris^[52], ou encore de toxines dans les phytoplanctons marins^[53]. Ensuite, le DMEQ-COCl est utilisé pour sa réactivité vis-à-vis des alcools, des phénols et des amines. Il a notamment été utilisé pour la détermination de la composition de mélange d'alcools^[54], la présence de composés phénoliques^[55] comme les phénylalanines hydroxylées^[56], ainsi que pour déterminer la présence de tryptophanes dans une séquence peptidique *via* un phénomène de FRET entre le potentiel tryptophane présent et la DMEQ^[57]. Et enfin, le DMEQ-TAD a été utilisé^[58] pour la quantification *in vitro* de métabolites de la vitamine D par HPLC^[58].

Les propriétés de fluorescence des quinoxalin-2(1H)-ones ne sont pas mises à profit uniquement dans le domaine de la chromatographie. Ainsi en 1996, le groupe de Dogra montre pour la première fois que le motif quinoxalin-2(1H)-one possède différents états prototropiques induisant des propriétés de solvatochromisme^[59]. Par la suite, en 2003, le groupe d'Imai publie ses travaux sur la corrélation entre la structure et les propriétés de fluorescence de différents fluorophores et notamment des dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones^[60]. Il en ressort que les quinoxalin-2(1H)-ones substituées par un groupement électrodonneur, comme un méthoxy ou une amine, ont de meilleurs rendements quantiques. Cela se vérifie tout particulièrement lorsque cette substitution a lieu en position 7 du noyau quinoxalin-2(1H)-one, ce qui est dû à la présence d'un effet *push-pull*, comme pour les coumarines. De plus, la présence d'un groupement électroattracteur en position 3 engendre un effet bathochrome à la fois de l'absorption et de l'émission du composé.

Une autre approche pour obtenir des quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes consiste à incorporer en position 3, un aromatique possédant un groupement électrodonneur en para. De plus, il est possible de moduler les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission en augmentant ou diminuant la conjugaison entre le groupement donneur et la quinoxalin-2(1H)-one jouant le rôle de groupement accepteur (Figure 41).

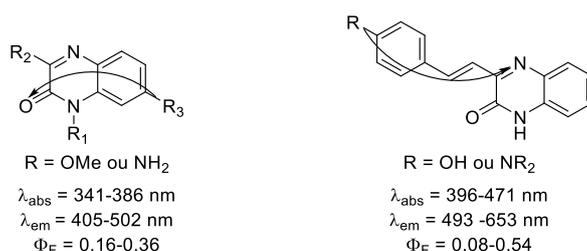


Figure 41 : Représentation de quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes par effet *push-pull* (flèche en noire)

Cette stratégie de modification en position 3 a permis le développement de sondes pour la détection de thiols^[61,62] ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)^[63] *in vitro* et en milieu cellulaire, ou encore pour la visualisation du transport vésiculaire^[64].

En 2013, le groupe de Madder a développé une sonde profluorescente de type FRET pour la détection de l'alpha-chymotrypsine^[65]. Cette sonde repose sur l'utilisation du DMEQ-TAD, d'un quencher adapté au fluorophore, ainsi que d'un peptide substrat pouvant être clivé par l'alpha-chymotrypsine (Figure 42).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

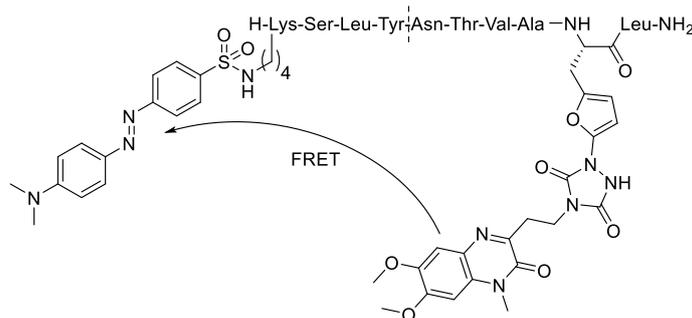


Figure 42 : Structure de la sonde FRET proposée par le groupe de Madder en 2013^[65]

Le groupe d'Akutagawa a développé en 2015 et 2017, deux sondes de type quinoxalin-2(1H)-one dont les propriétés de fluorescence sont dues à un phénomène d'ESIPT, c'est-à-dire à un transfert de proton intramoléculaire à l'état excité. Ce phénomène est possible uniquement lorsque la quinoxalin-2(1H)-one est sous sa forme lactime et non sous forme lactame habituelle. Cette approche a permis le développement de sondes pour la détection de différents anions (Schéma 109)^[66,67]. Ces sondes ont notamment été utilisées pour la détection de cation lithium Li^+ et sodium Na^+ mais également des anions fluorure F^- et acétate AcO^- . En effet, en absence de ces analytes la sonde se présente sous sa forme lactime avec une fluorescence dans le vert à 520 nm. En présence des anions F^- ou AcO^- ou des cations Li^+ ou Na^+ , l'équilibre est déplacé vers la forme lactame. On observe ainsi, une émission de fluorescence à 460 nm.

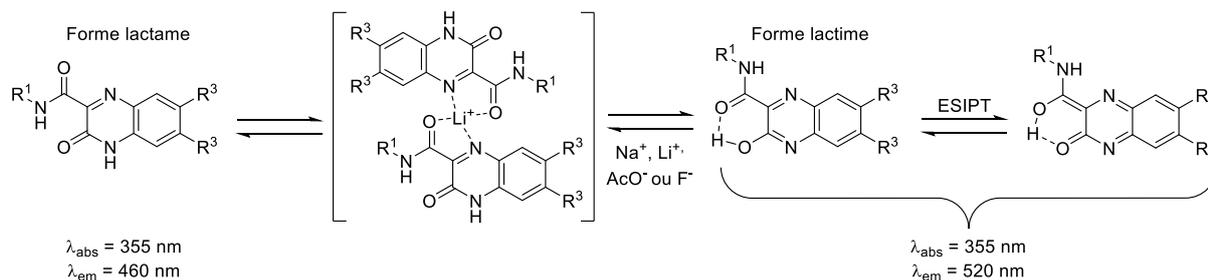


Schéma 109 : Principe des sondes ESIPT développées par le groupe d'Akutagawa^[66,67]

Enfin, en 1991, le groupe de Bernard Valeur a développé un hybride éther couronne-quinoxalin-2(1H)-one dans le but de synthétiser un complexe de lanthanide par chélation d'euporium Eu^{3+} . La quinoxalin-2(1H)-one joue ici le rôle d'antenne qui transmet l'énergie reçue vers le cation Eu^{3+} , ce qui permet d'atteindre une longueur d'onde d'émission supérieure à 600 nm^[68].

L'obtention, de manière fortuite, d'un dérivé de quinoxalin-2(1H)-one nous a conduits à développer une nouvelle voie de synthèse courte et convergente conduisant au noyau quinoxalin-2(1H)-one. Suite à cela une étude des propriétés photophysiques peu connues a été réalisée sur différents dérivés de quinoxalin-2(1H)-one obtenus.

II. Résultats et discussions

1. Nouvelle voie d'accès au 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones

1.1. Présentation de la stratégie de synthèse mise en oeuvre

Cette partie sera consacrée à la découverte d'une nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones qui a été le point de départ de différentes études à la fois chimiques et photophysiques. La synthèse des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones fut découverte par sérendipité lors de travaux réalisés par Hasan Mtiraoui sur les benzodiazépin-2-ones. En effet, dans le but d'obtenir un dérivé acétylé, la benzodiazépin-2-ones **144** a été mise en réaction avec du chlorure d'acétyle dans le DMSO à 80 °C. Cependant, dans ces conditions oxydantes, aucun produit acétylé **143** ne fut observé. En revanche, un produit ne présentant que des protons aromatiques en RMN ^1H a été obtenu avec un faible rendement de 15%. Il s'agissait de la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one **145** (Schéma 110), dont la structure a été confirmée par diffraction des rayons X.

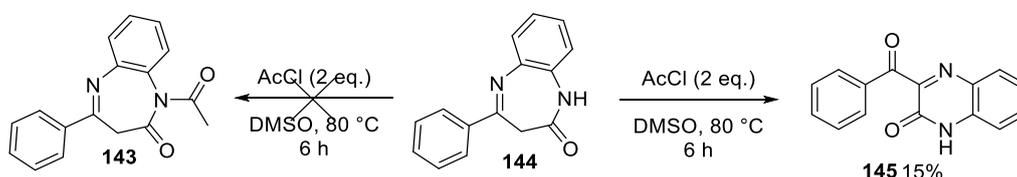


Schéma 110 : Obtention de la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one X par sérendipité

Toutefois, bien que le rendement obtenu soit modeste, l'obtention de dérivé de 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones en une seule étape par contraction du cycle benzodiazépin-2-one s'avère inédite. Ces benzodiazépin-2-one étant très faciles d'accès, avec une large possibilité de substitution sur les *o*-phenylènes diamines de départ, une étude méthodologique a donc été réalisée afin d'optimiser les rendements de cette transformation. L'utilisation de NBS (0,4 éq.) dans le DMSO pendant 6 heures, a permis d'obtenir le produit désiré avec une conversion de 100% et un rendement isolé de 52%. Suite à cette optimisation, une librairie de 10 molécules a pu être obtenue avec des rendements modérés à bons (Schéma 111).

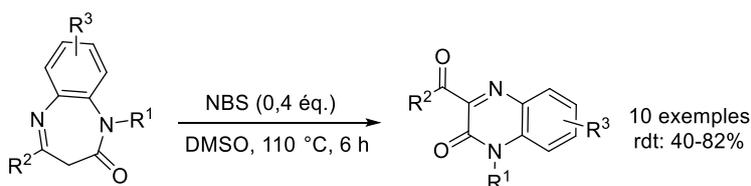


Schéma 111 : Obtention de divers quinoxalin-2(1H)-ones dans les conditions réactionnelles optimisées.

Contre toute attente, les 3-benzoylquinoxalinones obtenues ne sont pas fluorescentes, et ce, quelque soit la substitution apportée par le groupement R³. Toutefois, la réduction du motif cétone en alcool correspondant a permis de récupérer le caractère émissif des quinoxalinones. Cela a permis la synthèse d'un nouveau fluorophore qui a été utilisé dans la conception d'un dérivé de cholestérol fluorescent. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Hasan Mtiraoui de l'université de Monastir (Tunisie), et ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Organic and Biomolecular Chemistry* en 2017, en tant que co-premiers auteurs (Hasan Mtiraoui, Kevin Renault, Morgane

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Sanselme, Moncef Msaddek, Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot *Org. Biomol. Chem* **2017** 15, 3060-3068).

1.2. Article 4 : Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinone

Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones†

Hasan Mтираoui,^{‡a} Kevin Renault,^{‡b} Morgane Sanselme,^{c,d} Moncef Msaddek,^{*a} Pierre-Yves Renard^b and Cyrille Sabot^{*b}

Received 25th January 2017,
Accepted 12th March 2017
DOI: 10.1039/c7ob00205j

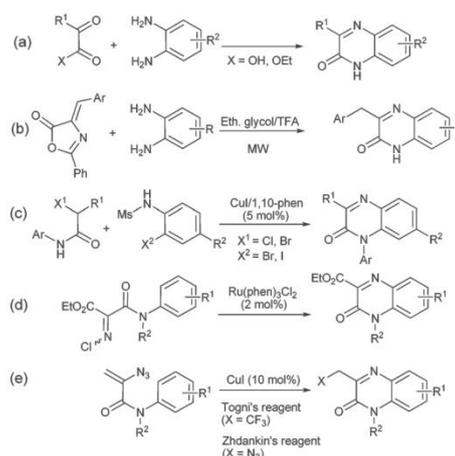
rsc.li/obc

A novel and practical synthesis of 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones from benzodiazepin-2-ones in two steps from commercially available starting materials is reported. The reaction was achieved in the presence of *N*-bromosuccinimide in DMSO which served both as a solvent and an oxidant. Significantly, the yet unknown ketone to alcohol fluorescence turn-on of benzoylquinoxalinones was unveiled through the preparation of a fluorescently labelled cholesterol conjugate.

Introduction

The nitrogen-containing heterocycle quinoxalin-2(1H)-one has undoubtedly become a privileged skeleton within the quinoxaline family.¹ Quinoxalinone derivatives exhibit an amazingly wide spectrum of biological properties including, among others, anticancer,² antimicrobial,³ antithrombotic,⁴ protein kinase inhibitory,⁵ or benzodiazepine receptor agonist activity.⁶ Importantly, they are also present in pharmaceutical compounds such as ataquimast,⁷ an anti-inflammatory agent, or caroverine,⁸ a spasmolytic drug. Besides, quinoxalinones are useful key synthetic intermediates for the construction of quinoxaline⁹ or benzimidazolone¹⁰ scaffolds. Furthermore, the electronic properties of these heterocycles have been leveraged in free radical photoinitiated polymerization processes¹¹ and fluorescence applications.¹²

From the synthetic point of view, quinoxalinones are traditionally generated by condensation of *o*-phenylenediamines with α -keto acids or with their related derivatives,¹³ in accordance with the method developed more than a century ago by Hinsberg (Scheme 1a).¹⁴ In a more elaborate approach, Jung *et al.* and Tu *et al.* reported the reaction of *o*-phenylenedi-



Scheme 1 Previous work regarding the synthesis of quinoxalin-2(1H)-ones.

amines with masked α -keto acid derivatives, oxazolones, under microwave and solid support conditions, respectively (Scheme 1b).¹⁵ Relatively few other approaches have been reported, most of them involving metal catalysis. In this context, Bao *et al.* reported copper-catalyzed domino S_N2 - or S_NAr /coupling synthesis of quinoxalinones from *N*-phenyl sulfonamides and *N*-phenyl halo acetamides (Scheme 1c).¹⁶ The cyclization of iminyl radicals generated either from *N*-chloroimines under visible light irradiation with $Ru(phen)_3Cl_2$ as a photocatalyst (Scheme 1d) or from vinyl azides under copper catalysis (Scheme 1e) also constitutes elegant approaches to quinoxalinone systems.¹⁷

Herein, we propose a complementary metal-free approach to the quinoxalinone core through an intramolecular oxidative

^aUniversité Monastir, Laboratory of Heterocyclic Chemistry Natural Products and Reactivity/CHPNR, Department of Chemistry, Faculty of Science of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

^bNormandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, France. E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr

^cNormandie Univ, France

^dUNIROUEN, Laboratoire SMS EA3233, 1 rue Tesniere, France, F-76821 Mont Saint Aignan, France

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C NMR, photophysical data for all new compounds, and X-ray crystallographic data (CIF files) for compound 2a. CCDC 1519664. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7ob00205j

‡ These authors contributed equally to this work.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Paper

Organic & Biomolecular Chemistry

rearrangement process of 1,5-benzodiazepin-2-ones. The fluorescence behavior of the 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one and its NaBH₄-reduced form was also explored. This strategy was subsequently applied to the preparation of a fluorescently labelled cholesterol derivative that would be suitable for imaging applications.

Results and discussion

In the course of studies on the chemoselective acylation of 1,5-benzodiazepin-2-one derivatives, we unexpectedly observed the formation of the quinoxalin-2-one **2a**, albeit in a low yield of 15% (Table 1, entry 1). This structure was unequivocally established by X-ray crystallographic analysis (Fig. 1). In order to improve the efficiency of this transformation which involves an oxidation step and a ring contraction step, the reaction was next carried out with one-electron oxidizing agents such as 2,3-dicyano-5,6-dichlorobenzoquinone (DDQ) or ceric ammonium nitrate (CAN). None of these conditions afforded the desired quinoxalinone **2a**. Alternatively, a protocol recently reported by Ravikumar for the oxidation of active methylenes using DMSO as the sole oxidant in the presence of Cs₂CO₃ was also attempted.¹⁸ No trace of compound **2a** was observed, but

instead a [1,3] sigmatropic rearrangement proceeded resulting in the unexpected 1-(1-phenylvinyl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-one **3**,¹⁹ which was obtained in 54% isolated yield.²⁰ Encouragingly, the reaction carried out with 40 mol% of *N*-bromosuccinimide (NBS) in DMSO at 80 °C led to **2a** in 29% yield (entry 5).²¹ Increasing the reaction temperature to 110 °C enabled the formation of the quinoxalinone in an acceptable 52% yield (entry 6). It should be mentioned that the reaction could be conducted in dry or wet DMSO, under a degassed, argon atmosphere or under an open air system, without affecting the yield. In addition, the use of 20 mol% of NBS led to incomplete conversion, and a stoichiometric amount of NBS did not improve the efficiency of the reaction. Besides, NIS and NCS were both less efficient than NBS (entries 8 and 9).

Having established the suitable reaction conditions (NBS 0.4 eq., DMSO, 110 °C), the scope of the transformation was next investigated with 1,5-benzodiazepin-2-ones **1a-l** differently substituted at positions R¹, R², and R³. Results obtained are summarized in Scheme 2. First, substitution on the amide moiety with a methyl group was well tolerated. However, although reactions carried out with NH-free amides were completed within 6 h, some *N*-methyl amide derivatives required longer reaction times (12 h, compounds **2b**, **2c**, and **2e**). Satisfyingly, the optimized oxidizing process was compatible with benzodiazepin-2-ones bearing electron-rich phenyl rings. The products **2c**, **2h** and **2i** were obtained in convenient 65, 40 and 59% yield, respectively. Unfortunately, the phenol substrate failed to give the desired quinoxazolidinone **2d**, which could be attributed to the competitive bromination of the

Table 1 Optimization study

Entry	Reactant	Solvent	T (°C)	Convrsn ^a (%)	Yield ^a (%)	
					2	3
1	AcCl (2 eq.)	DMSO	80	100	15	0
2	CAN (2 eq.)	ACN	80	100	0	0
3	DDQ (2 eq.)	ACN	80	60	0	0
4	Cs ₂ CO ₃ (0.25 eq.)	DMSO	125	100	0	54 ^b
5	NBS (0.4 eq.)	DMSO	80	40	29	0
6	NBS (0.4 eq.)	DMSO	110	100	52 ^b	0
7	NBS (1 eq.)	DMSO	110	100	62	0
8	NCS (0.4 eq.)	DMSO	110	45	9	0
9	NIS (0.4 eq.)	DMSO	110	100	30	0

^a Unless specified, determined by the ¹H NMR of the crude reaction mixture relative to the internal standard 1-phenylcyclohexene.
^b Isolated yields.

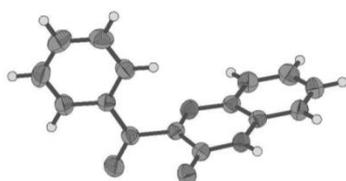
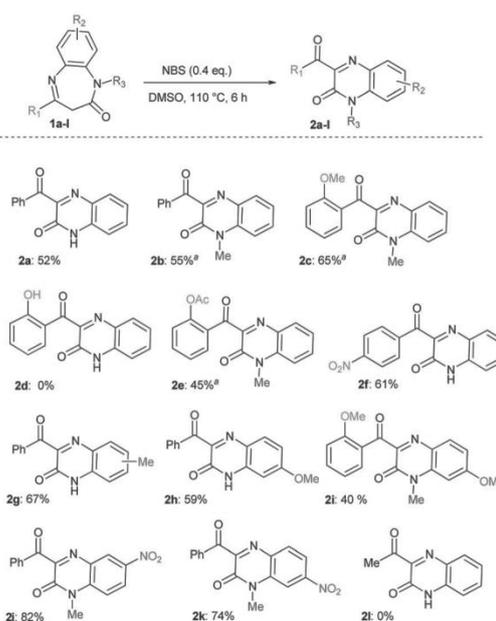


Fig. 1 X-ray structure of compound **2a**.



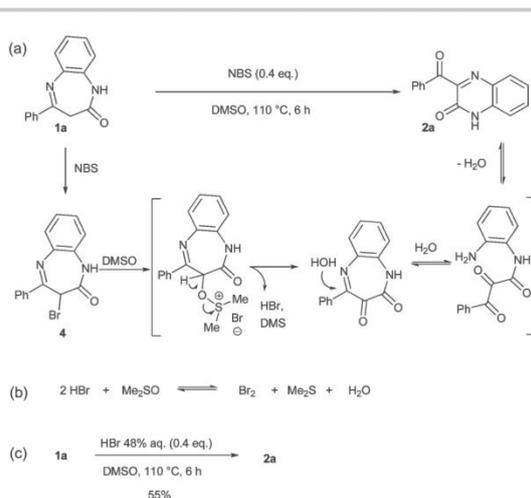
Scheme 2 Scope of the oxidative ring contraction process of benzodiazepinones. ^a Reaction time: 12 h.

1 **Q4** phenol ring. However, this limitation could be circumvented
 2 by converting the hydroxyl group of the benzodiazepin-2-one
 3 into the corresponding phenyl acetate, which furnished
 4 compound **2e** in 45% yield. In addition, the ring contraction
 5 methodology was also effective with electron-withdrawing
 6 functions present either on the phenyl or on the fused
 7 aromatic ring system. In fact, nitro derivatives **2f**, **2j** and **2k**
 8 were obtained in good 61, 82 and 74% yield, respectively.
 9 Finally, when a substrate bearing a methyl group instead of a
 10 phenyl at R¹ was subjected to the reaction conditions, only
 11 decomposition of the starting material was observed.

12 A plausible reaction mechanism, depicted in Scheme 3a,
 13 was proposed on the basis of experimental data and results
 14 reported in the literature.^{21,22} Initially, electrophilic bromina-
 15 tion at the C3 position of the benzodiazepinone by NBS would
 16 provide the corresponding alkyl bromide **4**, which may sub-
 17 sequently undergo the nucleophilic attack of DMSO. According
 18 to the Kornblum reaction,²³ the sulfonium thus formed would
 19 generate the α -keto amide with concomitant elimination of
 20 dimethyl sulfide (DMS) and hydrogen bromide (HBr). Finally,
 21 the thermodynamically driven 7-membered ring opening/
 22 6-membered ring closure process promoted by water would
 23 furnish the corresponding quinoxalinone **2a**. The water neces-
 24 sary at this stage, if not present initially, may result from the
 25 reaction of HBr with DMSO that would give rise to the for-
 26 mation of H₂O, DMS and Br₂ (Scheme 3b).^{22,24} Furthermore,
 27 *in situ* production of the Br₂ species (complexed with DMS)
 28 should contribute to making the system substoichiometric in
 29 a bromonium source. In order to examine these mechanistic
 30 hypotheses, the reaction between the 1,5-benzodiazepinone **1a**
 31 and NBS was carried out in deuterated DMSO at room tem-
 32 perature. ¹H NMR analysis of the reaction mixture showed that
 33 bromination of the methylene position was complete within
 34 the first minutes of reaction, which supports the first step of
 35 the mechanism (see the ESI[†]). However, none of the other

36 assumed intermediates, such as the sulfonium species, were
 37 identified.²⁵ Besides, in order to investigate whether the bromi-
 38 native species generated in the course of the reaction from HBr
 39 and DMSO may be able to perform the entire reaction sequence
 40 as assumed in the proposed mechanism, the synthesis of the
 41 quinoxalinone **2a** from 1,5-benzodiazepine **1a** was investigated
 42 using a 48% aqueous solution of HBr instead of NBS, in DMSO
 43 at 110 °C. Under these conditions, the quinoxalinone **2a** was
 44 indeed obtained, in 55% isolated yield (Scheme 3c). This experi-
 45 mental result thus supports the fact that a brominative species
 46 (Br₂) formed *in situ* may also be involved in the oxidative
 47 process involving NBS (40 mol%) and DMSO.

48 To illustrate the potential of this synthetic methodology,
 49 the preparation of a fluorescently labelled cholesterol deriva-
 50 tive was next investigated by using a quinoxalinone scaffold as
 51 a fluorophore.¹² In fact, cholesterol is an essential component
 52 of cell membranes, which plays a critical role in membrane
 53 permeability and trafficking. A better understanding of the
 54 dynamics of cholesterol in membranes may require the prepara-
 55 tion of fluorescently labelled cholesterol probes.²⁶ To do so,
 56 the covalent attachment of the cholesterol molecule to the
 57 fluorophore was first envisioned through the amide nitrogen
 58 of the quinoxalinone. However, our preliminary optical studies
 59 showed that quinoxalinone **2i**, an *N*-methylated model com-
 60 pound, has no significant fluorescence, whatever the excitation
 61 wavelength. In fact, few data are available on the fluorescence
 62 behavior of quinoxalinones,¹² hence we were surprised to
 63 notice that while compound **2i** was almost not fluorescent, its
 64 NaBH₄-reduced product **5** with a quantum yield of 0.11 (λ_{em}
 65 475 nm upon an excitation at 366 nm in PBS 7.4 at 25 °C) was,
 66 in contrast, markedly more emissive ($\times 57$, Fig. 2). To the best
 67 of our knowledge, this ketone-mediated quenching of fluo-



Scheme 3 Proposed reaction mechanism.

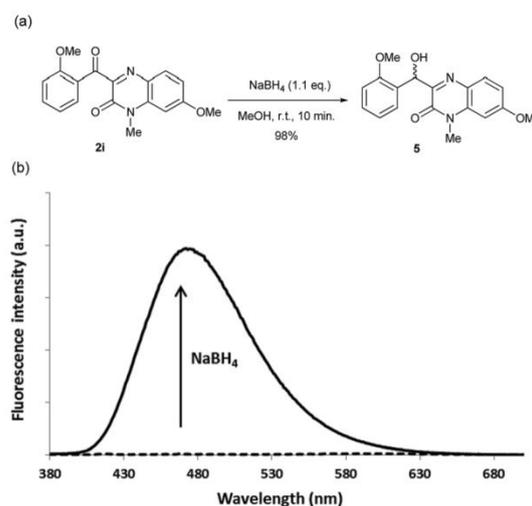
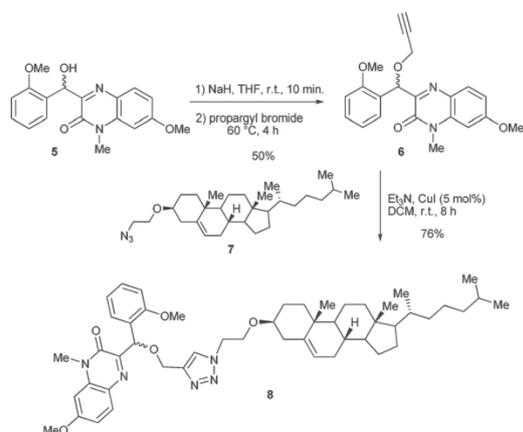


Fig. 2 (a) Preparation of the hydroxyl-containing quinoxalinone **5**. (b) Fluorescence emission spectrum of quinoxalinone **2i** (λ_{ex} 366 nm, λ_{em} 475 nm) in PBS 7.4 at 25 °C, before (dashed line) and after (black line) the addition of NaBH₄.



Scheme 4 Application to the preparation of the fluorescently labelled cholesterol derivative **8**.

rescence which might be explained through a singlet–triplet intersystem crossing process²⁷ has never been reported with quinoxalinone derivatives. Besides, it is worth noting that the presence of the methoxy group at the C7 position on the quinoxalinone moiety was critical for fluorescence since the unsubstituted analog was not emissive, which is assumedly ascribed to the absence of a strong push–pull system.

Following this unexpected result, we changed our strategy by taking advantage of the presence of the hydroxyl group to introduce a conjugatable handle which could subsequently be used to attach the sterol. This hydroxyl group thus formed in 98% yield was then used to install a propargyl function required for subsequent click chemistry with the azide partner **7** (Scheme 4). The “clickable” quinoxalinone **6** obtained in 50% yield in the presence of NaH and propargyl bromide was next reacted with cholesterol azide **7** in the presence of CuI and triethylamine in DCM at room temperature. The desired quinoxalinone cholesterol conjugate **8** was formed in convenient 76% yield, and displayed fluorescence properties in line with those of **5** (quantum yield of 0.08 upon an excitation at 366 nm in THF at 25 °C).

Conclusions

In summary, a novel access to benzoylquinoxalin-2(1H)-ones through an unprecedented metal-free oxidative ring contraction of 1,5-benzodiazepin-2-ones is reported. Of significance, this reaction was found to be operationally simple, not sensitive to moisture or oxygen and applicable to electron-rich/electron-deficient phenyl rings. A fluorescent and bioconjugatable quinoxalinone was next prepared and used for the construction of a cholesterol probe displaying suitable optical properties. Finally, this study brings to light the yet unprecedented fluorogenic properties of benzoylquinoxalin-2(1H)-ones that could be leveraged into biological applications.

Experimental

Commercially available reagents were used without further purification. Column chromatography purifications were performed on silica gel (40–63 μm). Thin-layer chromatography (TLC) analyses were carried out on F-254 aluminum sheets. The spots were visualized through illumination with a UV lamp ($\lambda = 254$ or 365 nm) and/or staining with KMnO_4 . Phosphate buffered saline PBS (0.1 M, pH 7.4) was prepared using water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MΩ cm).

Instruments and methods

IR spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory. ¹H and ¹³C NMR spectra (C13APT or C13CPD experiments) were recorded on a 300 MHz spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal: CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$), DMSO-d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.50$, $\delta_{\text{C}} = 39.52$). High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray source and in the positive and negative modes (ESI^{\pm}). UV-visible spectra were obtained using either a rectangular quartz cell (Open Top, 10 × 10 mm, 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies in solution were performed with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light patch base thickness 10 × 4 mm, chamber volume: 1400 μL for the determination of quantum yields, and chamber volume: 3.5 mL for all other studies), with excitation and emission slit widths of 5 nm. Solvents for spectroscopy were spectroscopic grade. Fluorescence quantum yields in 0.1 M PBS pH 7.4 were measured at 25 °C by using a relative method using anthracene ($\Phi_{\text{F}} = 0.27$ in ethanol, $\lambda_{\text{ex}} 366$ nm) as a standard. The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield in solution:

$$\Phi_{\text{F}}(x) = (A_{\text{S}}/A_{\text{X}})(F_{\text{X}}/F_{\text{S}})(n_{\text{X}}/n_{\text{S}})^2 \Phi_{\text{F}}(\text{s})$$

where A is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.333 for aq. H_2SO_4 , 1.407 for THF, and 1.337 for PBS.

Synthesis

Procedures for the synthesis of 1,5-benzodiazepin-2-ones 1a–l and 4. Compounds **1a**,²⁸ **1b**,²⁹ **1d**,²⁸ **1f**,³⁰ **1g**,³¹ **1h**,³² and **1l**³³ were prepared according to known procedures.

4-(2-Methoxyphenyl)-1-methyl-1,5-benzodiazepin-2-one 1c. To a solution of 4-(2-hydroxyphenyl)-1-methyl-1,5-benzodiazepin-2-one²⁷ (266 mg, 1 mmol, 1 equiv.) in anhydrous DMF (5 mL) was added K_2CO_3 (414 mg, 3 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of methyl iodide (494 μL, 8 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was maintained at room temperature overnight. After completion the

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

1 mixture was diluted with 40 mL of AcOEt, and the organic
layers were washed with water (3 × 30 mL). The organic phase
was finally dried over anhydrous MgSO₄, and concentrated
under reduced pressure. The crude material was purified by
5 flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc
from 80 : 20 to 70 : 30) to obtain the desired product (198 mg,
71% yield) as a white solid, mp = 118–120 °C. IR (ATR): ν_{\max} :
1661 (CN), 1595 (CO). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.04 (d,
10 J = 12.0 Hz, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.12 (d, J = 12.0 Hz,
1H), 6.92–6.99 (m, 2H), 7.20–7.29 (m, 3H), 7.35–7.44 (m, 2H),
7.51–7.54 (dd, J = 9.0 and 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz,
CDCl₃): δ = 36.3, 42.9, 55.5, 111.3, 120.9, 121.6, 125, 126.3,
127.7, 128.7, 130.6, 131.9, 135.1, 141.3, 158.2, 164.1,
15 167.7 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for C₁₇H₁₇N₂O₂ [M + H]⁺
281.1234; found 281.1226.

20 *2-(1-Methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-4-yl)*
phenyl acetate 1e. To a solution of 4-(2-hydroxyphenyl)-1-
methyl-1,5-benzodiazepin-2-one²⁸ (1 mmol) in anhydrous THF
(10 mL) at 0 °C was added NaH (60% in mineral oil, 0.044 g,
1.1 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min
before the addition of acetyl chloride (0.106 mL, 1.5 mmol, 1.5
equiv.). The reaction mixture was maintained at room tempera-
25 ture for 2 h, before removing the solvent under reduced
pressure. The crude material was purified by flash column
chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 100 : 0
to 85 : 15) to obtain the desired product (200 mg, 91% yield) as
a white solid, mp = 168–170 °C. IR (ATR): ν_{\max} : 1661 (CN),
1595 (CO), 1610 (CO). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.83 (s,
30 3H), 3.10 (sb, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.96 (sb, 1H), 7.16–7.19 (m,
1H), 7.29–7.43 (m, 6H), 7.92 (d, J = 6.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR
(75 MHz, CDCl₃): δ = 20.4, 34.4, 41.4, 120.9, 122.7, 124.3,
125.3, 125.7, 126.5, 129.2, 130.4, 130.9, 134.3, 140.3, 147.9,
159.2, 165.9, 168.5 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for C₁₈H₁₇N₂O₃
35 [M + H]⁺ 309.1234; found 309.1239.

40 *8-Methoxy-4-(2-methoxyphenyl)-1-methyl-1,5-benzodiazepin-2-*
one 1i. To a solution of 4-(2-hydroxyphenyl)-8-methoxy-1-
methyl-1,5-benzodiazepin-2-one³⁴ (162 mg, 0.55 mmol, 1
equiv.) in anhydrous DMF (3 mL) was added K₂CO₃ (215 mg,
1.68 mmol, 3 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min
before the addition of methyl iodide (272 μ L, 4.4 mmol, 8
equiv.). The reaction mixture was maintained at room tempera-
45 ture overnight. After completion the mixture was diluted with
40 mL of AcOEt, and the organic layers were washed with
water (3 × 30 mL). The organic phase was finally dried over
anhydrous MgSO₄, and concentrated under reduced pressure.
The crude material was purified by flash column chromato-
50 graphy on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 80 : 20 to 70 : 30)
to obtain the desired product (111.5 mg, 65% yield) as a yellow
solid, mp = 68–70 °C. IR (ATR): ν_{\max} : 1663 (CN), 1597 (CO). ¹H
NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.07 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.26
(s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.91 (d, J = 12.0 Hz, 1H),
6.86–7.03 (m, 3H), 7.16 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.38–7.52 (m, 3H)
55 ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.6, 42.7, 55.4, 55.5,
109.6, 111.9, 113.6, 120.3, 123.1, 128, 128.1, 130.2, 131.9,
141.6, 155.8, 157.7, 163.1, 166.0 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for
C₁₈H₁₉N₂O₃ [M + H]⁺ 311.1396; found 311.1390.

1 *1-Methyl-7-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one 1j and*
1-methyl-8-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one 1k. To a solu-
tion containing a mixture of 7- and 8-nitro-4-phenyl-1,5-benzo-
diazepin-2-one³⁵ (500 mg, 1.77 mmol) in anhydrous THF
18 mL) at 0 °C was added NaH (95% in mineral oil, 0.047 g,
5 1.96 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred for 10 to
15 min before the addition of methyl iodide (0.220 mL,
3.56 mmol, 2 equiv.). The reaction mixture was maintained
overnight at room temperature, before removing the solvent
under reduced pressure. The crude material was purified by
flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc
10 from 90 : 10, 80 : 20 to 50/50), allowing the separation of the
two regioisomers **1j** and **1k**. It should be stressed that the posi-
tion of the nitro substituent on the aromatic ring was assigned
retrospectively from the NOESY experiment carried out with
15 quinoxalinone **2j** (cf. the ESI⁺).

20 *1-Methyl-7-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one 1j. 1j*
(126 mg, 24% yield) was obtained as a yellow solid, mp =
198–200 °C. IR (ATR): ν_{\max} : 1671 (CN), 1615 (CO). ¹H NMR
(300 MHz, CDCl₃): δ = 2.98 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.46 (s, 3H),
4.26 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 7.43–7.59 (m, 4H), 8.09–8.17 (m, 3H),
8.24 (d, J = 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =
35.4, 40.1, 117.9, 120, 128.2, 128.2, 129, 132.2, 135.3, 136.5,
145.1, 146.2, 163.3, 165.8 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for
25 C₁₆H₁₄N₃O₃ [M + H]⁺ 296.1022; found 296.1018.

30 *1-Methyl-8-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one 1k. 1k*
(227 mg, 43% yield) was obtained as a yellow solid, mp =
188–190 °C. IR (ATR): ν_{\max} : 1671 (CN), 1576 (CO). ¹H NMR
(300 MHz, CDCl₃): δ = 3.03 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.50 (s, 3H),
4.32 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 7.49–7.63 (m, 4H), 8.15–8.22 (m, 3H),
8.40 (d, J = 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ =
35.6, 39.9, 120.7, 122.5, 123.4, 128, 129, 132, 136.6, 140.2,
141.6, 144.4, 162.7, 165.8 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for
35 C₁₆H₁₄N₃O₃ [M + H]⁺ 296.1022; found 296.1020.

40 *3-Bromo-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one 4*.³⁶ To a solution
of 4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one (500 mg, 2.11 mmol, 1
equiv.) in DMSO (6.3 mL) was added NBS (381 mg, 2.11 mmol,
1 equiv.). The mixture was stirred for 5 h at room temperature.
The solution was diluted with DCM, and successively washed
with a solution of saturated aq. NaHCO₃ and Na₂S₂O₃, then
with brine. The combined phase was washed with brine, dried
over MgSO₄, and evaporated under reduced pressure. The
45 crude material was purified by flash column chromatography
on silica gel (cyclohexane/EtOAc 90 : 10) to obtain the 3-bromo-
4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one **4** (578 mg, 1.8 mmol, 87%)
as a pale yellow solid, mp = 175–177 °C. IR (neat): 3162, 3065,
1675, 1644, 1573, 1480, 1327, 1239. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-
50 *d*₆): δ 11.21 (s, 1H), 8.04 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.68–7.44 (m, 4H),
7.44–7.19 (m, 3H), 6.06 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆):
 δ 162.7, 155.4, 139.1, 136.3, 131.3, 129.1, 128.8, 128.1, 127.6,
127.5, 124.5, 120.5 ppm. HRMS (ESI⁺): calcd for
C₁₅H₁₂N₃O⁷⁹Br [M + H]⁺ 315.0133; found 315.0123 and calcd
for C₁₅H₁₂N₃O⁸¹Br [M + H]⁺ 317.0113; found 317.0108.

55 **General procedure for the synthesis of quinoxalin-2-ones**
2a–l. To a solution of 1,5-benzodiazepin-2-one **1a–l** (0.5 mmol)
in DMSO (1.5 mL) in a flask equipped with a rubber septum

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Paper

Organic & Biomolecular Chemistry

- (with a needle inserted for preventing overpressure), was added *N*-bromosuccinimide (36 mg, 0.2 mmol, 0.4 eq.) at room temperature. Unless stated, the mixture was then heated to 110 °C, and stirred for 6 h if not specified. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (10 mL), a solution of saturated aq. NaHCO₃ (4 mL), and a solution of saturated aq. Na₂S₂O₃ (4 mL). The resulting organic layer was separated, and the aqueous layer was extracted with dichloromethane (3 × 10 mL). The organic layers were combined, washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 100:0 to 50:50) to obtain the desired product.
- 3-Benzoylquinoxalin-2(1H)-one 2a.**³⁷ **2a** (65 mg, 0.26 mmol, 52%) was obtained as a yellow solid, mp = 258–260 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.35–7.43 (m, 2H), 7.55–7.60 (m, 2H), 7.63–7.68 (m, 1H), 7.71–7.77 (m, 1H), 7.82–7.85 (dd, *J* = 9.0 and 3.0 Hz, 1H), 7.96–7.99 (m, 2H), 12.87 (s, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 115.9, 123.8, 129, 129.1, 129.7, 131.2, 131.7, 132.7, 134.6, 134.8, 153.4, 158.3, 192.4 ppm.
- 3-Benzoyl-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 2b.**³⁸ The reaction was stirred at 110 °C for 12 h. **2b** (74 mg, 0.28 mmol, 55%) was obtained as a yellow solid, mp = 155–157 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1670 (CO), 1650 (CN), 1590 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.68 (s, 3H), 7.46 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.55–7.60 (m, 2H), 7.68–7.77 (m, 3H), 7.89 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29, 115.2, 123.9, 129, 129.7, 129.9, 131.7, 132, 133.9, 134.4, 134.6, 152.8, 154.8, 192.2 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₆H₁₃N₂O₂ [M + H]⁺ 265.0977; found 265.0977.
- 3-(2-Methoxybenzoyl)-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 2c.**³⁹ The reaction was stirred at 110 °C for 12 h. **2c** (96 mg, 0.33 mmol, 65%) was obtained as a white solid, mp = 173–175 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1659 (CO), 1645 (CN), 1590 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.51 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 7.14–7.19 (m, 2H), 7.42 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.65–7.73 (m, 3H), 7.81–7.94 (m, 2H), ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 28.8, 56.3, 113.3, 115.1, 121.2, 123.8, 124.4, 129.5, 129.9, 131.3, 131.6, 133.4, 136.3, 152.7, 157.1, 160, 190.7 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₇H₁₅N₂O₃ [M + H]⁺ 295.1083; found 295.1082.
- 2-(4-Methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxaline-2-carbonyl)phenyl acetate 2e.** The reaction was stirred at 130 °C for 12 h. **2e** (72 mg, 0.22 mmol, 45%) was obtained as a white solid, mp = 148–150 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1660 (CO), 1626 (CN), 1604 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.84 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 7.28–7.31 (dd, *J* = 6.0 and *J* = 3.0 Hz, 1H), 7.44–7.49 (m, 2H), 7.68–7.80 (m, 3H), 7.85–7.88 (dd, *J* = 6.0 and 3.0 Hz, 1H), 7.95–7.98 (dd, *J* = 6.0 and 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 20.2, 28.9, 115.2, 124.2, 124.3, 126.5, 128, 129.9, 131.3, 131.6, 132.2, 133.7, 135.3, 150, 152.6, 155, 168.3, 190.3 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₈H₁₅N₂O₄ [M + H]⁺ 323.1032; found 323.1032.
- 3-(4-Nitrobenzoyl)quinoxalin-2(1H)-one 2f.**⁴⁰ **2f** (90 mg, 0.30 mmol, 61%) was obtained as a yellow solid, mp = 292 °C (decomposition). IR (ATR): ν_{max}: 2834, 1698, 1652, 1604, 1510, 1349. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.36–7.43 (m, 2H), 7.68 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.36 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 12.95 (s, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 115.9, 123.8, 123.9, 129.2, 131.0, 131.2, 132.2, 132.9, 139.1, 150.5, 153.3, 154.7, 191.2. HRMS (ESI+): calcd for C₁₅H₁₀N₃O₄ [M + H]⁺ 296.0671; found 296.0668.
- Mixture of 3-benzoyl-6-methylquinoxalin-2(1H)-one and 3-benzoyl-7-methylquinoxalin-2(1H)-one 2g.** **2g** (93 mg, 0.35 mmol, 67%) was obtained as a yellow solid as an inseparable mixture of regioisomers in a 0.54:1 ratio. IR (ATR): ν_{max}: 2843 (NH), 1694 (CO), 1650 (CN), 1616 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.39 (s, 3H), 2.45 (s, 1.64H), 7.18–7.32 (m, 2.85H), 7.47–7.64 (m, 5.6H), 7.70–7.76 (m, 2.3H), 7.94–7.97 (m, 2.23H), 12.81 (s, 1.64H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 20.8, 21.9, 115.9, 116.1, 125.7, 129.1, 129.3, 129.5, 130, 130.1, 130.9, 131.6, 133.1, 133.5, 133.7, 135, 135.1, 135.2, 142.8, 153.8, 154, 193.0 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₆H₁₃N₂O₂ [M + H]⁺ 265.0977; found 265.0967.
- 3-Benzoyl-7-methoxyquinoxalin-2(1H)-one 2h.** **2h** (82 mg, 0.29 mmol, 59%) was obtained as a yellow solid, mp = 206–208 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1683, 1651, 1495, 1372, 1289. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.79 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.73 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.36–7.29 (m, 3H), 3.81 (s, 3H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 55.6, 110.2, 116.7, 121.2, 126.8, 128.9, 129.5, 131.8, 134.4, 134.5, 152.9, 155.6, 156.3, 192.4 ppm. HRMS (ESI-): calcd for C₁₆H₁₁N₂O₃ [M - H]⁻ 279.0770; found 279.0769.
- 7-Methoxy-3-(2-methoxybenzoyl)-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 2i.** **2i** (66 mg, 0.20 mmol, 40%) was obtained as a yellow solid, mp = 178–180 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1766 (CO), 1643 (CN), 1519 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.45 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 7.07–7.12 (m, 2H), 7.25–7.30 (m, 2H), 7.52–7.64 (m, 2H), 7.83–7.86 (dd, *J* = 6.0 and 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29.5, 55.6, 56.3, 111.4, 113.2, 116, 119.9, 121.2, 124.5, 127.6, 129.9, 132.5, 136.2, 152.3, 155.6, 157.5, 160, 190.8 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₈H₁₇N₂O₄ [M + H]⁺ 325.1188; found 325.1196.
- 3-Benzoyl-1-methyl-6-nitroquinoxalin-2(1H)-one 2j.** **2j** (128 mg, 0.41 mmol, 82%) was obtained as a yellow solid, mp = 268–270 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1702 (CO), 1678 (CN), 1658 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.71 (s, 3H), 7.56–7.61 (m, 2H), 7.74–7.79 (m, 1H), 7.89 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 8.01–8.05 (m, 2H), 8.51–8.61 (m, 2H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29.6, 116.6, 125, 125.9, 129, 129.8, 130.8, 134, 134.9, 138.9, 142.8, 152.9, 157.0, 191.4 ppm. HRMS (ESI+): calcd for C₁₆H₁₂N₃O₄ [M + H]⁺ 310.0828; found 310.0822.
- 3-Benzoyl-1-methyl-7-nitroquinoxalin-2(1H)-one 2k.** **2k** (115 mg, 0.37 mmol, 74%) was obtained as a yellow solid, mp = 193–195 °C. IR (ATR): ν_{max}: 1679 (CO), 1649 (CN), 1594 (CO). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3.75 (s, 3H), 7.56–7.61 (m, 2H), 7.74–7.79 (m, 1H), 8.01–8.24 (m, 4H), 8.42 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 29.4, 110.8, 118, 129, 129.8, 131.2, 133.9, 134.6, 135, 135.1, 148.4, 152.7, 158.2,

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

1 191.6 ppm. HRMS (ESI+): calcd for $C_{16}H_{12}N_3O_4$ $[M + H]^+$ 310.0828; found 310.0829.

Procedures for the synthesis of the quinoxalinone-cholesterol conjugate 8

5 *3-(Hydroxy(2-methoxyphenyl)methyl)-7-methoxy-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 5*. To a solution of **2i** (33 mg, 0.1 mmol) in MeOH (5 ml) was added $NaBH_4$ (4.5 mg, 0.12 mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min, before removing the solvent under reduced pressure. Thereafter, the crude mixture was washed with Et_2O to obtain the desired product (32 mg, 0.098 mmol, 98%) as a yellow solid, mp = 223–225 °C. IR (ATR): ν_{max} : 3415(H), 1653(CN), 1597 (CO). 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.61 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 5.66 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.89–6.95 (m, 2H), 7.25–7.32 (m, 3H), 7.37 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 6.0 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 29, 55.5, 55.6, 65.2, 110.8, 111, 115.7, 118.9, 120, 127.4, 127.5, 128.2, 130.3, 132.3, 152.9, 155.4, 156.2, 160.6 ppm. HRMS (ESI+): calcd for $C_{18}H_{19}N_2O_4$ $[M + H]^+$ 327.1345; found 327.1344.

20 *7-Methoxy-3-((2-methoxyphenyl)(prop-2-yn-1-yl)oxy)methyl-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 6*. To a solution of **5** (32 mg, 0.1 mmol) in DMF (2 ml) was added NaH (3 mg, 1.2 eq.) at room temperature. After stirring the mixture for 10 min, propargyl bromide (9 μ l, 0.12 mmol, 1.2 eq.) was added and the reaction was heated at 60 °C for 6 h. Thereafter, the crude mixture was extracted with water/dichloromethane, before removing the solvent under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 100:0 to 50:50) to obtain the desired product **6** (19 mg, 0.5 mmol, 50%) as a yellow solid, mp = 171–173 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.41 (s, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 4.27 (s, 2H), 6.45 (s, 1H), 6.93–7.02 (m, 2H), 7.25–7.30 (m, 4H), 8.49 (d, J = 6.0 Hz, 1H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 29.0, 55.6, 56.9, 71.7, 77.2, 80.3, 111.1, 115.7, 119.5, 120.1, 126.5, 127.3, 127.8, 129.1, 132.4, 153, 155.4, 156.8, 157.7 ppm. HRMS (ESI+): calcd for $C_{21}H_{21}N_2O_4$ $[M + H]^+$ 365.1501; found 365.1512.

40 *3-(((1-(2-Cholesterolethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)(2-methoxyphenyl)methyl)-7-methoxy-1-methylquinoxalin-2(1H)-one 8*. To a mixture of compound **6** (18 mg, 0.05 mmol) and cholesterol azide **7**⁴¹ (35 mg, 0.075 mmol, 1.5 eq.) in DCM (5 mL) were added CuI (2 mg, 0.005 mmol, 0.1 eq.) and Et_3N (10 μ l, 0.075 mmol, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The crude reaction was filtered through Celite®, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 100:0 to 50:50) to obtain the desired product **8** (31 mg, 0.038 mmol, 76% yield) as a yellow solid, mp = 160–162 °C. 1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.84–1.49 (m, 30H), 1.74–2.24 (m, 11H), 3.61 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.46 (s, 2H), 4.59–4.68 (m, 2H), 6.42 (s, 1H), 6.94–7.01 (m, 2H), 7.23–7.39 (m, 4H), 7.48 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 18.5, 18.9, 20.5, 22.3, 22.6, 23.2, 23.8, 27.4, 27.7, 27.8, 29, 31.3, 31.3, 35.1, 35.6, 36.1, 45.7,

49.5, 49.7, 55.5, 55.6, 56.1, 63.1, 65.6, 65.7, 72.3, 78.3, 78.4, 111, 111.2, 115.7, 119.4, 120.1, 121.1, 123.7, 124.4, 126.9, 127.3, 127.7, 128.8, 132.4, 140.2, 143.7, 153.1, 155.4, 156.7, 158.1 ppm. HRMS (ESI+): calcd for $C_{50}H_{70}N_5O_5$ $[M + H]^+$ 820.5394; found 820.5393.

Fluorescence turn-on of quinoxalinone 2i. To a 20 μ M solution of the quinoxalinone **2i** in 3 mL of PBS buffer (0.1 M pH 7.4) in a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 \times 4 mm, Chamber volume 3.5 mL) was added $NaBH_4$ (2.34 mg, 10 eq.). Emission spectra (upon an excitation at 366 nm in PBS 7.4 at 25 °C) were recorded before and after the addition of $NaBH_4$.

Acknowledgements

We thank the Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN0001401) for financial support to K. R. This work was also partially supported by Rouen University, INSA Rouen, Rouen University, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029). The authors are grateful to Mrs Amna Benzarti and Miss Nadia Msaddek, NMR service at the Faculty of Monastir, University of Monastir for the NMR analysis and to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia for financial support (LR11ES39). The authors also thank Albert Marcual (CNRS) for HRMS analyses and Patricia Martel (University of Rouen-Normandie) for IR analyses.

Notes and references

- (a) Y. Ramli, H. Benzeid, R. Bouhfid, Y. K. Rodi, S. Ferfra and E. M. Essassi, *Synthesis, reactivity and biological activity of quinoxalin-2-one derivatives*, St. Cerc. St. CICBIA, 2010, p. 11; (b) L. Shi, H. Zhou, J. Wu and X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2015, **12**, 96–112; (c) J. A. Pereira, A. M. Pessoa, M. N. D. S. Cordeiro, R. Fernandes, C. Prudêncio, J. P. Noronha and M. Vieira, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 664.
- S. A. Galal, S. H. M. Khairat, F. A. F. Ragab, A. S. Abdelsamie, M. M. Ali, S. M. Soliman, J. Mortier, G. Wolber and H. El Diwani, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **86**, 122–132.
- D. A. E. Issa, N. S. Habib, A. E. Abdel and A. E. Abdel Wahab, *MedChemComm*, 2015, **6**, 202–211.
- J. A. Willardsen, D. A. Dudley, W. L. Cody, L. Chi, T. B. McClanahan, T. E. Mertz, R. E. Potoczak, L. S. Narasimhan, D. R. Holland, S. T. Rapundalo and J. J. Edmunds, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 4089–4099.
- M. Weiwer, J. Spoonamore, J. Wei, B. Guichard, N. T. Ross, K. Masson, W. Silkworth, S. Dandapani, M. Palmer, C. A. Scherer, A. M. Stern, S. L. Schreiber and B. Munoz, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 1034–1038.
- C.-L. Tung and C.-M. Sun, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 1159–1162.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Paper

Organic & Biomolecular Chemistry

- 1 7 Y. Kobayashi, M. Kuroda, N. Toba, M. Okada, R. Tanaka and T. Kimachi, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 6280–6283.
- 8 (a) N. Udilova, A. V. Kozlov, W. Bieberschulte, K. Frei, K. Ehrenberger and H. Nohl, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 59–65; (b) Y. Kobayashi, Y. Suzuki, T. Ogata, T. Kimachi and Y. Takemoto, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 3299–3301; (c) H. Nohl, W. Bieberschulte, B. Dietrich, N. Udilova and A. V. Kozlova, *Biofactors*, 2003, **19**, 79–85.
- 5 9 S. Piras, M. Logira, A. Carta, G. Paglietti, M. P. Costi and S. Ferrari, *J. Heterocycl. Chem.*, 2006, **43**, 541–548.
- 10 (a) V. A. Mamedov, N. A. Zhukova, T. N. Beschastnova, V. V. Syakaev, D. B. Krivolapov, E. V. Mironova, A. I. Zamaletdinova, I. Kh. Rizvanov and S. K. Latypov, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 1375–1386; (b) V. A. Mamedov, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 42132.
- 15 11 Z. Kucybała and J. Pączkowski, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1999, **128**, 135–138.
- 12 (a) M. Yamaguchi, T. Iwata, K. Inoue, S. Hara and M. Nakamura, *Analyst*, 1990, **115**, 1363–1366; (b) T. Iwata, T. Hirose, M. Nakamura and M. Yamaguchi, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.*, 1994, **654**, 171–176; (c) A. Katoh, T. Yoshida and J. Ohkanda, *Heterocycles*, 2000, **52**, 911–919; (d) K. Azuma, S. Suzuki, S. Uchiyama, T. Kajiro, T. Santa and K. Imai, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 443–449; (e) H. Hideo Honda, Y. Shibusawa, J. Taniguchi, H. Matsuda, M. Kondod, K. Kumasaka, T. Miwa, Y. Notoya and H. Shindo, *Vasc. Pharmacol.*, 2005, **42**, 163–169; (f) Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K. Sakai and T. Akutagawa, *J. Phys. Chem. A*, 2015, **119**, 6223–6231.
- 20 13 J. Gris, R. Glisoni, L. Fabian, B. Fernández and A. G. Moglioni, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 1053–1056.
- 14 (a) O. Hinsberg, *Liebigs Ann. Chem.*, 1887, **237**, 1228; (b) O. Hinsberg, *Liebigs Ann. Chem.*, 1887, **237**, 327; (c) O. Hinsberg, *Liebigs Ann. Chem.*, 1896, **292**, 245.
- 25 15 (a) N. J. P. Subhashini and P. Hanumanthu, *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 1987, **26**, 32–35; (b) S.-L. Wang, J. Ding, B. Jiang, Y. Gao and S.-J. Tu, *ACS Comb. Sci.*, 2011, **13**, 572–577; (c) S. Gräßle, S. Vanderheiden, P. Hodapp, B. Bulat, M. Nieger, N. Jung and S. Bräse, *Org. Lett.*, 2016, **18**, 3598–3601.
- 30 16 (a) D. Chen and W. Bao, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, **352**, 955–960; (b) D. Chen, Z.-J. Wang and W. Bao, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 5768–5771.
- 35 17 (a) D. Li, H. Ma and W. Yu, *Adv. Synth. Catal.*, 2015, **357**, 3696–3702; (b) T. Yang, H. Zhu and W. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 3376–3384.
- 40 18 R. Chebolu, A. Bahuguna, R. Sharma, V. K. Mishra and P. C. Ravikumar, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 15438.
- 45 19 G. Vernin, H. Domlog, H. C. Siv, J. Metzger and A. K. El-Shafei, *J. Heterocycl. Chem.*, 1981, **18**, 85–89.
- 50 20 [1,3] sigmatropic rearrangement of benzodiazepin-2-ones into benzimidazolones has been scarcely reported: (a) R. Achour, E. M. Essassi and R. Zniber, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 195–198; (b) R. Pennini, A. Cerri, A. Tajana, D. Nardi and F. Giordano, *J. Heterocycl. Chem.*, 1988, **25**, 305–310; (c) M. Benchidmi and E. M. Essassi, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1991, **100**, 31–32; (d) V. A. Mamedov, A. M. Murtazina, N. A. Zhukova, T. N. Beschastnova, I. K. Rizvanov and S. K. Latypov, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 7567–7576.
- 5 21 Y.-F. Liang, K. Wu, S. Song, X. Li, X. Huang and N. Jiao, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 876–879.
- 22 E. Schipper, M. Cinnamon, L. Rascher, Y. H. Chiang and W. Oroshnik, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 6201–6204.
- 23 N. Kornblum, J. W. Powers, G. J. Anderson, W. J. Jones, H. O. Larson, O. Levand and W. M. Weaver, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 6562.
- 24 Since the reaction could be carried out indifferently in dry or wet DMSO without affecting the yield, the substitution of the bromide in **1a** by DMSO appeared to be the preferred pathway over its substitution by a water molecule.
- 15 25 (a) T. L. Fletcher and H.-L. Pan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 4812; (b) M. B. Floyd, M. T. Du, P. F. Fabio, L. A. Jacob and B. D. Johnson, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 5022–5027.
- 20 26 (a) F. Maxfield and D. Wüstner, *Methods Cell Biol.*, 2012, **108**, 367–393; (b) S. Milles, T. Meyer, H. A. Scheidt, R. Shwarzer, L. Thomas, M. Marek, L. Szenté, R. Bittman, A. Herrmann, T. G. Pomorski, D. Huster and P. Müller, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1828**, 1822–1828; (c) A. L. McIntosh, H. Huang, B. P. Atshaves, S. M. Storey, A. M. Gallegos, T. A. Spencer, R. Bittman, Y. Ohno-Iwashita, A. B. Kier and F. Schroeder, *Fluorescent Sterols for the Study of Cholesterol Trafficking in Living Cells*, Wiley-VCH GmbH & KGaA, 2008, pp. 1–33.
- 25 27 M. K. Froemming and D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 14518–14522.
- 30 28 H. Mtiraoui, R. Gharbi, M. Msaddek, Y. Bretonnière, C. Andraud, C. Sabot and P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 4720–4727.
- 35 29 X. Chen, Y. Zheng, C. Shu, W. Yuan, B. Liu and X. Zhang, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 9109–9115.
- 40 30 M. Rueping, E. Merino and R. M. Koenigs, *Adv. Synth. Catal.*, 2010, **352**, 2629–2634.
- 45 31 T. J. Woltering, J. Wichmann, E. Goetschi, F. Knoflach, T. M. Ballard, J. Huwyler and S. Gatti, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 6969–6974.
- 50 32 A. A. Gaponov, E. T. Zlenko, S. V. Shishkina, O. V. Shishkin, O. M. Antypenko, S. V. Tretyakov and V. A. Palchikov, *Med. Chem. Res.*, 2016, **25**, 1768–1780.
- 55 33 A. Shaabani, Z. Hezarkhani, H. Mofakham and S. W. Ng, *Synlett*, 2013, 1485–1492.
- 34 H. Mtiraoui, R. Gharbi, M. Msaddek, Y. Bretonnière, C. Andraud, P.-Y. Renard and C. Sabot, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 86352–86360.
- 35 K. Bougrin, A. K. Bennaoui, S. F. Tétouani and M. Soufiaoui, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 8373–8376.
- 36 R. Achour, E. M. Essassi, M. Salem and R. Zniber, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1989, **98**, 405–412.
- 37 V. A. Mamedov, A. A. Kalinin, A. T. Gubaidullin, I. Kh. Rizvanov, A. V. Chernova, G. M. Doroshkina, I. A. Litvinov and Ya. A. Levin, *Zh. Org. Khim.*, 2003, **39**, 141.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

	Organic & Biomolecular Chemistry		Paper
1	38 V. A. Mamedov, A. A. Kalinin, A. T. Gubaidullin, A. V. Chernova, I. A. Litvinov, Ya. A. Levin and R. R. Shagidullin, <i>Russ. Chem. Bull., Int. Ed.</i> , 2004, 53 , 164–175.	40 E. A. Gorbunova and V. A. Mamedov, <i>Russ. J. Org. Chem.</i> , 2006, 42 , 1528–1531.	1
5	39 N. Vinot, C. Bellec and P. Maitte, <i>J. Heterocycl. Chem.</i> , 1983, 20 , 1645–1649.	41 I. A. Nikolaeva, A. Y. Misharin, G. V. Ponomarev, V. P. Timofeev and Y. V. Tkachev, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2010, 20 , 2872–2875.	5
10			10
15			15
20			20
25			25
30			30
35			35
40			40
45			45
50			50
55			55



Cite this: DOI: 10.1039/c7ob90126g

Correction: Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones†

Hasan Mтираoui,‡^a Kevin Renault,‡^b Morgane Sanselme,^{c,d} Moncef Msaddek,^{*a} Pierre-Yves Renard^b and Cyrille Sabot^{*b}

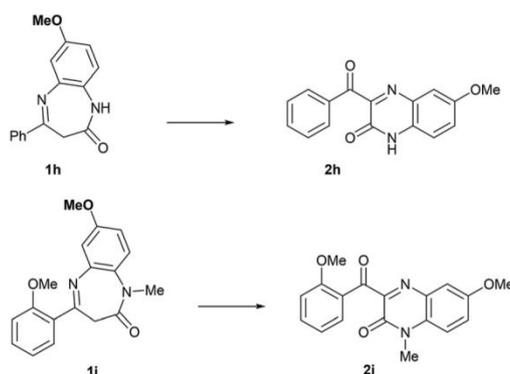
DOI: 10.1039/c7ob90126g

rsc.li/obc

Correction for 'Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones' by Hasan Mтираoui, *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 3060–3068.

The authors regret that there were errors in some of the structures. The reactions to obtain compounds **2h** and **2i** were in fact carried out from 7-methoxy-benzodiazepinones **1h** and **1i**, and not from the regioisomer 8-methoxy-benzodiazepinones as reported. Consequently, the 6-methoxyquinoxalinones **2h** and **2i** were formed (and not the regioisomer 7-methoxyquinoxalinones). Subsequent compounds **5**, **6** and **8** (Fig. 2, and Scheme 4) prepared from **2i** should be modified accordingly.

The correct structures and corrected Fig. 2 and Scheme 4 are shown below.



^aUniversité Monastir, Laboratory of Heterocyclic Chemistry Natural Products and Reactivity/CHPNR, Department of Chemistry, Faculty of Science of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia

^bNormandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, France. E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr

^cNormandie Univ, France

^dUNIROUEN, Laboratoire SMS EA3233, 1 rue Tesnière, France, F-76821 Mont Saint Aignan, France

†Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C NMR, 2D NMR data in support of the formation of 6-methoxyquinoxalinones **2h** and **2i**, photo-physical data for all new compounds, and X-ray crystallographic data (CIF files) for compound **2a**. CCDC 1519664. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7ob00205j

‡These authors contributed equally to this work.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Correction

Organic & Biomolecular Chemistry

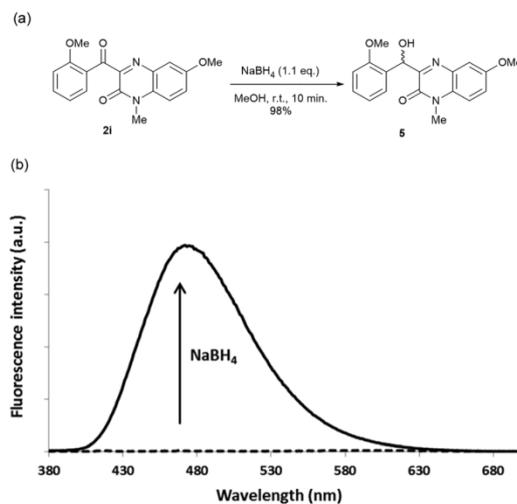
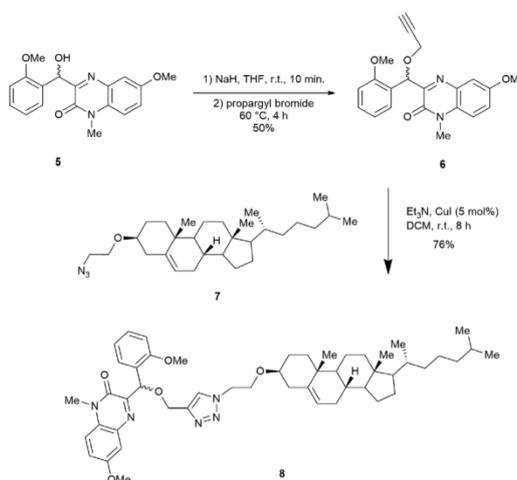


Fig. 2 (a) Preparation of the hydroxyl-containing quinoxalinone 5. (b) Fluorescence emission spectrum of quinoxalinone 2i (λ_{ex} 366 nm, λ_{em} 475 nm) in PBS 7.4 at 25 °C, before (dashed line) and after (black line) the addition of NaBH₄.



Scheme 4 Application to the preparation of the fluorescently labelled cholesterol derivative 8.

In addition, compounds 2h, 2i, 5, 6 and 8 were named incorrectly in the Experimental section and should also be amended accordingly.

The original ESI has been updated with a corrected version showing the corrected structures and including 2D NMR data in support of the formation of 6-methoxyquinoxalinones 2h and 2i.

The Royal Society of Chemistry apologises for these errors and any consequent inconvenience to authors and readers.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

En plus des résultats présents dans l'article 4, la viabilité de notre méthodologie a été testée sur des dérivés de benzodiazépin-2-ones présentant en position 1 d'autres groupements qu'un hydrogène ou méthyle. La benzodiazépin-2-one **147A** portant une fonction nitro en position 8 fut choisie pour diversification, suite au bon rendement (74%) obtenu lors de la contraction de cycle. Ainsi, l'incorporation d'un groupement benzyle ou ester éthylique a pu être réalisé, conduisant à la formation des composés **149** et **151** avec des rendements respectifs de 48 et 61%. Ces composés ont ensuite été utilisés pour la synthèse de quinoxalin-2(1H)-ones *via* la réaction de contraction de cycle développée dans le cadre de l'article 4. Toutefois, une faible diminution des rendements a été observée puisque l'on obtient respectivement 48 et 51% de rendement pour les composés **150** et **152**. Cependant, la réaction avec le dérivé **153** comportant une fonction ester de *tert*-butyle a échoué, probablement suite à une réaction d'hydrolyse de l'ester en présence du bromure d'hydrogène généré au cours de la réaction (Schéma 112). En conclusion, cette étude montre qu'une fonction ester est compatible avec les conditions de synthèse de la quinoxalinone. Cet ester, une fois hydrolysé, pourrait servir de point d'ancrage dans l'optique de la préparation de photomarqueurs d'affinité fluorogéniques fonctionnalisables, étude qui sera abordée par la suite (*cf.* partie 2.5, pages 203).

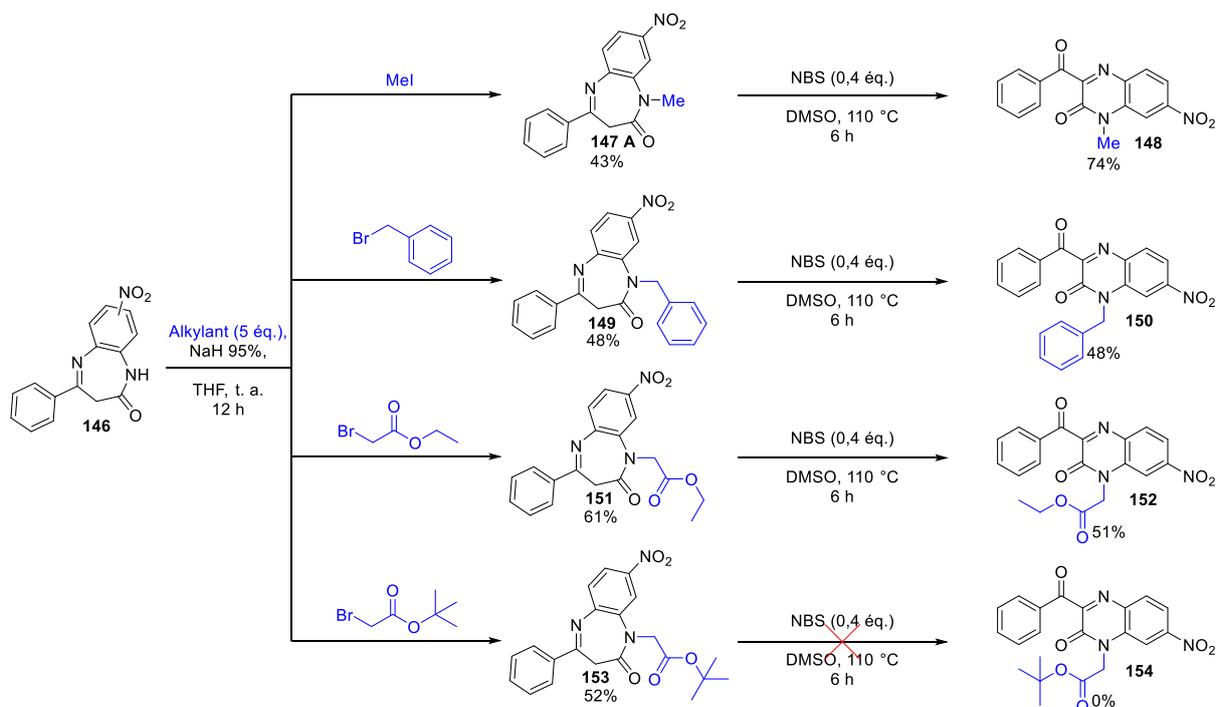


Schéma 112 : Synthèse de dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones substituées en position 1 par contraction de cycle

Disposant d'un certain nombre de quinoxalin-2(1H)-ones en main, leurs propriétés photophysiques ont été examinées en détail par la suite.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

2. Développement de nouvelles quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes et application à la détection *in vitro* du sulfure d'hydrogène

2.1. Présentation de la stratégie de synthèse mise en œuvre

La synthèse des quinoxalin-2(1H)-ones par contraction de cycle oxydative nous a permis de mettre en évidence qu'il était nécessaire de réduire la fonction cétone en alcool correspondant afin d'avoir un composé fluorescent. En effet, il semblerait que la non fluorescence des dérivés cétones soit due à un croisement intersystème, faisant passer le composé d'un état excité singulet à un état triplet. (Schéma 113), cette propriété sera étudiée plus en détails au paragraphe 2.4 (page 196).

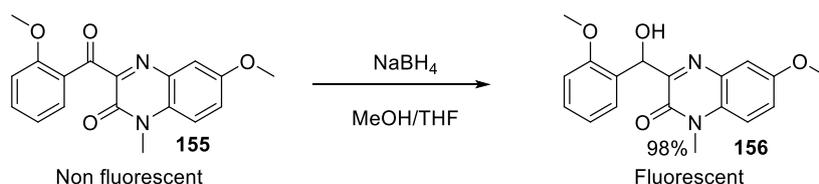


Schéma 113 : Synthèse d'une quinoxalin-2(1H)-one fluorescente

Dans cette étude différentes quinoxalinones ont été synthétisées afin d'obtenir une corrélation entre leur structure et leurs propriétés photophysiques. De plus, l'incorporation d'un groupement électrodonneur en position 7 du noyau quinoxalin-2(1H)-one, pourrait permettre d'augmenter significativement les propriétés de fluorescence, à l'instar de ce qui est observé avec les coumarines par exemple. L'incorporation d'une fonction amine a été réalisée par réduction du dérivé nitro **148** obtenu lors de l'étude précédente en amine correspondante.

De ces travaux, trois dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones fluorescents ont été obtenus et étudiés. Ainsi, il a été possible de comprendre l'impact des différents substituants et de leurs positions sur les propriétés photophysiques des quinoxalin-2(1H)-ones. (Schéma 114)

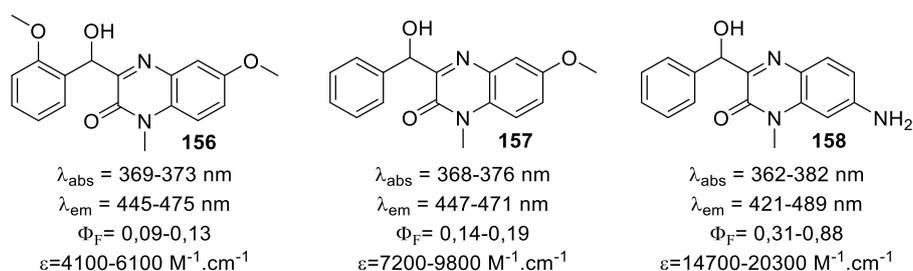


Schéma 114 : Structure des fluorophores obtenus de type de quinoxalin-2(1H)-one

Ainsi le dérivé 7-amino-quinoxalin-2(1H)-one **158** présentant des valeurs de rendements quantiques inédites pour ce type de composé, a été utilisé dans l'élaboration d'une sonde pro-fluorescente pour la détection sélective du sulfure d'hydrogène (Schéma 115) ; tout cela, avec un facteur d'exaltation de fluorescence de 72, ce qui permet une limite de détection de 1,30 μM .

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

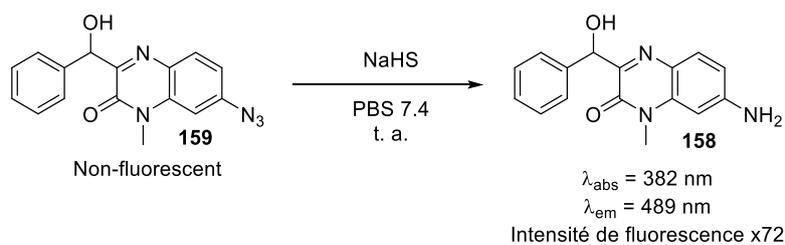


Schéma 115 : Sonde profluorescente pour la détection spécifique du sulfure d'hydrogène étudiée

Ces travaux sur l'étude des propriétés photophysique des quinoxalin-2(1H)-ones ont fait l'objet d'une publication dans le journal *New Journal of Chemistry* en 2017 (Kévin Renault, Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot *New J Chem* **2017** 41, 10432 – 10437).

2.2. Article 5 : Photophysical properties of quinoxalin-2(1H)-ones: application in the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection of hydrogen sulfide



1 NJC

5 PAPER

10 **Photophysical properties of quinoxalin-2(1H)-ones: application in the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection of hydrogen sulfide†**

Q1

15 Cite this: DOI: 10.1039/c7nj01893b

15 Kévin Renault, Pierre-Yves Renard and Cyrille Sabot *

20 Received 29th May 2017,
Accepted 28th July 2017

20 DOI: 10.1039/c7nj01893b

20 rsc.li/njc

20 Quinoxalinones are widely exploited for their biological activities, but more rarely for their fluorescence behavior, partly due to a lack of data. Herein, we investigated the photophysical properties of selected 3-benzoylquinoxalin-2-ones and their NaBH₄-reduced products, obtained by the rearrangement of benzodiazepin-2-ones. To illustrate their potential, a quinoxalinone-based chemoprobe for the specific detection of hydrogen sulfide was investigated.

25 **Introduction**

25 The quinoxalin-2-one framework is a privileged scaffold in medicinal chemistry, known to have an extremely wide spectrum of biological activities including, amongst others, anti-cancer,¹ anti-inflammatory,² antioxidant,³ and antimicrobial⁴ activities. Of note, the quinoxalin-2-one pharmacophore is also regularly found in pharmaceuticals or in bioactive molecules that have entered clinical trials.⁵

30 In contrast, the photophysical properties of quinoxalin-2-ones have been scarcely reported, and their use as fluorescent dyes remains largely underexplored in particular in comparison to their oxygenated homologue coumarin.^{6–8} In early reports, quinoxalinone derivatives were used as fluorescence derivatization reagents for the fluorometric detection of carboxylic acid,^{9–11} amine,¹² or conjugated diene-containing¹³ bioactive substances. More recently, quinoxalinones capable of tautomerization were reported to exhibit excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) activity.^{14,15} This photochemical process was utilized for the construction of cation-anion-dual sensors. The quinoxalinone core was also involved in the design of fluorescent probes for monitoring biological events such as enzymatic digestion¹⁶ or interactions between membrane peptides and marine polycyclic ether metabolites.¹⁷ Besides, we recently reported a novel access to 3-benzoylquinoxalinones by the rearrangement of benzodiazepin-2-ones, a methodology which was illustrated by the preparation of a quinoxalinone-labelled cholesterol probe suitable for bioimaging applications.¹⁸ The surprising lack of data regarding the optical

25 behavior of these derivatives convinced us to examine this point in more detail in the present article. Thus, the preparation of a small collection of 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones and their NaBH₄-reduced products, with modifications at the C7 position (OMe, NH₂, N₃), are reported, and their corresponding photophysical properties fully determined. Then, to illustrate their potent utility, a quinoxalinone-based fluorogenic probe for the specific detection of hydrogen sulfide was also prepared.

35 **Results and discussion**

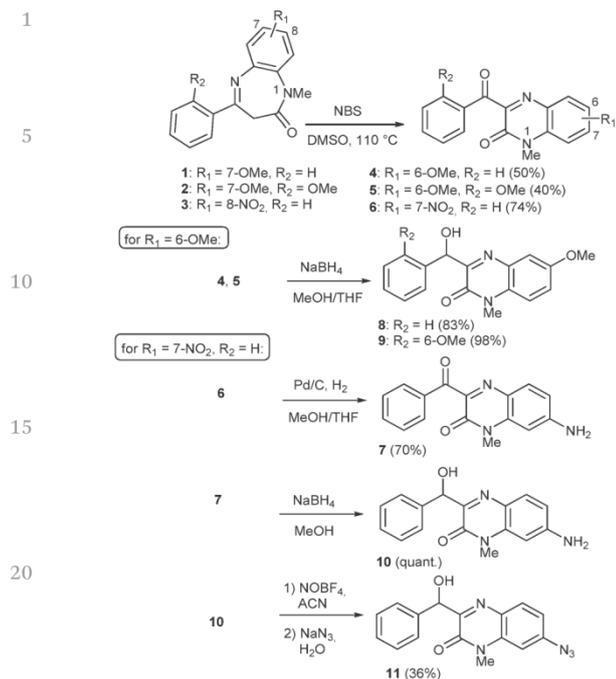
35 First, benzodiazepines **1–3** were readily prepared from *o*-phenylenediamines and α -keto esters using the reported conditions (Scheme 1).^{18,19}

40 Their subsequent ring contraction carried out in the presence of NBS in DMSO afforded the corresponding 3-benzoylquinoxalinones **4–6** in 40–74% yields. Catalytic hydrogenation of **6** in the presence of Pd/C delivered the 7-amino derivative **7** in good 70% yield. Then, reduction of ketones **4–7** with NaBH₄ furnished benzylic alcohols **8–10** in high 83–100% yields. The azido moiety at the C7 position was installed by treating compound **10** successively by nitrosonium tetrafluoroborate and sodium azide, affording **11** albeit in a low 36% yield.

45 The spectroscopic behavior of compounds **4–11** was measured and is collected in Table 1. Benzoyl quinoxalinones **5–7** were not fluorescent in all solvents investigated (THF, DMSO, EtOH, PBS 7.4), whereas compound **4** was slightly emissive in DCM (0.05), DMSO (0.08) and EtOH (0.04), upon excitation at 366 nm. Accordingly, the presence of the methoxy group on the phenyl ring resulted in a complete loss of fluorescence emission (compound **5**). Interestingly, this phenomenon is reversed in the solid state since the benzoyl quinoxalinone **5** was the

55 *Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, France. E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr*

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7nj01893b



Scheme 1 Preparation of quinoxalinones 4–11.

only fluorescent material (Fig. 1). The presence of the methoxy substituent on the phenyl ring may somehow impact molecular packing and molecule conformation, favoring thus, a radiative de-excitation process in the solid state.²⁰

NaBH₄-reduced products 8–10 were all fluorescent, but at varying degrees. Quinoxalinones 8 and 9, both substituted at the C6 position with a methoxy group, exhibited fluorescence at 445–475 nm upon excitation at 366 nm, and acceptable quantum yields of 0.11–0.19. Increasing the electron donating ability in position 7 resulted in a marked increase in fluorescence emission. In fact, the amino derivative 10 displayed generally high quantum yields (0.31–0.88), with absorption and emission maxima in the range of 362–380 nm and 421–489 nm, respectively, and large Stokes' shifts (up to 119 nm). The quantum yield of 0.88 obtained in DMSO is, to the best of our knowledge, the highest value reported for quinoxalinones. Moreover, quantum yields remain high in aqueous media such as water (0.65) or PBS buffer (0.60), which is important from the perspective of monitoring biological events or bioanalytes. Whilst the absorption spectrum displays minor change with increasing polarity of solvents, a bathochromic shift (up to 68 nm) of the fluorescence emission spectrum is observed (Fig. 2). However, emission wavelength in cyclohexane was higher than those observed in more polar solvents (such as MeCN or DMSO) which can be rationalized by the presence of aggregates. In fact, the excitation is slightly red-shifted relative to the absorption suggesting the formation of aggregates in cyclohexane (see the ESI†).²¹ Finally, the pH-dependent fluorescence of 10 was investigated. Satisfyingly, no significant loss of intensity was observed for pH ranging from 4.5 to 10.9 (Fig. S12, ESI†). However, the

Table 1 Spectral properties of quinoxalinones 4–11

Cmpd	Solvent	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Stokes' shift (nm)	E (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Φ_F
4	Toluene	388	520	132	6236	0.01 ^a
	THF	386	520	134	6176	0.01
	DCM	390	538	148	6540	0.05
	DMSO	391	553	162	6272	0.08
	EtOH	387	562	175	6407	0.04
	Water	395	595	200	5899	<0.01
5	PBS 7.4	395	602	207	6673	<0.01
	THF	375	n.a. ^b	n.a.	5126	n.a.
	DMSO	382	n.a.	n.a.	4499	n.a.
	EtOH	376	n.a.	n.a.	4777	n.a.
6	PBS 7.4	382	595	213	4948	<0.01 ^a
	THF	376	n.a.	n.a.	n.d. ^c	n.a.
	DMSO	384	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.
	EtOH	369	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.
7	PBS 7.4	377	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.
	Toluene	384	481	97	n.d.	<0.01 ^d
	THF	391	480	89	n.d.	<0.01
	DCM	386	480	94	n.d.	<0.01
	DMSO	408	490	82	26 526	0.01
	EtOH	409	490	81	n.d.	<0.01
8	Water	410	490	80	n.d.	<0.01
	PBS 7.4	413	490	77	n.d.	<0.01
	THF	376	447	71	7453	0.15 ^a
	DMSO	374	457	83	9771	0.14
9	EtOH	372	458	86	9095	0.14
	PBS 7.4	368	471	103	7211	0.19
	THF	372	445	73	4132	0.09 ^a
	DMSO	372	460	88	6161	0.13
10	EtOH	373	456	83	5647	0.11
	PBS 7.4	369	475	106	5608	0.11
	Cyclohex.	373	464	91	9266	0.38 ^a
	Toluene	362	421	59	16 212	0.33
	EtOAc	367	434	67	14 827	0.71
	THF	371	431	60	20 347	0.55
	DCM	362	429	67	20 030	0.31
	MeCN	371	444	73	15 416	0.58
	DMSO	382	459	77	17 354	0.88
	EtOH	380	467	87	18 284	0.72
11	MeOH	378	474	96	17 531	0.72
	Water	370	489	119	15 754	0.65
	PBS 7.4	370	489	119	14 714	0.60
	THF	353	436	83	28 415	<0.01
11	DMSO	355	449	94	16 910	0.016
	EtOH	351	469	118	23 885	<0.01
	PBS 7.4	353	489	136	22 015	<0.01

^a Quantum yield determined at 25 °C by the relative method using anthracene ($\Phi_F = 0.27$ in EtOH) with excitation at 366 nm. ^b Not applicable. ^c Not determined. ^d Quantum yield determined at 25 °C by the relative method using Lucifer Yellow ($\Phi_F = 0.21$ in water) with excitation at 420 nm.

fluorescence was altered under extreme pH conditions such as 2.2 and 12.9, with 20 and 98% loss in the fluorescence intensity, respectively.

Collectively, data reported in Table 1 show that the ketone function of the benzoyl moiety is responsible for the fluorescence quenching. This is presumably due to a singlet–triplet intersystem crossing process, a non-radiative de-excitation pathway which competes with the fluorescence phenomenon.^{22,23}

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

NJC

Paper

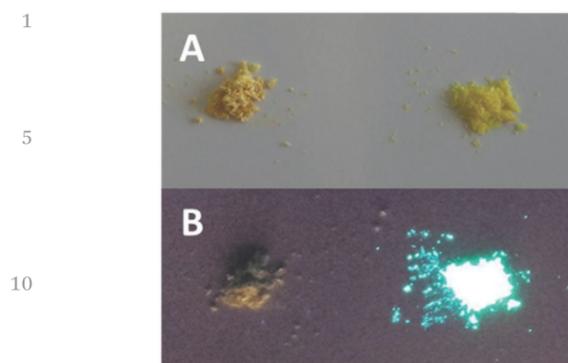


Fig. 1 Photographs of benzoylquinoxalinones **4** (left) and **5** (right) taken under visible light (A) or under 365 nm light (B).

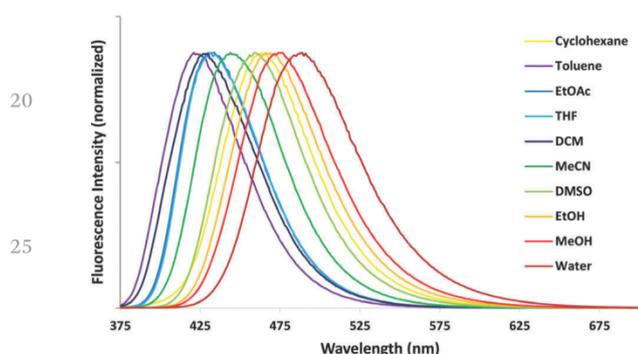


Fig. 2 Solvent dependent fluorescence emission of compound **10**.

Finally, despite having its ketone function reduced, the azido derivative **11** exhibited no significant fluorescence emission, whatever the solvent used. As one might expect, the presence of an electron-withdrawing azido group at this position causes the interruption of the intramolecular charge transfer of the push-pull quinoxalinone dye.

The dramatic difference in fluorescence emission observed between the amine **10** and the azide **11** in aqueous systems prompted us to investigate whether the latter compound would be a suitable fluorogenic probe for the specific detection of hydrogen sulfide (H_2S). In fact, recent investigations demonstrated that H_2S is a gasotransmitter contributing to a variety of significant biological processes such as neurotransmission, angiogenesis,²⁴ apoptosis,²⁵ anti-inflammation or vasodilatation.²⁶ Within a few years, fluorometry has become a very popular method for the detection of H_2S by providing several advantages over well-established strategies such as good selectivity and sensitivity and rapid response.²⁷ In this context, azide-based probes are known to exhibit fluorescence as a result of a reaction with H_2S acting as a reducing agent by converting the electron-withdrawing azido group into an electron-donating amino group.^{28–30}

Thus, a 10 μM solution of 7-azidoquinoxalinone **11** in PBS 7.4 at 25 $^{\circ}C$ was treated with NaHS (50 equiv.), which resulted in a robust increase in fluorescence emission with a correct 72-fold enhancement after 240 min (Fig. 3A, in black). HPLC monitoring

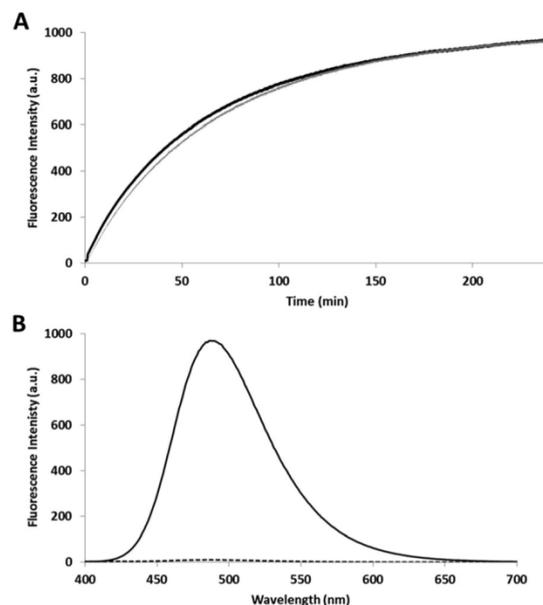


Fig. 3 (A) Time-dependent fluorescence intensity changes of a 10 μM solution of quinoxalinone **11** (black, λ_{ex} 370 nm, λ_{em} 489 nm), and 4-methyl-7-azidocoumarin (grey, λ_{ex} 330 nm, λ_{em} 450 nm) after the addition of NaHS (50 equiv.), at 25 $^{\circ}C$ in PBS 7.4; (B) fluorescence emission spectrum ("Scan" mode, λ_{ex} 370 nm) of compound **11** before (dotted line) and after (black) the addition of NaHS (50 equiv., 300 μM) at 25 $^{\circ}C$ in PBS 7.4.

of the reaction medium showed the gradual disappearance of compound **11** with concomitant formation of the 7-aminoquinoxalinone **10**, species that is unambiguously responsible for fluorescence emission (Fig. S13, ESI[†]). Informatively, a comparative experiment carried out with the 4-methyl-7-azidocoumarin, which is a probe already reported for the specific detection of H_2S ,²⁸ showed a similar fluorescence recovery rate (Fig. 3A, in grey) and quenching efficiency to that of probe **11** (see the ESI[†]). However, the maximum absorption and emission wavelengths of **10** are red-shifted by ~ 30 and 45 nm, respectively, compared to that of the H_2S -mediated reduction product, 4-methyl-7-aminocoumarin ($\lambda_{abs\ max} = 345$ nm, $\lambda_{em\ max} = 443$ nm, at 25 $^{\circ}C$ in PBS 7.4).³¹ Finally, the detection limit of **11** for H_2S was determined to be 1.30 μM by setting the signal-to-noise ratio to 3:1 (Fig. S14, ESI[†]), which is in the upper range of the reported values.³²

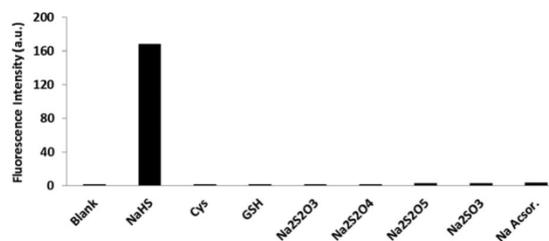


Fig. 4 Fluorescence response of probe **11** (10 μM) in the absence of analytes (blank) or upon the addition of biologically relevant species (50 equiv.) after 60 min in PBS pH 7.4 at 25 $^{\circ}C$ at λ_{ex} 370 nm and λ_{em} 489 nm.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Paper

NJC

1 With these encouraging results, the selectivity of the new
chemoprobe **11** towards biothiols (cysteine, glutathione) and
other biologically relevant reductive species (Na₂S₂O₃, Na₂S₂O₄,
Na₂S₂O₅, Na₂SO₃, sodium ascorbate) was next investigated
5 (Fig. 4). Gratifyingly, no significant increases in fluorescence
intensity were observed for all bioanalytes tested after 60 min of
incubation, which attests to the reliability of the probe for the
selective detection of H₂S.

10 Conclusions

15 In summary, quinoxalinon-2-ones obtained in this study by the
rearrangement of benzodiazepin-2-ones could be divided into
the following two categories according to their optical behavior:
the benzoylquinoxalinone which are generally not fluorescent;
and their NaBH₄-reduced products which are emissive. Notably,
derivatives belonging to the latter group such as compound **11**
20 have shown to possess suitable photophysical properties for
chemosensing applications.

Experimental

General methods

25 Flash column chromatography purifications were performed
on a Geduran[®] Si 60 silica gel (40–63 mm) from Merck.
Preparative TLC was carried out on Merck PLC Kieselgel 60 F-
254 1 mm, glass plate 20 × 20 cm. TLC was carried out on
Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were
30 visualized by illumination with a UV lamp (at 254/365 nm) and/
or staining with KMnO₄ solution. Unless otherwise noted, all
chemicals were used as received from commercial sources
without further purification. Phosphate buffer saline PBS (pH
7.4, 0.1 M) and aq. mobile phases for HPLC were prepared with
35 water purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 MU
cm). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded using a Bruker
DPX 300 (Bruker, Wissembourg, France). Chemical shifts are
expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent
peak for calibration. *J* values are expressed in Hz. Mass spectra
40 were obtained using a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap)
apparatus equipped with an APCI source. UV-visible absorption
spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotom-
eter by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell,
Open Top, 10 × 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Fluorescence
45 spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were per-
formed on a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a
semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 ×
4 mm, Chamber volume 1.4 mL for quantum yields determina-
tion, Chamber volume 3.5 mL for all other studies). The
50 absorption spectra of compounds were recorded (220–
800 nm) in different solvents at 25 °C. Excitation/emission
spectra were recorded under the same conditions after emis-
sion/excitation at the corresponding wavelength depending on
fluorophores (excitation and emission filters: auto, excitation
55 and emission slit: 5 nm). Fluorescence quantum yields were
measured at 25 °C by a relative method using anthracene ($\Phi_F =$

27% in EtOH, 366 nm) and Lucifer Yellow ($\Phi_F = 21%$ in water,
420 nm) as a standard. The following equation was used to
determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(X) = (A_s/A_x) (F_x/F_s) (n_x/n_s)^2 \Phi_F(S)$$

where *A* is the absorbance (in the range of 0.01–0.1 a.u.), *F* is the
area under the emission curve, *n* is the refractive index of the
solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts *s*
and *x* represent standard and unknown, respectively. The
10 following refractive index values were used: 1.337 for PBS,
1.333 for water, 1.362 for EtOH, 1.497 for toluene, 1.424 for
CH₂Cl₂, 1.344 for MeCN, 1.407 for THF, 1.328 for MeOH, 1.426
for cyclohexane, 1.372 for AcOEt, and 1.478 for DMSO.

Analytical HPLC: Thermo Hypersyl GOLD C18 column (5
µm, 2.1 × 100 mm) with MeCN and 0.1% aq. TFA as eluents
15 (0% MeCN for 5 min followed by 0–100% MeCN for 40 min) at a
flow rate of 0.25 mL min⁻¹.

Syntheses

Benzodiazepin-5-ones **1–3**¹⁸ were prepared according to known
20 procedures.

Compound 4. To a solution of 1,5-benzodiazepin-2-one **1**
(158 mg, 0.57 mmol, 1 equiv.) in DMSO (1.7 mL) in a flask
equipped with a rubber septum (with a needle inserted for
preventing overpressure), *N*-bromosuccinimide (40 mg,
0.23 mmol, 0.4 eq.) was added at room temperature. Unless
25 stated, the mixture was then heated to 110 °C for 6 h. There-
after, to the solution cooled to room temperature dichloro-
methane (10 mL) was added. The resulting organic layer was
successively washed with a solution of saturated aq. NaHCO₃ (4
mL), a solution of saturated aq. Na₂S₂O₃ (4 mL), and brine. The
30 organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under
reduced pressure. The crude material was purified by flash
column chromatography on a silica gel (cyclohexane/EtOAc
from 90:10, 80:20, 70:30 to 50:50) to obtain the desired
product (83 mg, 0.28 mmol, 50%) as brown amorphous powder.
Mp = 166 °C. IR (neat, cm⁻¹): 3069, 2936, 2846, 1679, 1638,
1587, 1553, 1499, 1366, 1330, 1266, 1207, 1028, 1008, 922, 849,
814. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.89 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.52
(t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H),
40 7.21 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.64 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz,
CDCl₃): δ = 191.9, 156.4, 155.2, 153.1, 134.9, 134.3, 133.1, 130.1,
128.8, 128.3, 121.7, 115.0, 112.0, 55.9, 29.2. HRMS (ESI⁺): calcd
for C₁₇H₁₅N₂O₃ [M + H]⁺ 295.1083; found 295.1076.

Compound 7. To a solution of 3-benzoyl-1-methyl-7-
nitroquinoxalin-2(1H)-one **6** (86 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in
an anhydrous solution of THF/MeOH (5.2 mL, 1:1), Pd/C (28
mg, 0.028 mmol, 0.1 equiv.) was added and was stirred for 1
hour under H₂ atmosphere at room temperature. After comple-
50 tion the mixture was filtered under Celite[®], and washed with
DCM and MeOH. The mixture was concentrated under reduced
pressure to obtain the desired product (55 mg, 70% yield) as
orange amorphous powder. Mp = 242 °C. IR (neat, cm⁻¹): 3447,
3339, 3222, 1673, 1634, 1591, 1535, 1233, 1170, 964, 910, 816.
55 ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆): δ = 7.91–7.82 (m, 2H), 7.67 (ddd,
J = 8.8, 4.0, 1.3 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 10.6, 4.7 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* =

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

NJC

Paper

1 8.8 Hz, 1H), 6.69 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 1H), 6.53 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H),
6.46 (s, 2H), 3.52 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): $\delta =$
192.46, 153.44, 153.38, 144.99, 136.60, 135.72, 133.80, 131.64,
129.57, 128.72, 123.93, 112.30, 95.24, 28.45. HRMS (ESI $^+$): calcd
5 for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$ [M + H] $^+$ 280.1086; found 280.1097.

Compound 8. To a solution of 3-benzoyl-6-methoxy-1-
methylquinoxalin-2(1H)-one **4** (72 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.) in
an anhydrous solution of MeOH/THF (7 mL, 1:1), NaBH_4 (11
mg, 0.29 mmol, 1.2 equiv.) was added. The mixture was stirred
10 for 10 min at room temperature. After completion the mixture
was diluted with DCM 30 mL, and washed with water dried over
 MgSO_4 , and evaporated under vacuum to obtain the desired
product (60 mg, 0.20 mmol, 83%) as yellow amorphous powder.
Mp = 188 °C. IR (neat, cm^{-1}): 3399, 2924, 1647, 1591, 1563,
1500, 1365, 1324, 921. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.50$ – 7.43
15 (m, 2H), 7.32 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.27–7.19 (m, 2H), 7.19–7.09
(m, 3H), 5.96 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.52 (s, 3H). ^{13}C
NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 158.87, 156.29, 153.31, 140.63,$
132.58, 128.42, 127.96, 127.66, 127.26, 119.89, 114.81, 111.41,
20 73.32, 55.89, 29.11. HRMS (ESI $^+$): calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$ [M + H] $^+$
297.1234; found 297.1234.

Compound 10. To a solution of 7-amino-3-benzoyl-1-
methylquinoxalin-2(1H)-one **7** (80 mg, 0.28 mmol, 1 equiv.) in
anhydrous MeOH (7 mL), NaBH_4 (13 mg, 0.33 mmol, 1.2 equiv.)
25 was added. The mixture was stirred for 7 min at room tem-
perature. After completion the mixture was diluted with DCM
30 mL, and washed with water, dried over MgSO_4 , and evo-
luted under vacuum to obtain the desired product (81 mg,
quant. yield) as brown amorphous powder. Mp = 182 °C. IR
(neat, cm^{-1}): 3343, 3232, 1651, 1604, 1549, 1494, 1474, 1453,
30 1300, 1251, 1190, 1132, 1079, 1052, 992, 944, 820. ^1H NMR (300
MHz, DMSO- D_6): $\delta = 7.50$ (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 7.2$ Hz,
2H), 7.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.24–7.14 (m, 1H), 6.65 (dd, $J = 8.7,$
2.1 Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 5.97 (s, 1H),
35 5.59 (s, 1H), 3.46 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): $\delta =$
153.79, 151.60, 151.03, 142.70, 135.13, 130.48, 127.83, 126.90,
126.79, 123.74, 111.59, 95.59, 70.91, 28.45. HRMS (ESI $^+$): calcd
for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$ [M + H] $^+$ 282.1243; found 282.1241.

Compound 11. To a solution of 7-amino-3-
(hydroxy(phenyl)methyl)-1-methylquinoxalin-2(1H)-one **10** (36
mg, 0.127 mmol, 1 equiv.) in DMF (200 μL), cooled at 0 °C,
40 ACN (800 μL) and NOBF_4 (17.8 mg, 0.152 mmol, 1.2 equiv.) were
added. The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 15
min. Thereafter, a solution of NaN_3 (9.9 mg, 0.152 mmol, 1.2
45 equiv.) in distilled water (200 μL) was added dropwise and the
resulting mixture was stirred 30 min at 0 °C. After completion
the mixture was diluted with DCM (30 mL), and washed three
times with water, then dried over MgSO_4 , and evaporated under
vacuum. The crude material was purified by preparative TLC
50 (cyclohexane/EtOAc from 50:50) to obtain the 7-azido-3-
(hydroxy(phenyl)methyl)-1-methylquinoxalin-2(1H)-one (14.02
mg, 36% yield) as an orange solid. Mp = 136 °C. IR (neat,
 cm^{-1}) 3388, 2923, 2112, 1661, 1606, 1564, 1493, 1464, 1436,
1354, 1315, 1279, 118, 1102, 1080, 1064, 1029, 995, 848, 808,
55 761. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 7.87$ (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz,
1H), 7.49–7.40 (m, 1H), 7.33–7.26 (m, 2H), 7.25–7.12 (m, 3H),

6.05 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 5.76 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.57 (s, 3H). ^{13}C
NMR (75 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 158.46, 153.15, 141.66, 141.57,$
134.41, 130.92, 129.13, 127.96, 127.24, 127.09, 114.87, 104.87,
70.94, 29.01. HRMS (ESI $^+$): calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_2$ [M + H] $^+$
308.1147; found 308.1150.

Acknowledgements

We thank the Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN
0001401) for financial support to K. R. This work was also
partially supported by the Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), INSA Rouen, Rouen-Normandie Univer-
sity, and the Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029). We also thank
Albert Marcual (CNRS) for HRMS analyses.

Notes and references

- 1 S. A. Galal, S. H. M. Khairat, F. A. F. Ragab, A. S. Abdelsamie,
M. M. Ali, S. M. Soliman, J. Mortier, G. Wolber and H. I. El
Diwani, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **86**, 122–132.
- 2 S. Wagle, V. A. Adhikari and N. S. Kumari, *Indian J. Chem.*,
2008, **47B**, 439–448.
- 3 H. Nohl, W. Bieberschulte, B. Dietrich, N. Udilova and
A. V. Kozlov, *BioFactors*, 2003, **19**, 79–85.
- 4 D. A. E. Issa, N. S. Habib and A. E. Abdel Wahab, *MedChem-*
Comm, 2015, **6**, 202–211.
- 5 L. Shi, H. Zhou, J. Wu and X. Li, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2015,
12, 96–112.
- 6 H. Li, L. Cai and Z. Chen, *Coumarin-Derived Fluorescent*
Chemosensors, Plenum, New York, 2012.
- 7 P. Shieh and C. R. Bertozzi, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**,
9307–9320.
- 8 A. Lizzul-Jurse, L. Bailly, M. Hubert-Roux, C. Afonso, P.-Y. Renard
and C. Sabot, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 7777–7791.
- 9 T. Iwata, T. Hirose, M. Nakamura and M. Yamaguchi,
J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl., 1994, **654**, 171–176.
- 10 K. Azuma, S. Suzuki, S. Uchiyama, T. Kajiro, T. Santa and
K. Imai, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 443–449.
- 11 H. Honda, Y. Shibusawa, J. Taniguchi, H. Matsuda,
M. Kondo, K. Kumasaka, T. Miwa, Y. Notoya and
H. Shindo, *Vasc. Pharmacol.*, 2005, **42**, 163–169.
- 12 A. Katoh, T. Yoshida and J. Ohkanda, *Heterocycles*, 2000, **52**,
911–920.
- 13 T. Yasumoto and A. Takizawa, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*,
1997, **61**, 1775–1777.
- 14 Q.-C. Yao, X.-L. Lu and M. Xia, *New J. Chem.*, 2014, **38**,
2693–2700.
- 15 Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K.-I. Sakai and
T. Akutagawa, *J. Phys. Chem. A*, 2015, **119**, 6223–6231.
- 16 K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins and
A. Madder, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2927–2929.
- 17 K. Yamada, H. Kuriyama, T. Hara, M. Murata, R. Irie,
Y. Harntaweessup, M. Satake, S. Fukuzawa and
K. Tachibana, *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, **22**, 3773–3780.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Paper	NJC
1 18 H. Mtiraoui, K. Renault, M. Sanselme, M. Msaddek, P.-Y. Renard and C. Sabot, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2017, 15 , 3060–3068. Correction: H. Mtiraoui, K. Renault, M. Sanselme, M. Msaddek, P.-Y. Renard and C. Sabot, <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2017, DOI: 10.1039/c7ob90126g.	1
Q3 19 A. A. Gaponov, E. T. Zlenko, S. V. Shishkina, O. V. Shishkin, O. M. Antypenko, S. V. Tretiakov and V. A. Palchikov, <i>Med. Chem. Res.</i> , 2016, 25 , 1768–1780.	5
20 H. Mtiraoui, R. Gharbi, M. Msaddek, Y. Bretonnière, C. Andraud, C. Sabot and P.-Y. Renard, <i>J. Org. Chem.</i> , 2016, 81 , 4720–4727.	10
21 (a) D. Zhai, W. Xu, L. Zhang and Y.-T. Chang, <i>Chem. Soc. Rev.</i> , 2014, 43 , 2402–2411; (b) M. Giardinetti, J. Marrot, V. Coeffard, X. Moreau and C. Greck, <i>New J. Chem.</i> , 2017, advance article.	10
Q4 22 M. K. Froemming and D. Sames, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2007, 129 , 14518–14522.	15
23 Z. Kucybala, I. Pyszka, B. Marciniak, G. L. Hug and J. Paczkowski, <i>J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2</i> , 1999, 2147–2154, DOI: 10.1039/A903363G.	15
24 A. Papapetropoulos, A. Pyriochou, Z. Altaany, G. Yang, A. Marazioti, Z. Zhou, M. G. Jeschke, L. K. Branski, D. N. Herndon, R. Wang and C. Szabó, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 2009, 106 , 21972–21977.	20
25 P. Rose, P. K. Moore, S. H. Ming, O. C. Nam, J. S. Armstrong and M. Whiteman, <i>World J. Gastroenterol.</i> , 2005, 11 , 3990–3997.	20
26 G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder and R. Wang, <i>Science</i> , 2008, 322 , 587–590.	25
27 J. Li, C. Yin and F. Huo, <i>RSC Adv.</i> , 2015, 5 , 2191–2206.	25
28 B. Chen, W. Li, C. Lv, M. Zhao, H. Jin, H. Jin, J. Du, L. Zhang and X. Tang, <i>Analyst</i> , 2013, 138 , 946–951.	30
29 M. D. Hammers, M. J. Taormina, M. M. Cerda, L. A. Montoya, D. T. Seidenkranz, R. Parthasarathy and M. D. Pluth, <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2015, 137 , 10216–10223.	30
30 K. Xiang, Y. Liu, C. Li, B. Tian, T. Tong and J. Zhang, <i>Dyes Pigm.</i> , 2015, 123 , 78–84.	35
31 K. Renault, C. Sabot and P.-Y. Renard, <i>Eur. J. Org. Chem.</i> , 2015, 7992–7996.	35
32 B. Roubinet, L. Bailly, E. Petit, P.-Y. Renard and A. Romieu, <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2015, 56 , 1015–1019.	40
25	45
30	50
35	55
40	
45	
50	
55	

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Dans le but d'avoir une étude la plus complète possible, la synthèse d'autres dérivés fluorescents a été envisagée. Cependant, les stratégies de synthèse mises en œuvre se sont révélées infructueuses et n'ont pas conduit aux composés souhaités suite à une faible stabilité chimique des composés envisagés. Ces travaux, non publiés sont exposés ci-après.

Nous avons voulu synthétiser un composé comportant la fonction amine, riche en électrons, en position 6 du noyau quinoxalin-2(1H)-one, afin de vérifier l'influence de la position de l'amine sur l'aromatique (position 6 versus 7) sur les propriétés photophysiques. La synthèse envisagée comprenait deux étapes à partir du composé **160** possédant une fonction nitro en position 6. Cette molécule issue de la méthodologie de synthèse précédemment décrite (voir article 4), a été réduite par une hydrogénation hétérogène catalysée par le palladium sur charbon sous atmosphère d'hydrogène. Le produit **161** obtenu avec un rendement de 59% a été mis en réaction en présence de NaBH_4 dans le but de réduire la fonction cétone en alcool correspondant. Néanmoins, aucune trace du produit attendu **162** n'a été observée, seul un mélange complexe de produits non identifiés a été obtenu (Schéma 116).

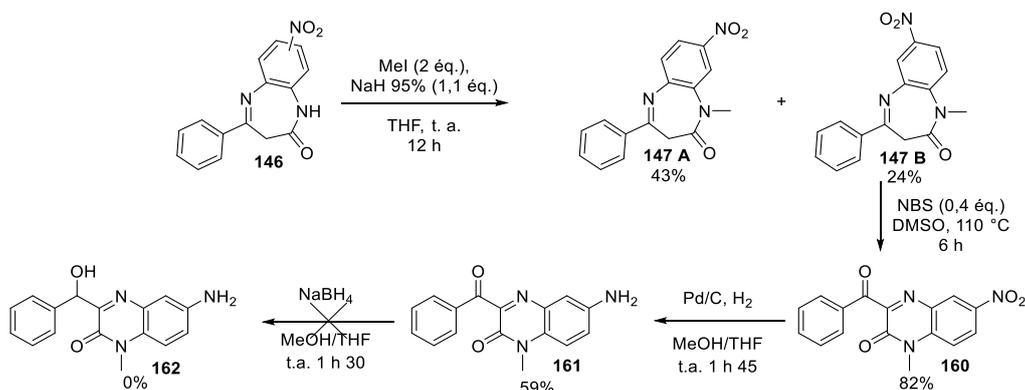


Schéma 116 : Tentative d'obtention du dérivé 7-aminoquinoxalin-2(1H)-one

Afin de voir l'influence de l'alkylation en position 1, la synthèse de dérivés NH libre a ensuite été envisagée. Le dérivé **163** portant un groupement méthoxy en position 6 a été choisi en raison de sa facilité d'accès. Il a été ensuite réduit en présence de NaBH_4 . Toutefois, malgré les différentes conditions réactionnelles testées, le produit désiré **164**, n'a été obtenu qu'une seule fois avec un rendement non reproductible de 8% (Schéma 117). De plus, le produit s'est révélé particulièrement instable, et ce, même lors de son stockage à -20 °C et sous atmosphère inerte après moins de 48 heures.

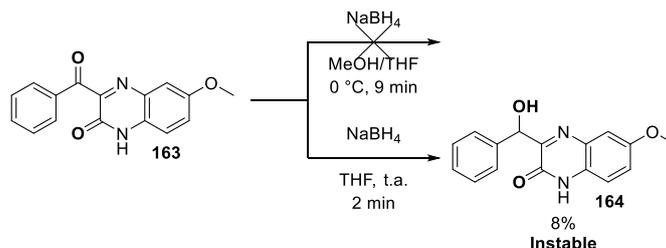


Schéma 117 : Synthèse du dérivé 6-méthoxy 164

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

A la suite de ce résultat, nous nous sommes tournés vers la préparation d'un composé substitué en position 7 par une amine, dont l'analogue N-méthylé **158** en position 1 s'était révélé stable lors de l'étude précédente (cf Article 5). Malgré cela, contrairement au dérivé N-méthylé, la benzodiazépin-2-one nitro **146** n'est pas suffisamment soluble dans les solvants de purification pour permettre la séparation du mélange de régioisomères par chromatographie sur gel de silice constitué du 7- et 8-nitrobenzodiazépinone (ratio 7-nitro/8-nitro : 1:2). Nous nous sommes donc tournés vers la préparation de la N-benzyl-quinoxalinone **150** dont le précurseur benzodiazépinone s'est avéré suffisamment soluble pour pouvoir séparer le mélange de régioisomères. Une fois la N-benzylquinoxalinone **150** en main, différentes conditions de déprotection du benzyle ont été testées sans succès, puisque dans la majorité des cas le produit de départ a été récupéré intact (Schéma 118).

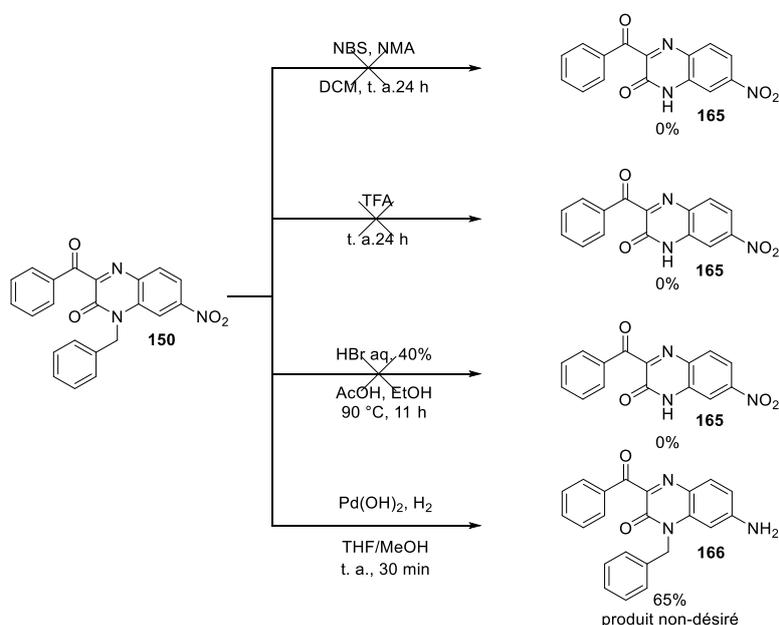


Schéma 118 : Tentative de déprotection de la quinoxalin-2(1H)-one **150**

Suite à ces travaux, la préparation de quinoxalin-2(1H)-ones dont l'amine en position 7 serait mono- ou dialkylée a été envisagée. Ceci permettrait d'une part, d'améliorer le rendement quantique mais également, d'offrir une solution supplémentaire pour permettre la fonctionnalisation de quinoxalin-2(1H)-ones.

2.3. Optimisation des propriétés de fluorescence de la 7-aminoquinoxalin-2(1H)-one

Suite à l'obtention du composé **158**, présentant d'excellentes propriétés spectrales pour un dérivé de quinoxalin-2(1H)-ones (Φ_F : 0,31 (DCM), 0,65 (eau), 0,88 (DMSO)), ce dernier présente une base solide dans le but d'obtenir des dérivés fluorescents toujours plus performants. A l'instar de ce que l'on peut observer avec les coumarines^[69,70], une dialkylation de l'amine en position 7 pourrait permettre de décaler l'émission de notre composé jusqu'à 520 nm (Figure 43). Cela serait intéressant

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

puisque le composé obtenu pourrait ainsi émettre dans le vert et permettrait une utilisation de ce dernier pour des applications en imagerie de surface par exemple.

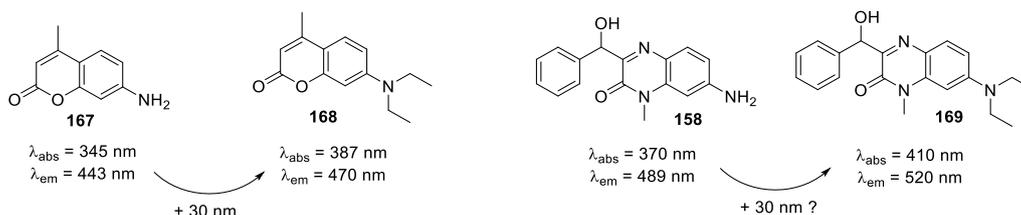


Figure 43 : Analogie entre les propriétés spectrales des coumarines et celles des quinoxalin-2(1H)-ones.

Suite à cette observation, une série de réactions a été réalisée à partir de la 3-benzoyl-7-aminoquinoxalin-2(1H)-one **170**, afin d'obtenir des composés dialkylés. Plusieurs types de réactions ont été testées comme l'utilisation d'agents alkylants puissants, ou encore les réactions de Mitsunobu et d'amination-réductrice. L'ensemble des conditions testées et résultats obtenus sont résumés dans le Schéma 119.

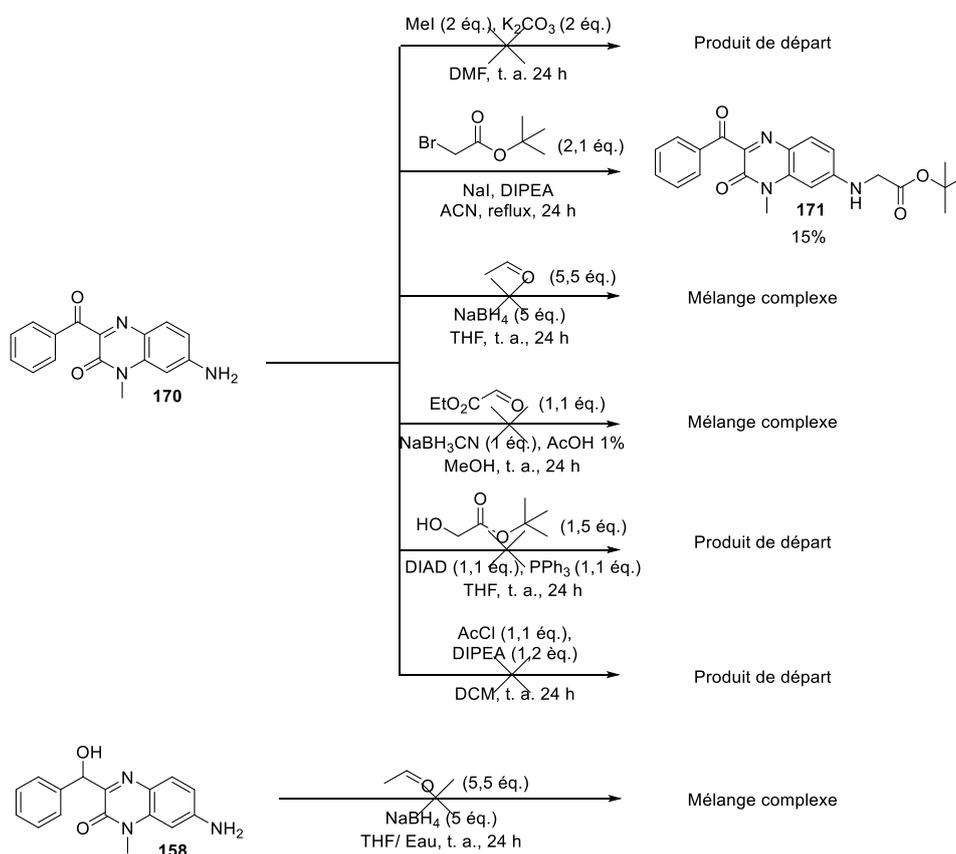


Schéma 119 : Tentatives d'alkylation de 7-aminoquinoxalin-2(1H)-ones

Sur les sept réactions engagées, seule la réaction avec le bromoacétate de *tert*-butyle a permis une alkylation de l'amine en position 7. Cependant, seule la mono-alkylation a été observée avec un faible rendement de 15%. L'influence de cette modification sur les propriétés de fluorescence du composé a été étudiée. En effet, l'intensité de fluorescence du composé a été mesurée en l'absence, et en présence de NaBH₄. La réduction de la cétone par NaBH₄ (10 éq.) dans le tampon PBS pH 7,4,

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

0,1 M à température ambiante s'accompagne de façon concomitante avec une grande exaltation de fluorescence d'un facteur 110 pour le composé **171** contre un facteur de 81 pour le dérivé 7-amino **158** (Figure 44).

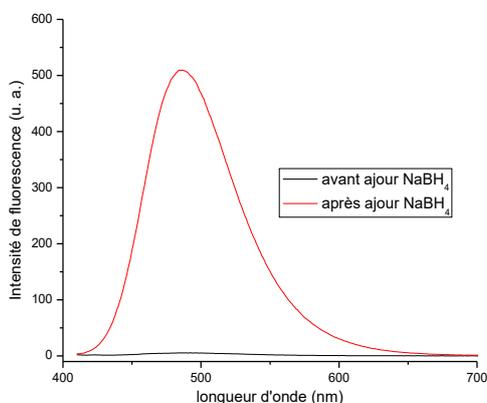


Figure 44 : Variation de l'intensité de fluorescence du composé **171** avant et après ajout de NaBH_4 ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$)

Néanmoins, l'alkylation n'a entraînée aucune modification significative de la longueur d'émission puisque l'intensité maximale a été observée à 485 nm (contre 489 pour l'analogue non alkylé **158**). Suite à ces observations, il est probable qu'une di-alkylation de l'amine soit nécessaire afin d'obtenir un effet bathochrome notable sur l'émission du composé. C'est dans cette optique qu'une tentative d'insertion d'une amine secondaire sur une 7-halogénoquinoxalin-2(1H)-one par $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ a alors été envisagée. En effet, cette approche a été réalisée avec succès au sein du laboratoire pour la synthèse de sulforhodamines non symétriques^[71]. Pour ce faire, la synthèse d'une quinoxalin-2(1H)-one substituée par un atome de fluor en position 7 a été réalisée en deux étapes à partir de la 4-fluoro-1,2-phenylenediamine commerciale. Puis, une tentative de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ a été réalisée en utilisant la morpholine comme amine secondaire, car cette dernière est moins volatile que la diéthylamine tout en permettant d'améliorer l'hydrosolubilité du produit. Toutefois, même après quinze heures de réaction au reflux de l'acétonitrile, seul le réactif de départ a été récupéré intact (Schéma 120).

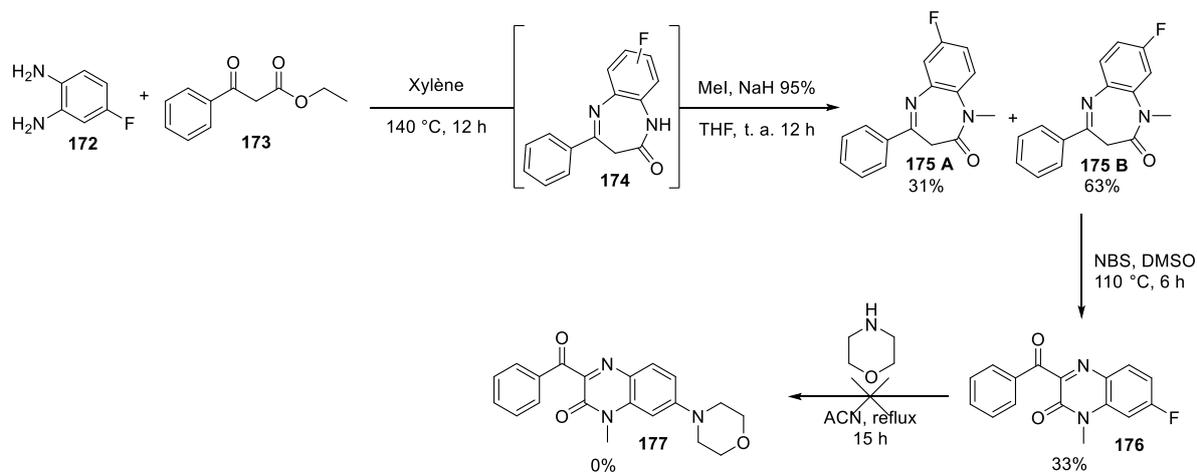


Schéma 120 : Voie de synthèse pour l'insertion d'amines secondaires sur le noyau quinoxalin-2(1H)-one

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Ne parvenant pas à obtenir de déplacement bathochrome de l'émission des quinoxalinones par modification du groupement donneur, l'extension de la conjugaison du fluorophore a été envisagée. A l'instar des coumarines, dont l'allongement de la conjugaison en position 3 rend possible la modulation des propriétés d'émissions^[72], il serait donc possible de décaler l'émission des quinoxalin-2(1H)-ones vers le rouge. L'approche développée ici est d'engager la fonction cétone des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones dans une réaction de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) avec le 2-(diethoxyphosphoryl) acetate d'éthyle. Ceci, dans le but de générer une double liaison CC possédant une fonction ester, qui aura pour but d'étendre la conjugaison du système. Un premier essai sur le composé model **145** a permis de montrer la viabilité de l'approche malgré le faible rendement de 16%. Ce rendement a pu être amélioré à 66% par l'utilisation de la quinoxalin-2(1H)-one **148** possédant un groupement nitro en position 7. Les produits issus des réactions de HWE sont obtenus sous forme d'un isomère unique non identifié. Toutefois, la réduction sélective de la fonction nitro en présence de l'oléfine n'a pu être réalisée. La dernière tentative a été d'utiliser la quinoxalin-2(1H)-one **170** possédant un groupement amino en position 7. Nonobstant, de façon surprenante, la formation unique d'un produit non-désiré issu d'une rupture de liaison carbone-carbone a été observée. L'ensemble de ces réactions est résumé dans le Schéma 121.

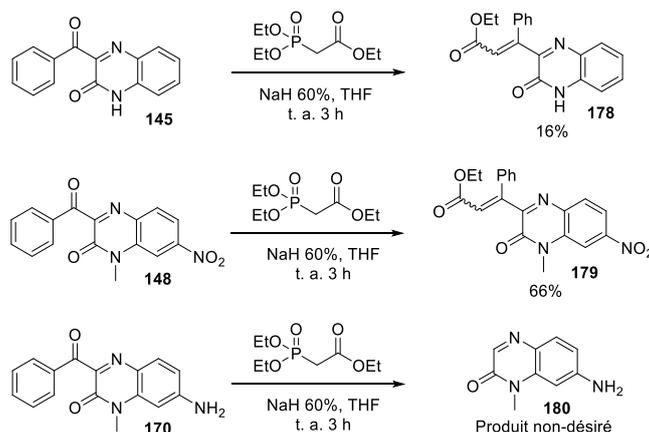


Schéma 121 : Réaction de HWE sur les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones

En conclusion de cette partie, les modifications post-synthétiques des quinoxalin-2(1H)-ones se sont avérées dépendantes du substrat, ce qui a limité l'étude des relations structure-propriétés photophysiques de cette famille de molécules.

Toutefois, nous avons noté que la plupart des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones préparées n'étaient pas fluorescentes. L'étude suivante a été réalisée afin de comprendre les propriétés électroniques des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones en vue de déterminer l'origine de l'absence d'émission sous radiation lumineuse.

2.4. Les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones comme photosensibilisateur de dioxygène singlet

Les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones n'étant pas fluorescentes, le retour à l'état fondamental qui a lieu après excitation lumineuse doit donc emprunter une voie de désexcitation non-radiative. Il en

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

existe de nombreuses (transfert d'électron ou de proton photoinduit, ICT, changement conformationnel ...). Cependant, la voie de désexcitation la plus probable semble être due à un croisement intersystème. En effet, lorsqu'une molécule est excitée, elle produit un état électronique excité singulet (S_n). A partir de cet état excité, différents chemins de relaxation existent, comme par exemple le croisement intersystème vers l'état triplet T_n . Cet état triplet est responsable de diverses propriétés comme la phosphorescence ou encore la possibilité de générer de l'oxygène singulet. En effet, le dioxygène naturellement présent à l'état triplet, passe à l'état singulet sous l'action d'une molécule appelée photosensibilisateur qui est excitée à l'état triplet.

L'hypothèse selon laquelle les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones seraient capables de passer à l'état triplet est confortée par l'exemple de la 3-benzoyl-7-diéthylamino-5-méthyl-1-phenyl-1H-quinoxalin-2-one (ChAD)^[73] (Figure 45). Cette 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one est utilisée comme photosensibilisateur pour générer de l'oxygène singulet^[74] dans des réactions de polymérisation initiées par des radicaux libres^[75] ou comme référence pour des études de photoblanchiment sur divers pigments^[76].

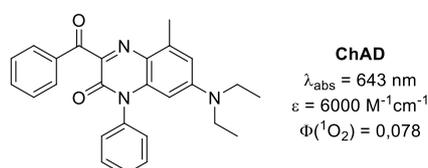


Figure 45 : Structure et propriétés photophysiques du ChAD

Nous avons alors réalisé une série d'expériences afin de vérifier si nos 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones, dont les structures sont proches de celle du ChAD, étaient capables de générer de l'oxygène singulet à partir du dioxygène triplet. Pour ce faire, nous avons suivi la réaction entre le dioxygène singulet et le diphenylbenzofurane (DPBF)^[77] en mesurant la décroissance de fluorescence de ce dernier, le produit de cycloaddition n'étant pas fluorescent. La réaction a été amorcée par différents dérivés de 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones, mais également avec la phénalénone qui est un photosensibilisateur de référence dont le rendement de formation de dioxygène singulet $\Phi(^1\text{O}_2)$ connu est de 0,95^[78] (Schéma 122).

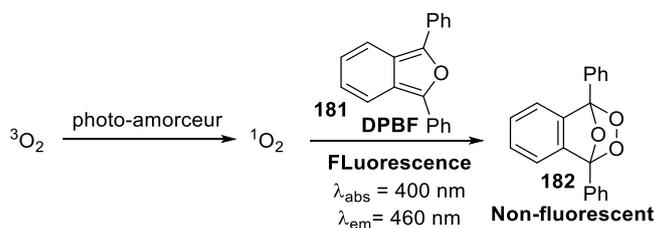


Schéma 122 : Principe de la détection du dioxygène singulet

La disparition de la fluorescence à 460 nm du DPBF a donc été suivie au cours du temps pour une excitation lumineuse à 400 nm. Il est à noter que le DPBF ainsi que tous les composés absorbent à cette longueur d'onde. A l'issue de cette série d'expériences, les courbes reportées Figure 46 ont été obtenues.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

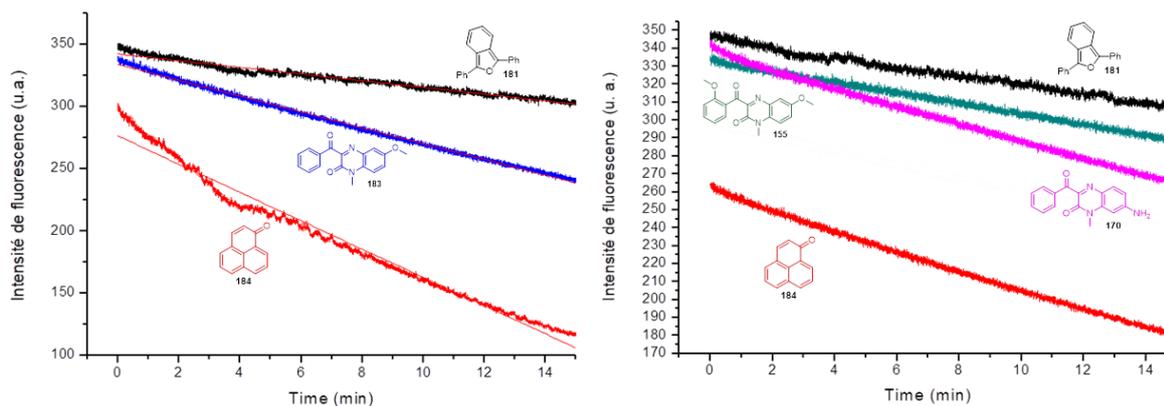


Figure 46 : Etude des propriétés de photosensibilisateur des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones. Diminution de fluorescence du DPBF seul par photoblanchiment (en noir), en présence du photoinitiateur de référence phénalénone (en rouge), en présence de différentes 3-benzoyl-quinoxalin-2(1H)-ones (en bleu, vert foncé et rose). Etude réalisée dans le chloroforme, à 25 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$.

On observe bien une décroissance de fluorescence du DPBF (courbes bleue, verte et rose, Figure 46), ce qui confirme de façon indirecte la formation de dioxygène singulet en présence des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones testées **155**, **170** et **183**. Ceci montre donc que le mécanisme de désexcitation non radiatif de ces composés serait dû à un croisement intersystème $S_1 \rightarrow T_1$. De plus, en calculant le coefficient directeur de ces droites et en prenant en compte le photoblanchiment naturel subit par le DPBF, on peut remonter à une approximation des rendements quantiques de formation de dioxygène singulet $\Phi(^1\text{O}_2)$ de nos composés qui sont résumés dans le Tableau 3.

Composé	$\Phi(^1\text{O}_2)$
phénalénone	0,95
ChAD	0,078
183	0,38
155	0,13
170	0,78

Tableau 3 : Valeur des $\Phi(^1\text{O}_2)$ des différent composés

Ces valeurs sont toutefois à prendre avec beaucoup de prudence, car nous ne possédons pas le matériel optimal pour réaliser de telles mesures. Néanmoins, cette expérience permet de classer les composés du plus réactif au moins réactif.

Cette étude a donc montré que nos 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones feraient bien intervenir un état électronique triplet dans leur processus de désexcitation. Le même phénomène est observé entre autres avec les benzophénones qui sont utilisées dans le cadre du marquage de photo-affinité ou photoréticulation^[79]. Nous avons alors envisagé d'utiliser les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones en tant que marqueur de photo-affinité fluorogénique (l'alcool obtenu après réaction du diradical étant fluorescent, ce qui est encore peu décrit dans la littérature, *vide infra*), les résultats préliminaires réalisés font l'objet de la partie suivante.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

2.5. Les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones comme marqueurs de photo-affinités

Les réactions de marquage par photo-affinité sont très utilisées, notamment pour réaliser un lien covalent avec des cibles biologiques comme les protéines, ou pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine^[80] ou protéine – petite molécule. Ces réactions de bioconjugaison reposent sur l'utilisation de fonctions photo-réactives qui sont bio-orthogonales avant irradiation. L'irradiation entraîne alors la formation d'un motif très réactif capable de se lier sur différentes positions avec une biomolécule en interaction proche avec le réactif de photomarquage. Les groupements les plus utilisés à cet effet sont les benzophénones, les diazirines ou encore les azidoaryles^[81,82] (Figure 47). L'avantage de la benzophénone par rapport aux deux autres fonctions, est que l'intermédiaire diradicalaire obtenu après photoactivation réagit de façon dégénérée avec l'eau pour redonner la benzophénone, ce qui accroît sensiblement les rendements de photocrosslinking.

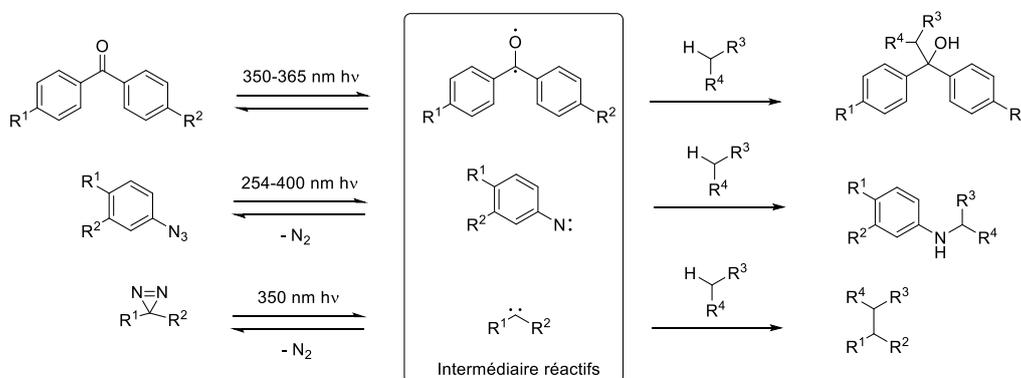


Figure 47 : Structures générales et réactivités des principaux marqueurs de photo-affinités

Une approche intéressante du marquage par photo-affinité a été étudiée par Jun-Seok Lee *et al* en 2015^[83], en utilisant un hybride BODIPY-benzophénone leur permettant de faire une ligation sous irradiation UV tout en conservant la fluorescence du motif BODIPY après marquage (Schéma 123). Dans ce cas, le motif benzoyle n'est pas responsable d'un « quenching » de la fluorescence, mais engendre un effet bathochrome sur l'émission du composé. Ainsi, après réaction un décalage isochrome sur l'émission du composé est observé, ce qui permet d'évaluer qualitativement, voire même, quantitativement l'efficacité du photomarquage, ce qui est souvent l'étape limitante dans ces expériences.

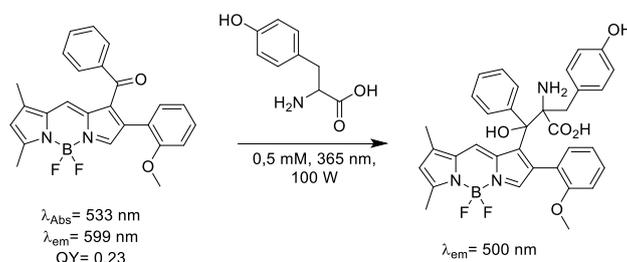


Schéma 123 : Hybride BODIPY-benzophénone développé par Jun-Seok Lee, pour le marque de photo-affinité^[83]

Cette structure hybride fluorophore-benzophénone est très intéressante puisque l'on retrouve ce même type de structure chez les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones. Combinées à leurs capacités à

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

passer à l'état triplet, ces dérivés de quinoxalin-2(1H)-ones seraient donc de bons candidats pour le marquage par photo-affinité. De plus, si le marquage s'avère réalisable, la cétone aromatique en position 3 responsable du croisement intersystème, serait transformée en alcool tertiaire. Cela signifie que l'utilisation d'une 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one profluorescente, permettrait peut-être de réaliser un photo-marquage fluorogénique (Schéma 124).

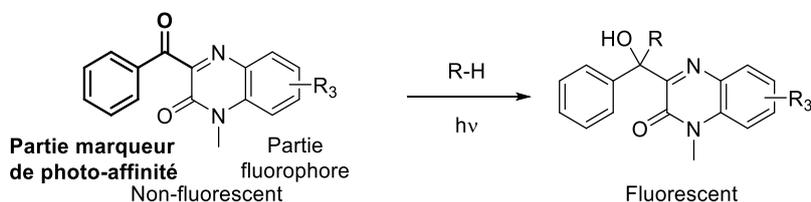


Schéma 124 : Hypothèse sur une utilisation possible des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones en tant que marqueur de photo-affinité

Les marqueurs de photo-affinité doivent être bio-orthogonaux avant leur activation lumineuse. La bio-orthogonalité de la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones **183** portant un groupement méthoxy en position 6, a donc été vérifiée, et en particulier, avec différentes aldo-keto-réductases. Ces enzymes ont la capacité de réduire une large gamme d'aldéhydes et de cétones en utilisant le NADH comme cofacteur^[84]. La réduction des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones par ces enzymes présentes dans les milieux biologiques investigués entraînerait un faux positif quant à la réussite du photo-marquage puisque l'on observerait un retour de fluorescence de la part de nos composés qui ne serait pas dû au photo-marquage. Ainsi des aldo-keto-réductases, venant de quatre sources différentes, ont ainsi été testées. On retrouve l'alcool dehydrogénase recombinant (*E. coli*), le AKR1C2 humaine ayant déjà fait ces preuves dans la réduction de cétones aromatiques^[85,86], et enfin les réductases issues d'extraits de pommes ou de carottes^[87]. De façon satisfaisante, aucune de ces réductases n'a provoquée la réduction de nos dérivés, puisqu'aucun retour de fluorescence n'a été observé au spectrofluorimètre. Suite à cette première preuve de la bio-orthogonalité des 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones envers ces réductases, les premiers tests de marquage par photo-affinité ont été réalisés avec la BSA, protéine connue pour présenter des interactions non spécifiques avec des dérivés hydrophobes.

Les premiers tests ont été réalisés avec la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones **155** (0,5 éq.), dans le tampon PBS en présence d'une protéine modèle [la BSA (1 éq.)] sous irradiation UV à 380 nm (Rayonet® 16 x 15 W) pendant trois heures. Les premiers résultats obtenus sont encourageants puisqu'une faible exaltation de fluorescence est observée uniquement en présence de BSA et sous irradiation UV (Schéma 125).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

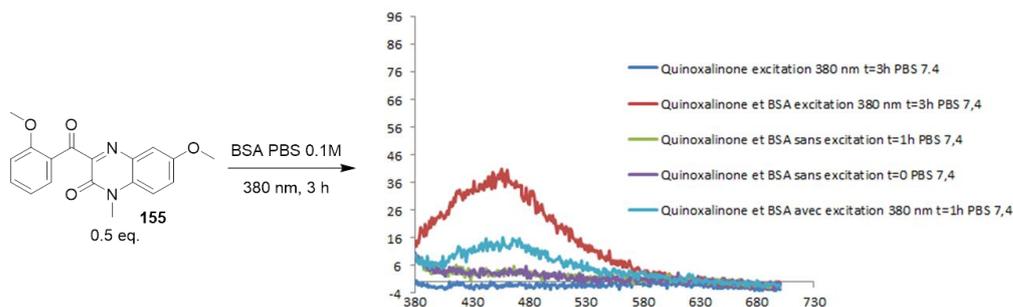


Schéma 125 : Marquage de photo-affinité entre la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones **155** (15 μM) et la BSA (30 μM) dans le tampon PBS 7,4 sous activation lumineuse (Rayonet® 16 x 15 W) pendant 6 heures. Scans de fluorescence mesurés de 380 à 700 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$.

Suite au faible retour de fluorescence observé, l'utilisation d'une 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one possédant de meilleures propriétés photophysiques permettrait d'améliorer la fluorescence post-photo-marquage. Notre choix s'est d'abord porté sur la 3-benzoyl-7-aminoquinoxalin-2(1H)-one **170**. Cependant, ce dérivé présente une trop grande instabilité sous irradiation UV. Notre choix s'est donc reporté sur le dérivé **183** présentant une meilleure stabilité à l'activation lumineuse que le dérivé **170** tout en possédant de meilleures propriétés de fluorescence que le dérivé **155** (Φ_F de 0,19 et ϵ de $7200 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le composé **157** dans le tampon PBS contre Φ_F de 0,11 et ϵ de $5600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour le composé **156**). Les conditions de photo-marquage ont été optimisées. Pour les nouvelles conditions testées, la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one **183** (5 éq.), est mise en réaction dans le tampon PBS (pH 7,4) en présence de BSA (1 éq.) sous irradiation UV à 380 nm (Rayonet® 16 x 15 W) pendant six heures. Avec cinq équivalents de marqueur, le marquage semble plus efficace puisque l'on observe un bien meilleur retour de fluorescence du photo-marquage que précédemment, avec un facteur d'exaltation de 21 contre 9 précédemment (Schéma 126 A). Cependant, le suivi du photo-marquage par évolution de l'absorption se révèle difficile, puisqu'une superposition de l'absorption de la BSA et du composé **183** est observée après irradiation UV à 380 nm (Rayonet® 16 x 15 W) pendant six heures (Schéma 126 B).

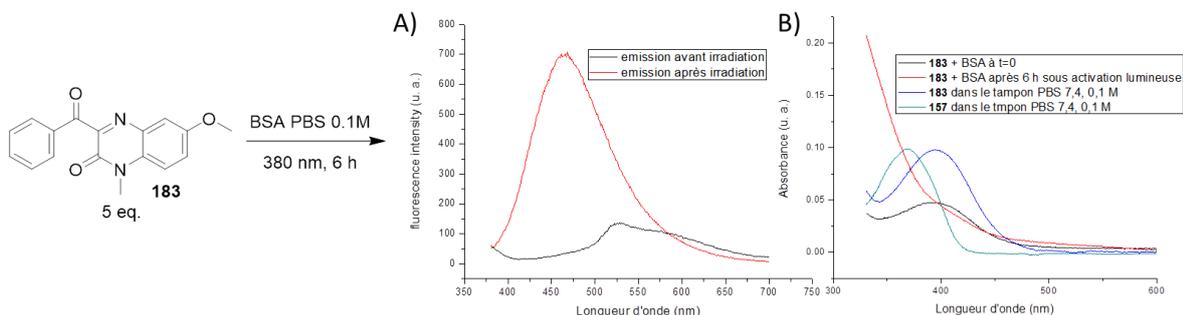


Schéma 126 : Marquage de photo-affinité entre la 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones **183** (5 éq.) et la BSA (30 μM) dans le tampon PBS 7,4 sous activation lumineuse (Rayonet® 16 x 15 W) pendant 6 heures. A) Spectres de fluorescence mesurés de 380 à 700 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$. B) Spectres d'absorption mesurés de 330 à 600 nm.

Suite à ces résultats, une digestion par la chymotrypsine de la BSA *a priori* marquée avec la monométhoxy quinoxalin-2(1H)-one **183** a été entreprise afin de confirmer, sans ambiguïté, le marquage

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

et le mécanisme de marquage. Toutefois, la masse des fragments obtenus par spectrométrie de masse n'a pas mis en évidence des produits de photo-marquage. Toutefois, les fragments traditionnellement observés pour la BSA native n'ont pas été identifiés non plus lors de la digestion chymotrypsique. Ceci, à la suite d'une irradiation de la BSA native en l'absence de quinoxalinone dans les conditions de photo-marquage (Rayonet® 16 x 15 W, 6 heures). Des recherches bibliographiques ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle, la BSA se dégraderait sous irradiation UV. En effet, les travaux du groupe de Ganesan ont montré que, sous irradiation UV (150 W, 280 nm, de 0 à 640 s), la BSA subit des dégradations qui se caractérisent par l'apparition d'une bande d'absorption observable à 320 nm^[88]. Ainsi, le spectre d'absorption de la BSA a donc été mesuré avant et après excitation lumineuse. La bande caractéristique à 320 nm apparaît, ce qui signifie que la BSA subit des dégradations durant le marquage, ce qui limite ainsi l'analyse de fragments connus de la BSA en spectrométrie de masse après digestion chymotrypsique (Figure 48).

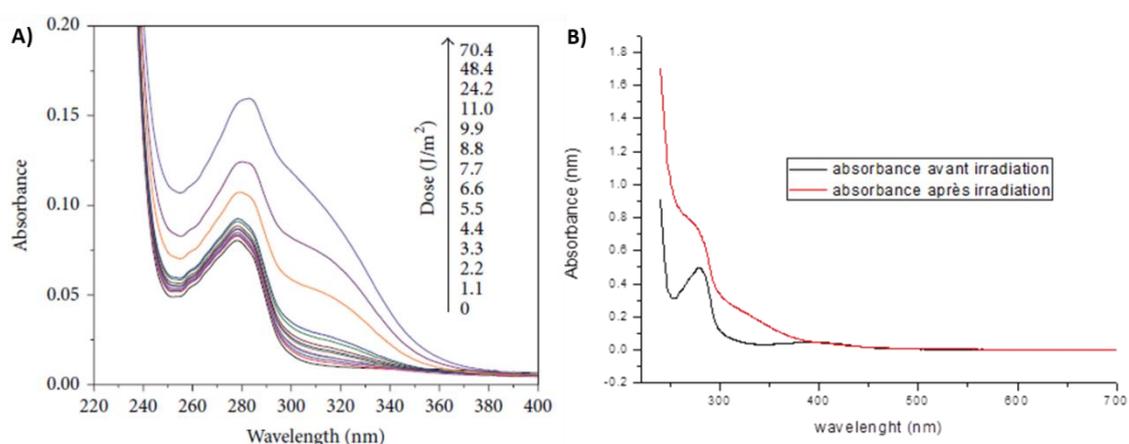


Figure 48 : Dégradation de la BSA sous irradiation UV. A) Figure directement extraite de l'article^[88]. B) Mesures réalisées au sein du laboratoire.

De ces observations, il ressort que la source lumineuse utilisée dans le cadre de ce projet est trop puissante pour les protéines comme la BSA. Néanmoins, afin de vérifier la compatibilité de nos molécules aux radiations lumineuses, nous avons alors envisagé une approche intermédiaire de photo-ligation chimiosélective. En effet, il a été montré que des dérivés de benzophénones ou de benzaldéhydes substitués en *ortho* par un groupement méthyle, peuvent réaliser sous excitation lumineuse, des cycloaddition [4+2] avec des alcènes appauvris en électrons tels que les maléimides^[89] ou les cyclohexénones^[90]. Cette approche a même été utilisée pour la modification de peptides^[91]. Il a donc été envisagé de réaliser ce même type de réaction avec une 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-one possédant un méthyle en *ortho* de la cétone aromatique. En addition du marquage covalent, cette approche devrait également permettre d'obtenir un retour de fluorescence à l'issue de la ligation (Schéma 127).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

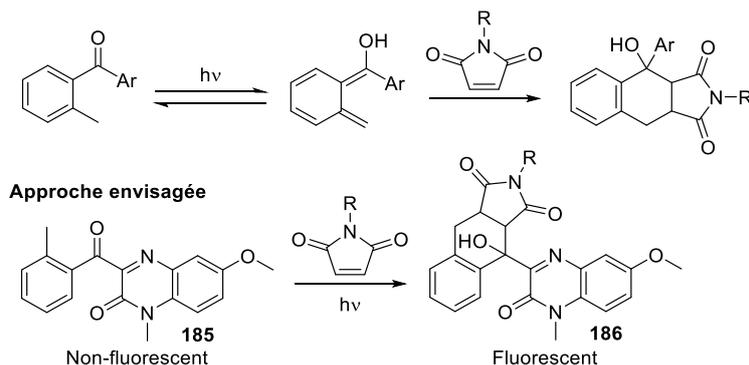


Schéma 127 : Réaction de photo cycloaddition 4+2 connue et envisagée avec les maléimides

La synthèse de la quinoxalin-2(1H)-one méthylée **185** a donc été synthétisée en 4 étapes à partir de l'*ortho*-méthylacétophénone **186** commerciale. La stratégie de synthèse repose sur l'obtention d'une benzodiazépin-2-one comportant le groupement convenablement positionné afin de donner, après l'étape de contraction de cycle, la quinoxalin-2(1H)-one méthylée **185** (Schéma 128).

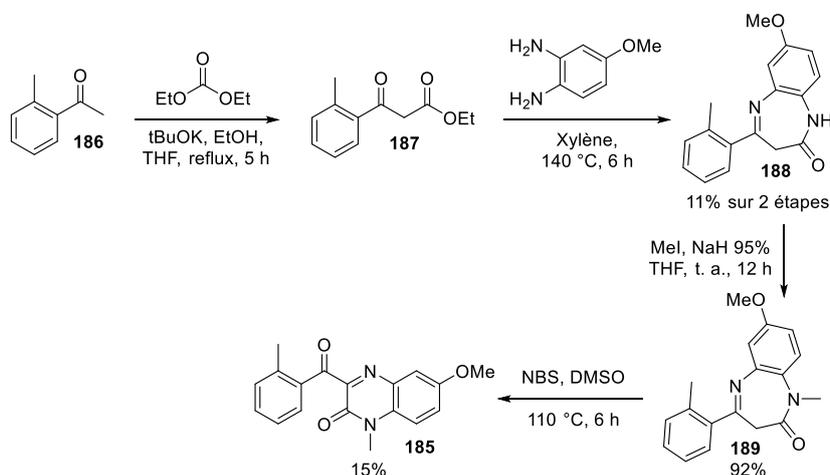


Schéma 128 : Voie de synthèse de la quinoxalin-2(1H)-one méthylé **185**

Après l'obtention du produit désiré, la réaction de photo-ligation avec le maléimide (5 éq.) a été testée sous irradiation UV à 380 nm (Rayonet® 8 x 15 W) pendant dix minutes ou deux heures, respectivement, dans le toluène ou dans un mélange ACN/eau (3:1, v/v) à une concentration de 0,04 M. Pour valider le résultat obtenu avec la quinoxalinone **185**, nous avons réalisé en parallèle une réaction contrôle décrite entre l'*ortho*-benzophénone et le maléimide^[89]. Cependant, que ce soit dans le cas de notre composé **185** ou du composé référence, seuls les réactifs ont été récupérés. Cela montre une nouvelle fois que la source lumineuse utilisée n'est pas adaptée à la réaction. Les travaux d'investigation de cette réaction de ligation photo-induite profluorescente feront l'objet d'une nouvelle thèse au laboratoire (thèse de Madeleine Cauwel 2018-2021, financement région Normandie).

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

3. Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, une nouvelle méthodologie d'accès au 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones a été découverte en collaboration avec le Dr. Hasan Mtiraoui (Université de Monsatir, Pr. Msaddeck). De cette méthodologie, une dizaine de quinoxalino-2(1H)-ones a pu être obtenue avec des rendements compris entre 40 et 82%.

Suite à ces travaux, il a été observé qu'une réduction de la cétone aromatique en position 3 conduisait à la formation de composés fluorescents lorsque ceux-ci sont substitués par des groupements électrodonneurs en position 6 ou 7. Ainsi, trois nouveaux composés fluorescents ont pu être obtenus. De ces trois composés, la 7-aminoquinoxalin-2(1H)-one **158** se détache des autres en affichant un rendement quantique sans précédent pour cette famille de composés (jusqu'à 0,80 dans le DMSO). Les caractéristiques de ce composé ont donc été exploitées pour la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une sonde profluorescente pour la détection du sulfure d'hydrogène (Schéma 129).

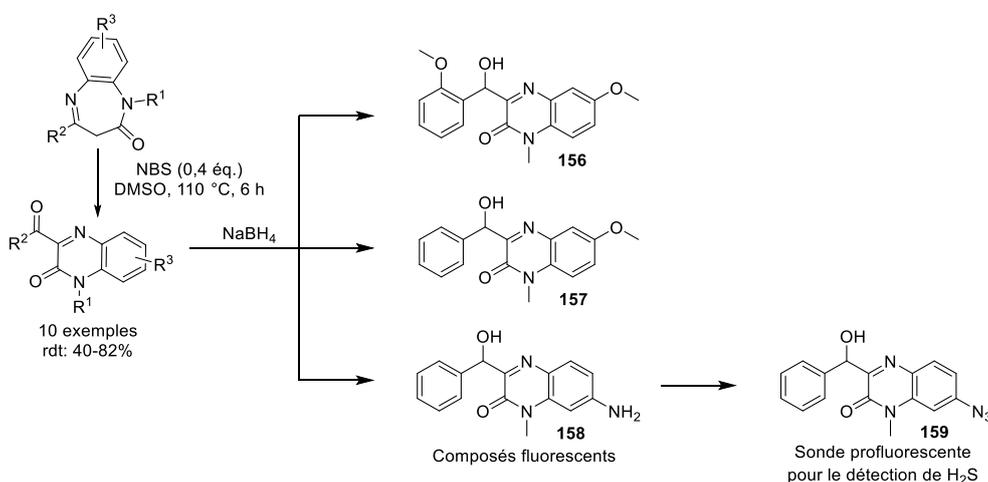


Schéma 129 : Résumé de la méthodologie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones, de la synthèse de composés fluorescents ainsi que leur application

Par la suite, des tentatives de modifications structurelles des quinoxalin-2(1H)-ones ont été réalisées dans le but d'optimiser d'avantage leurs propriétés photophysiques en termes de longueurs d'ondes d'absorption/d'émission ou de rendements quantiques. Malheureusement, aucune modification pertinente n'ont pu être réalisées, le noyau quinoxalin-2(1H)-one ne se montrant pas suffisamment réactif.

Ensuite, la raison pour laquelle les 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones ne sont pas fluorescentes (croisement intersystème vers l'état triplet) a pu être démontrée par une série d'expériences impliquant la mise en évidence de la conversion du dioxygène triplet en dioxygène singulet. Cette conversion interne a alors été exploitée pour du marquage de photo-affinité. Les résultats obtenus dans ce contexte sont prometteurs, bien qu'une optimisation de la source lumineuse utilisée soit nécessaire lors d'expériences futures afin de limiter la dégradation de la cible biologique (BSA). Par exemple, l'utilisation d'une source lumineuse beaucoup moins puissante de type DEL (diode électroluminescente) ou DEL noire devrait rendre possible le photo-marquage sans dégradation. De

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

plus, l'incorporation d'un ester en position 1 ou sur l'amine en position 7 des quinoxalin-2(1H)-ones, permettrait d'avoir un point d'encrage sur la quinoxalin-2(1H)-one pour attacher, à terme par exemple, un ligand de la cible biologique. Cela permettrait de réaliser des expériences de « fishing », et donc d'évaluer l'interaction de petites molécules avec des biomolécules. Le caractère profluorescent du composé de photomarquage d'affinité apporterait une aide substantielle pour la purification et l'identification des composés photo-pontés (Schéma 130).

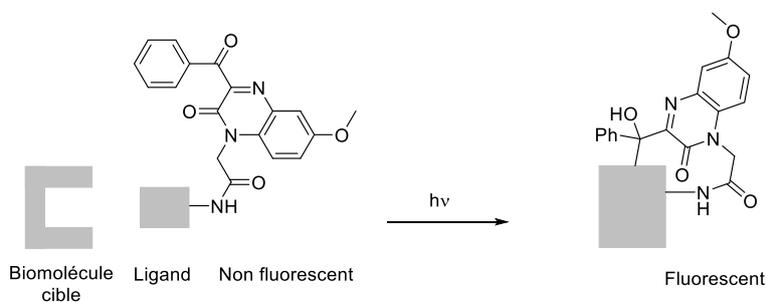


Schéma 130 : Perspective de « fishing » par photomarquage *via* l'utilisation d'un ligand

Références: Chapitre 4

- [1] S. A. Galal, S. H. M. Khairat, F. A. F. Ragab, A. S. Abdelsamie, M. M. Ali, S. M. Soliman, J. Mortier, G. Wolber, H. I. El Diwani, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *86*, 122–132.
- [2] P. Sanna, A. Carta, M. Loriga, S. Zanetti, L. Sechi, *Il Farmaco* **1998**, *53*, 455–461.
- [3] D. A. E. Issa, N. S. Habib, A. E. Abdel Wahab, *MedChemComm* **2015**, *6*, 202–211.
- [4] Y. Kobayashi, M. Kuroda, N. Toba, M. Okada, R. Tanaka, T. Kimachi, *Organic Letters* **2011**, *13*, 6280–6283.
- [5] T. Hinohara, K. Amano, K. Matsui, *NIPPON KAGAKU KAISHI* **1976**, *1976*, 247–247.
- [6] Y. Ramli, H. Benzeid, R. Bouhfid, Y. K. Rodi, S. Ferfra, E. M. Essassi, *St. Cerc. St. CICBIA* **2010**, *11*, 67–90.
- [7] L. Shi, H. Zhou, J. Wu, X. Li, *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2014**, *12*, 96–112.
- [8] O. Hinsberg, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1887**, *237*, 327–372.
- [9] O. Hinsberg, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **1896**, *292*, 245–258.
- [10] S. A. Galal, A. S. Abdelsamie, H. Tokuda, N. Suzuki, A. Lida, M. M. ElHefnawi, R. A. Ramadan, M. H. E. Atta, H. I. El Diwani, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *46*, 327–340.
- [11] Y. Tamura, M. Chun, H. Nishida, S. Kwon, M. Ikeda, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1978**, *26*, 2866–2873.
- [12] W. Fischer, E. Fahr, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1967**, *6*, 630–631.
- [13] S.-L. Wang, J. Ding, B. Jiang, Y. Gao, S.-J. Tu, *ACS Combinatorial Science* **2011**, *13*, 572–577.
- [14] P. D. Croce, M. Ioannisci, E. Licandro, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1979**, 330–332.
- [15] F. E. King, J. W. Clark-Lewis, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1951**, 3379–3382.
- [16] V. V. Titov, L. P. Kozhokina, *Tetrahedron Letters* **1973**, *14*, 1105–1107.
- [17] A. Molnár, S. Boros, K. Simon, I. Hermeicz, *Arkivoc* **2010**, *2010*, 199–207.
- [18] F. Christopher Bi, G. E. Aspnes, A. Guzman-Perez, D. P. Walker, *Tetrahedron Letters* **2008**, *49*, 1832–1835.
- [19] G. Bencivenni, T. Lanza, R. Leardini, M. Minozzi, D. Nanni, P. Spagnolo, G. Zanardi, *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 4721–4724.
- [20] F. Wang, B.-L. Hu, L. Liu, H.-Y. Tu, X.-G. Zhang, *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 11247–11252.
- [21] Z.-S. Li, W.-X. Wang, J.-D. Yang, Y.-W. Wu, W. Zhang, *Organic Letters* **2013**, *15*, 3820–3823.
- [22] D. Chen, W. Bao, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, *352*, 955–960.
- [23] D. Chen, Z.-J. Wang, W. Bao, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 5768–5771.
- [24] T. Yang, H. Zhu, W. Yu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2016**, *14*, 3376–3384.
- [25] D. Li, H. Ma, W. Yu, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2015**, *357*, 3696–3702.
- [26] A. T. A. Boraie, E. S. H. El Tamany, I. A. I. Ali, S. M. Gebriel, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **2017**, *54*, 2881–2888.
- [27] L. Cazaux, M. Faher, C. Picard, P. Tisnès, *Canadian Journal of Chemistry* **1993**, *71*, 1236–1246.
- [28] A. R. Bassindale, D. J. Parker, P. Patel, P. G. Taylor, *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 4933–4936.
- [29] X. Zeng, C. Liu, X. Wang, J. Zhang, X. Wang, Y. Hu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15*, 8929–8935.
- [30] J.-W. Yuan, J.-H. Fu, S.-N. Liu, Y.-M. Xiao, P. Mao, L.-B. Qu, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, 3203–3212.
- [31] K. Yin, R. Zhang, *Organic Letters* **2017**, *19*, 1530–1533.
- [32] S. Paul, J. H. Ha, G. E. Park, Y. R. Lee, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2017**, *359*, 1515–1521.
- [33] J. Yuan, S. Liu, L. Qu, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2017**, *359*, 4197–4207.
- [34] B. Ramesh, C. R. Reddy, G. R. Kumar, B. V. S. Reddy, *Tetrahedron Letters* **2018**, *59*, 628–631.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

- [35] L. Sumunnee, C. Pimpasri, M. Noikham, S. Yotphan, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16*, 2697–2704.
- [36] A. Carrère, J.-D. Brion, S. Messaoudi, M. Alami, *Organic Letters* **2013**, *15*, 5606–5609.
- [37] A. V. Gulevskaya, O. N. Burov, A. F. Pozharskii, M. E. Kletskii, I. N. Korbukova, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 696–707.
- [38] A. Gupta, M. S. Deshmukh, N. Jain, *The Journal of Organic Chemistry* **2017**, *82*, 4784–4792.
- [39] J. Maichrowski, M. Gjikaj, E. G. Hübner, B. Bergmann, I. B. Müller, D. E. Kaufmann, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, *2013*, 2091–2105.
- [40] A. A. Kalinin, S. M. Sharipova, T. I. Burganov, Y. B. Dudkina, A. R. Khamatgalimov, S. A. Katsyuba, Y. H. Budnikova, M. Y. Balakina, *Dyes and Pigments* **2017**, *146*, 82–91.
- [41] S. M. Sharipova, A. A. Gilmutdinova, D. B. Krivolapov, Z. R. Khisametdinova, O. N. Kataeva, A. A. Kalinin, *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2017**, *53*, 504–510.
- [42] B. Wu, Y. Yang, X. Qin, S. Zhang, C. Jing, C. Zhu, B. Ma, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1913–1917.
- [43] S. Noji, N. Seki, T. Maeba, T. Sakai, E. Watanabe, K. Maeda, K. Fukushima, T. Noguchi, K. Ogawa, Y. Toyonaga, et al., *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2016**, *7*, 919–923.
- [44] M. Yamaguchi, S. Hara, R. Matsunaga, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Analytical Sciences* **1985**, *1*, 295–296.
- [45] M. Yamaguchi, O. Takehiro, S. Hara, M. Nakamura, Y. Ohkura, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1988**, *36*, 2263–2266.
- [46] M. Yamaguchi, S. Hara, Y. Takemori, M. Nakamura, *Analytical Sciences* **1989**, *5*, 35–38.
- [47] M. Yamaguchi, M. Nakamura, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN* **1987**, *35*, 3740–3745.
- [48] M. Konishi, H. Hashimoto, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1992**, *81*, 1038–1041.
- [49] H. Kamimori, Y. Hamashima, M. Konishi, *Analytical Biochemistry* **1994**, *218*, 417–424.
- [50] K. Nakashima, M. Okamoto, K. Yoshida, N. Kuroda, S. Akiyama, M. Yamaguchi, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1992**, *584*, 275–279.
- [51] M. Yamaguchi, K. Fukuda, S. Hara, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1986**, *380*, 257–265.
- [52] W.-F. Chao, M. Kai, Y. Ohkura, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1990**, *526*, 77–86.
- [53] M. J. Nogueiras, A. Gago-Martinez, A. I. Paniello, M. Twohig, K. J. James, J. F. Lawrence, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *377*, 1202–1206.
- [54] K. J. Dave, C. M. Riley, D. V. Velde, J. F. Stobaugh, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1990**, *8*, 307–312.
- [55] Y. Higashi, *Detection* **2016**, *04*, 16–24.
- [56] Y. Iwasaki, K. Mochizuki, Y. Nakano, N. Maruya, M. Goto, Y. Maruyama, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Biomedical Chromatography* **2012**, *26*, 41–50.
- [57] M. Yoshitake, N. Sejima, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Analytical Sciences* **2007**, *23*, 949–953.
- [58] M. Shimizu, S. Kamachi, Y. Nishii, S. Yamada, *Analytical Biochemistry* **1991**, *194*, 77–81.
- [59] S. Santra, S. K. Dogra, *Chemical Physics* **1996**, *207*, 103–113.
- [60] K. Azuma, S. Suzuki, S. Uchiyama, T. Kajiro, T. Santa, K. Imai, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 443–449.
- [61] S. Ghorbanian, L. K. Mehta, J. Parrick, *Journal of Chemical Research* **2000**, *2000*, 52–53.
- [62] B. Yang, J. Xu, Z.-H. Yuan, D.-J. Zheng, Z.-X. He, Q.-C. Jiao, H.-L. Zhu, *Talanta* **2018**, *189*, 629–635.
- [63] L. Shi, Q. Guan, X. Gao, X. Jin, L. Xu, J. Shen, C. Wu, X. Zhu, C. Zhang, *Analytical Chemistry* **2018**, DOI 10.1021/acs.analchem.8b01721.
- [64] L. Shi, X. Gao, W. Yuan, L. Xu, H. Deng, C. Wu, J. Yang, X. Jin, C. Zhang, X. Zhu, *Small* **2018**, *14*, 1800223–1800229.
- [65] K. Hoogewijs, D. Buyst, J. M. Winne, J. C. Martins, A. Madder, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 2927–2929.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

- [66] Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K. Sakai, T. Akutagawa, *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, *119*, 6223–6231.
- [67] Y. Nakane, T. Takeda, N. Hoshino, K. Sakai, T. Akutagawa, *Journal of Materials Chemistry C* **2017**, *5*, 6234–6242.
- [68] M. Sowinska, M.-T. Le Bris, B. Valeur, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1991**, *60*, 383–386.
- [69] K. Renault, C. Sabot, P.-Y. Renard, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015*, 7992–7996.
- [70] R. T. Kuznetsova, N. S. Savenkova, T. N. Kopylova, A. V. Reznichenko, M. A. Tavrizova, **2003**, *37*, 287–293.
- [71] A. Chevalier, K. Renault, F. Boschetti, P.-Y. Renard, A. Romieu, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, *2015*, 152–165.
- [72] J.-A. Richard, M. Massonneau, P.-Y. Renard, A. Romieu, *Organic Letters* **2008**, *10*, 4175–4178.
- [73] W. G. Herkstroeter, *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97*, 3090–3096.
- [74] Z. Kucybała, M. Pietrzak, J. Pączkowski, *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, 3555–3561.
- [75] Z. Kucybała, J. Pączkowski, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1999**, *128*, 135–138.
- [76] Z. Kucybała, I. Pyszka, B. Marciniak, G. L. Hug, J. Pączkowski, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1999**, *0*, 2147–2154.
- [77] T. Ohyashiki, M. Nunomura, T. Katoh, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1421*, 131–139.
- [78] R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1994**, *79*, 11–17.
- [79] S. M. A. Fateminia, Z. Mao, S. Xu, Z. Yang, Z. Chi, B. Liu, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 12160–12164.
- [80] M. Berg, A. Michalowski, S. Palzer, S. Rupp, K. Sohn, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e89436.
- [81] J. Brunner, *Annual Review of Biochemistry* **1993**, *62*, 483–514.
- [82] Y. Tanaka, M. R. Bond, J. J. Kohler, *Molecular BioSystems* **2008**, *4*, 473–480.
- [83] D. P. Murale, S. C. Hong, J. Yun, C. N. Yoon, J.-S. Lee, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 6643–6646.
- [84] T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513–557.
- [85] D. J. Yee, V. Balsanek, D. R. Bauman, T. M. Penning, D. Sames, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 13304–13309.
- [86] M. Halim, M. S. Tremblay, S. Jockusch, N. J. Turro, D. Sames, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7704–7705.
- [87] Z.-H. Yang, R. Zeng, G. Yang, Y. Wang, L.-Z. Li, Z.-S. Lv, M. Yao, B. Lai, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35*, 1047–1051.
- [88] S. Chinnathambi, S. Karthikeyan, D. Velmurugan, N. Hanagata, P. Aruna, S. Ganesan, *International Journal of Spectroscopy* **2015**, *2015*, 1–12.
- [89] L. Dell'Amico, A. Vega-Peñaloza, S. Cuadros, P. Melchiorre, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 3313–3317.
- [90] X. Yuan, S. Dong, Z. Liu, G. Wu, C. Zou, J. Ye, *Organic Letters* **2017**, *19*, 2322–2325.
- [91] T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Börner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1071–1074.

Chapitre 4 : Nouvelle voie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones et étude de leurs propriétés photophysiques

Conclusion et perspectives

I. Conclusion

L'objectif initial de ces travaux était de développer de nouvelles réactions de ligations chimiosélectives biocompatibles afin de pallier les limites des réactions actuelles. Parmi ces limitations, on retrouve leur réversibilité ou le manque de sélectivité conduisant parfois à la formation de multiples isomères.

Une première étude des propriétés photophysiques de la ligature de Kondrat'eva a mis en évidence son caractère fluorogénique, avec une émission dans le vert à 520 nm à pH physiologique. Ce phénomène a été exploité pour le développement d'une sonde pour la détection et le suivi de l'activité enzymatique de l'urokinase mais également pour la préparation d'une sonde azaphthalimide-tétrazine permettant le suivi cinétique de réactions bio-orthogonales (Schéma 131).

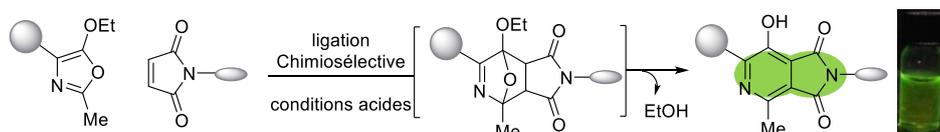


Schéma 131 : Principe de la ligature fluorogénique basée sur la réaction de Kondrat'eva.

Cette dernière approche a inspiré la synthèse d'une sonde fluorogénique analogue plus performante *via* le remplacement de l'azaphthalimide par la fluorescéine. Cette sonde **66** a permis de réaliser le criblage de différentes molécules énolisables à pH physiologique, susceptibles de réagir avec la tétrazine. De cette étude, il en est ressorti un partenaire en particulier, il s'agit de l'édaravone qui est un composé faisant parti de la famille des pyrazolones. Un deuxième criblage a été réalisé afin d'établir une relation entre la structure et la réactivité des différentes pyrazolones étudiées. Cette étude a également permis de trouver une structure de pyrazolone à la fois réactive et comportant un point de fonctionnalisation pour la bioconjugaison. D'un point de vue mécanistique, il semblerait que la pyrazolone réagisse d'une manière assez singulière avec la tétrazine, *via* une première addition de Michael. Ensuite, trois autres équivalents de pyrazolones réagissent à leur tour, afin d'incorporer deux pyrazolones identiques en lieu et place de la tétrazine de départ. Cette réaction se révèle intéressante puisqu'elle est chimiosélective et ne forme qu'une seule molécule à l'issue de la ligature, évitant ainsi les mélanges d'isomères habituellement observés dans l'iEDDA. L'utilité de cette approche a été illustrée pour optimiser le marquage par fluorescence du lysozome humain, qui est une protéine dont la fonctionnalisation est réputée difficile (Schéma 132).

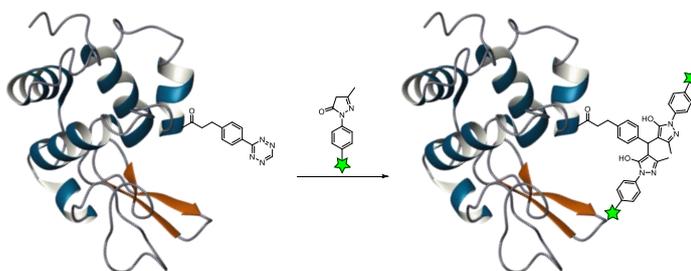


Schéma 132 : Marquage chimiosélectif et fluorescent du lysozome humain

Conclusion

Ce mécanisme d'addition de Michael de la pyrazolone a été étudié sur d'autres systèmes conjugués afin de mettre au point une autre réaction biocompatible. Parmi les différents systèmes étudiés, la N-diméthylamino-mérocyanine **99** s'est montrée particulièrement intéressante de par sa stabilité aux biomolécules. Toutefois, la réaction entre cet accepteur de Michael et la pyrazolone ainsi que la stabilité du produit formé, se sont avérées trop dépendantes du substrat pour pouvoir établir une stratégie générale de ligation. Ce projet a donc été abandonné, mais les connaissances acquises lors de cette étude, ont conduit au développement d'une sonde profluorescente et hydrosoluble pour la détection spécifique de biothiols (Schéma 133). Cette sonde permet de détecter les biothiols d'un pH physiologique jusqu'à un pH modérément acide (pH 5), avec des exaltations de fluorescence allant d'un facteur 15 jusqu'à 45.



Schéma 133 : Sonde profluorescente pour la détection spécifique de biothiols basée sur un pigment pyrazolone

En parallèle de ces travaux de développement de nouvelles ligations, une nouvelle méthodologie d'accès aux 3-benzoylquinoxalin-2(1H)-ones a été découverte en collaboration avec le Dr. Hasan Mtiraoui (Université de Monsatir, Pr. Msaddek). De cette approche, une dizaine de quinoxalino-2(1H)-ones a pu être obtenue avec des rendements compris entre 40 et 82%. Suite à ces travaux, il a été observé qu'une réduction de la cétone aromatique en position 3, en alcool correspondant, conduisait à la formation de composés fluorescents lorsque ceux-ci étaient substitués par des groupements électrodonneurs en position 6 ou 7. Ainsi, trois nouveaux composés fluorescents ont pu être obtenus. De ces trois composés, la 7-aminoquinoxalin-2(1H)-one **158** se détache des autres en affichant un rendement quantique sans précédent pour cette famille de composés (jusqu'à 0,80 dans le DMSO). Les caractéristiques optiques de ce composé ont donc été exploitées pour la synthèse et l'évaluation *in vitro* d'une sonde profluorescente pour la détection du sulfure d'hydrogène (Schéma 134).

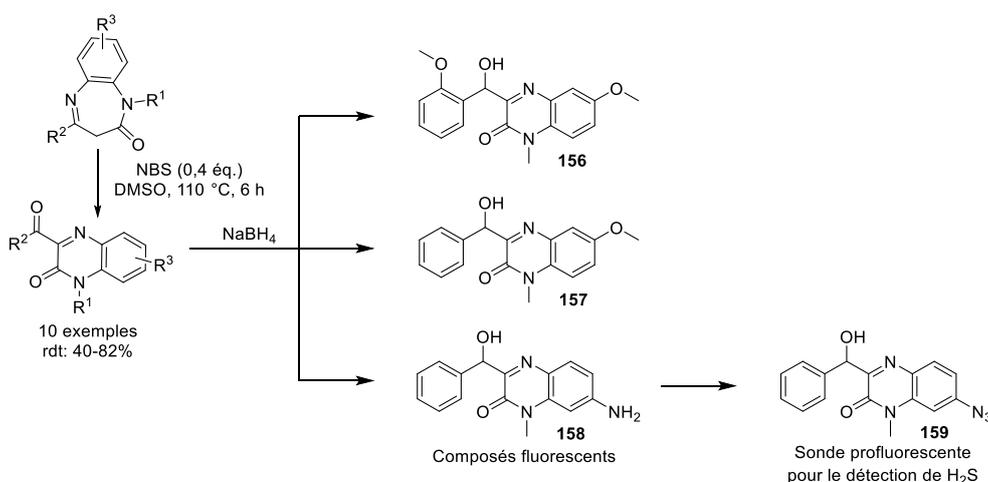


Schéma 134 : Résumé des synthèses des différentes quinoxalin-2(1H)-ones fluorescentes

II. Perspectives

Lors de ce doctorat deux nouvelles ligations chimiosélectives ont été étudiées, il s'agit de la réaction de Kondrat'eva ainsi que la conjugaison pyrazolone-tétrazine. La ligation de Kondrat'eva est compatible avec la tétrazine et orthogonale à la CuAAC. On peut donc envisager la préparation d'un réactif hétérotrifonctionnel basé sur les fonctions maléimides, tétrazines, et alcynes pouvant réagir chimiosélectivement et respectivement avec l'oxazole (Diels-Alder), la pyrazolone (addition de Michael) et l'azoture (cycloaddition 1,3 dipolaire). Pour cela, il faudra vérifier, en amont, la compatibilité entre le maléimide et la pyrazolone. Si tel n'est pas le cas, il faudra donc faire la conjugaison oxazole-maléimide en premier lieu (Schéma 135).

Ce réactif devrait avantageusement conduire après une triple conjugaison, à la formation d'un produit unique.

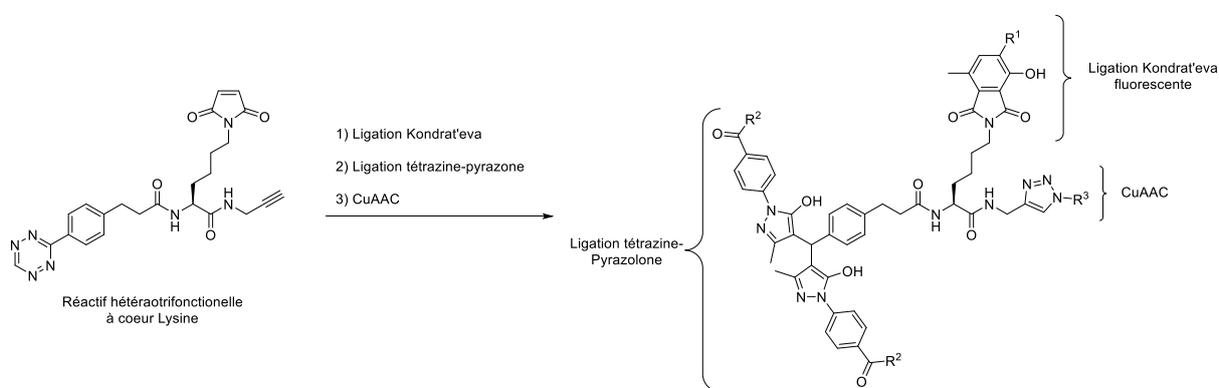


Schéma 135 : Perspective d'un réactif hétérotrifonctionnel basé sur les ligations Kondrat'eva et tétrazine-pyrazolone

**Revue 1: 5-Alkoxyoxazole - A
Versatile Building Block in
(Bio)organic Synthesis**

1 | Oxazole Building Blocks

5-Alkoxyoxazole – A Versatile Building Block in Bioorganic and Organic Synthesis

Laurie-Anne Jouanno,^[a] Kévin Renault,^[b] Cyrille Sabot*^[b] and Pierre-Yves Renard*^[b]

Abstract: The 5-alkoxyoxazole ring system has proved to be a useful and versatile building block that is involved in a variety of chemical transformations (e.g., hetero-Diels–Alder reactions, formal 1,3-dipolar cycloadditions, photochemical [2+2] cycloadditions, Claisen rearrangements, and ring-opening processes). 5-Alkoxyoxazoles have provided synthetic access to hetero-

aromatic scaffolds such as pyridines, furans, oxadiazolines, pyrrolidines, and significant linear chemical patterns, including amino acid derivatives. This review focuses on the broad range of reactivity of 5-alkoxyoxazoles and their subsequent applications to the syntheses of naturally occurring compounds and biologically active molecules.

1. Introduction

The oxazole ring system is a five-membered heteroaromatic scaffold that contains an oxygen and nitrogen atom that is separated by one carbon atom.^[1] Although the oxazole moiety is found in many natural products such as bengazole A, disorazole C1, mycalolide A, and hennoxazole A (Figure 1),^[2] its 5-alkoxy counterparts are unnatural, which perhaps explains for their under-representation in the literature.

In comparison with their analogues, the preparation and use of 5-alkoxyoxazoles has long been neglected, which is most likely the result of their low stability, especially under acidic and thermal conditions.^[3] Alternative protocols that involve mild and effective cyclodehydration processes instead of the traditional monomolecular Robinson–Gabriel cyclodehydration^[4] reaction, which requires harsh conditions and long reaction times, have recently emerged (Scheme 1, a). Other methods based on bimolecular processes include the metal-catalyzed decomposition of α -diazo esters **3** and **4** in the presence of nitriles and oximes, respectively (Scheme 1, b and c),^[5,6] and a Ritter-type reaction that involves a nitrile and α -oxo tosylate or α -triflyloxy ester **5**, as recently reported by Taylor^[7] and our group,^[8] respectively (Scheme 1, d).

Zhu and Masson have developed an elegant multicomponent approach to 5-alkoxyoxazoles from α -isocyanacetate **6** along with aldehyde and amine precursors. In this case, the addition of the isocyanide to the iminium species, which is generated in situ, furnished nitrilium intermediate **7**, which subse-

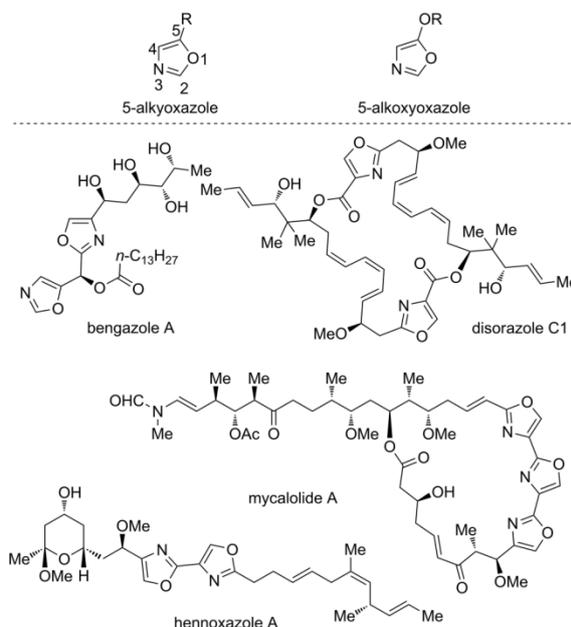


Figure 1. Examples of natural products that contain the oxazole core.

quently underwent cyclization to provide the corresponding 5-alkoxyoxazole (Scheme 1, e).^[9] These recently developed bi- and trimolecular methods widen the scope of examples of 5-alkoxyoxazole derivatives that are reported in the literature.

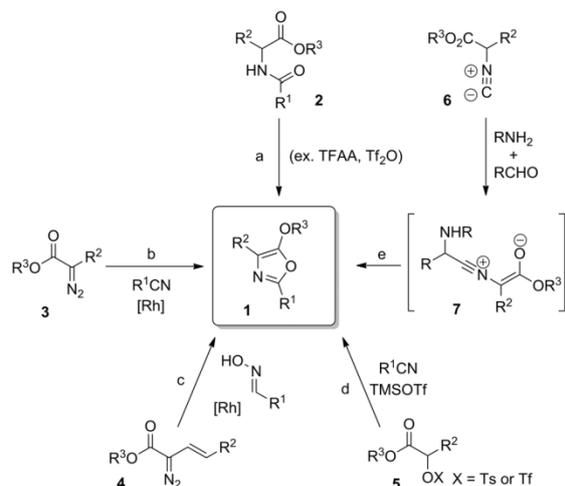
As a direct consequence of their lower stability, 5-alkoxyoxazoles advantageously exhibit a higher reactivity than their aliphatic analogues, which makes this class of compounds particularly attractive as a means to access valuable scaffolds.

These heterocycles are important key intermediates with versatile reactivities that depend on the nature of the electrophile and the reaction conditions (Figure 2). The electron-rich charac-

[a] Centre for Catalysis, Research and Innovation, Department of Chemistry, University of Ottawa, Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada

[b] Normandie Univ, COBRA, UMR 6014 & FR 3038; CNRS, Université de Rouen, 1 rue Tesnière, 76821 Mont-Saint-Aignan, Cedex, France
E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr
<http://www.lab-cobra.fr/?equipe=equipe-2>

ORCID(s) from the author(s) for this article is/are available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.201600127>.



Scheme 1. Synthetic approaches for the preparation of 5-alkoxyoxazoles (TFAA = trifluoroacetic anhydride, Tf = trifluoromethylsulfonyl, TMS = trimethylsilyl, Ts = *para*-tolylsulfonyl).

56 ter of 5-alkoxyoxazoles was first exploited in Diels–Alder reactions with electron-deficient systems. In fact, they provided a

straightforward entry to heteroaromatic scaffolds such as 2-alkoxyfurans and 3-hydroxypyridines through a [4+2] cycloaddition process with alkynes and alkenes, respectively (Scheme 2, a). Moreover, a number of non-aromatic heterocyclic ring systems, including oxadiazoles and triazolines (Scheme 2, b), fused oxazolines (Scheme 2, c), and oxazolones (Scheme 2, d) are also accessible by employing 1,3-dipolar and [2+2] cycloadditions along with [3,3] sigmatropic rearrangements. Finally, linear patterns such as isocyanoacetates (Scheme 2, e), azomethine ylides (Scheme 2, f), which can lead to pyrrolidines through a [3+2] cycloaddition reaction, and amino acid and amino alcohol derivatives (Scheme 2, g), can be accessed by ring-opening strategies of 5-alkoxyoxazoles.

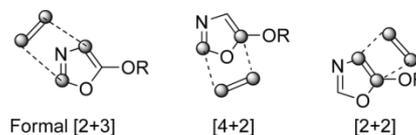


Figure 2. Range of reactivity of 5-alkoxyoxazoles.

This microreview will focus on the broad range of reactivities of 5-alkoxyoxazoles, which will be demonstrated by their subsequent use in the synthesis of natural products.



After obtaining an M.Sc. in organic chemistry from the University of Rennes I (France), Laurie-Anne Jouanno received her Ph.D. at the University of Rouen under the supervision of Prof. Pierre-Yves Renard and Dr. Cyrille Sabot of the bio-organic team. She has worked as a postdoctoral fellow under the guidance of Prof. Barriault at the University of Ottawa (Canada) since January 2015.



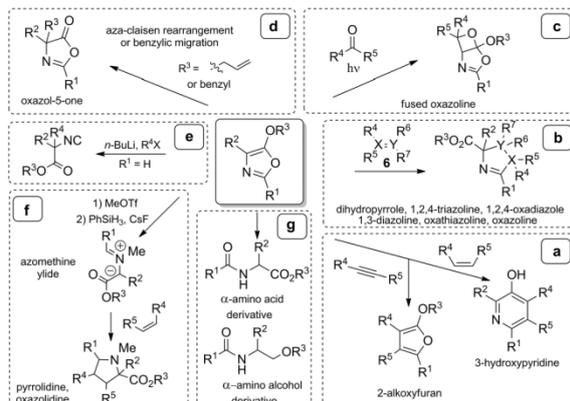
Kévin Renault was born in 1992 in Mont Saint Aignan (France). He studied chemistry and obtained a Bachelor of Chemistry degree with honor and a Master of Chemistry degree with honor at Normandy University Rouen (France). He is a Ph.D. student under the supervision of Prof. Dr. Pierre-Yves Renard and Dr. Cyrille Sabot at Normandy University Rouen (France). He works on the development of new reactions for bio-orthogonal conjugation.



Cyrille Sabot received his Ph.D. in organic chemistry in 2007 at the Université de Strasbourg under the supervision of Dr. Charles Mioskowski. After postdoctoral research positions at the University of Québec at Montreal with Prof. Sylvain Canesi (2007–2009) and the University Joseph Fourier in Grenoble with Dr. Andrew Greene (2009–2010), he obtained a permanent position in 2010 in the CNRS at the Université de Rouen. His current research fields in the bio-organic team include the development of chemical tools for bioconjugation and the synthesis of compounds of interest through new synthetic methodologies.



Prof. Pierre-Yves Renard received his Ph.D. in organic chemistry in 1994 at the Université Paris-Sud/Ecole Polytechnique under the supervision of Prof. Jean-Yves Lallemand. After a nine year period (1994–2003) as French Department of Defense procurement agency staff (Délégation générale pour l'armement) at CEA Saclay, where he conducted research on biocompatible means to detoxify organophosphorus nerve agents under the supervision of Dr. Charles Mioskowski, he was appointed professor in 2003 at the Université de Rouen (France). He has, since then, led the bio-organic chemistry group, and his current research fields are the development of smart probes for the detection of bioanalytes and chemical tools for bioconjugation and medicinal chemistry.



Scheme 2. Versatile reactivity of 5-alkoxyoxazoles: cycloaddition (a–c), rearrangement (e), and ring-opening (d, f, and g) processes.

2. Hetero-Diels–Alder (h-D-A) Reactions – Access to 3-Hydroxypyridine and 2-Alkoxyfuran Systems

5-Alkoxyoxazoles are convenient dienes in Diels–Alder reactions with alkenes and alkynes, which provide the corresponding electron-enriched pyridine and furan derivatives, respectively. The reaction with olefins, eponymously named the Kondrat'eva reaction, was the first reported reaction to involve oxazoles substituted at the C-5 position by alkoxy groups.

2.1. In the Presence of Alkenes – Synthesis of 3-Hydroxypyridines

The 3-hydroxypyridine moiety is an important structural motif that can be found in naturally occurring products and biologically active compounds (Figure 3). Pyridoxine hydrochloride, which is the active ingredient of vitamin B₆, is an essential nutri-

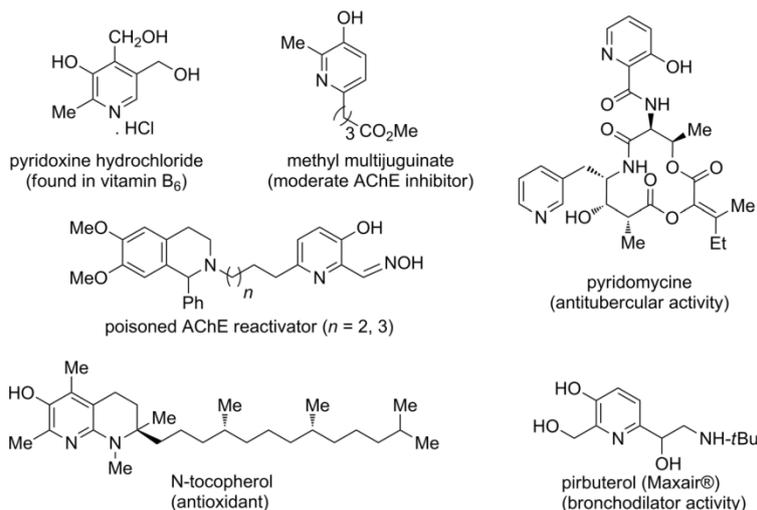


Figure 3. Presence of the 3-hydroxypyridine core in natural and biologically active molecules.

ent involved in protein and glycogen metabolism. It also plays an important role in the immune system and the synthesis of neurotransmitters and hemoglobin.^[10] Other examples of compounds that contain the 3-hydroxypyridine moiety include methyl multijuginate, which was recently isolated from the leaves of *Senna multijuga*,^[11] pyridomycine, which exhibits antitubercular activity against *Mycobacterium tuberculosis*,^[12] N-tocopherol, which is well-known for its antioxidant properties,^[13] and pirbuterol, which is used as a bronchodilator.^[14] Moreover, the 3-hydroxypyridine core has been used to develop acetylcholinesterase reactivators to restore the enzyme's catalytic activity, which is inhibited by organophosphorus agents.^[15] Also, apart from these aforementioned biologically relevant chemicals, the 3-hydroxypyridine scaffold is a convenient key intermediate for the preparation of natural compounds such as pterocellin A^[16] (Figure 4) and hydroxypiperidine-based products such as juliprosopine, which was extracted from *Prosopis juliflora* leaves.^[17]

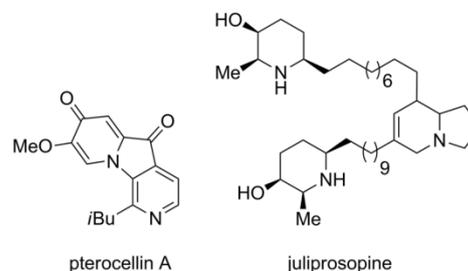
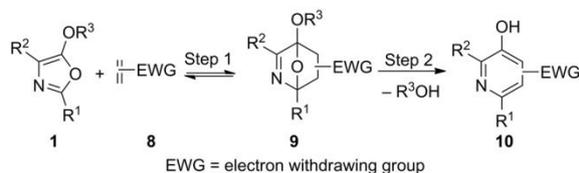


Figure 4. Ring-fused systems and piperidines that are prepared from 3-hydroxypyridines.

In fact, shortly after the first report of normal electron demand [4+2] cycloadditions of alkyl-substituted oxazoles with electron-poor olefins by Kondrat'eva in the 1950s, Firestone extended this approach to 5-alkoxyoxazole systems for the preparation polysubstituted 3-hydroxypyridines (Scheme 3).^[18]

Heterocycle ring system **1** underwent a reaction with dienophile **8** through an h-D-A process (Scheme 3, Step 1) to afford oxabicyclic intermediate **9**, which subsequently aromatized to give the corresponding 3-hydroxypyridine **10** with the concomitant loss of a molecule of alcohol (Scheme 3, Step 2).^[19]



Scheme 3. Synthesis of polysubstituted 3-hydroxypyridines.

The presence of a strong electron-donating alkoxy group instead of an alkyl group at the C-5 position of the oxazole ring system increases its HOMO energy level, which thus favors the cycloaddition step with electron-poor olefins (Table 1).

Table 1. Energies of HOMOs and LUMOs oxazole.^[20]

Entry	Heterocycle	HOMO [eV]	LUMO [eV]	ΔE [eV]
1	unsubstituted oxazole	-9.53	4.49	14.02
2	5-methyloxazole	-9.06	4.69	13.75
3	5-methoxyoxazole	-8.74	4.48	13.22

Indeed, the presence of electron-withdrawing groups on the olefin results in a decrease in the energy gap between the HOMO of the diene and the LUMO of the dienophile, as shown in frontier orbital energy diagram in Figure 5. A large variety of dienophiles have efficiently undergone the Kondrat'eva cycloaddition process, including α,β -unsaturated enones, acrylates, fumarates, maleates, maleimides, an acrylonitrile, and an acrylic acid.^[21]

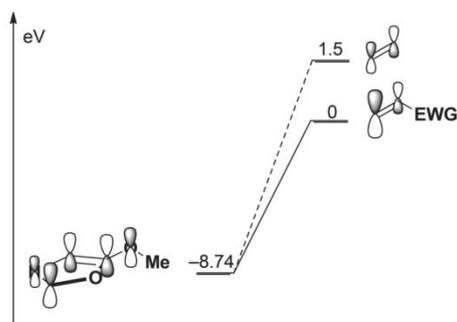


Figure 5. Energy of the HOMO of 5-methoxyoxazole^[22] and the LUMO of unsubstituted and monosubstituted ethylene.

With regard to the regioselective outcome of the h-D-A reaction, the 3-hydroxypyridine that is substituted at the C-4 position was mainly obtained when the reaction was carried out with a monosubstituted dienophile.^[23] Indeed, this experimental result is corroborated by the molecular orbital diagram that is shown in Figure 6. The presence of an electron-withdrawing group on the dienophile increases the orbital coefficient of the CH_2 moiety, which improves the overlap with the HOMO of the diene to give the 4-substituted 3-hydroxypyridine. Conse-

quently, when the reaction is performed with an unsymmetrically disubstituted dienophile, the most electron-withdrawing group will ultimately be positioned at the C-4 position of the pyridine core.

141

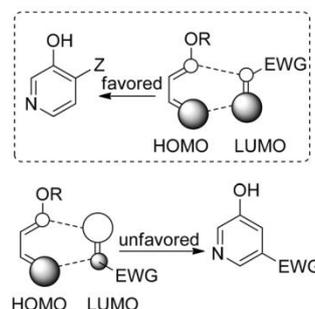
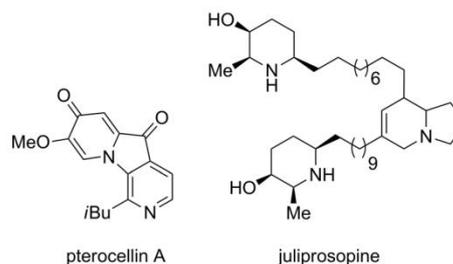


Figure 6. Regioselectivity of the Kondrat'eva reaction.

The nature of the substituent on the 5-alkoxyoxazole scaffold also affects the progress of the cycloaddition step. Indeed, when the C-2 position is functionalized with a phenyl group, the Diels-Alder reaction is unfavorable in terms of both steric hindrance and electronic effects as a result of the conjugation between the π -electrons of both aromatic rings, which stabilize the 5-alkoxyoxazole.^[24]

Few studies have been reported concerning the stereochemical outcome of this pericyclic reaction, as the aromatization process generally proceeds too rapidly under the reaction conditions of the cycloaddition step to allow for the isolation of the oxabicyclic intermediate. With regard to this, Ibatá^[25] and co-workers performed a [4+2] cycloaddition reaction between maleimide derivatives **11** and 5-alkoxyoxazoles **12** (Scheme 4), which are substituted by a *para*-nitrobenzene group at the C-4 position that is reported to increase the stability of the oxabicyclic intermediate. Their study showed that *endo* adduct **13** (Table 2) was mainly obtained regardless of the reaction conditions that were employed (i.e., varying the substituent, solvent, and temperature).

161



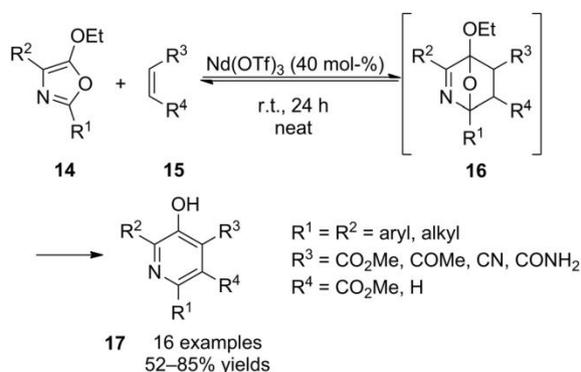
Scheme 4. [4+2] Cycloaddition reaction between 5-methoxyoxazoles and maleimides.

As far as the aromatization step is concerned, it may be promoted by the subsequent addition of Brønsted acids, such as trichloroacetic acid,^[26] or an alcoholic hydrogen chloride solution,^[27] or by using thermal conditions.^[25a] Alternatively, our group^[24b] recently reported the use of lanthanide triflates such as $\text{Nd}(\text{OTf})_3$ to promote both the formation of cycloadduct **16**

Table 2. Stereochemistry of the cycloaddition step of the Kondrat'eva reaction.

Entry	R ¹	R ²	Solvent	Temp. [°C]	Time [h]	Isolated % yield <i>endo/exo</i> - 13
1	CH ₃	CH ₃	CH ₃ CN	80	50	58:32
2	CH ₃	CH ₃	toluene	100	70	54:29
3	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃ CN	80	24	58:29
4	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃ CN	80	50	53:21
5	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃ CN	80	50	96:3

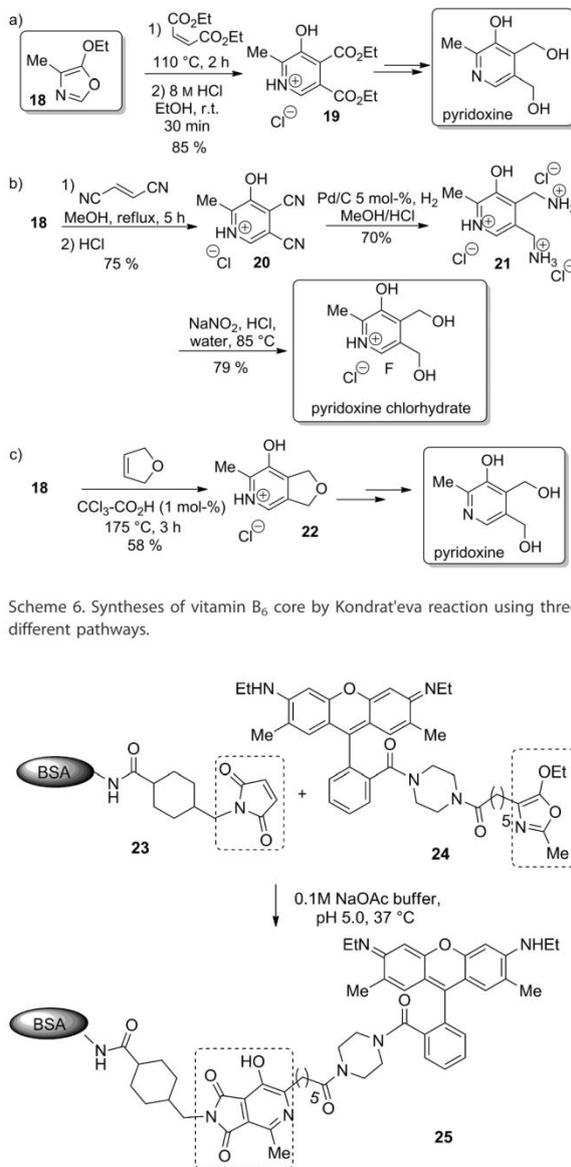
followed by the aromatization step to lead to **17** (Scheme 5). In this particular case, the reaction was realized under mild conditions (i.e., room temperature, neat, and atmospheric pressure), whereas most other examples reported in the literature require elevated temperatures.



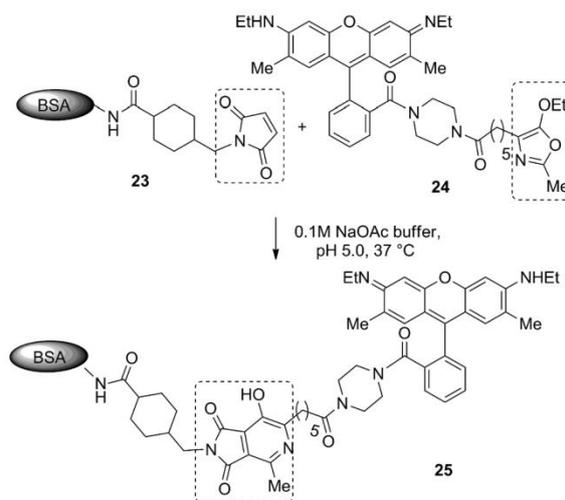
Scheme 5. Synthesis of 3-hydroxypyridines at room temp. in the presence of a lanthanide catalyst.

The h-D-A/aromatization process has also been applied to the preparation of natural products such as one of the forms of vitamin B₆ (i.e., pyridoxine), which represents one of the most prominent applications of this approach.^[10] Because of the industrial importance of pyridoxine, different synthetic approaches based on the Kondrat'eva reaction have been investigated, which all use 5-ethoxy-4-methyloxazole (**18**) as the common intermediate.^[18b,28] Oxazole **18** can undergo a reaction with diethyl maleate (Scheme 6, a), fumaronitrile (Scheme 6, b), and 2,5-dihydrofuran (Scheme 6, c) to lead to the corresponding polysubstituted 3-hydroxypyridinium chloride **19**, **20**, and **22** in 85, 75, and 58 % yield respectively, which can then proceed to form the pyridoxine after a few additional steps.

An optimization of the reaction conditions with regard to the choice of dienophile, reaction temperature, and pH extended the use of the Kondrat'eva reaction to the field of bioconjugation. Indeed, under well-defined conditions, both the cycloaddition and aromatization occurred in a single-step process to form an irreversible and stable azaphthalimide-based linkage. This strategy has been applied to label peptide and protein substrates. Maleimide-modified bovine serum albumin (BSA) **23** (Scheme 7) was, for instance, efficiently functionalized with a fluorescent dye (rhodamine 6G), which was covalently bonded to the 5-ethoxyoxazole moiety (i.e., **24**) under mild aqueous conditions.^[29]



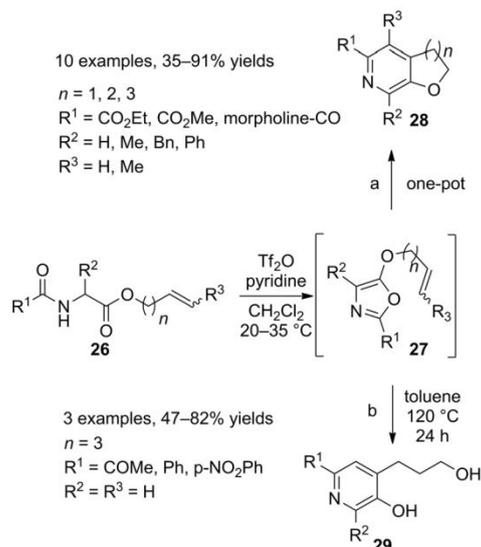
Scheme 6. Syntheses of vitamin B₆ core by Kondrat'eva reaction using three different pathways.



Scheme 7. Application of the Kondrat'eva reaction to protein labelling.

An intramolecular version of the Kondrat'eva pyridine synthesis that involves a cascade cyclodehydration/cycloaddition/aromatization sequence has recently been developed by Mans et al.^[30] 5-Alkenoxyoxazoles **27**, which were generated in situ by the cyclodehydration of amido ester precursors **26** in the presence of triflic anhydride and pyridine at room temperature, underwent the Kondrat'eva reaction to provide facile access to the corresponding fused dihydropyrano(furano)pyridines **28** (Scheme 8, a). Several derivatives were successfully prepared from oxamate precursors **26**, although the cycloaddition step failed to proceed when R¹ = Me, MeO, (OMe)₂CH, Ph, and Me₂N. Collectively, these results suggest that, unlike the usual Kon-

dra'eva reaction, the transformation in this case may proceed through an inverse electron demand cycloaddition as a result of the presence of an electron-withdrawing group at 2-position of the oxazole ring and an electron-rich olefin. Remarkably, two products could be selectively obtained, which depended on the reaction conditions of the cycloaddition step. Fused pyridine system **28** was provided under acidic conditions (Scheme 8, a), whereas 3-hydroxypyridine **29** was selectively formed under thermal conditions (Scheme 8, b).

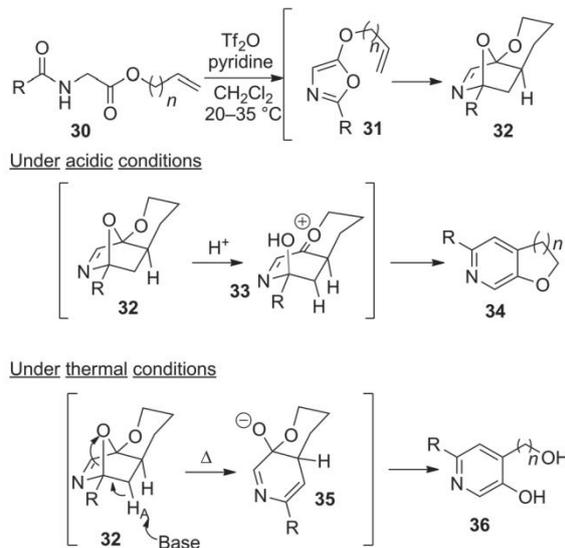


Scheme 8. Intramolecular Kondrat'eva reaction from 5-alkenoxazolones.

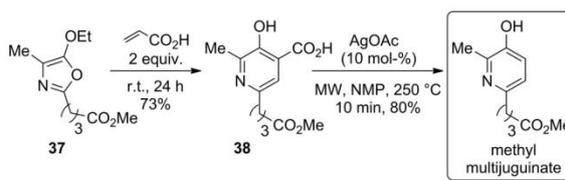
For the reaction mechanism, the authors proposed the first step of the cycloaddition reaction to lead to the formation of common oxabicyclic intermediate **32** (Scheme 9). Under acidic conditions, this intermediate can be opened regioselectively by protonation of the bridge oxygen atom followed by dehydration of oxonium species **33**. On the other hand, under thermal conditions, H_A is first removed by deprotonation, which leads to ring-opened intermediate **35** with the opposite selectivity to yield hydroxypyridine **36**.

The aforementioned examples of Kondrat'eva reactions led to 3-hydroxypyridines that are substituted at the 4- and/or 5-positions because of the presence of one or more electron-deficient (or electron-donating in the latter example) substituents on the dienophile, which are necessary to promote the cycloaddition step. Recently, a modified version of the Kondrat'eva reaction, which allows for the formation of 3-hydroxypyridines substituted only at the C-2 and C-6 positions, was reported by our group. In the first approach, which is illustrated by the synthesis of methyl multijuguinate, the 2,3-disubstituted 3-hydroxypyridine was prepared by a two-step strategy: (a) the synthesis of 3-hydroxyisonicotinic acid **38** by using a Kondrat'eva reaction with acrylic acid as the dienophile and (b) the protodecarboxylation of **38** mediated by AgOAc at 250 °C under microwave conditions (Scheme 10).

Further optimization of the cycloaddition step enabled direct access to 4- and 5-unsubstituted 3-hydroxypyridines **42** from 5-

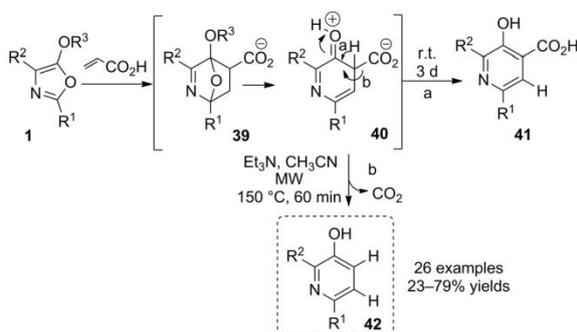


Scheme 9. Proposed mechanisms.



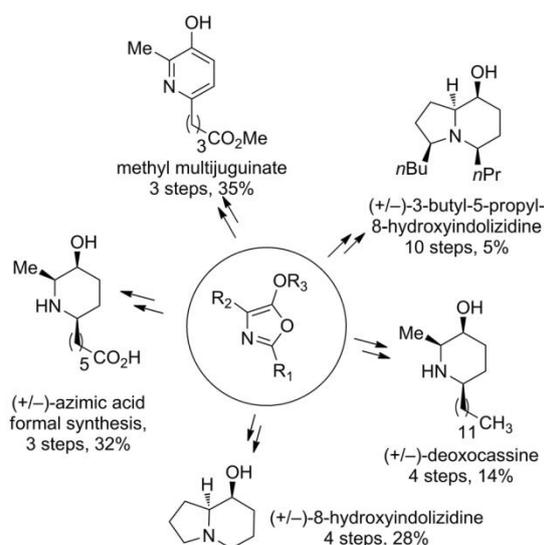
Scheme 10. Protodecarboxylative synthesis of methyl multijuguinate (MW = microwave, NMP = *N*-methylmorpholine *N*-oxide).

alkoxyoxazole precursors **1** under milder conditions than those used for methyl multijuguinate (150 vs. 250 °C, CH_3CN vs. NMP, 246 catalyst-free).^[31] The synthetic method proved general and wide in scope (26 examples, 23–79 % yield). In the suggested mechanism, intermediate **40** undergoes a release of CO_2 with concomitant aromatization to furnish compound **42** (Scheme 11, b). This reaction pathway circumvents the usual keto-enol isomerization process that provides **41** (Scheme 11, a).^[32]



Scheme 11. Decarboxylative Kondrat'eva cycloaddition route to 2,6-disubstituted 3-hydroxypyridines.

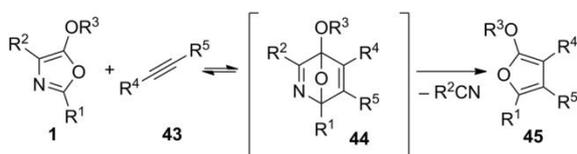
Naturally occurring 2,6-disubstituted 3-hydroxypyridines have been prepared by using this decarboxylative Kondrat'eva reaction. Methyl multijuginate was prepared within three steps in 35% overall yield (Scheme 12).^[31] Moreover, the pyridine derivatives prepared by this method can be used as key intermediates (e.g., azimic acid and deoxocassine) and fused piperidinol systems (e.g., indolizidine). This approach involves a diastereoselective heterogeneous catalytic hydrogenation of the pyridine system to establish the stereochemistry of the piperidine core.



Scheme 12. Synthesis of natural products by employing decarboxylative Kondrat'eva 3-hydroxypyridine synthesis.

2.2. In the Presence of Alkynes – Access to 2-Alkoxyfurans

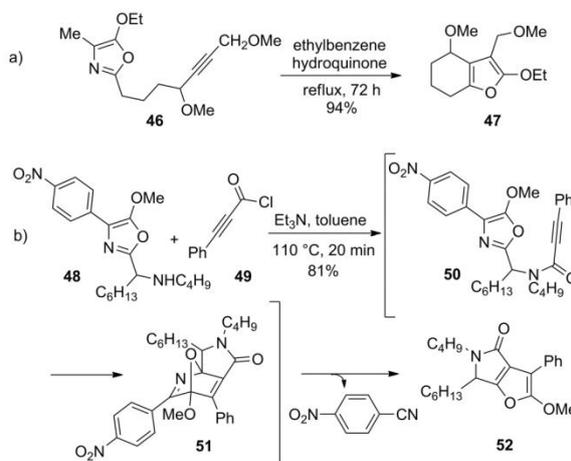
Similar to olefins, 5-alkoxyoxazoles **1** readily undergo reactions with electron-deficient alkynes **43** to yield the corresponding oxabicyclic intermediates **44**. At this stage, the absence of a removable proton prevents an elimination process but promotes a retro-Diels–Alder (r-D-A) reaction instead to afford the corresponding alkoxyfuran **45** and nitrile as a byproduct (Scheme 13).



Scheme 13. Reaction of 5-alkoxyoxazoles with alkynes.

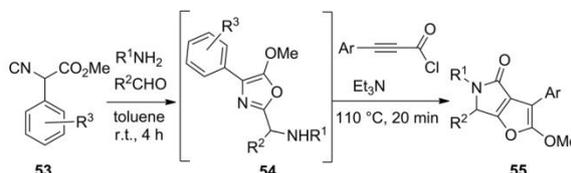
Few dienophiles such as dimethyl acetylenedicarboxylate, diphenylacetylene, and propargyl acetate, have been used in this reaction.^[33] Subsequently, an intramolecular version of this transformation was investigated for the preparation of bicyclic

structures such as tetrahydrobenzofuran **47** (Scheme 14, a) and furopyrrolone **52** (Scheme 14, b).^[34]



Scheme 14. Synthesis of 2-alkoxyfuran and furopyrrolone derivatives by employing an intramolecular h-D-A/r-D-A process.

It is noteworthy that 5-alkoxyoxazoles can be prepared in situ by an Ugi-type multicomponent reaction involving an amine, an aldehyde, and α -isocyano ester **53** (Scheme 15). 5-Alkoxyoxazole **54** was then derivatized in situ with an alkyne moiety by undergoing an acylation/h-D-A/r-D-A reaction sequence to afford the desired furopyrrolone **55**. This four-step one-pot procedure has been shown to afford 5-furopyrrolones in good overall yields (40–52%).^[34]



Scheme 15. Synthesis of furopyrrolone derivatives via a one-pot acylation/h-D-A/r-D-A procedure.

The aforementioned h-D-A/r-D-A strategy that involves electron-poor alkynes has been employed in either an intra- or intermolecular fashion towards the syntheses of diverse natural products such as fredericamycin A,^[35] cadiolide A, B, and D,^[36] stemoamide,^[37] norsecurine,^[38] paniculide A,^[39] and geigerin 291 (Figure 7).^[40] Highlights of some of these syntheses are discussed below.

Rao and Reddy reported the synthesis of the isoquinoline moiety that was comprised the D, E, and F rings of fredericamycin A. Initially, the preparation of key intermediate **59** was achieved by submitting 5-ethoxy-4-methyloxazole (**18**) to the sequential h-D-A/r-D-A process in the presence of methyl 5-methylhex-5-en-2-ynoate (**60**, Scheme 16). Furan **59** subsequently underwent a [4+2] cycloaddition reaction with a 2,3-pentadienoate derivative to lead to a substituted phenyl ring, that is, the precursor of quinoline **57**.

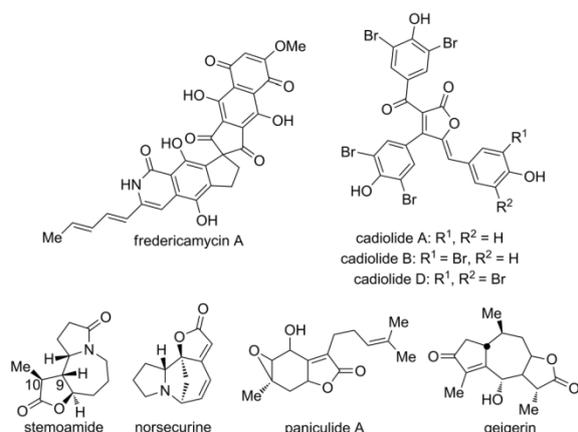
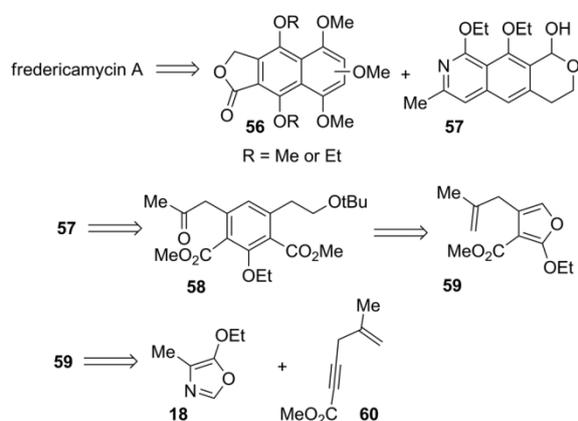
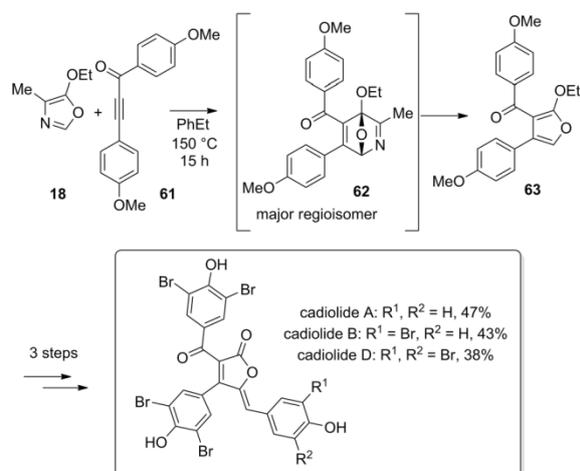


Figure 7. Natural products synthesized from 5-alkoxyoxazoles.



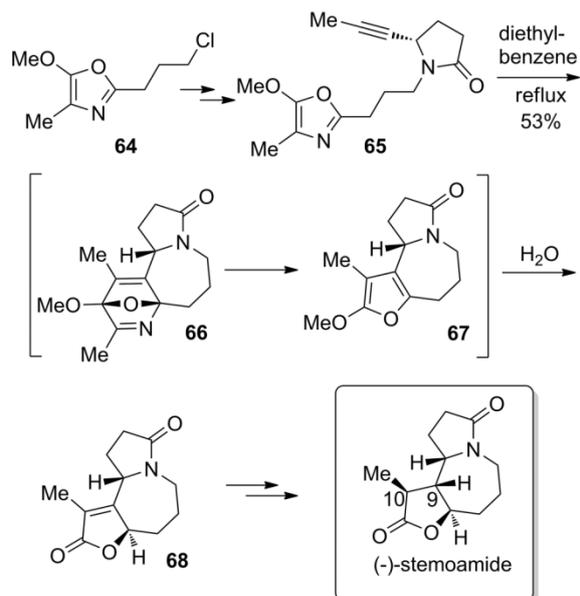
Scheme 16. Approach to the synthesis of fredericamycin A by employing an h-D-A/r-D-A reaction between 5-ethoxy-4-methyloxazole and methyl 5-methylhex-5-en-2-ynoate.

- In 2014, the Boukouvalas group used the same method for the synthesis of cadiolides A, B, and D. Indeed, these marine butenolides, which were isolated from Indonesian and Korean ascidians, were recently prepared from 5-ethoxy-4-methyloxazole (**18**) in the presence of an asymmetrically substituted dienophile **61** (Scheme 17). The subsequent furan derivative **63** provided access to the desired cadiolide A, B, and D within three steps.
- 311 (-)-Stemoamide is an alkaloid isolated from the *Stemona tuberosa* plant, the root extracts of which were commonly used in Chinese traditional medicine to treat respiratory diseases. The structure of the tricyclic alkaloid was first elucidated in 1992 by Xu and co-workers.^[41] Five years later, Jacobi proposed a synthesis of this natural product by starting from 5-alkoxyoxazole **64**, which was prepared on a gram scale (20 g, Scheme 18). An intramolecular cycloaddition reaction led to intermediate **66**, which underwent an r-D-A reaction to afford **67**. Hydrolysis of the 2-methoxyfuran moiety of **67** then afforded butenolide **68**.
- 321 Importantly, after a final reduction and epimerization at C-10,



Scheme 17. Synthesis of cadiolides through an h-D-A/r-D-A process.

this method allowed access to the desired seven-membered ring system of (-)-stemoamide on a multigram scale.

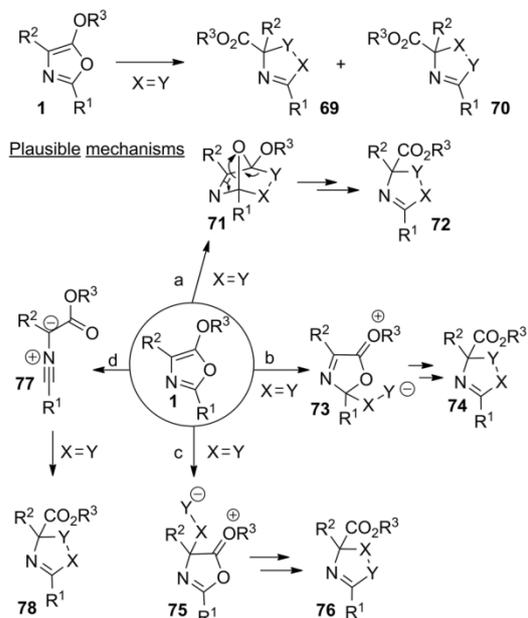


Scheme 18. Total synthesis of (-)-stemoamide by employing an intramolecular h-D-A reaction followed by an r-D-A process.

3. Formal 1,3-Dipolar Cycloadditions

5-Alkoxyoxazoles can also be engaged in 1,3-dipolar-like cycloadditions with suitable dipolarophiles X=Y (e.g., aldehydes, oxomalonates, thioaldehydes, tetracyanoethylene, isatin, nitrosoaryl derivatives, and diazodicarboxylates) to form the corresponding five-membered ring heterocycles (Scheme 19).

Formal [3+2] cycloaddition



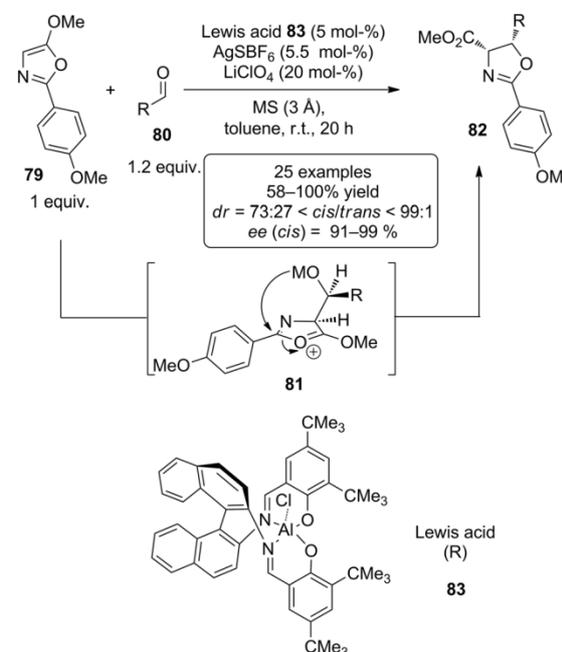
Scheme 19. Plausible mechanisms for formal [3+2] cycloaddition reactions with 5-alkoxyoxazoles.

In this context, four plausible pathways, which depend on the nature of the dipolarophile, the effect of the substituent on the oxazole ring, and the reaction conditions are envisaged: (a) a [4+2] cycloaddition reaction between the oxazole and the dienophile to lead to oxabicyclic intermediate **71**, which would collapse and cyclize again to give **72**; (b) and (c) electrophilic addition of the dipolarophile at the C-2 or C-4 position of the oxazole ring followed by a second nucleophilic addition to the oxonium intermediate to generate **74** and **76**, respectively; (d) the 5-alkoxyoxazole undergoes a ring-opening reaction to give nitrile ylide **77**, which subsequently undergoes a 1,3-dipolar cycloaddition to afford **78**.

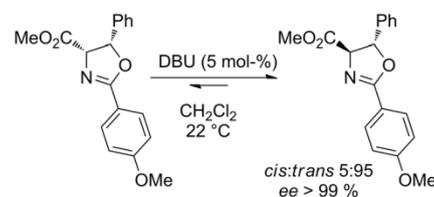
3.1. Carbonyl- and Thiocarbonyl-Based Dipolarophiles – Synthesis of Oxazoline and Thiazoline Derivatives

Formal [3+2] cycloadditions have been reported between 5-alkoxyoxazoles and carbonyl derivatives such as aldehydes, thioaldehydes, and activated carbonyl compounds [i.e., oxomalonates, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), and isatin]. It is noteworthy that these reactions generally require the presence of a Lewis acid such as SnCl_4 , TiCl_4 , or AlCl_2Me , to decrease the LUMO energy level of the dipole. As illustrated by the reaction of 5-alkoxyoxazole **79** with aldehydes **80**, the use of Lewis acids enables the simultaneous control of the regiochemistry (2-oxazoline vs. 3-oxazoline) and the stereochemistry of the process (Scheme 20).^[42] Indeed, by using chiral salen-aluminium complex **83**, the reaction pro-

ceeded through intermediate **81** and favored the formation of the *cis* isomer of 2-oxazoline **82** with a high enantiomeric excess (*ee*) value.^[43]

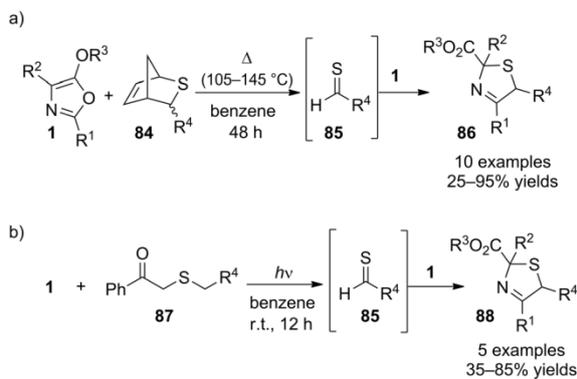

 Scheme 20. Enantioselective aldolization between 5-alkoxyoxazoles and aldehydes (*dr* = diastereomeric ratio, M = metal of chiral complex **83**).

Importantly, the *trans* product can be readily prepared from the *cis* form by carrying out a thermodynamic epimerization in the presence of a base^[43] (Scheme 21).


 Scheme 21. Epimerization of the *cis* into the *trans* product (DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene).

As mentioned above, this reaction can be extended to employ thioaldehydes.^[44] These unstable compounds, however, need to be generated in situ from either cycloadduct **85** or phenacyl sulfide **87** by heating (Scheme 22, a) or photolysis (Scheme 22, b), respectively.

Suga and Ibatani^[45] found that the SnCl_4 -catalyzed reaction of 5-alkoxyoxazoles **1** with diethyl oxomalonate furnished 3-oxazolines with complete regioselectivity, whereas a mixture of 3- and 2-oxazolines **89** and **90** was obtained under thermal conditions (Table 3, Entries 1–3).^[46] Interestingly, the presence of bulky functional groups such as an isopropyl substituent at the C-4 position of the oxazole ring completely reversed the



Scheme 22. Formal [3+2] cycloaddition between 5-alkoxyoxazoles and thioaldehydes.

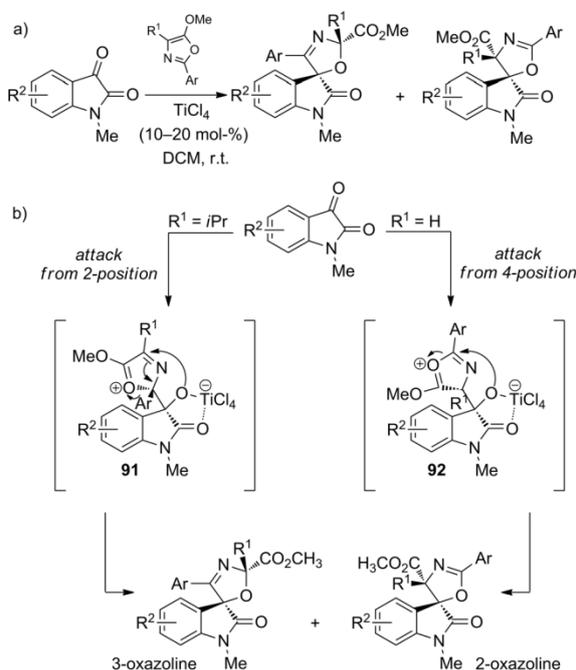
regioselectivity of the process (Table 3, Entry 4).^[47] This difference may be ascribed to the initial attack of the oxazole ring, 376 which occurs preferentially at C-2 instead of the C-4 position (cf. Scheme 19b and c), presumably the result of steric factors ■■■ ((=>Author: changes correct throughout this paragraph? Please check)) ■■■ .

Table 3. Influence of SnCl₄ on formal [3+2] cycloaddition between 5-alkoxyoxazoles and diethyl oxomalonate.

Entry	R ¹	R ²	R ³	Conditions	Time [h]	89/90
1	Ph	H	Et	xylene, at reflux	46	55:45
2	Ph	H	Et	SnCl ₄ (1 equiv.), CH ₃ CN, room temp.	19	100:0
3	Me	H	Et	SnCl ₄ (1 equiv.), CH ₃ CN, room temp.	72	100:0
4	Me	<i>i</i> Pr	Me	SnCl ₄ (1 equiv.), CH ₃ CN, room temp.	96	0:100

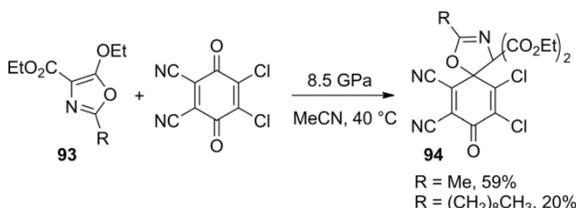
This formal cycloaddition has also been investigated by using 381 other sources of carbonyl compounds such as isatins, which were examined by Franz et al.^[48] Likewise, the regioselectivity of the reaction depended on the size of the substituents at the C-4 position of the 5-alkoxyoxazole (Scheme 23, a). Indeed, for small groups such as a hydrogen atom or methyl substituent, 386 the formation of the 2-oxazoline was favored, whereas with bulky substituents such as an isopropyl group, the other regioisomer (e.g., 3-oxazoline) was formed exclusively (Scheme 23, b). This method allowed for the formation of oxazolines in good yields (51–95 %) with good diastereoselectivities. According to 391 the authors, the reaction proceeds through a stepwise mechanism that involves zwitterionic intermediates **91** and **92**, which result from initial C–C bond formation at the C-2 or C-4 position of the oxazole, respectively (Scheme 23, b) ■■■ ((=>Author: at the bottom of scheme 23, the labels for oxazolines were reversed. Do you agree with this change?)) ■■■ .

The formal cycloaddition process was also reported by using DDQ as a dipolarophile (Scheme 24). In this case, only high



Scheme 23. Formal [2+3] cycloaddition with isatins (DCM = dichloromethane).

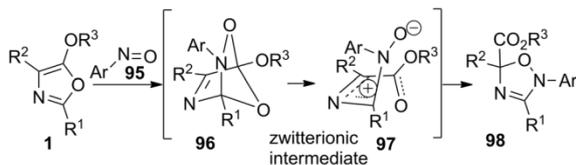
pressure enabled the formation of the corresponding 2-oxazoline **94**, as thermal and catalytic conditions gave only complex mixtures.^[47] 401



Scheme 24. Formal [3+2] cycloaddition between DDQ and 5-ethoxyoxazole **93**.

3.2. Nitrosoaryls – Preparation of Oxadiazoline Compounds

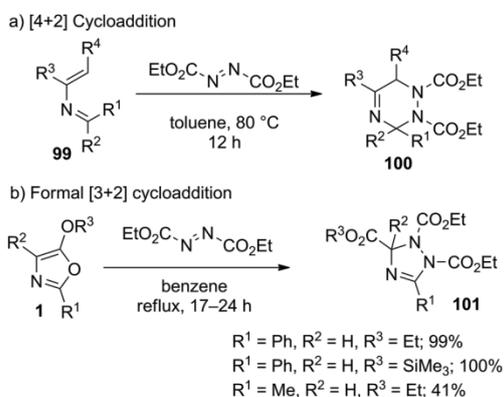
The reaction of nitrosoaryl derivatives with 5-alkoxyoxazoles regioselectively afforded the corresponding 1,2,4-oxadiazolines **98**. According to theoretical investigations that were performed 406 by Wu and Yu^[49] ■■■ ((=>Author: citation? if a ref # needs to be added, please try to keep the number of changes to following [ref] low)) ■■■ , this transformation starts with a [4+2] cycloaddition process (cf. Scheme 19, d) followed by a stepwise ring-opening/ring-closing process as described in Scheme 25. 411 This approach has been applied to the synthesis of 14 molecules, which were obtained in a range of 29–100 % yield.^[49]



Scheme 25. Formal [3+2] cycloaddition with nitrosoaryl compounds.

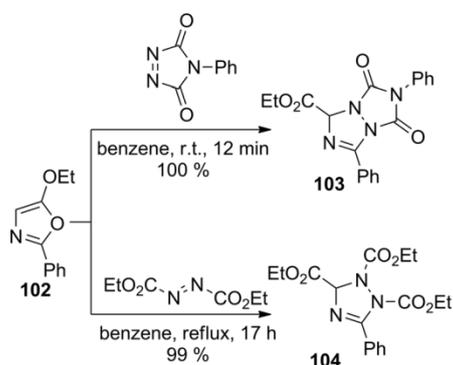
3.3. Diazo Derivatives – Preparation of 1,2,4-Triazolines

Contrary to the classical azadienes **99**, which can undergo a 416 [4+2] cycloaddition process with diazo derivatives that contain electron-withdrawing groups to give six-membered heterocycles **100** (Scheme 26, a),^[50] 5-alkoxyoxazoles **1** undergo a formal [3+2] process to afford 1,2,4-triazolines **101** (Scheme 26, b).^[46]



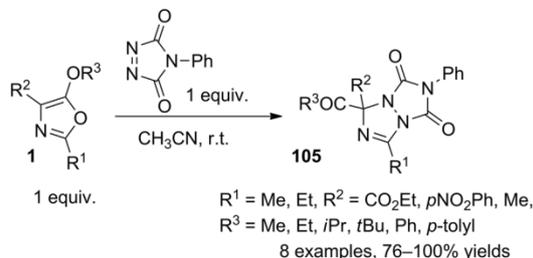
Scheme 26. Difference in reactivities of classical azadienes and 5-alkoxyoxazoles towards diazo derivatives.

421 This reaction can be extended to cyclic azodicarbonyl compounds^[51] and give rise to fused 1,2,4-triazolines **103** under milder conditions (Scheme 27). In general, this application of the reaction generates higher yields of product than that with the corresponding acyclic analogues.^[52]



Scheme 27. Reaction of oxazole **102** with triazoline-3,5-dione and diethyl azodicarboxylate.

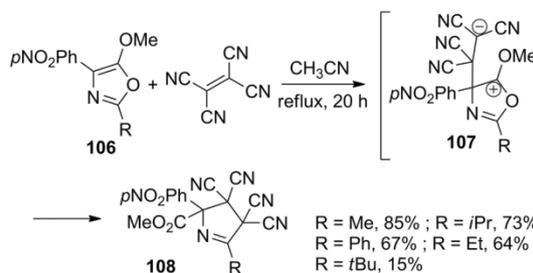
Moreover, the latter reaction has been extended to diversely 426 substituted 5-alkoxyoxazoles to afford the corresponding bicyclic 1,2,4-triazolines in good yields (Scheme 28).



Scheme 28. Preparation of bicyclic 1,2,4-triazolines.

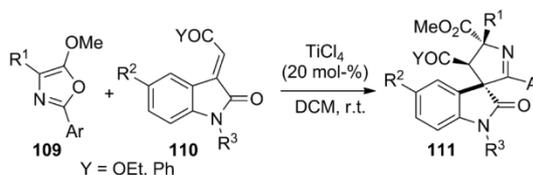
3.4. Olefins – Synthesis of Pyrrolines

Ibata et al. reported a pioneering example of this approach by carrying out the formal [2+3] cycloaddition between 5-alkoxy- 431 oxazoles **106** and the olefin derivative tetracyanoethylene to form the corresponding dihydropyrroles **108** (Scheme 29). Interestingly, this electron-deficient olefin did not proceed through the Kondrat'eva Diels–Alder reaction as one might expect. This could be the result of the absence of a labile func- 436 tional group, such as a proton or carboxylic acid on the 1,1-disubstituted olefin, which is needed to make the Kondrat'eva reaction irreversible through the aromatization process. The course of this formal [2+3] cycloaddition process would then involve zwitterionic species **107** (according to Scheme 19, b), 441 which then would cyclize to form the desired product.^[53]



Scheme 29. Formal [3+2] cycloaddition between tetracyanoethylene and 5-alkoxyoxazoles.

Continuing their efforts to develop an efficient stereocontrolled synthesis of spirooxindole scaffolds, Franz and co-workers extended this approach to alkylidene oxindoles **110** (Scheme 30).^[54] In this case, the authors used a Lewis acid cata- 446

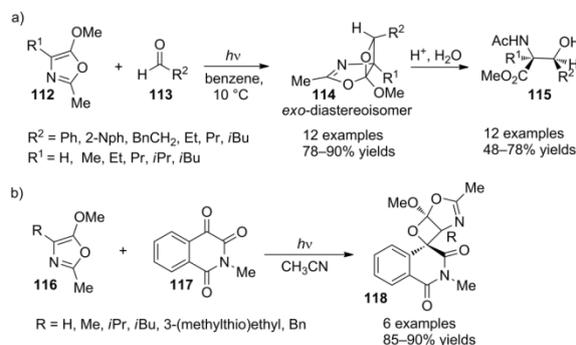


Scheme 30. Formal [3+2] cycloaddition between alkylidene oxindoles and 5-alkoxyoxazoles.

lyst (TiCl₄) to promote the formal cycloaddition. Notably, when a chiral scandium(III) complex was used, an enantioenriched spirooxindole was obtained [enantiomeric ratio (*er*) of 86:14].^[55]

4. Photochemical [2+2] Cycloadditions

451 In the early 2000s, Griesbeck et al. reported the photochemical [2+2] cycloaddition of 5-methoxyoxazoles **112** and aldehydes **113** to form the corresponding bicyclic oxetanes **114** with a high degree of regio- and stereocontrol. The *exo* diastereoisomer was obtained almost exclusively in most of the cases that
456 were investigated (Scheme 31, a).^[56] This method, derived from the Paterno-Büchi reaction, was successfully extended to methyl phenylglyoxylate and methyl pyruvate, albeit with moderate to good diastereoselectivities. Remarkably, upon subsequent hydrolysis of the oxetane derivatives, this transformation
461 offered a rapid approach to the preparation of α -amido- β -hydroxy acid derivatives with good to excellent diastereomeric ratios (>98:2).



Scheme 31. Photochemical [2+2] cycloaddition (2-Nph = 2-naphthyl).

More recently, Zhang and co-workers studied the photochemical [2+2] cycloaddition of 5-methoxyoxazoles **116** with
466 isoquinoline-1,3,4-trione **117** and observed the chemo- and diastereoselective formation of the corresponding spirobicyclic oxetanes **118** (Scheme 31, b).^[57]

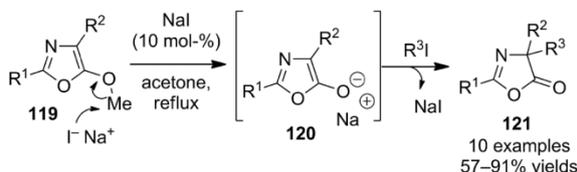
5. Rearrangements toward the Preparation of Oxazol-5-ones

471 Over the years, oxazolones or azlactones have emerged as attractive synthetic targets because of their importance as pharmaceuticals and precursors of biologically active compounds such as herbicides, fungicides, and pesticides. Moreover, oxazolones can provide effective access to organic molecules of
476 interest, including α -amino alcohols and α -amino acids. In this respect, 5-alkoxyoxazoles have shown to be valuable precursors of oxazolones, in particular through the intramolecular migration of sp^3 - or sp^2 -hybridized carbon atoms (e.g., Claisen rearrangements,) as described below.

5.1. Methyl Carbon-Oxygen Bond Cleavage of 5-Methoxyoxazoles – Preparation of Oxazolone Derivatives

Ma and co-workers developed the convenient synthesis of azalactones **121** by using the sodium iodide catalyzed methoxy

carbon–oxygen bond cleavage of 5-methoxyoxazoles in the presence of a variety of alkyl iodides (i.e., propargyl iodide, allyl iodide, methyl iodide, α -iodoketones, and α -iodo esters; Scheme 32).^[58] This strategy is reminiscent of the Steglich rearrangement of 5-carboxyl-substituted oxazole derivatives into their corresponding 4-carboxyl-substituted azlactones.

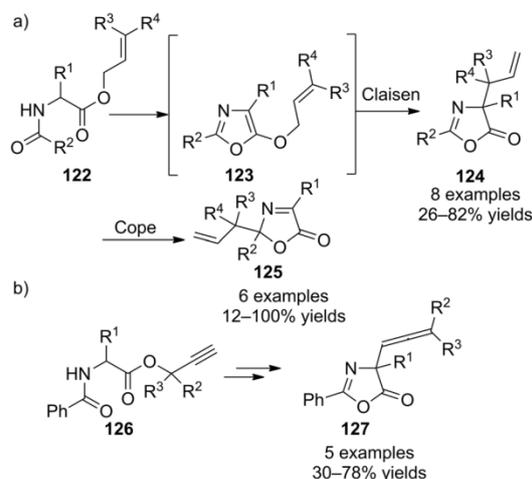


Scheme 32. Synthesis of azlactones from 5-methoxyoxazoles **119**.

Notably, no trace amounts of the 4-methyloxazolone products were observed despite the formation of methyl iodide as a byproduct in the course of the reaction. According to the authors, the MeI, which is formed in situ, is continuously evaporated under the reaction conditions.

5.2. Claisen Rearrangements

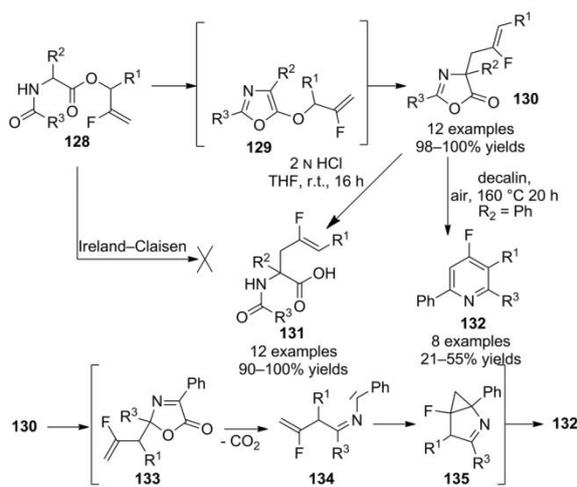
Steglich and co-workers reported that 5-allyloxyoxazoles **123**, which are formed in situ from *N*-acylamino acid allyl esters **122**, directly undergo a Claisen rearrangement to give 4-allyloxazolin-5-ones **124** (Scheme 33, a).^[59]



Scheme 33. Successive sigmatropic rearrangements.

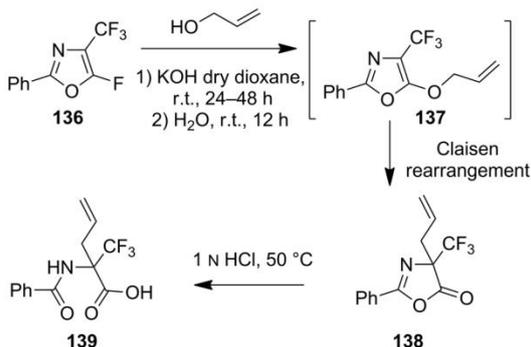
In accordance with the stereoselectivity of the Claisen re-
481 arrangement, 4-allyloxazolin-5-ones **124** were generally obtained as single diastereomers. However, when $\text{R}^1 = \text{H}$, a mixture of diastereomers was formed, which is presumably the result of the facile isomerization of the synthesized oxazolones.^[60] Steglich et al. subsequently reported a one-pot successive Claisen-
506 Cope [3,3] sigmatropic rearrangement.^[61] Similarly, when allylic amido esters were replaced by propargylic derivatives, the corresponding 4-allenyl-substituted oxazolinones **127** were obtained (Scheme 33, b).

511 On the basis of the Steglich rearrangement of *N*-acylamino acid allyl esters into 4-allyloxazolin-5-ones, Haufe and co-workers described the synthesis of a range of α -amido- γ -fluorovinyl acids **131** in high yields through the hydrolysis of 4-(2-fluoro-allyl)oxazol-5(4*H*)-one precursors **130** (Scheme 34).^[62] It should 516 be noted that the starting amido esters **128** failed to give the desired amido acids **131** under Kazmaier conditions, a variation of the Ireland–Claisen rearrangement.^[63] This approach also provided an effective route to substituted 4-fluoropyridine ring systems **132** through consecutive thermal cascade rearrange- 521 ments as previously reported by Steglich.^[64]



Scheme 34. Synthesis of 4-fluoropyridines and α -amido- γ -fluorovinyl acids (THF = tetrahydrofuran).

Closely related to the work by Haufe regarding the introduction of fluorine atoms onto the side chain of α -amino acids, Burger and co-workers developed an approach to α -trifluoromethyl- α -amino acids **139** from 5-alkoxyoxazoles **137**, which 526 are generated in situ from 5-fluorooxazoles **136** and allyl alcohol (Scheme 35).^[65]



Scheme 35. Synthesis of α -trifluoromethyl α -amino acids **139**.

C-Glycosylated peptides are an important class of glycopeptide mimetics particularly because of their greater stability towards enzymatic hydrolysis compared with their *O*- and *S*-glycosylated analogues. For their synthesis, Colombo et al. cleav-

erly conducted a Claisen rearrangement to afford oxazole-containing glycals (Scheme 36). In fact, they reported the [3,3] sigmatropic rearrangement of glucosidic 5-alkoxyoxazole **141**, which was generated in situ from **140**, as key step in the stereoselective synthesis of α -D-C-mannosyl-(*R*)-alanine.^[66] 536

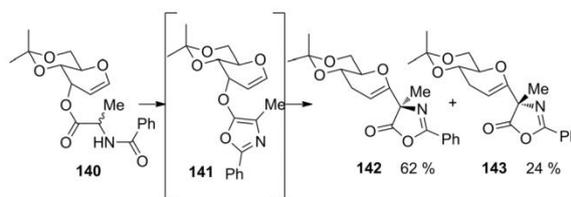
/disk/disk6/vchimages/EJOC16/1/012
7/Scheme36.tif

Abbildung fehlt!

Scheme 36. Claisen rearrangement of glucosidic 5-alkoxyoxazoles.

5.2. Benzylic and Benzylic-Like Rearrangements

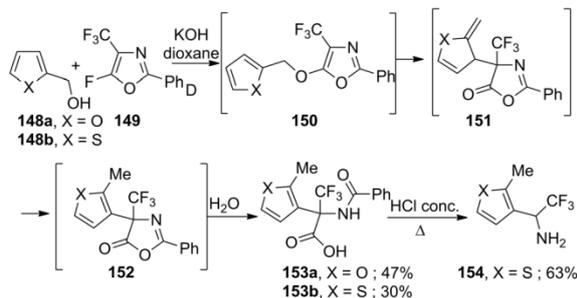
Oxazol-5(4*H*)-ones **145** can be prepared from 5-alkoxyoxazoles **144** through a formal [1,3] sigmatropic rearrangement (Scheme 37). In this reaction, the benzyl group of the alkoxy moiety migrates to the C-4 position of the five-membered ring 541 of **144**. The substitution pattern of this benzyl group has a strong influence on the yield of the reaction (8–99%).^[67] In fact, when R^3 is an electron-withdrawing substituent such as a halogen or nitro group (Author: please note that the NO_2 group is not listed as an option for R^3 in the graphic for 546 scheme 37)) (Author: moderate yields are obtained. On the other hand, when R^2 , R^3 , or R^4 is an electron-donating group such as a methoxy substituent, the oxazolones are formed in excellent yields.



Scheme 37. Benzylic rearrangement of oxazoles.

It appears that the 1,3-benzyl shift could result from a recombination of radicals **146** and **147**, which are generated during the reaction by the homolytic fission of the C–O bond. However, despite further studies, neither of these radicals were isolated as proof of this mechanism.

This reaction has been extended to other aromatic compounds such as furan **148a** and thiophene **148b** (Scheme 38). Interestingly, in this case, the reaction proceeds through a true [3,3] sigmatropic process. Indeed, furan and thiophene, both of which have a lower aromatic character than benzene, displayed similar reactivity towards allylic derivatives. It is noteworthy that 561 5-alkoxyoxazoles **150** could not be isolated as they readily underwent a Claisen rearrangement.



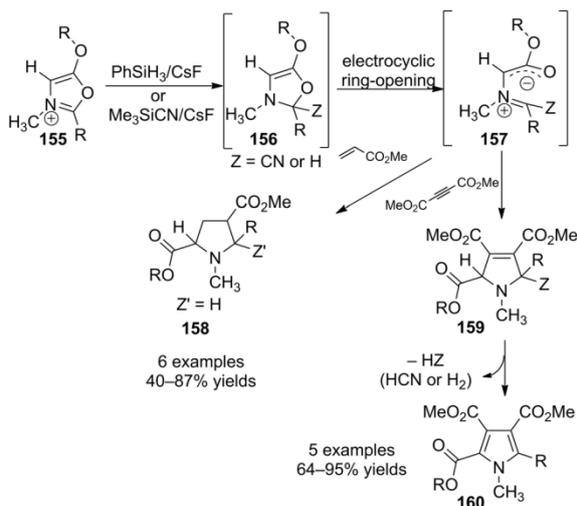
Scheme 38. Benzylic rearrangement with furan and thiophene derivatives.

6. Ring-Opening Processes

The ring-opening reactions of 5-alkoxyoxazole derivatives are accompanied by the formation of highly reactive intermediates such as azomethine ylides, nitrile ylides, or ester enolates. These reactions, which are promoted by photolysis, electrophilic activation, or organolithium reagents, have been used for the preparation of heterocycles, α -amino alcohols, and α -amino acids as outlined below.

6.1. Azomethine Ylides

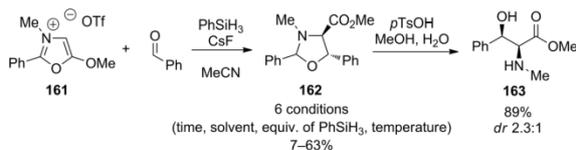
Vedejs and co-workers demonstrated that 5-alkoxyoxazoles are convenient azomethine ylide precursors in 1,3-dipolar cycloadditions with electron-deficient π -systems.^[68] Indeed, oxazolium salts **155**, which are generated in situ from 5-alkoxyoxazoles, provided the corresponding oxazolines **156** upon reductive or nucleophilic addition by using $\text{PhSiH}_3/\text{CsF}$ or $\text{Me}_3\text{SiCN}/\text{CsF}$, respectively (Scheme 39). The subsequent spontaneous ring-opening reaction afforded azomethine ylides **157**, which were intercepted by different dipolarophiles such as methyl acrylate or dimethyl acetylenedicarboxylate.^[69] Notably, this approach



Scheme 39. Formation and trapping of azomethine ylides.

led to the construction of polysubstituted pyrrolidine **158** or pyrroles **160**.

More recently, Somfai and co-workers used Vedejs' oxazole method to generate azomethine ylides for a reaction with aldehydes.^[70] The corresponding oxazolidine **162**, precursor of β -hydroxy α -amino ester **163**, was provided in 89% yield with *dr* 2.3:1 (Scheme 40). Despite further efforts to optimize the reaction conditions (i.e., time, solvent, temperature, or equivalents of PhSiH_3), no significant improvement to the yield or diastereo-

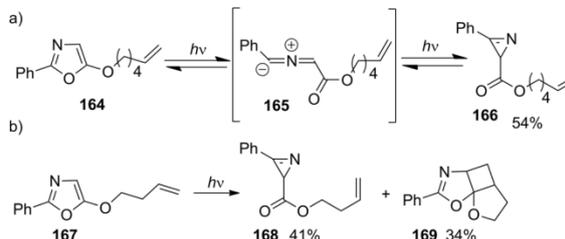


Scheme 40. Reaction between the azomethine ylide and benzaldehyde.

6.2. Photolysis Rearrangements through Nitrile Ylides

It is well-established that aliphatic oxazoles undergo photoisomerization to give isoxazoles.^[71] However, the photolysis rearrangement of their 5-alkoxy analogue had not been studied prior to the work of Padwa and co-workers. The photoactivation of 2-phenyl-5-alkenoxyoxazole **164**, which underwent a reversible photoisomerization process to provide the corresponding aziriny ester **166** in 54% yield, was the first to be investigated

601

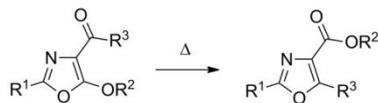


Scheme 41. Photolysis of 5-alkenoxyoxazoles.

The supposed mechanism involves the homolytic cleavage at the C-2-O bond to form carbonyl nitrile ylide intermediate **165**, which subsequently undergoes a 1,5-electrocyclization reaction. Remarkably, no intramolecular 1,3-dipolar cycloadduct, derived from the reaction of the nitrile ylide with the olefin moiety, was noticed.^[72] However, the intramolecular [2+2] cycloadduct **169** was obtained in addition to the ring-contraction product **168** in 34 and 41% yield, respectively, by starting from 5-butenyloxyoxazole derivative **167** (Scheme 41, b). In the latter case, it appears from molecular models that the oxazole and olefin systems are properly positioned to enable the cycloaddition process to proceed as well.

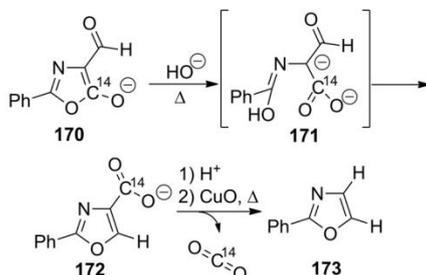
6.3. Cornforth Rearrangement

The thermal interconversion of 4-carbonyl-substituted oxazoles was disclosed for the first time by Cornforth in 1949 (Scheme 42).^[73]



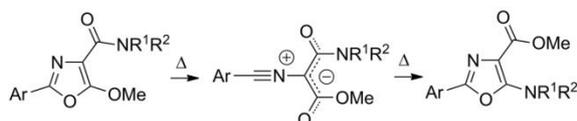
Scheme 42. Cornforth rearrangement.

The mechanism of this transformation was first investigated by using the base-induced rearrangement of 4-formyl-5-oxazolone **170** into oxazole-4-carboxylic acid **172**, which is an analogous reaction.^[74] It was observed that ¹⁴C-labeled oxazolone **170** provided radioactive carbon dioxide by decarboxylation of rearranged product **172**. This result was consistent with a ring-opening/ring-closing reaction mechanism as shown in Scheme 43.



Scheme 43. Mechanism suggested by Stuckwisch and Powers.

Further studies, based on the determination of either rate constants or solvent effects, have been carried out by Turchi and Dawar and highlight the formation of a zwitterionic intermediate such as a nitrile ylide (Scheme 44).



Scheme 44. Mechanism suggested by Turchi and Dewar.

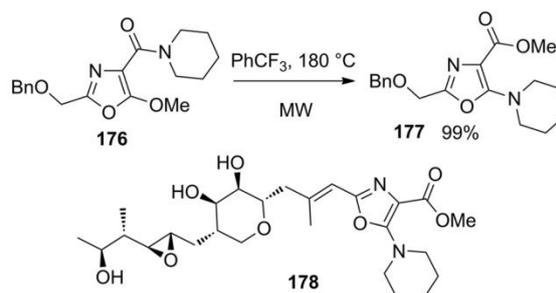
More recently, Nolt and co-workers synthesized a series of 5-aminooxazoles **175** from 5-methoxyoxazole-4-carboxamides **174** through a microwave-assisted Cornforth rearrangement (Scheme 45).^[75]



Scheme 45. Microwave assisted Cornforth rearrangement (ACN = acetonitrile).

Optimization studies conducted with 5-methoxyoxazole-4-carboxamides **174** revealed that the rearrangement reaction required a temperature higher than 170 °C to obtain the thermodynamically more stable product (i.e., the 5-aminooxazole) with complete conversion of the starting material in acetonitrile.

Moreover, the reaction required a significantly shorter reaction time when the solvent was changed from acetonitrile to trifluorotoluene. With the optimized conditions in hand, Nolt et al.⁶⁴¹ extended the scope of the reaction to the formation of various substituted 5-aminooxazoles, including cyclic amines (i.e., pyrrolidine, piperidine, and piperazine), esters, acetals, thioethers, and *tert*-butoxycarbonyl (BOC)-protected amines. A total of 14 examples were reported with yields of 19–99%. The utility of this method was illustrated by the formal synthesis of the 5-aminooxazole-containing pseudomonic acid derived antibiotic **178** (Scheme 46).

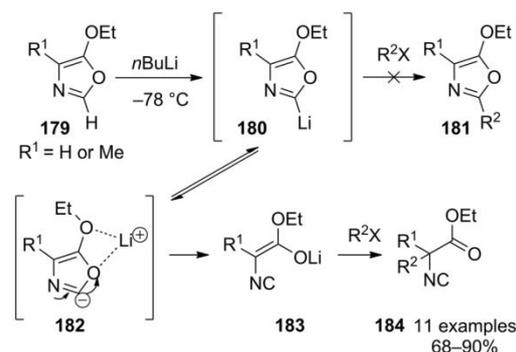


Scheme 46. Formal synthesis of the pseudomonic acid derived antibiotic **178**.

6.4. In the Presence of Organolithium Reagent

Heterocycles such as benzoxazoles,^[76] thiazoles,^[77] and oxazoles^[78] are readily functionalized by using a one-pot procedure that first involves a lithiation followed by an alkylation step. However, Jacobi's team unexpectedly observed that closely related 5-ethoxyoxazoles **179** exhibit a different behavior under these conditions. Indeed, when these compounds were successively treated with *n*BuLi and an alkyl halide, only isocyanoacetic acid derivatives **184** were obtained (Scheme 47). They assumed that coordinated lithium species **182** could be formed during the lithiation process and lead to the ring-opening of the oxazole core.

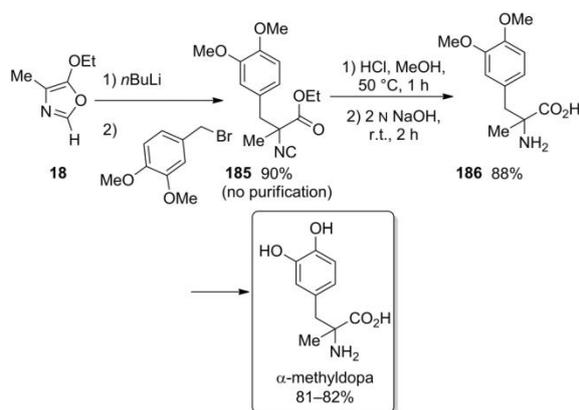
661



Scheme 47. Synthesis of isocyanoacetic acid derivatives through ring-opening of 5-ethoxyoxazoles.

Several examples of this reaction have provided good to excellent product yields. It is noteworthy that this simple method

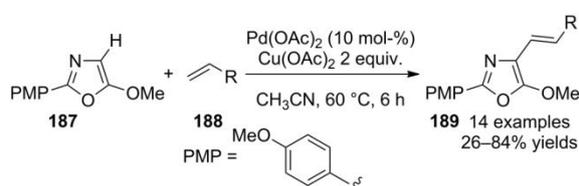
generates highly reactive isocyanoacetate esters from stable derivatives and provides easy access to α -amino acids and biologically active products. In this context, the formal synthesis of the α -methyl-dopa, a psychoactive drug used to treat hypertension, was investigated. In this case, 4-methyl-5-ethoxyoxazole **18** led to the corresponding ethyl isocyanoacetate **185** under the developed reaction conditions (Scheme 48). This intermediate subsequently underwent treatment with acid and base to furnish the corresponding α -amino acid **186** in 88 % yield, which has previously been used for the preparation of α -methyl-dopa.^[79]



Scheme 48. Formal synthesis of α -methyl-dopa through an isocyanopropanoate derivative.

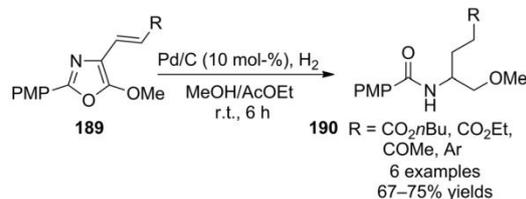
6.5. Preparation of Functionalized α -Amino Acid and α -Amino Alcohol Derivatives by Using a Divergent Strategy

Antilla and co-workers have recently shown that unnatural α -amino acids and α -amino alcohols were accessible through the reductive ring-opening process of 5-alkoxyoxazoles.^[80] First, the functionalization of 5-alkoxyoxazoles **187** was carried out at the C-4 position by a variety of olefin derivatives **188** using a Pd-catalyzed C–H bond activation strategy under optimized reaction conditions [$\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (10 mol-%), $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (2 equiv.), CH_3CN , 60 °C, 6 h; Scheme 49]. This method allowed for the preparation of 14 derivatives of **189** in 26–87 % yield, which contain functional groups such as an ester, ketone, or amide.



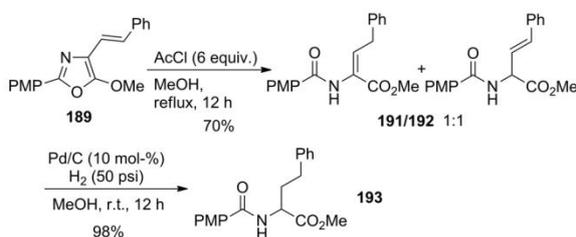
Scheme 49. Pd-catalyzed C–H bond activation of oxazoles (PMP = *para*-methoxyphenyl).

These heterocycles were then engaged in Pd-catalyzed ring-opening reactions to provide non-natural α -amino alcohol derivatives **190** in good yields of 67–75 % (Scheme 50).



Scheme 50. Synthesis of α -amino alcohol derivatives.

Alternatively, the hydrolysis of the 5-alkoxyoxazole **189** in a mixture of AcCl/MeOH followed by Pd/C-mediated reduction of the corresponding olefins gave homophenylalanine derivative **193** in 69 % yield over two steps (Scheme 51).



Scheme 51. Synthesis of homophenylalanine derivative.

7. Conclusions

In summary, 5-alkoxyoxazoles are amongst the most reactive oxazole species. They are readily accessible by various ring-construction strategies or by a late-stage functionalization that is mediated by transition metals. Because of their versatile reactivity, 5-alkoxyoxazoles have been involved in a number of distinct chemical transformations, including (formal) pericyclic reactions, which provide direct access to different heterocycle and α -amino acid derivatives. However, this review shows that 5-alkoxyoxazoles have had little involvement in asymmetric transformations, which may worth exploring more widely in future studies.

Acknowledgments

The authors thank the Region Haute-Normandie (FEDER CHIM-BIO HN 0001401) for the financial support to K. R. This work was also partially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National des Sciences (INSA) Rouen, Rouen University, and the Labex SynOrg.

Keywords: Total synthesis · Cycladdition · Sigmatropic rearrangement · Nitrogen heterocycles · Oxygen heterocycles · Ylides

[1] For selected reviews, see: a) I. J. Turchi, M. J. S. Dewar, *Chem. Rev.* **1975**, 75, 389–437; b) D. L. Boger, *Tetrahedron* **1983**, 39, 2869–2939; c) D. L. 716 Boger, *Chem. Rev.* **1986**, 86, 781–793; d) R. Sakhuja, S. S. Panda, K. Bajaj, *Curr. Org. Chem.* **2012**, 16, 789–828.

- [2] a) V. S. C. Yeh, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11995–12042; b) K. J. Ralston, C. Ramstadius, R. C. Brewster, H. S. Niblock, A. W. Hulme, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7086–7090; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 7192; c) T. J. Hoffman, A. Kolleth, J. H. Rigby, S. Arseniyadis, J. Cossy, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3348–3351.
- [3] I. Maeda, K. Togo, R. Yoshida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 1407–1410.
- [4] a) R. J. Robinson, *J. Chem. Soc. Trans.* **1909**, *95*, 2167–2174; b) S. Gabriel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43*, 1283.
- [5] a) K. J. Doyle, C. J. Moody, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 3761–3772; b) I. F. Cléménçon, B. Ganem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8665–8669; c) P. C. Ducept, S. P. Marsden, *Synlett* **2000**, *5*, 692–694.
- [6] X. Xu, P. Y. Zavalij, W. Hu, M. P. Doyle, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11522–11524.
- [7] P.-S. Lai, M. S. Taylor, *Synthesis* **2010**, *9*, 1449–1452.
- [8] L.-A. Jouanno, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8549–8555; correction: L.-A. Jouanno, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1706.
- [9] a) C. Lalli, M. J. Bouma, D. Bonne, G. Masson, J. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 880–889; b) M. J. Bouma, G. Masson, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 475–479.
- [10] a) D. Heinert, A. E. Martell, *Tetrahedron* **1958**, *3*, 49–61; b) Y. R. Dumond, A. G. Gum, *Molecules* **2003**, *8*, 873–881.
- [11] W. Francisco, M. Pivatto, A. Danuello, L. O. Regasini, L. R. Baccini, M. C. M. Young, N. P. Lopes, J. L. C. Lopes, V. S. Bolzani, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 408–413.
- [12] a) R. C. Hartkoorn, F. Pojer, J. A. Read, H. Gingell, J. Neres, O. P. Horlacher, K.-H. Altmann, S. T. Cole, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 96–98; b) R. C. Hartkoorn, C. Sala, J. Neres, F. Pojer, S. Magnet, R. Mukherjee, S. Uplekar, S. Boy-Röttger, K.-H. Altmann, S. T. Cole, *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 1032–1042.
- [13] P. Palozza, N. I. Krinsky, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 184–187.
- [14] P. F. Moore, J. W. Constantine, W. E. Barth, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1978**, *207*, 410–418.
- [15] a) G. Mercey, T. Verdelet, G. Saint-André, E. Gillon, A. Wagner, R. Baati, L. Jean, F. Nachon, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5295–5297; b) G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean, P.-Y. Renard, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 756–766.
- [16] M. M. O'Malley, F. Damkaci, T. R. Kelly, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2651.
- [17] a) V. D. A. Silva, B. P. S. Pitanga, R. P. Nascimento, C. S. Souza, P. L. C. Coelho, N. Menezes-Filho, A. M. M. Silva, M. de F. D. Costa, R. S. El-Bacha, E. S. Vellozo, S. L. Costa, *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1810–1820; b) A. A. Rahman, V. Samoylenko, M. R. Jacob, R. Sahu, S. K. Jai, S. I. Khan, B. L. Tekwani, I. Muhammad, *Planta Med.* **2011**, *77*, 1639–1643.
- [18] a) G. Ya. Kondrat'eva, *Khim. Nauka Prom-St.* **1957**, *2*, 666; b) R. A. Firestone, K. Pfister, R. R. Boettcher, F. J. Cross, R. B. Currie, M. Monaco, E. R. Peterson, W. Reuter, *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 2705.
- [19] a) G. Y. Kondrat'eva, C.-H. Huang, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1962**, *142*, 593–595 [*Chem. Abstr.* **1959**, *53*, 122148]; b) T. Yoshikawa, F. Ishikawa, Y. Omura, T. Naito, *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 873–878; c) T. Naito, T. Yoshikawa, F. Ishikawa, S. Isoda, Y. Omura, I. Takamura, *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 869–872; d) T. Naito, T. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1966**, *14*, 918–921.
- [20] S. Belaidi, M. Mellaoui, *Org. Chem. Int.* **2011**, Article ID 254064.
- [21] S. Bondock, *Heteroat. Chem.* **2005**, *16*, 49–55.
- [22] Z.-X. Yu, Y.-D. Wu, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 412–420.
- [23] D. C. Palmer, S. Venkatraman, *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, vol. 60 (*Oxazoles: Synthesis, Reactions, and Spectroscopy, Part A*) (Ed.: D. C. Palmer), John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., **2003**.
- [24] a) B. A. Johnsen, K. Undheim, *Acta Chem. Scand. Ser. B* **1983**, *37*, 127–132; b) C. Sabot, E. Oueis, X. Brune, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 768–770.
- [25] a) T. Ibata, S. Nakano, H. Nakawa, J. Toyoda, Y. Isogami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 433–437; b) T. Ibata, H. Nakawa, Y. Isogami, K. Matsumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 3197–3200.
- [26] S. Sharif, D. Schagen, M. D. Toney, H.-H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4440–4455.
- [27] M. Chan-Huot, C. Niether, S. Sharif, P. M. Tolstoy, M. D. Toney, H.-H. Limbach, *J. Mol. Struct.* **2010**, *976*, 282–289.
- [28] a) R. G. Jones, E. C. Kornfeld, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 107–109; b) M. Murakami, M. Iwanami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41*, 726–727; c) M. Murakami, K. Takahashi, J. Matsumoto, K. Tamazawa, K. Murase, H. Iwamoto, M. Iwanami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1968**, *41*, 628–633.
- [29] L.-A. Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. 791 Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366.
- [30] S. N. Goodman, D. M. Mans, J. Sisko, H. Yin, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1604–1607.
- [31] a) L.-A. Jouanno, V. Tognetti, L. Joubert, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2530–2533; b) L.-A. Jouanno, V. Di Mascio, V. Tognetti, L. Joubert, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1303–1319.
- [32] In the following publication, the reaction performed with 2-(trifluoromethyl)propenoic acid as the dienophile forced the decarboxylation step. For details, see: G. Sandford, I. Wilson, C. M. Timperley, *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 1425–1430. 801
- [33] a) H. König, F. Graf, V. Weberndörfer, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 668–682; b) R. Grigg, J. L. Jackson, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 552–556.
- [34] a) D. Bonne, M. Dekhane, J. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2485–2488; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2537; b) B. H. Lipshutz, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 795–819; c) P. A. Jacobi, T. A. Craig, D. G. Walker, B. A. Arrick, R. F. 806 Frechette, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5585–5594.
- [35] A. V. Rama Rao, D. Reddeppa Reddy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 574–575.
- [36] J. Boukouvalas, C. Thibault, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 681–684.
- [37] a) P. A. Jacobi, K. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3409–3410; b) P. A. 811 Jacobi, K. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4295–4303; c) K.-I. Takao, R. Munakata, K.-I. Adano, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4779–4807.
- [38] a) P. A. Jacobi, C. A. Blum, R. W. DeSimone, U. E. S. Udodong, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7173–7176; b) P. A. Jacobi, C. A. Blum, R. W. DeSimone, U. E. S. Udodong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5384–5392. 816
- [39] P. A. Jacobi, C. S. R. Kaczmarek, U. E. S. Udodong, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4859–4862.
- [40] P. A. Jacobi, K. M. Touchette, H. G. Selnick, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6305–6313.
- [41] W.-H. Lin, Y. Ye, R.-S. Xu, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 571–576. 821
- [42] a) H. Suga, X. Shi, H. Fujieda, T. Ibata, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6911–6914; b) H. Suga, H. Fujieda, Y. Hirotsu, T. Ibata, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3359–3364; c) H. Suga, K. Ikai, T. Ibata, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 869–872.
- [43] D. A. Evans, J. M. Janey, N. Magomedv, J. S. Tedrow, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1884–1888; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1936.
- [44] E. Vedejs, S. Fields, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4663–4667.
- [45] H. Suga, X. Shi, T. Ibata, *Chem. Lett.* **1994**, 1673–1676.
- [46] A. Hassner, B. Fischer, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 3535–3546.
- [47] H. Suga, X. Shi, T. Ibata, A. Kakehi, *Heterocycles* **2001**, *55*, 1711–1725. 831
- [48] a) J. J. Badillo, G. E. Arevalo, J. C. Fettinger, A. K. Franz, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 418–421; b) J. P. MacDonald, J. J. Badillo, G. E. Arevalo, A. Silva-Garcia, A. K. Franz, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 285–293.
- [49] a) H. Suga, X. Shi, T. Ibata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 1231–1236; b) H. Suga, T. Ibata, *Chem. Lett.* **1991**, 1221–1224. 836
- [50] a) J. Barluenga, F. J. Gonzalez, S. Fustero, S. Garcia-Granda, E. Perez-Carreno, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4459–4463; b) J. Barluenga, F. J. Gonzalez, S. Fustero, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 397–398.
- [51] T. Ibata, Y. Isogami, H. Tamura, *Chem. Lett.* **1988**, 1551–1554.
- [52] R. C. Cookson, S. S. H. Gilani, I. D. R. Stevens, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 841–846.
- [53] a) T. Ibata, Y. Isogami, S. Nakano, H. Nakawa, H. Tamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1692–1693; b) T. Ibata, Y. Isogami, H. Nakawa, H. Tamura, H. Suga, X. Shi, H. Fujieda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *65*, 1771–1778. 846
- [54] J. J. Badillo, C. J. A. Ribeiro, M. M. Olmstead, A. K. Franz, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6270–6273.
- [55] For a related example, see: P. V. Reddy, S. V. Bhat, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 9039–9042.
- [56] a) A. X. Griesbeck, S. Bondock, *Can. J. Chem.* **2003**, *81*, 555–559; b) A. G. 851 Griesbeck, S. Bondock, J. Lex, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9899–9906; c) A. G. Griesbeck, S. Bondock, J. Lex, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1113–1115.
- [57] a) C. Huang, H. Yu, Z. Miao, J. Zhou, S. Wang, H.-K. Fun, J. Xu, Y. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 3629–3631; b) C. Huang, H. Jiang, R. Wang, C. K. Quah, H.-K. Fun, Y. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5023–5033. 856
- [58] L. Lu, P. Lu, S. Ma, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 676–680.

- [59] B. Kübel, G. Höfle, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 58–59; *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 64.
- [60] P. A. Bartlett, J. F. Barstow, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3933–3941.
- 861 [61] N. Engel, B. Kübel, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 394–396; *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 407.
- [62] U. Wittmann, F. Tranel, R. Fröhlich, G. Haufe, *Synthesis* **2006**, *13*, 2085–2096.
- [63] U. Kazmaier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 998–999; *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1046.
- 866 [64] S. Götz, B. Kübel, W. Steglich, *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 2331.
- [65] K. Burger, L. Hennig, P. Tsouker, J. Spengler, F. Albericio, B. Kokschi, *Amino Acids* **2006**, *31*, 55–62.
- [66] L. Colombo, M. Di Giacomo, P. Coceri, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9381–9386.
- 871 [67] K. Burger, K. Gaa, K. Geith, C. Schierlinger, *Synthesis* **1989**, *11*, 850–855.
- [68] a) E. Vedejs, J. W. Grissom, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6433–6434; b) E. Vedejs, J. W. Grissom, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1876–1882; c) E. Vedejs, J. W. Grissom, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1882–1987; d) E. Vedejs, J. W. Grissom, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3238–3246.
- 876 [69] E. Vedejs, D. W. Piotrowski, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1341–1348.
- [70] B. Seashore-Ludlow, S. Torsell, P. Somfai, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3927–3933.
- [71] For a recent example, see: C. M. Nunes, I. Reva, R. Fausto, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10657–10665.
- [72] L. A. Cohen, A. Padwa, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 399–406. 881
- [73] a) J. W. Cornforth, in: *The Chemistry of Penicillin*, Princeton University Press, Princeton, N.J., **1949**, p. 700.
- [74] C. G. Stuckwisch, D. D. Powers, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1819–1820.
- [75] M. B. Nolt, M. A. Smiley, S. L. Varga, R. T. McClain, S. E. Wolkenberg, C. W. Lindsley, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4698–4704. 886
- [76] a) A. Heynderickx, R. Guglielmetti, R. Dubest, J. Aubard, A. Sanat, *Synthesis* **2003**, *7*, 1112–1116; b) C. F. Nutaitis, J. Obaza-Nutaitis, *Org. Prep. Proced. Int.* **1997**, *29*, 315–321.
- [77] a) L. Revesz, F. E. Di Padova, T. Buhl, R. Feifel, H. Gram, P. Hiestand, U. Manning, A. G. Zimmerlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1261–1264; 891
b) C. F. Nutaitis, B. D. Swartz, *Org. Prep. Proced. Int.* **2005**, *37*, 507–511.
- [78] L. Revesz, F. E. Di Padova, T. Buhl, R. Feifel, H. Gram, P. Hiestand, U. Manning, R. Wolf, A. G. Zimmerlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2109–2112.
- [79] P. A. Jacobi, S. Ueng, D. Carr, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 2042–2044. 896
- [80] S. Cui, L. Wojtas, J. C. Antilla, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5040–5043.

Received: February 4, 2016

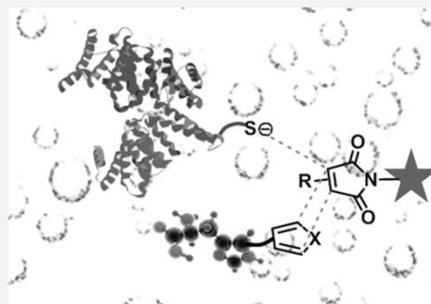
Revue 2: Covalent modification of biomolecules through maleimide-based labeling strategies

1 Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based 2 Labeling Strategies

3 Kévin Renault,[‡] Jean Wilfried Fredey,[‡] Pierre-Yves Renard, and Cyrille Sabot*[ⓧ]

4 Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, France

5 **ABSTRACT:** Since their first use in bioconjugation more than 50 years
6 ago, maleimides have become privileged chemical partners for the site-
7 selective modification of proteins via thio-Michael addition of biothiols
8 and, to a lesser extent, via Diels–Alder (DA) reactions with biocompatible
9 dienes. Prominent examples include immunotoxins and marketed maleimide-
10 based antibody–drug conjugates (ADCs) such as Adcetris, which are used in
11 cancer therapies. Among the key factors in the success of these groups is
12 the availability of several maleimides that can be N-functionalized by fluor-
13 ophores, affinity tags, spin labels, and pharmacophores, as well as their
14 unique reactivities in terms of selectivity and kinetics. However, maleimide
15 conjugate reactions have long been considered irreversible, and only recently
16 have systematic studies regarding their reversibility and stability toward hydro-
17 lysis been reported. This review provides an overview of the diverse applica-
18 tions for maleimides in bioconjugation, highlighting their strengths and weaknesses, which are being overcome by recent strategies.
19 Finally, the fluorescence quenching ability of maleimides was leveraged for the preparation of fluorogenic probes, which are mainly
20 used for the specific detection of thiol analytes. A summary of the reported structures, their photophysical features, and their relative
21 efficiencies is discussed in the last part of the review.



22 ■ INTRODUCTION

23 The popularity of maleimide derivatives has steadily increased
24 over the years, particularly in the fields of bioorganic chemistry
25 and biotechnology. This can be attributed to several factors,
26 including the unique reactivity of maleimides in terms of reac-
27 tion rate, selectivity, and yield, as well as their good stability
28 toward air, water, or heat. Furthermore, several functionalized
29 maleimides are now commercially available or readily acces-
30 sible in a few synthetic steps at low cost via high-yielding and
31 scalable strategies. In particular, maleimides have been used in
32 biological applications that require their specialized functional
33 groups, for example, (a) photoactive functional groups, such
34 as benzophenone, to map interactions between biomolecules;
35 (b) a wide range of fluorophores (coumarin, fluorescein, pyrene,
36 dansylamide, etc.) for the specific detection of biothiols; (c) affini-
37 ty tags such as biotin; (d) bioconjugated or bio-orthogonal
38 functionalities such as cyclooctynes or trans-cyclooctenes;
39 (e) spin labels ((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl, TEMPO)
40 for probing biological-membrane or protein dynamics; (f) pharma-
41 cological inhibitors (such as U-73122, an inhibitor of phos-
42 pholipase C-dependent processes); and (g) hydrophilic solu-
43 bilizing agents (PEG) (Figure 1).

44 Maleimides have been shown to readily react either directly
45 with chemical functionalities that are naturally present in bio-
46 molecules (such as thiols via Michael addition reactions) or in
47 two-step strategies through Diels–Alder (DA) processes via
48 the prior introduction of biocompatible chemical handles. This
49 review summarizes these two approaches by focusing on the
50 structure–reactivity relationships of maleimides in order to high-
51 light important factors governing their reactivity and stability.

52 The last part of this review tackles their use in the design of
53 fluorogenic probes and, in particular, for the detection of
54 specific bioanalytes.

55 ■ REACTION OF MALEIMIDES WITH BIOLOGICAL 56 THIOLS

57 The main categories of biomolecules, i.e., carbohydrates, lipids,
58 proteins, and nucleic acids, constitute a variety of chemical func-
59 tional groups that participate in diverse metabolic processes.
60 Among these many reactivities, maleimide ligation through
61 Michael addition has been shown to be highly specific for
62 thiols between pH 6.5 and 7.5. In comparison, ϵ -amino groups
63 in Lys react with maleimides 1000 times slower than sulfhydryls
64 at pH 7.0.¹ This specificity can be associated with both HSAB
65 theory (thiols and maleimides are soft nucleophiles/electrophiles,
66 respectively) and the thiol pK_a (approximately 8). It has been
67 shown that the rate constant for the protonated thiol RSH of
68 2-mercaptoethanol with *N*-ethylmaleimide is negligible com-
69 pared to that of the thiolate RS^- ($0.0002\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$ versus
70 $790\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$).² However, the thiol pK_a can shift dramatically
71 from one thiol to another, depending on the chemical structure
72 of the thiol and intermolecular interactions which stabilize or
73 destabilize the thiol or thiolate. For example, the pK_a of a Cys
74 residue in a protein (as low as 3 for Cys in an active site) may
75 significantly differ from its intrinsic pK_a (8.3).³

Received: April 9, 2018

Revised: May 28, 2018

Published: June 28, 2018

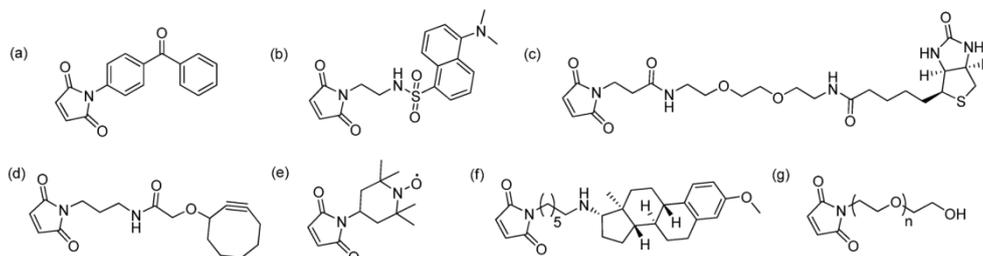


Figure 1. Functionalized maleimides.

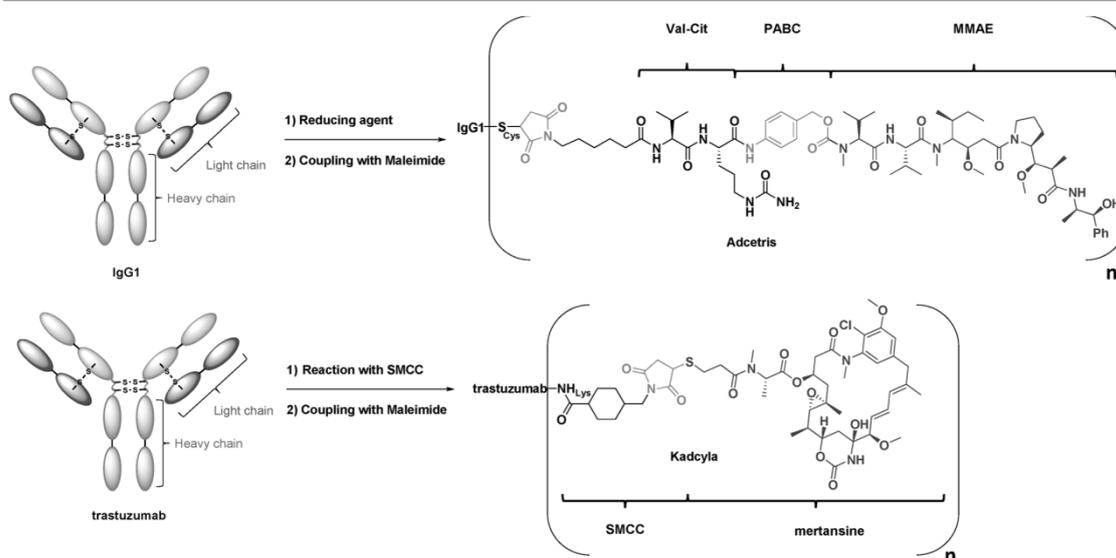


Figure 2. Structures of Adcetris (brentuximab vedotin, Seattle Genetics/Millennium Pharmaceuticals) used against Hodgkin's and anaplastic large cell lymphoma and Kadcylla (trastuzumab emtansine, Roche/Genentech) used against breast cancer, which each bear the corresponding cytotoxic agent monomethyl auristatin E and mertansine (in green) linked to their monoclonal antibody brentuximab and trastuzumab (in gray) by a thiosuccinimide linkage (in red).

76 Thiol–maleimide Michael addition has been widely imple-
 77 mented for the radio and fluorescence labeling of biomole-
 78 cules,⁴ PEGylation of peptides and proteins,⁵ and preparation
 79 of antibody–drug conjugates (ADCs) through the site-selective
 80 conjugation of drugs to mAbs.⁶ In this context, only two ADCs
 81 have been approved by the FDA for cancer treatment, Adcetris
 82 (brentuximab vedotin) and Kadcylla (trastuzumab emtansine),
 83 both of which contain a thiosuccinimide linkage in their struc-
 84 ture (Figure 2). Adcetris has a monomethylauristatin E (MMAE)
 85 payload linked to a self-immolative spacer *p*-aminobenzoylcar-
 86 bonyl (PABC), the latter being bounded to a dipeptide valine-
 87 citrulline (Val-Cit), which is hydrolyzed by lysosomal enzymes
 88 such as cathepsin B. The payload used in Kadcylla is mertansine,
 89 which is conjugated to *N*-succinimidyl 4-(maleimidomethyl)-
 90 cyclohexanecarboxylate (SMCC) moiety. Adcetris and Kadcylla
 91 both contain an average drug to antibody ratio (DAR) of
 92 approximately 3.5. However, Kadcylla relies on conjugation to
 93 Lys residues, which are abundant (a total of ~80 Lys in the
 94 mAb) and thus results in more heterogeneous distribution
 95 than for Adcetris which uses Cys residues resulting from
 96 interchain S–S bond reduction (a total of 4 interchain S–S
 97 bonds in the mAb). Apart from these marketed drugs, several

other ADCs bearing similar conjugated linkers are currently in
 clinical development.⁷

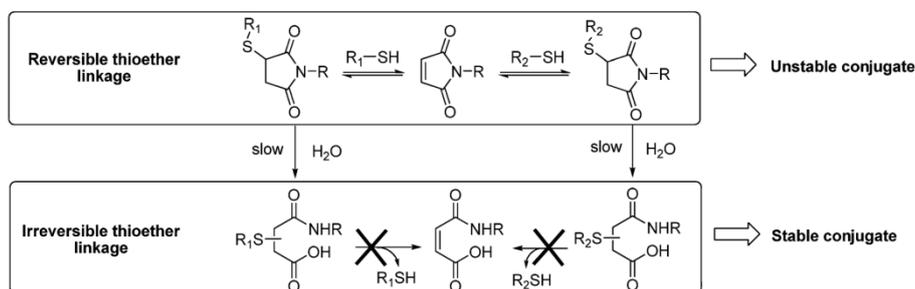
Specific Features of Maleimide–Thiol Conjugates. Unlike other Michael acceptors,^{8–10} the thiosuccinimide linkage is known to be hydrolytically unstable or to readily undergo thiol exchange via a retro-Michael process, particularly with endogenous thiols such as human serum albumin (HSA) and glutathione (GSH).¹¹ On the other hand, succinamide acids generated upon the hydrolysis of thio-Michael adducts are resistant to thiol-exchange reactions (Scheme 1). Several factors have been investigated to determine their role in favoring one of these two competitive reactions, depending on the intended application of the maleimide–thiol conjugates. For example, in the context of ADCs, a challenging balance between stability and reactivity must be found in order to design biological conjugates that are stable in the bloodstream and are capable of releasing a drug upon an appropriate stimulus once at the target site. In this part, we will give an account of the different factors that influence the stability of the succinimidyl ring and discuss new strategies to expand the applications of maleimide derivatives for bioconjugation.

Evidence of the Reversibility of Maleimide–Thiol Conjugates. In 1998, Shively and co-workers pointed out the

B

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 1. Two Competitive Reactions: Retro-Michael Addition versus Hydrolysis of Thiosuccinimides



120 insufficient stability of bis-succinimide-based radioimmuno-
 121 conjugates when exposed to fresh human serum at 37 °C.¹²
 122 In a subsequent study, Senter and co-workers reported that
 123 antibody-drug conjugates bearing a succinimide thioether
 124 linker showed dissociation of the anti-mitotic drug mono-
 125 methyl auristatin F (MMAF) from the antibody 1F6-C4v2
 126 with a half-life of 7 days upon exposure to in vivo plasma
 127 proteins. In contrast, bromoacetamide linkers have demon-
 128 strated higher stability. A covalent drug transfer was observed
 129 from the succinimide thioether-based ADC to the Cys-34
 130 residue of serum albumin, presumably through a mechanism
 131 involving a retro-Michael process followed by the conjugate
 132 addition of a plasmatic protein to a maleimide intermediate.¹³
 133 Furthermore, retro-Michael and thiol-exchange reactions in the
 134 presence of biothiols under physiological conditions have been
 135 clearly demonstrated by Kiick and co-workers in 2011.¹¹
 136 Model studies carried out with the thioacids 4-mercaptophen-
 137 nylic acid (pK_a 6.6), *N*-acetylcysteine (pK_a 9.5), and
 138 3-mercaptopropionic acid (pK_a 10.3) conjugated to *N*-ethyl-
 139 maleimide highlighted that the rate of exchange with GSH was
 140 closely related to the reactivity of the Michael donor. As the
 141 pK_a of the thioacid decreases, the rate of the thiol-exchange
 142 reaction increases. The half-life of a mercaptophenyl acetic
 143 acid-maleimide conjugate with respect to the retro-reaction
 144 was found to be 19 h versus 337 h for the *N*-acetylcysteine-
 145 maleimide in a reducing environment, while no reaction was
 146 observed in the absence of a GSH reductant in the medium.
 147 Almost no Michael exchange reaction was detected with the
 148 3-mercaptopropionic acid-maleimide conjugate. Importantly,
 149 these results showed that the stability of thiol-maleimide
 150 conjugates could be tuned for the controlled release of drugs at
 151 a target site, to reduce drug toxicity and improve the pharma-
 152 cokinetic profiles of these drugs.
 153 Whereas in the aforementioned studies, the stability of the
 154 thio-Michael adducts was closely related to the structure of
 155 the thiosuccinimide linker and the presence of thiol species in
 156 the media, Liebler and co-workers suggested that, in cells, the
 157 clearance of maleimide adducts was linked to an enzymatic
 158 metabolic pathway, rather than simply the instability of the
 159 adduct. Actually, they have shown that in cell lysates, thiol-
 160 Michael adducts were stable, even in the presence of cellular
 161 reductants, whereas in intact cells, succinimide-based con-
 162 jugates rapidly disappeared.¹⁴
 163 However, in some circumstances, such reversibility may not
 164 be desirable. In the context of ADCs, a premature breakdown
 165 of the thiosuccinimide would release the drug in the blood-
 166 stream with potentially toxic effects. Improved chemical stabil-
 167 ity of maleimide-thiol adducts toward both retro-Michael and

168 exchange reactions has been reported by Kalia and co-workers
 169 using exocyclic olefinic maleimides, which proved to be more
 170 resistant to thiol-exchange reactions than their endocyclic
 171 counterparts.¹⁵ However, reaction kinetics of thiols with
 172 exocyclic maleimides are significantly slower than with classic
 173 maleimides. For example, kinetics studies showed that the
 174 reaction between GSH and exocyclic maleimide was complete
 175 within 1 h, whereas it was complete within a few minutes with
 176 the endocyclic maleimide analog.

177 Furthermore, a more popular strategy facilitates the hydro-
 178 lytic cleavage of thiol-Michael adducts, thus generating succi-
 179 namide acid derivatives that are not prone to thiol-exchange
 180 reactions.

**Hydrolysis of Maleimide-Thiol Conjugates: Forma-
 181 tion of a Chemically Stable Succinamic Acid Linker.**
 182 Different factors have been investigated to accelerate the
 183 hydrolytic ring-opening of maleimide-thiol adducts, including
 184 external factors such as the reaction conditions (i.e., catalyst,
 185 pH and temperature) or the environment of the conjugation
 186 site (polarity, hydrophobicity), and internal factors, namely,
 187 the functionalization of the parent maleimides.
 188

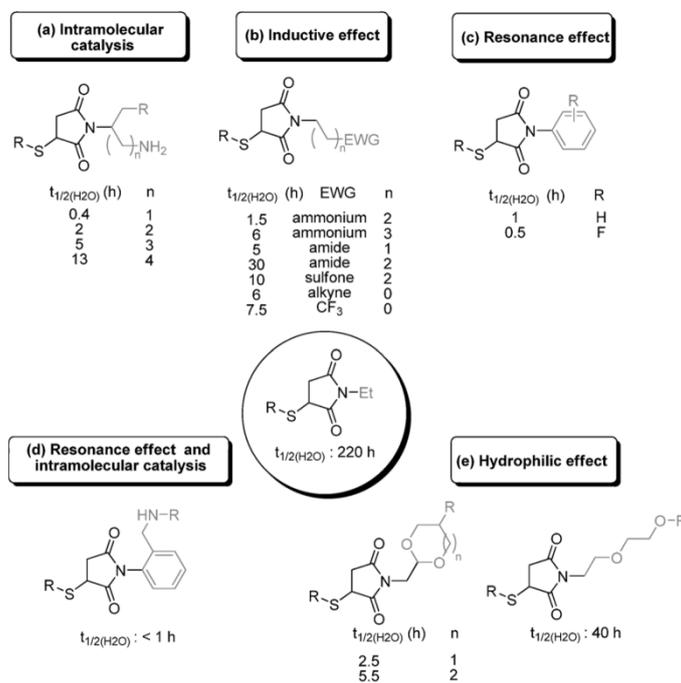
Reaction Conditions. In pioneering work, Raines and
 189 co-workers developed a catalytic system based on molybdate
 190 and chromate to hydrolyze thiosuccinimides at near-neutral pH,
 191 anticipating that the heterogeneity of the thiol adducts could
 192 alter the activity of the resultant bioconjugates.¹⁶ The mech-
 193 anism of maleimide hydrolysis under basic conditions has been
 194 known since the early 1950s.¹⁷⁻¹⁹ In this context, Tumey and
 195 co-workers observed that the hydrolysis of thiosuccinimide-
 196 based ADCs was markedly improved in basic conditions
 197 (29% and 54% of conversion at pH 8.5 and 9.2 at 37 °C,
 198 respectively).²⁰ Inspired by these results, an anion exchange
 199 resin procedure was developed by Shiraishi and co-workers to
 200 promote the hydrolysis of ADC conjugates.²¹
 201

Conjugation Site Environment. Apart from the bioconju-
 202 gation reaction conditions, the structural and chemical envi-
 203 ronments surrounding the conjugation site have been shown
 204 to promote either thiol-exchange reactions or hydrolysis of
 205 thiosuccinimide ADC linkers. Junutula and co-workers
 206 observed that on one hand, when the site was readily acces-
 207 sible to solvent, rapid maleimide exchange with endogenous
 208 thiols was observed. On the other hand, however, a partially
 209 accessible conjugation site surrounded by a positively charged
 210 environment led to the hydrolysis of the thiosuccinimide ring
 211 linker.²²
 212

Specific Functionalization of the Maleimide Nitrogen.
 213 Extensive efforts have been devoted to developing maleimide
 214 derivatives whose thio-Michael adducts readily undergo
 215

C

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX-XXX

Scheme 2. Chemical Modifications Used to Increase the Rate of Ring-Opening for Thiosuccinimides^a

^a $t_{1/2\text{H}_2\text{O}}$ are hydrolysis half-lives of thiosuccinimides recorded under near-physiological conditions.

216 ring-opening reactions under physiological conditions. Scheme 2
217 summarizes the different strategies explored and half-lives of
218 the corresponding thiosuccinimides, as recorded under near-
219 physiological conditions.

220 In this context, Senter and co-workers showed that appro-
221 priately positioning a primary amine on the *N*-alkyl group of
222 the maleimide dramatically accelerated the ring-opening hydro-
223 lysis rate of the thiosuccinimide through intramolecular amine-
224 based catalysis. Slower hydrolytic rates were also observed as
225 the space between the amino group and the thiosuccinimide
226 moiety increased (Scheme 2a).²³ Shortly after this study,
227 Santi and co-workers attributed this rapid hydrolysis to the
228 electron-withdrawing inductive effect of the protonated amine,
229 rather than to an intramolecular amine-mediated process
230 (Scheme 2b).²⁴ In fact, similar accelerating effects were observed
231 with quaternary amines on *N*-substituted maleimides, which are
232 devoid of any basic character. Other electron-withdrawing
233 groups, such as amides, ethers, sulfones, thioethers, trifluoro-
234 methanes, and alkynes, which are all uncharged, also enhanced
235 the ring-opening hydrolysis rate to some extent. Notably, the
236 presence of electron-withdrawing functional groups also
237 accelerated the thiol exchange reactions, but to a much lesser
238 extent (30-fold versus 600-fold for hydrolysis).

239 The resonance-promoted hydrolysis of maleimide–thiol
240 adducts was also explored in order to increase the stabilization
241 of the linker toward retro-Michael reactions (Scheme 2c).²⁵
242 To this end, a phenyl ring was directly attached to the nitro-
243 gen atom of the maleimides to allow the nitrogen lone pair to
244 delocalize into the aromatic ring, and thus decrease the elec-
245 tron density on the carbonyl, which were, as a result, more read-
246 ily hydrolyzable. *N*-Phenyl thiosuccinimides exhibited hydrolysis

247 rates 15–20-fold higher than those of the *N*-alkyl succinimide
248 analogues. The addition of a fluorine atom on the phenyl ring
249 further increased the hydrolysis rate (~1.4–2.1-fold).

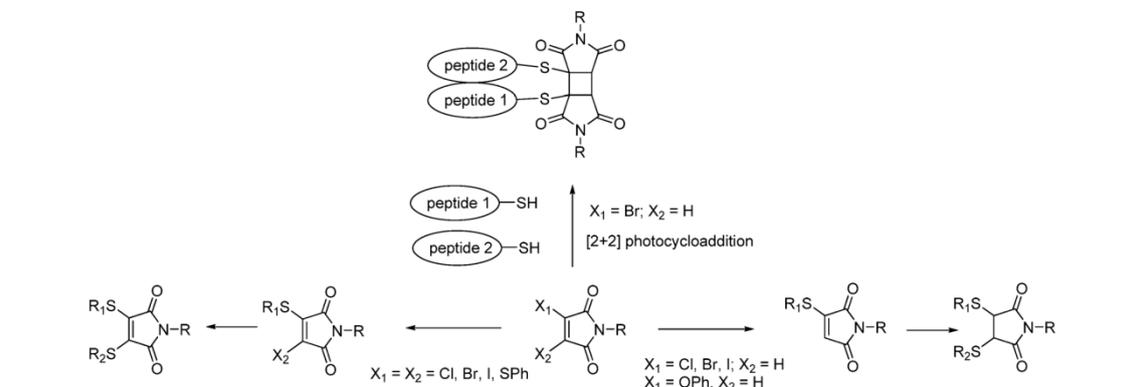
250 The introduction of an amino group (*o*-CH₂-NH₂) to the
251 *ortho* position of an *N*-phenylmaleimide further increased the
252 rate of ring-opening hydrolysis due to the combined effects
253 of the electron-withdrawing group on the phenyl ring system
254 and the ability of the ammonium group (formed from the
255 corresponding amine under physiological conditions) to
256 promote an intramolecular proton transfer to a maleimide
257 carbonyl group (Scheme 2d).²⁶ However, it should be noted
258 that direct attachment of the amino group (*o*-NH₂) at the
259 *ortho* position of the *N*-phenyl ring produced a thiol conjugate
260 that was highly resistant to hydrolysis. This stability was ascribed
261 to the low p*K*_a value of the aniline derivative (4.6 versus 9.3 for
262 *o*-CH₂-NH₂), which is present under physiological conditions
263 when the molecule is in the nonprotonated state and therefore
264 is not able to catalyze the hydrolysis.

265 Eventually, Tumey and co-workers unexpectedly noticed
266 that ADCs containing six polyethylene glycol (PEG) units
267 attached to the nitrogen atom of the thiosuccinimides were
268 slowly hydrolyzed upon storage in a neutral buffer, while their
269 counterpart with incorporated alkyl chains did not show
270 significant ring-opening.²⁰ It was assumed that the PEG units
271 facilitated the hydrolysis by coordinating a water molecule,
272 which was ultimately close to the succinimide carbonyl groups.
273 In this context, Wagner and co-workers developed cyclic
274 (5 and 6 atoms) acetal-based maleimides, whose corresponding
275 thiosuccinimide rings were readily hydrolyzed under mild aqueous
276 conditions, resulting in conjugates with significantly improved
277 stabilities. These derivatives constitute an important alternative

D

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 3. Next-Generation Maleimides (NGMs)



278 to the classical and most-used reagent, sulfo-*N*-succinimidyl
279 4-(maleimidomethyl)-cyclohexanecarboxylate (sulfo-SMCC),
280 which suffers from poor solubility and undesirable thiol-
281 exchange reactions (Scheme 2e).^{27,28}

282 It is important to keep in mind that the aforementioned
283 modifications were carried out on maleimides to accelerate the
284 kinetics of succinimide ring-opening but inherently increased
285 the hydrolysis rate of the parent maleimides, which may lead to
286 storage issues and thiol-exchange reactions of thiosuccinimides.
287 These problems were addressed by Kalia and co-workers, who
288 reported a maleimide bearing a photoremovable group in order
289 to temporarily mask the amino group that is responsible for the
290 acid-mediated hydrolytic ring opening of thiol-maleimide
291 conjugates.²⁰ Finally, it is worth noting that the hydrolysis
292 of thiol-Michael adducts may also have a significant impact on
293 the biological activity of the conjugates. In fact, Tumej and
294 co-workers noticed that the ring-opened linkers of anti-Her2
295 ADCs displayed improved in vitro stabilities and thus effi-
296 ciencies, without increasing the toxicity compared to their
297 nonhydrolyzed succinimide-based counterparts.²⁰ Indeed,
298 comparative studies showed that ADCs bearing hydrolyzed
299 succinimide linkers were significantly more resistant to thiol-
300 and plasma-mediated loss of payload than their nonhydrolyzed
301 counterparts, which were subjects to retro-Michael reactions
302 and subsequent payload loss.

303 **Specific Functionalization of Maleimides on the Double**
304 **Bond.** In contrast, Palanki and co-workers noticed that a
305 methyl-substituent on the alkene of the maleimide improved the
306 stability of the succinimide thioether toward hydrolysis, while
307 maintaining a comparative rate of thiol-Michael addition to
308 that of the 3,4-unsubstituted maleimide. In fact, the maleimide
309 underwent complete succinimide ring hydrolysis after 72 h at
310 pH 7.5 and 40 °C, whereas the monomethyl derivative exhibited
311 ~50% hydrolysis. This study also mentions that the presence of
312 a hydrophobic alkyl chain (such as a cyclohexyl group) on the
313 nitrogen also improves the stability of these molecules toward
314 hydrolysis.²⁹

315 **Next-Generation Maleimides.** A new class of maleimides
316 named “next-generation maleimides” (NGMs) are function-
317 alized with leaving groups X₁ and X₂ at the 3- and/or 4-position
318 of the maleimides and have been recently developed by the groups
319 of Baker, Caddick, and Chudasama in order to overcome some
320 of the limitations associated with the use of classic maleimide
321 derivatives (Scheme 3).^{30–32} In fact, NGMs are covalently
322 attached to thiols through a conjugated addition/elimination

323 sequence, thus preserving the maleimide scaffold for a second
324 thiol addition. Moreover, this new chemical platform could be
325 inserted into the disulfide bonds of biomolecules in order to
326 introduce specific chemical functionalities (PEG, fluorophore)
327 while retaining the bridging character of the maleimide.^{33–35}
328 In particular, this was illustrated through the synthesis of a
329 fluorescently labeled endogenous peptide hormone somatostat-
330 in. Interestingly, the reactivity of NGMs can be readily
331 tuned by the strength of the leaving group. 3-Aryloxymalei-
332 mides displayed a lower reactivity toward thiol conjugation and
333 a greater tolerance toward TCEP than 3-bromomaleimides.³⁷
334 Furthermore, dithiophenol maleimide derivatives proved
335 suitable for an in situ disulfide reduction-bridging protocol,
336 since they were tolerant to the presence of the disulfide bond
337 reducing agent, TCEP.^{38–40} 3,4-Diiodomaleimide cross-linking
338 reagents have been shown to be more stable toward hydrolysis
339 than their chloro- and bromo- counterparts, while being highly
340 reactive with Cys residues, yet too sterically hindered for
341 protein systems.⁴¹ Alternatively, to the direct addition of thiols
342 to maleimides, a rebridging disulfide bond method based on
343 photoinduced dimerization of thiomaleimides has also been
344 recently reported. This strategy was illustrated by cross-
345 linking the heavy and light chains of the monoclonal antibody
346 Herceptin by reacting the two thiomaleimide-containing
347 antibody fragments through a [2 + 2] photocycloaddition.⁴²

348 These NGMs led the way to the use of pyridazinones,
349 offering new perspectives for the reversible or irreversible plug-
350 and-play modification of peptides and proteins, though such
351 applications are out of the scope of this review and will not be
352 discussed further.^{43–45}

353 In addition to their use as soft electrophiles in Michael-type
354 bioconjugate reactions, the ability of maleimide derivatives
355 to act as dienophile partners in DA reactions was leveraged for
356 the site-specific modification of oligonucleotides, peptides,
357 proteins, and carbohydrates, as described in the next section.

MALEIMIDES IN DIELS–ALDER REACTIONS

358 Pericyclic transformations possess many attractive features such
359 as high chemoselectivities and fast kinetics, particularly in water,
360 wherein dramatic rate-accelerating effects (up to 10⁴) have been
361 observed.^{46,47} In contrast to the Huisgen 1,3-dipolar cycloaddi-
362 tion of terminal alkynes to organic azides, DA reactions with
363 maleimides do not require a catalyst to proceed at a reasonable
364 rate, although examples of RNA-accelerated cycloadditions
365 have been reported.^{48,49} 366

E

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

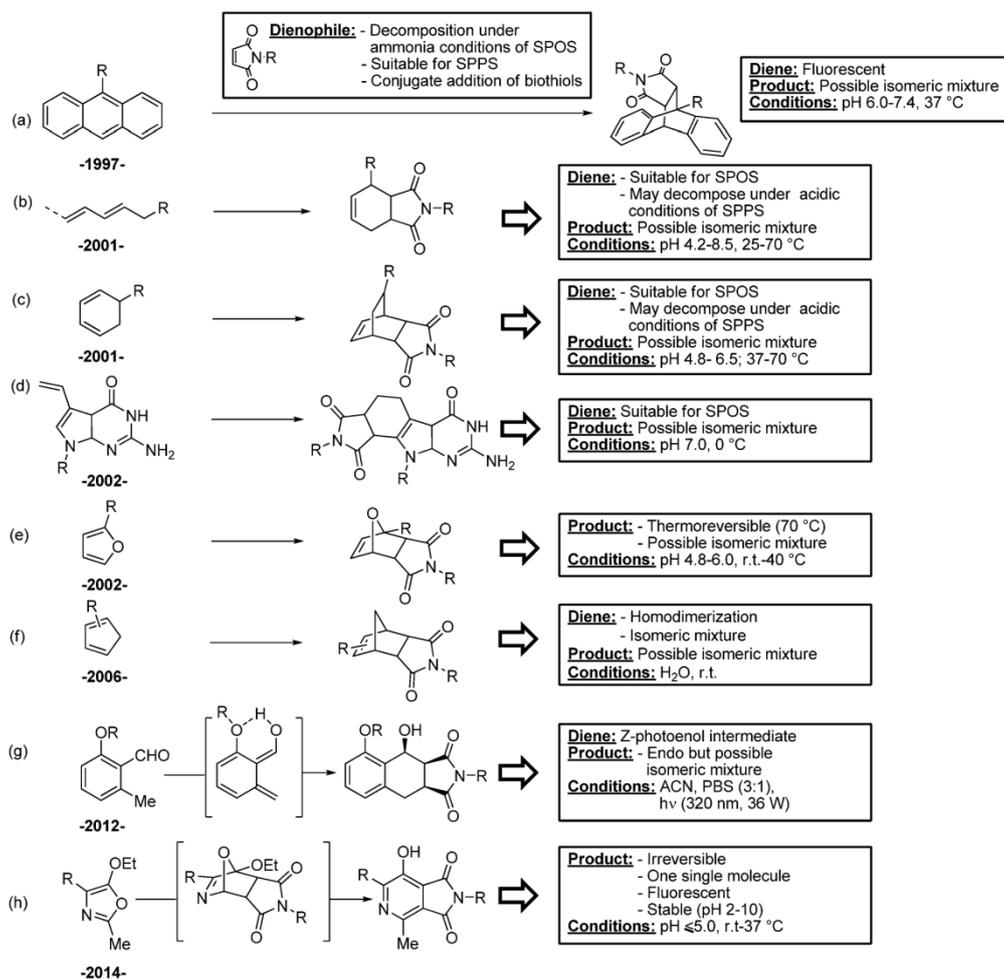


Figure 3. Maleimide-based DA reactions developed for the covalent labeling of biomolecules.

367 **Description of Dienes Used in Bioconjugation**
 368 **Reactions.** Pioneering studies performed by Jäschke in 1997
 369 showed that the DA reaction of anthracene with maleimide
 370 was amenable to bioconjugation for the site-specific modifica-
 371 tion of oligonucleotides (Figure 3a).^{50,51} Interestingly, the anthra-
 372 cene scaffold was used both as a fluorescent label and as a reactive
 373 partner in the DA process. Sebesta et al. reported complemen-
 374 tary bioconjugate techniques based on the use of butadienyl
 375 and cyclohexadienyl derivatives as dienes for covalent oligonu-
 376 cleotide preparation and immobilization onto a solid surface.⁵²
 377 This covalent attachment chemistry was used several times
 378 thereafter,^{53,54} particularly for the bioconjugation of carbohy-
 379 drates,^{55,56} peptides, and proteins (Figure 3b,c).⁵⁷
 380 Other dienes used as DA partners include a 7-vinyl guanine-like
 381 aromatic base,⁵⁸ furan,⁵⁹ cyclopentadiene,^{60,61} photoenol,⁶²
 382 and 5-ethoxyoxazole (Kondrat'eva ligation)^{63,64} derivatives
 383 (Figure 3d-h). Notably, the photoenol reported by Barner-
 384 Kowollik and co-workers was generated in situ from the corre-
 385 sponding benzaldehyde precursor upon photoactivation.⁶²
 386 Few studies have been carried out to determine the stability
 387 and relative effectiveness of dienes reacted with maleimides.

Stability of Reagents. *In the Context of Oligonucleotide*
 388 *Conjugation.* Hill and Sebesta reported that linear butadienyl
 389 and cyclohexadienyl derivatives were compatible with the
 390 conditions in automated solid-phase oligonucleotide synthesis
 391 (SPOS) (Ac₂O, pyr, THF; 3% TCA/DCM; 10% DCA; I₂,
 392 pyr/water/THF; *t*-Bu-OOH/PhMe; 0.45 M tetrazole/ACN;
 393 0.25 M 4,5-dicyanoimidazole; NH₄OH), thus making diene-
 394 oligonucleotides amenable to bioconjugate reactions and easily
 395 accessible.⁵¹ In addition, the nucleobase 7-vinyl-7-deazaguanine
 396 was successfully incorporated into an oligonucleotide through an
 397 automated DNA synthesizer, although the phosphite oxidative
 398 steps should be extremely fast (15 s) to avoid damage to the
 399 synthetic nucleobase/guanine upon long exposure to iodine.⁵⁸
 400 However, until recently, contrary to their diene counterparts,
 401 the use of maleimides in resin-linked oligonucleotides was imprac-
 402 tical due to their instability under the final deprotection step
 403 conditions, which require concentrated aqueous ammonia. This chal-
 404 lenge was elegantly solved by Grandas and co-workers through
 405 the use of maleimide-furan cycloadducts as protecting groups
 406 for the maleimides, which have been shown to be compatible with
 407 the conditions of oligonucleotide protecting group removal.^{65,66}
 408

F

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX-XXX

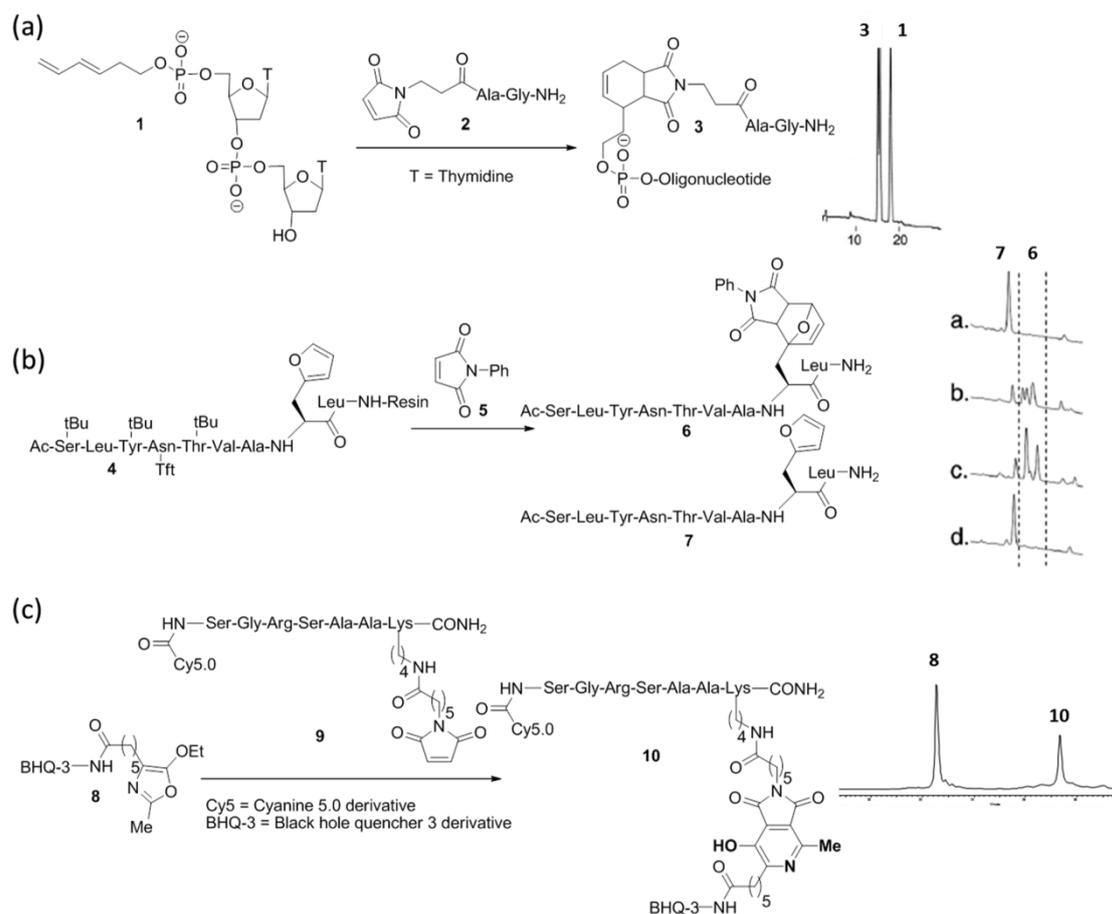


Figure 4. Maleimide-based ligation reactions and their corresponding RP-HPLC traces, using (a) butadiene derivative **1** as the diene. (Adapted from Grandas and co-workers, *Nucleic Acids Research* 2006.⁶⁵); (b) furan derivative **4** as the diene: a. reference of peptide **7** obtained after cleavage; b. peptide **4** after treatment with *N*-phenylmaleimide in toluene (48 h at RT) obtained after cleavage; c. peptide **4**, after treatment with *N*-phenylmaleimide in toluene (24 h at 70 °C) obtained after cleavage; d. retro-DA after reaction c. by heating the solid-supported product mixture in toluene for 24 h at 70 °C. (Adapted from ref 71, with permission from The Royal Society of Chemistry). (c) 5-Ethoxyoxazole derivative **8** as the diene. (Adapted with permission from Sabot, Renard and co-workers, *J. Org. Chem.* 2014.⁶³).

409 A subsequent retro-DA reaction, which occurs upon heating,
410 then releases the corresponding maleimido-oligonucleotide.

411 *In the Context of Peptide Conjugation.* Dienes are relatively
412 unstable under the acidic conditions used for both the
413 removal of side-chain protecting groups on amino acids and
414 the cleavage of peptides from resins in solid-phase peptide
415 synthesis (SPPS). In this context, Waldmann and co-workers
416 experienced a troublesome deprotection of Lys(Mtt) in the
417 presence of a butadienyl partner, which decomposed in 5%
418 TFA/5% TIS in DCM.⁶⁷ Accordingly, maleimides were
419 preferentially installed on the peptide moiety, which proved
420 relatively stable under standard cleavage conditions for SPPS
421 (e.g., TFA/H₂O/TIS triisopropylsilane 90:5:5 or thioanisole/
422 H₂O/EDT/TIS/TFA 2.5:2.5:2.5:1:91.5).⁶⁸

423 **Comparative Efficiency of DA Strategies.** Over the course
424 of the preparation of oligonucleotide-peptide conjugates,
425 Graham and co-workers noted that the cycloaddition process
426 significantly improved with the cyclohexadienyl-modified oligo-
427 nucleotide (72% conversion determined by HPLC of the

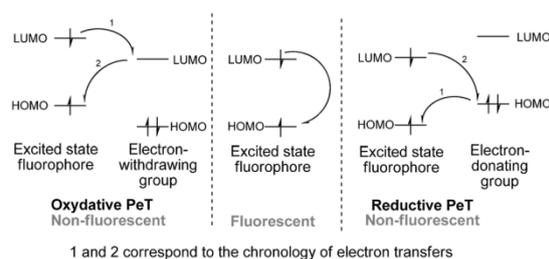


Figure 5. PeT phenomena.

428 crude reaction mixture), compared to the butadienyl (23%
429 conversion) and furanyl (33% conversion) analogues after
430 heating at 40 °C overnight.⁶⁹ It was then assumed that DA
431 was favored for nonaromatic dienes with a fixed *cis*-conformation.
432 By labeling proteasome activity in cell extracts using the DA
433 ligation, Overkleeft and co-workers also supported that the

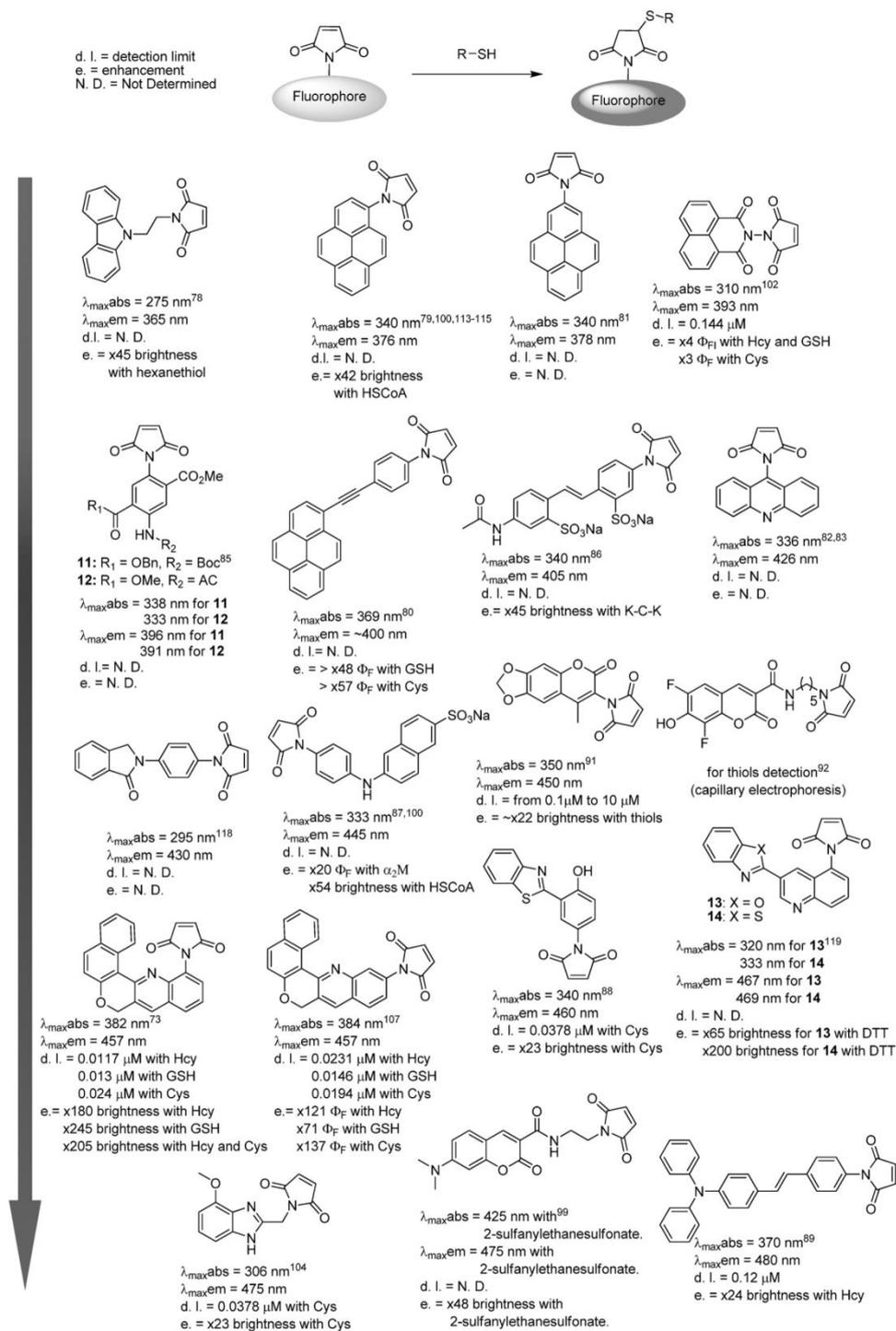


Figure 6. continued

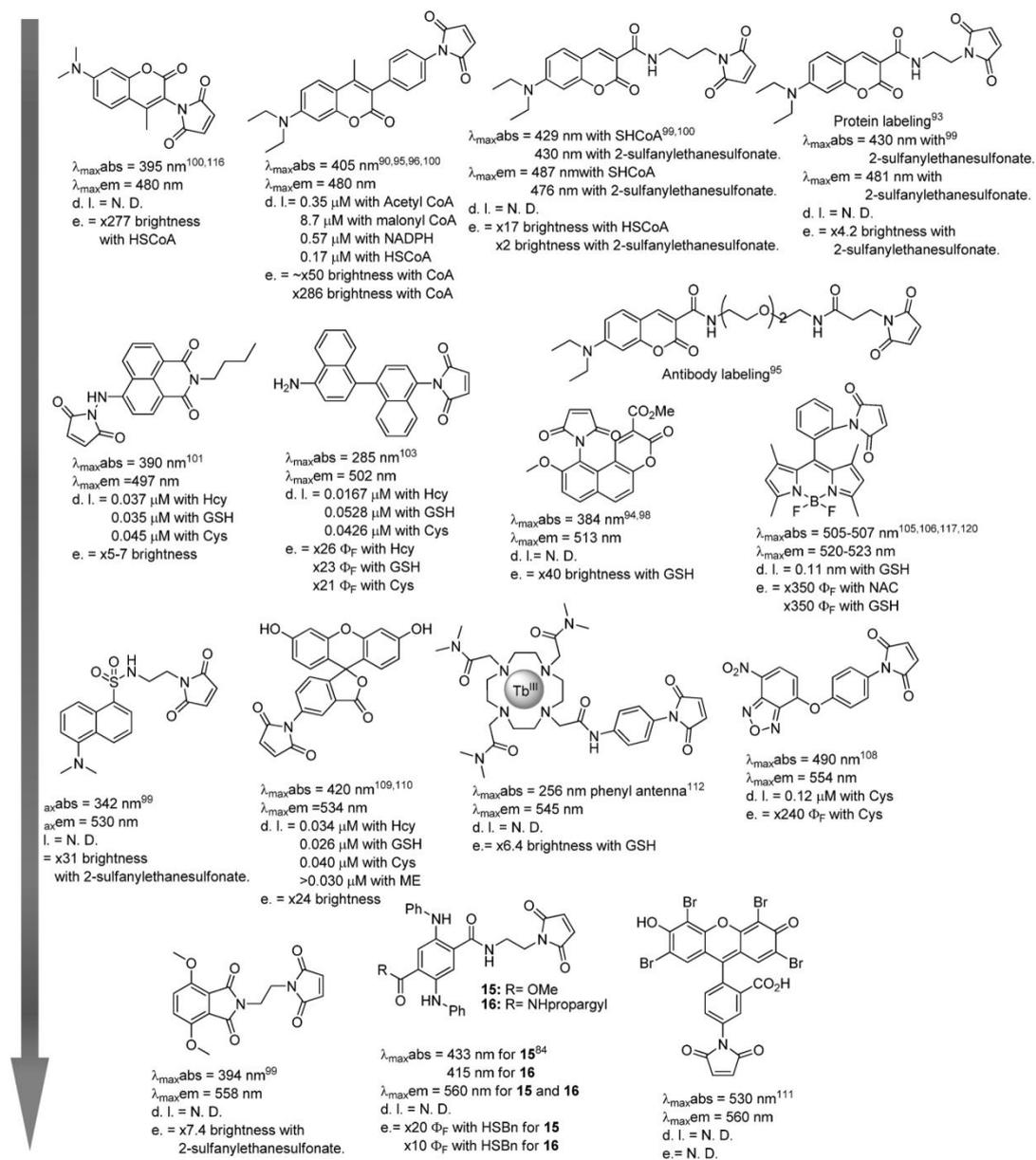


Figure 6. Maleimide-based PeT fluorogenic probes.

434 nature of the diene was of crucial importance, since they observed
 435 that the noncyclic butadienyl derivative underwent cycloaddition
 436 more efficiently than the anthracenyl analogue.⁷⁰ Reactions are
 437 usually carried out under mild conditions, that is, at room
 438 temperature or 37 °C, at pH values between ~5.0 and 7.0, except
 439 for Kondrat'eva ligation, which requires a rather acidic environ-
 440 ment in order to promote the irreversible aromatization step.
 441 Moreover, a lower pH was found to favor cycloaddition pro-
 442 cesses in terms of reaction rate and chemical yield.^{51,55} DA reac-
 443 tions are generally compatible with nucleophilic amino acids
 444 such as His, Trp, and Lys. However, slightly acidic conditions

are sometimes preferred to prevent conjugate addition of the
 445 amino groups to maleimides. In fact, Waldmann and co-workers
 446 observed that nucleophilic addition of native proteins to
 447 maleimides which occurred at pH 7, was not detected at pH
 448 values below 6.5.⁵⁷ However, the sulfhydryl groups of biothiols
 449 were reported to compete with dienes in DA with maleimides,
 450 even at pH 5.0.⁶³ Although this technical barrier precludes the
 451 use of maleimide-based DA reactions for in vivo applications,
 452 Overkleeft and co-workers recently reported a two-step ligation
 453 procedure for selective labeling in cellular extracts and living
 454 cells by masking thiols prior to the DA reaction. In addition,
 455

Scheme 4. Specific Detection of Cys over Hcy and GSH

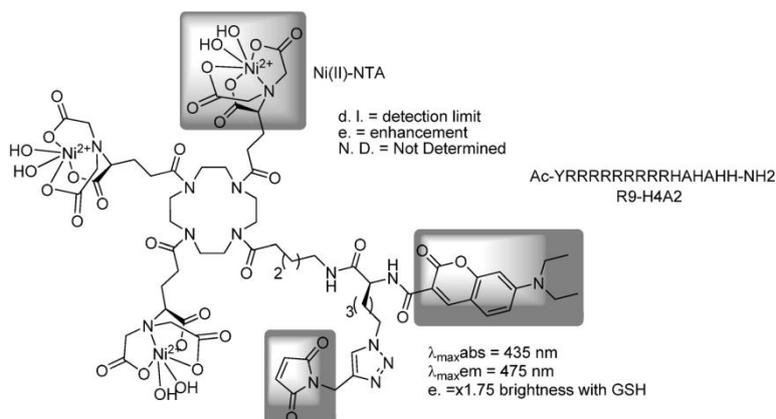
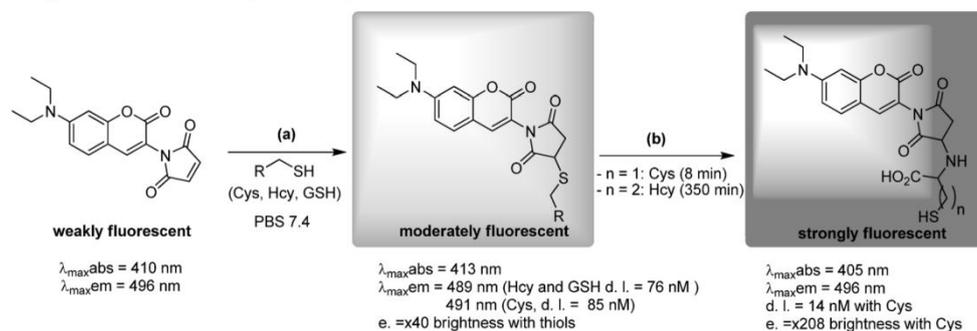


Figure 7. Pro-fluorescent probe Ni(II)-NTA and the carrier peptide R9-H4A2.

456 the combination of mutually orthogonal ligation strategies has
 457 been investigated, and preliminary results revealed that
 458 maleimide-based ligations were orthogonal both to Staudinger–Bertozzi ligation⁷⁰ and to copper(I)-catalyzed Huisgen
 459 1,3-dipolar cycloaddition.⁶³

461 **Diastereoselectivity of DA Strategies.** Cycloadditions of
 462 maleimides with the aforementioned dienes led to the formation
 463 of cycloadducts, mostly as a mixture of diastereoisomers,
 464 stemming from a lack of an endo/exo and facial diastereoselectivity.
 465 As shown Figure 4a, this mixture of products may
 466 induce particularly challenging analysis and separation issues.⁶⁸
 467 Furthermore, incomplete conversion was also observed due
 468 to the reversible nature of the DA reactions. Maddar and
 469 co-workers noticed that the reaction of furan **4** with maleimide
 470 **5** stopped at 85% conversion, whether the cycloaddition
 471 was carried out at room temperature or at 70 °C (Figure 4b).⁷¹
 472 To address these two issues, a sequential DA reaction/
 473 aromatization process was recently developed by our team,
 474 which first involved a DA reaction between 5-alkoxyoxazole
 475 and the maleimide derivatives, followed by an irreversible
 476 aromatization step to furnish the corresponding azaphthalimide
 477 scaffold as a single molecule, which could be readily
 478 isolated by RP-HPLC (Figure 4c).^{63,64,72}

479 From these studies, maleimide-diene bioconjugation strategies
 480 may represent a valuable alternative to standard click chemistry,
 481 which requires the use of a copper catalyst. However,
 482 further studies should be performed to determine the relative

kinetic rates of DA reactions, as well as the stability of the
 corresponding succinimide cycloadducts in a biological matrix. 484

FLUOROGENIC MALEIMIDE-BASED PROBES 485

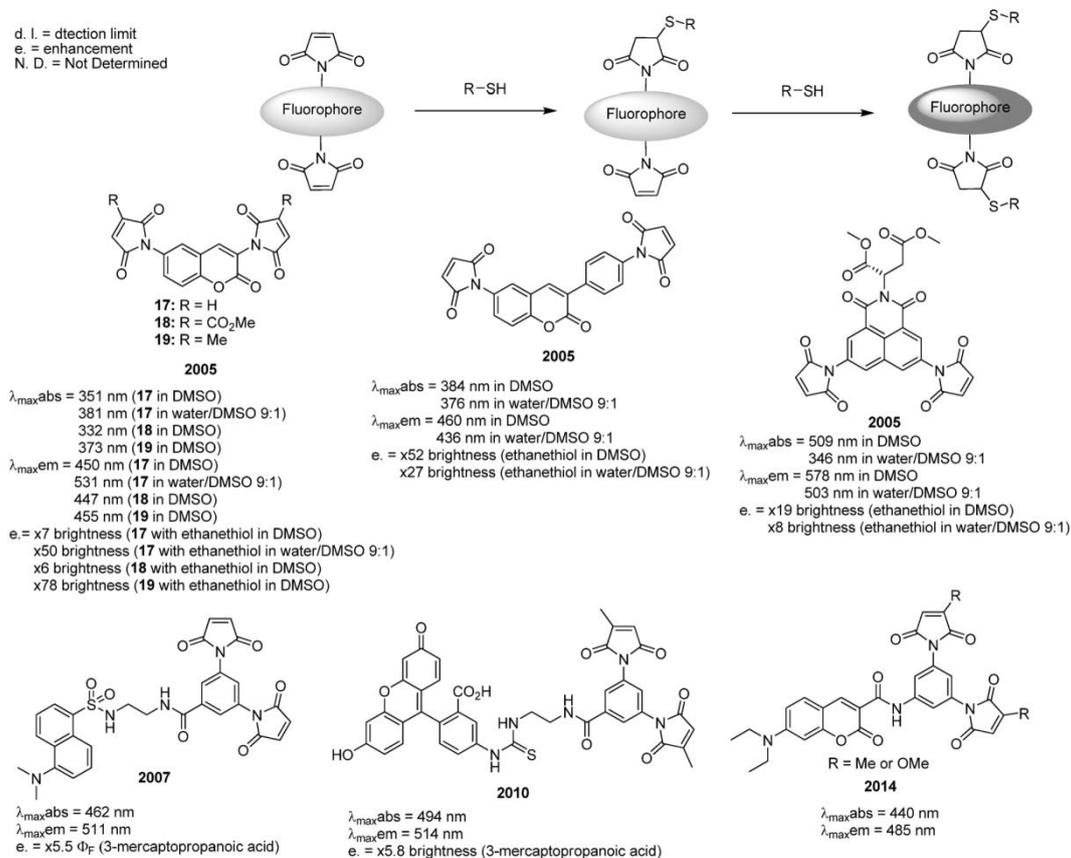
Fluorogenic Principle. The maleimide scaffold is widely
 used in fluorescence applications because of its good capacity
 to quench fluorescence, in particular, by photoinduced electron
 transfer (PeT), or more rarely by intramolecular charge transfer
 (ICT).⁷³ The PeT phenomenon refers to a single electron
 transfer between an excited-state fluorophore and a spatially close
 receptor, whose lowest unoccupied molecular orbital LUMO
 (oxidative PeT) or highest occupied molecular orbital HOMO
 (reductive PeT) is located between the LUMO and HOMO of
 the fluorophore (Figure 5). The indirect relaxation of the
 excited electron from the fluorophore to this energy level, rather
 than the ground state, thus preventing fluorescence emission. 497

Reductive PeT generally involves receptors with electron-
 donating groups, such as anilines or phenolates, while oxidative
 PeT mechanisms typically use electron-withdrawing functional
 groups such as nitro groups, aryl groups, or maleimides.⁷⁴
 Upon chemically modifying the structure of the receptor, the
 PeT mechanism could be interrupted, thus restoring the
 expected fluorescence. This particular strategy was used in the
 design of maleimide-based receptors for the specific detection
 of thiol analytes (amino acid residues: Cys, homocysteine –
 Hcy-; coenzyme A – CoASH-; peptides or proteins: glutathione
 – GSH-, α 2-macroglobulin; other analytes: 2-mercaptophenol, 508

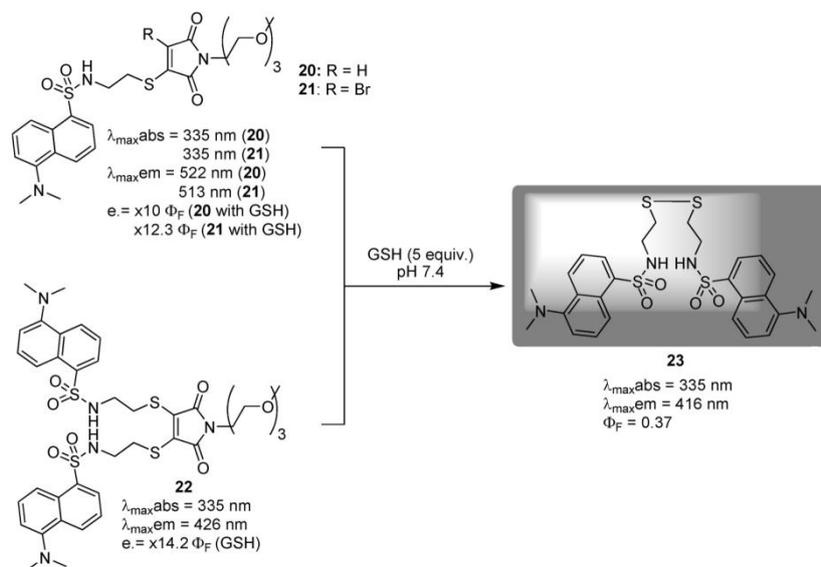
J

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 5. Bis-Maleimide-Based Probes for the Detection of Proteins Bearing Cys Residues Close to Each Other



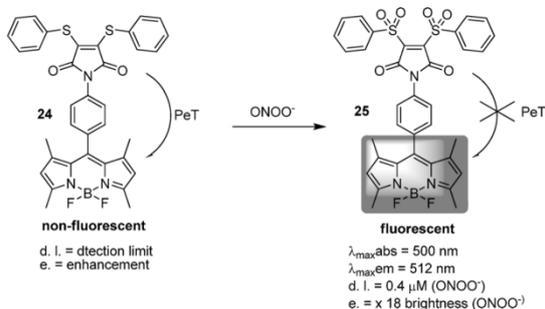
Scheme 6. Turn-On Fluorescence Probes by Chromophore Detachment



K

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 7. Fluorescent Detection of Peroxynitrite

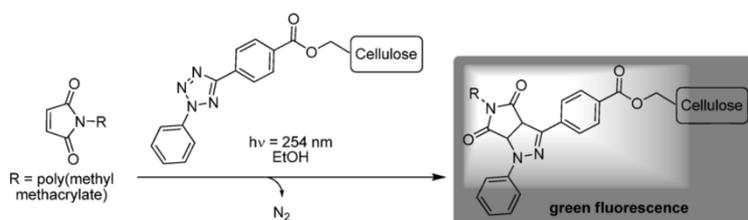


509 ethanethiol, hexanethiol, dithiothreitol – DTT-, 2-sulfanyla-
 510 nesulfonate). More than 30 different fluorescent sensors using
 511 a maleimide as the receptor have been reported (Figure 6).
 512 They consist of excited-state intramolecular proton transfer
 513 (ESIPT), polyaromatic, or intramolecular charge transfer
 514 (ICT) fluorophores, which cover a wide range of absorption
 515 (275–530 nm) and emission (385–560 nm) wavelengths, and
 516 exhibit fluorescence enhancement from 5 to 286 times for
 517 brightness and from 3 to 350 times for quantum yield. Accord-
 518 ingly, maleimide-based PeT probes appear to be a valuable
 519 alternative to Förster resonance energy transfer (FRET)-based
 520 quenchers, which display, with exception,^{75,76} a narrow
 521 quenching wavelength range.⁷⁷

522 More pronounced fluorescence responses were observed
 523 with probes where the maleimide moiety was directly connected
 524 to the aromatic core of the fluorophore (6–286× in
 525 brightness, and 21–350× in quantum yield) than those having
 526 an aliphatic spacer (5–45× for the brightness, and 3–20×
 527 for the quantum yield).^{78–120} While these probes are mostly used
 528 for the in vitro, in cellulo, or in plasma detection of biothiols,
 529 peptides, proteins, or antibodies, some of these probes can be
 530 used for biothiol recognition by HPLC with fluorescence moni-
 531 toring. To this end, pyrene,^{113–115} coumarin,¹¹⁶ BODIPY,^{106,117}
 532 and *N*-[4-(2-phthalimidyl) phenyl] maleimide (PPM)¹¹⁸ were
 533 used for their good fluorescence responses to biothiols.

534 **Biosensing Applications.** Remarkably, Qian and co-workers
 535 recently reported a highly sensitive coumarin-based probe for
 536 the specific detection of Cys over Hcy and GSH.¹²¹ In fact, this
 537 dye displayed a rapid response to Cys, Hcy, and GSH with an
 538 ~40-fold fluorescence enhancement within 1 min, accom-
 539 panied by a slight bathochromic shift of the absorbance maxi-
 540 mum (3 nm). This was attributed to thiol addition to the
 541 maleimide moiety, thus restoring the fluorescence of the
 542 fluorophore (Scheme 4a). After this 1 min period, a
 543 subsequent 8 nm hypsochromic shift was specifically observed
 544 for Cys and Hcy over GSH, accompanied by the formation of

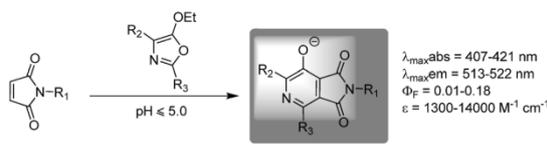
Scheme 8. [3 + 2] Photoclick Reaction of Tetrazole with Maleimide



L

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
 Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

Scheme 9. Fluorescent Azaphthalimides Obtained from Oxazoles and Maleimides



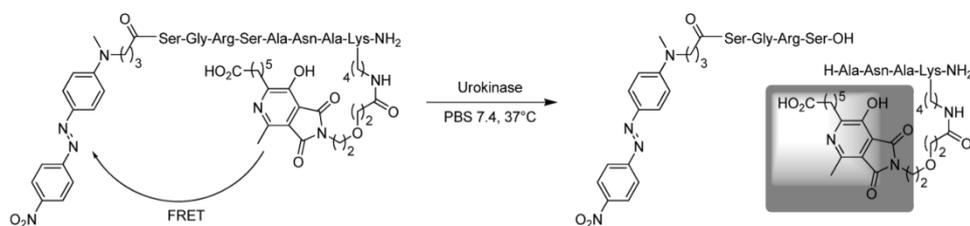
an isosbestic point at 395 nm. This isosbestic point indicated
 545 the formation of a new product, which appeared concomitantly
 546 with a marked increase in the fluorescence intensity (~208-fold).
 547 This product arose from the intramolecular nucleophilic
 548 substitution of the thiol by the amine functionality from the
 549 Cys/Hcy residue through a five-/six-membered ring transition
 550 state (Scheme 4b). However, the fluorescence intensity returned
 551 much faster in the presence of Cys over Hcy (8 min for Cys
 552 versus 350 min for Hcy). Accordingly, GSH, Cys, and Hcy
 553 could be kinetically discriminated from each other. 554

In 2017, Demizu and co-workers developed a maleimide-
 555 based fluorogenic probe linked to three Ni(II)-NTA (nickel-
 556 nitrilotriacetic) moieties. This probe was capable of interacting
 557 with intracellular proteins fused with a CH6 tag, which
 558 comprises a hexa-histidine tag (His tag) and one Cys residue
 559 (Figure 7).¹²² To increase the cell membrane penetration, a
 560 carrier peptide R9-H4A2 composed of nine Arg, four His, and
 561 two Ala residues was conjugated to the probe by forming a
 562 complex between the Ni(II)-NTA and H4A2 moieties, in
 563 order to shield the charge of the probe. Due to the presence of
 564 only four His residues in H4A2, it was anticipated that the
 565 binding affinity of this probe would be weaker than that of
 566 the His tag, thus favoring ligand exchange in cells. Moreover,
 567 the presence of a Cys residue next to the His tag allowed both
 568 the formation of a covalent bond with the target protein upon
 569 Michael addition and recovery of the fluorescence of the probe
 570 system with ~2-fold fluorescence turn-on response. 571

The labeling of specific proteins within a complex biological
 572 matrix is a great and interesting challenge, and in 2005, Keillor
 573 and co-workers developed different fluorogenic probes to select-
 574 ively detect selectively bearing two Cys residues close to each
 575 other in a target protein.¹²³ Their approach used fluorophores
 576 functionalized with two maleimide groups, in which the
 577 fluorescence increased dramatically upon the second thiol
 578 addition to maleimide (Scheme 5). This proof of concept was
 579 demonstrated for a di-Cys mutant of the helical protein Fos.
 580 Subsequent photophysical studies carried out in 2007 on
 581 dansyl-based dimaleimide fluorogens showed complementary
 582 fluorophore and quencher redox potentials, which supported
 583 the PeT quenching mechanism.¹²⁴ 584

In 2010, Keillor and co-workers developed novel probes
 585 using fluorescein or dansyl cores as the fluorogenic moiety.¹²⁵ 586

Scheme 10. FRET Probe for the Specific Detection of Urokinase



587 Introducing methyl groups to the alkene of the maleimide
588 decreased their reactivity with proteins and GSH by 1 and 3
589 orders of magnitude, respectively. These probes were thus used
590 for the specific detection of the α -helix dC10, a helical peptide
591 bearing two Cys residues, which was subsequently fused with
592 maltose binding protein (MPB).

593 More recently, in 2014, Keillor and co-workers demon-
594 strated that the presence of a methoxy group on the conju-
595 gated double bond of the maleimide dramatically suppressed
596 the reaction of the fluorogen with abundant intracellular
597 GSH while maintaining its reactivity with the dithiol tag.
598 Remarkably, this new reagent has enabled specific labeling in
599 live cells without requiring washing a protein genetically fused
600 to a short peptide sequence that presents two spatially close
601 Cys residues.¹²⁶

602 Baker and co-workers reported NGMs (next generation
603 maleimides) containing one or two fluorophores attached at
604 the C3- and C4-positions of the maleimide through a thioether
605 linkage. It has been shown that the fluorophore quenched by
606 the maleimide system could be detached via a thio-Michael/
607 retro-thio-Michael sequence upon treatment of the probe with
608 thiols, thus restoring its fluorescence (Scheme 6).¹²⁷

609 **Chemosensing Applications.** Maleimide fluorogenic
610 probes have not only been used as biosensors for monitoring
611 specific proteins or thiols but also for chemosensing
612 applications. In 2017, Churchill and co-workers designed a
613 dithiomaleimide BODIPY probe **24** for the selective detection
614 of peroxynitrite ONOO^- , which is a highly reactive nitrogen
615 species (RNS) with a very short half-life (below 20 ms) found
616 in living systems (Scheme 7).¹²⁸ The presence of peroxynitrite
617 led to a turn-on fluorescence change, which resulted from block-
618 ing the PeT process by the plausible formation of disulfo-
619 nylmaleimide **25**. Importantly, this probe, tested in living cells,
620 was found to be remarkably selective, as no fluorescence turn-
621 on was observed in the presence of other reactive oxygen/
622 nitrogen species (NaOCl , H_2O_2 , tBuOOH , tBuO^\cdot , O_2^\cdot , OH^\cdot ,
623 and NO). However, a 5-fold emission enhancement was
624 observed with O_2^\cdot , which was found to be relatively modest in
625 comparison to the 18-fold fluorescence enhancement observed
626 with ONOO^- .

627 **Fluorogenic Pericyclic Reactions.** Maleimide conjugates
628 were also involved in fluorogenic 1,3-dipolar and Diels–Alder
629 cycloadditions. The fluorescent species are formed from the
630 pericyclic products, and these chemoselective ligations enabled
631 the formation of a fluorescent linkage from reagents that had
632 no fluorophore in their structure.

633 In 2012, tetrazole photoclick chemistry was successfully used
634 by Barner-Kowollik and co-workers for the specific mod-
635 ification of (bio)surfaces such as cellulose (Scheme 8).¹²⁹
636 Upon UV light exposure, a tetrazole-functionalized cellulose
637 generated a nitrile imine intermediate, which readily reacted

with α -maleimido poly(methyl methacrylate) (PMMA) to
638 afford the corresponding PMMA-grafted cellulose together
639 with a remarkable increase in fluorescence, even in the solid
640 state.

641 In 2016, our group reported the fluorescence of a series of
642 azaphthalimides generated from nonemissive 5-alkoxyoxazole
643 and maleimide derivatives, under conditions compatible with
644 peptide chemistry (Scheme 9).^{64,72,130} Azaphthalimides
645 exhibited green fluorescence with quantum yields ranging
646 from 0.01 to 0.18, depending on the pH value of the aqueous
647 solution. In fact, deprotonation of the hydroxyl functionality in
648 azaphthalimides, which predominantly occurred above pH 6.0,
649 led to the formation of markedly more emissive species.⁶⁵⁰

651 Accordingly, this fluorogenic labeling strategy has found
652 applications in the synthesis of biologically relevant probes that
653 require significant fluorescence to turn on at physiological pH,
654 such as a biosensor for the specific detection of urokinase-
655 plasminogen-activator (uPA), which is overexpressed in breast
656 and prostate cancer (Scheme 10).

CONCLUSIONS

657 As discussed in this review, maleimides have been used in
658 multiple biological applications due to their small size, good
659 accessibility, and modular reactivity by acting either as Michael
660 acceptors with biothiols or as dienophiles in primarily Diels–
661 Alder reactions. Furthermore, maleimides can have up to three
662 points of chemical attachment, which recently has proved to be
663 particularly useful for protein modification through disulfide
664 bridge insertion. In this context, recently reported dibromo-
665 pyridazinone platforms now allow loading of up to four
666 moieties, which has enabled the effective labeling of antibodies.
667 Although the reversibility of maleimide–thiol adducts
668 could provide, if controlled, a substantial advantage in the
669 context of controlled release drug delivery, structural tuning of
670 the maleimide scaffolds promotes the hydrolysis of thio-con-
671 jugates, thus making ligation irreversible, if necessary. Notably,
672 complementary strategies have recently emerged for the irrevers-
673 ible labeling of protein thiols, using reagents including
674 methylsulfonyl benzothiazole,¹³¹ allenamide,¹³² or 3-arylpropio-
675 nitrile.¹³³ In addition to bioconjugation, maleimides have also
676 been shown to be convenient partners to temporarily mask the
677 fluorescence of fluorochromes that exhibit a broad range of
678 emission wavelengths. This phenomenon proved useful for the
679 design of fluorogenic probes, mainly for the specific detection of
680 biothiols.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: cyrille.sabot@univ-rouen.fr.

ORCID

Cyrille Sabot: 0000-0002-5014-7217

M

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00252
Bioconjugate Chem. XXXX, XXX, XXX–XXX

687 Author Contributions

688 ‡Kévin Renault and Jean Wilfried Fredy contributed equally to
689 this review.

690 Notes

691 The authors declare no competing financial interest.

692 ■ ACKNOWLEDGMENTS

693 This work was supported by the Agence Nationale de la
694 Recherche (ANR-16-CE07-0004, “Click and Fish”), and the
695 Region Haute-Normandie (FEDER CHIMBIO HN 0001401)
696 provided financial support to K.R. This work was also partially
697 supported by the Centre National de la Recherche Scientifique
698 (CNRS), INSA Rouen, Rouen-Normandie University, and the
699 Labex SynOrg (ANR-11-LABX-0029).

700 ■ REFERENCES

701 (1) Hermanson, G. T. (2008) *Bioconjugate Techniques*, 2nd ed.,
702 Academic Press, Waltham, MA.
703 (2) Bednar, R. A. (1990) Reactivity and pH dependence of thiol
704 conjugation to N-ethylmaleimide: detection of a conformational
705 change in chalcone isomerase. *Biochemistry* 29, 3684–3690.
706 (3) Awoonor-Williams, E., and Rowley, C. N. (2016) Evaluation of
707 Methods for the Calculation of the pKa of Cysteine Residues in
708 Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 12, 4662–4673.
709 (4) Adumeau, P., Sharma, S. K., Brent, C., and Zeglis, B. M. (2016)
710 Site-Specifically Labeled Immunoconjugates for Molecular Imaging—
711 Part I: Cysteine Residues and Glycans. *Mol. Imaging Biol.* 18, 1–17.
712 (5) Veronese, F. M. (2001) Peptide and protein PEGylation: a
713 review of problems and solutions. *Biomaterials* 22, 405–417.
714 (6) Joubert, N., Denevault-Sabourin, C., Bryden, F., and Viaud-
715 Massuard, M.-C. (2017) Towards antibody-drug conjugates and
716 prodrug strategies with extracellular stimuli-responsive drug delivery
717 in the tumor microenvironment for cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.*
718 142, 393–415.
719 (7) Jackson, D. Y. (2016) Processes for Constructing Homogeneous
720 Antibody Drug Conjugates. *Org. Process Res. Dev.* 20, 852–866.
721 (8) Koniev, O., and Wagner, A. (2015) Developments and recent
722 advancements in the field of endogenous amino acid selective bond
723 forming reactions for bioconjugation. *Chem. Soc. Rev.* 44 (15), 5495–
724 5551.
725 (9) Nair, D. P., Podgórski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W., Fenoli,
726 C. R., and Bowman, C. N. (2014) The Thiol-Michael Addition Click
727 Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry.
728 *Chem. Mater.* 26, 724–744.
729 (10) Gunnoo, S. B., and Madder, A. (2016) Chemical Protein
730 Modification through Cysteine. *ChemBioChem* 17, 529–553.
731 (11) Baldwin, A. D., and Kiick, K. L. (2011) Tunable Degradation of
732 Maleimide–Thiol Adducts in Reducing Environments. *Bioconjugate*
733 *Chem.* 22, 1946–1953.
734 (12) Lewis, M. R., and Shively, J. E. (1998) Maleimidocysteine-
735 mido-DOTA Derivatives: New Reagents for Radiometal Chelate
736 Conjugation to Antibody Sulfhydryl Groups Undergo pH-Dependent
737 Cleavage Reactions. *Bioconjugate Chem.* 9, 72–86.
738 (13) Alley, S. C., Benjamin, D. R., Jeffrey, S. C., Okeley, N. M.,
739 Meyer, D. L., Sanderson, R. J., and Senter, P. D. (2008) Contribution
740 of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates.
741 *Bioconjugate Chem.* 19, 759–765.
742 (14) Lin, D., Saleh, S., and Liebler, D. C. (2008) Reversibility of
743 Covalent Electrophile-Protein Adducts and Chemical Toxicity. *Chem.*
744 *Res. Toxicol.* 21, 2361–2369.
745 (15) Kalia, D., Malekar, P. V., and Parthasarathy, M. (2016)
746 Exocyclic Olefinic Maleimides: Synthesis and Application for Stable
747 and Thiol-Selective Bioconjugation. *Angew. Chem., Int. Ed.* 55, 1432–
748 1435.
749 (16) Kalia, J., and Raines, R. T. (2007) Catalysis of imido group
750 hydrolysis in a maleimide conjugate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17,
751 6286–6289.

(17) Khan, M. N. (1984) Kinetics and mechanism of the alkaline
752 hydrolysis of maleimide. *J. Pharm. Sci.* 73, 1767–1771. 753
(18) Khan, M. N., and Khan, A. A. (1975) Kinetics and mechanism
754 of hydrolysis of succinimide in highly alkaline medium. *J. Org. Chem.*
755 40, 1793–1794. 756
(19) Gregory, J. D. (1955) The Stability of N-Ethylmaleimide and
757 its Reaction with Sulfhydryl Groups. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3922–
758 3923. 759
(20) Tumey, L. N., Charati, M., He, T., Sousa, E., Ma, D., Han, X.,
760 Clark, T., Casavant, J., Loganzo, F., et al. (2014) Mild Method for
761 Succinimide Hydrolysis on ADCs: Impact on ADC Potency, Stability,
762 Exposure, and Efficacy. *Bioconjugate Chem.* 25, 1871–1880. 763
(21) Shinmi, D., Taguchi, E., Iwano, J., Yamaguchi, T., Masuda, K.,
764 Enokizono, J., and Shiraishi, Y. (2016) One-Step Conjugation
765 Method for Site-Specific Antibody–Drug Conjugates through
766 Reactive Cysteine-Engineered Antibodies. *Bioconjugate Chem.* 27,
767 1324–1331. 768
(22) Shen, B.-Q., Xu, K., Liu, L., Raab, H., Bhakta, S., Kenrick, M.,
769 Parsons-Reponde, K. L., Tien, J., Yu, S.-F., et al. (2012) Conjugation
770 site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of
771 antibody-drug conjugates. *Nat. Biotechnol.* 30, 184–189. 772
(23) Lyon, R. P., Setter, J. R., Bovee, T. D., Doronina, S. O., Hunter,
773 J. H., Anderson, M. E., Balasubramanian, C. L., Duniho, S. M., Leiske,
774 C. I., et al. (2014) Self-hydrolyzing maleimides improve the stability
775 and pharmacological properties of antibody-drug conjugates. *Nat.*
776 *Biotechnol.* 32, 1059–1062. 777
(24) Fontaine, S. D., Reid, R., Robinson, L., Ashley, G. W., and
778 Santi, D. V. (2015) Long-Term Stabilization of Maleimide–Thiol
779 Conjugates. *Bioconjugate Chem.* 26, 145–152. 780
(25) Christie, R. J., Fleming, R., Bezabeh, B., Woods, R., Mao, S.,
781 Harper, J., Joseph, A., Wang, Q., Xu, Z.-Q., et al. (2015) Stabilization
782 of cysteine-linked antibody drug conjugates with N-aryl maleimides. *J.*
783 *Controlled Release* 220, 660–670. 784
(26) Kalia, D., Pawar, S. P., and Thopate, J. S. (2017) Stable and
785 Rapid Thiol Bioconjugation by Light-Triggered Thiomaleimide Ring
786 Hydrolysis. *Angew. Chem., Int. Ed.* 56, 1885–1889. 787
(27) Dovgan, I., Kolodych, S., Koniev, O., and Wagner, A. (2016) 2-
788 (Maleimidomethyl)-1,3-Dioxanes (MD): a Serum-Stable Self-hydro-
789 lysable Hydrophilic Alternative to Classical Maleimide Conjugation.
790 *Sci. Rep.* 6, 30835–30840. 791
(28) Tobaldi, E., Dovgan, I., Mosser, M., Becht, J.-M., and Wagner,
792 A. (2017) Structural investigation of cyclo-dioxo maleimide cross-
793 linkers for acid and serum stability. *Org. Biomol. Chem.* 15, 9305–
794 9310. 795
(29) Palanki, M. S. S., Bhat, A., Lappe, R. W., Liu, B., Oates, B.,
796 Rizzo, J., Stankovic, N., and Bradshaw, C. (2012) Development of
797 novel linkers to conjugate pharmacophores to a carrier antibody.
798 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 4249–4253. 799
(30) Tedaldi, L. M., Smith, M. E. B., Nathani, R. I., and Baker, J. R.
800 (2009) Bromomaleimides: new reagents for the selective and
801 reversible modification of cysteine. *Chem. Commun.* 0, 6583–6585. 802
(31) Kuan, S. L., Wang, T., and Weil, T. (2016) Site-Selective
803 Disulfide Modification of Proteins: Expanding Diversity beyond the
804 Proteome. *Chem. - Eur. J.* 22, 17112–17129. 805
(32) Nunes, J. P. M., Morais, M., Vassileva, V., Robinson, E.,
806 Rajkumar, V. S., Smith, M. E. B., Pedley, R. B., Caddick, S., Baker, J.
807 R., and Chudasama, V. (2015) Functional native disulfide bridging
808 enables delivery of a potent, stable and targeted antibody-drug
809 conjugate (ADC). *Chem. Commun.* 51, 10624–10627. 810
(33) Smith, M. E. B., Caspersen, M. B., Robinson, E., Morais, M.,
811 Maruani, A., Nunes, J. P. M., Nicholls, K., Saxton, M. J., Caddick, S.,
812 et al. (2015) A platform for efficient, thiol-stable conjugation to
813 albumin's native single accessible cysteine. *Org. Biomol. Chem.* 13,
814 7946–7949. 815
(34) Nunes, J. P. M., Vassileva, V., Robinson, E., Morais, M., Smith,
816 M. E. B., Pedley, R. B., Caddick, S., Baker, J. R., and Chudasama, V.
817 (2017) Use of a next generation maleimide in combination with
818 THIOMAB antibody technology delivers a highly stable, potent and 819

- 820 near homogeneous THIOMAB antibody-drug conjugate (TDC). *RSC*
821 *Adv.* 7, 24828–24832.
- 822 (35) Ryan, C. P., Smith, M. E. B., Schumacher, F. F., Grohmann, D.,
823 Papaioannou, D., Waksman, G., Werner, F., Baker, J. R., and Caddick,
824 S. (2011) Tunable reagents for multi-functional bioconjugation:
825 reversible or permanent chemical modification of proteins and
826 peptides by control of maleimide hydrolysis. *Chem. Commun.* 47,
827 5452–5454.
- 828 (36) Smith, M. E. B., Schumacher, F. F., Ryan, C. P., Tedaldi, L. M.,
829 Papaioannou, D., Waksman, G., Caddick, S., and Baker, J. R. (2010)
830 Protein Modification, Bioconjugation, and Disulfide Bridging Using
831 Bromomaleimides. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1960–1965.
- 832 (37) Marculescu, C., Kossen, H., Morgan, R. E., Mayer, P., Fletcher,
833 S. A., Tolner, B., Chester, K. A., Jones, L. H., and Baker, J. R. (2014)
834 Aryloxymaleimides for cysteine modification, disulfide bridging and
835 the dual functionalization of disulfide bonds. *Chem. Commun.* 50,
836 7139–7142.
- 837 (38) Schumacher, F. F., Nobles, M., Ryan, C. P., Smith, M. E. B.,
838 Tinker, A., Caddick, S., and Baker, J. R. (2011) Situ Maleimide
839 Bridging of Disulfides and a New Approach to Protein PEGylation.
840 *Bioconjugate Chem.* 22, 132–136.
- 841 (39) Collins, J., Tanaka, J., Wilson, P., Kempe, K., Davis, T. P.,
842 McIntosh, M. P., Whittaker, M. R., and Haddleton, D. M. (2015) In
843 Situ Conjugation of Dithiophenol Maleimide Polymers and Oxytocin
844 for Stable and Reversible Polymer–Peptide Conjugates. *Bioconjugate*
845 *Chem.* 26, 633–638.
- 846 (40) Jones, M. W., Strickland, R. A., Schumacher, F. F., Caddick, S.,
847 Baker, J. R., Gibson, M. I., and Haddleton, D. M. (2012) Highly
848 efficient disulfide bridging polymers for bioconjugates from radical-
849 compatible dithiophenol maleimides. *Chem. Commun.* 48, 4064–
850 4066.
- 851 (41) Forte, N., Livanos, M., Miranda, E., Morais, M., Yang, X.,
852 Rajkumar, V. S., Chester, K. A., Chudasama, V., and Baker, J. R.
853 (2018) Tuning the Hydrolytic Stability of Next Generation
854 Maleimide Cross-Linkers Enables Access to Albumin-Antibody
855 Fragment Conjugates and tri-scFvs. *Bioconjugate Chem.* 29, 486–492.
- 856 (42) Richards, D. A., Fletcher, S. A., Nobles, M., Kossen, H.,
857 Tedaldi, L., Chudasama, V., Tinker, A., and Baker, J. R. (2016)
858 Photochemically re-bridging disulfide bonds and the discovery of a
859 thiomaleimide mediated photodecarboxylation of C-terminal cyste-
860 teines. *Org. Biomol. Chem.* 14, 455–459.
- 861 (43) Maruani, A., Smith, M. E. B., Miranda, E., Chester, K. A.,
862 Chudasama, V., and Caddick, S. (2015) A plug-and-play approach to
863 antibody-based therapeutics via a chemoselective dual click strategy.
864 *Nat. Commun.* 6, 6645–6653.
- 865 (44) Lee, M. T. W., Maruani, A., Baker, J. R., Caddick, S., and
866 Chudasama, V. (2016) Next-generation disulfide stapling: reduction
867 and functional re-bridging all in one. *Chem. Sci.* 7, 799–802.
- 868 (45) Lee, M. T. W., Maruani, A., Richards, D. A., Baker, J. R.,
869 Caddick, S., and Chudasama, V. (2017) Enabling the controlled
870 assembly of antibody conjugates with a loading of two modules
871 without antibody engineering. *Chem. Sci.* 8, 2056–2060.
- 872 (46) Rideout, D. C., and Breslow, R. (1980) Hydrophobic
873 acceleration of Diels-Alder reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7816–
874 7817.
- 875 (47) Otto, S., and Engberts, J. B. F. N. (2003) Hydrophobic
876 interactions and chemical reactivity. *Org. Biomol. Chem.* 1, 2809–
877 2820.
- 878 (48) Tarasow, T. M., Tarasow, S. L., and Eaton, B. E. (1997) RNA-
879 catalysed carbon–carbon bond formation. *Nature* 389, 54–57.
- 880 (49) Seelig, B., and Jäschke, A. (1999) A small catalytic RNA motif
881 with Diels-Alderase activity. *Chem. Biol.* 6, 167–176.
- 882 (50) Seelig, B., and Jäschke, A. (1997) Site-specific modification of
883 enzymatically synthesized RNA: Transcription initiation and Diels-
884 Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* 38, 7729–7732.
- 885 (51) Hill, K. W., Taunton-Rigby, J., Carter, J. D., Kropp, E., Vagle,
886 K., Pieken, W., McGee, D. P. C., Husar, G. M., Leuck, M., et al.
887 (2001) Diels–Alder Bioconjugation of Diene-Modified Oligonucleo-
888 tides. *J. Org. Chem.* 66, 5352–5358.
- (52) Husar, G. M., Anziano, D. J., Leuck, M., and Sebesta, D. P. 889
(2001) Covalent modification and surface immobilization of nucleic
890 acids via the Diels-Alder bioconjugation method. *Nucleosides,*
891 *Nucleotides Nucleic Acids* 20, 559–566.
- (53) Tona, R., and Haner, R. (2004) Functionalisation of a diene-
893 modified hairpin mimic via the Diels-Alder reaction. *Chem. Commun.*
894 0, 1908–1909.
- (54) Tona, R., and Häner, R. (2005) Synthesis and Bioconjugation
896 of Diene-Modified Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem.* 16, 837–
897 842.
- (55) Pozsgay, V., Vieira, N. E., and Yergey, A. (2002) A Method for
899 Bioconjugation of Carbohydrates Using Diels–Alder Cycloaddition.
900 *Org. Lett.* 4, 3191–3194.
- (56) Latham-Timmons, H. A., Wolter, A., Shawn Roach, J., Giare,
902 R., and Leuck, M. (2003) Novel Method for the Covalent
903 Immobilization of Oligonucleotides via Diels-Alder Bioconjugation.
904 *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* 22, 1495–1497.
- (57) de Araújo, A. D., Palomo, J. M., Cramer, J., Köhn, M., Schröder,
906 H., Wacker, R., Niemeyer, C., Alexandrov, K., and Waldmann, H.
907 (2006) Diels–Alder Ligation and Surface Immobilization of Proteins.
908 *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, 296–307.
- (58) Okamoto, A., Taiji, T., Tanaka, K., and Saito, I. (2002) 910
Oligonucleotides containing 7-vinyl-7-deazaguanine as a facile
911 strategy for expanding the functional diversity of DNA. *Bioorg. Med.*
912 *Chem. Lett.* 12, 1895–1896.
- (59) Graham, D., Grondin, A., McHugh, C., Fruk, L., and Smith, W.
914 E. (2002) Internal labeling of oligonucleotide probes by Diels–Alder
915 cycloaddition. *Tetrahedron Lett.* 43, 4785–4788.
- (60) Sun, X.-L., Stabler, C. L., Cazalis, C. S., and Chaikof, E. L. 917
(2006) Carbohydrate and Protein Immobilization onto Solid Surfaces
918 by Sequential Diels–Alder and Azide–Alkyne Cycloadditions.
919 *Bioconjugate Chem.* 17, 52–57.
- (61) Sun, X.-L., Yang, L., and Chaikof, E. L. (2008) Chemoselective
921 immobilization of biomolecules through aqueous Diels–Alder and
922 PEG chemistry. *Tetrahedron Lett.* 49, 2510–2513.
- (62) Pauloehr, T., Delaittre, G., Winkler, V., Welle, A., Bruns, M.,
924 Börner, H. G., Greiner, A. M., Bastmeyer, M., and Barner-Kowollik, C.
925 (2012) Adding Spatial Control to Click Chemistry: Phototriggered
926 Diels–Alder Surface (Bio)functionalization at Ambient Temperature.
927 *Angew. Chem., Int. Ed.* 51, 1071–1074.
- (63) Jouanno, L.-A., Chevalier, A., Sekkat, N., Perzo, N., Castel, H.,
929 Romieu, A., Lange, N., Sabot, C., and Renard, P.-Y. (2014) 930
Kondrat'eva Ligation: Diels–Alder-Based Irreversible Reaction for
931 Bioconjugation. *J. Org. Chem.* 79, 10353–10366.
- (64) Renault, K., Jouanno, L.-A., Lizzul-Jurse, A., Renard, P.-Y., and
933 Sabot, C. (2016) Fluorogenic Behaviour of the Hetero-Diels–Alder
934 Ligation of 5-Alkoxyoxazoles with Maleimides and their Applications.
935 *Chem. - Eur. J.* 22, 18522–18531.
- (65) Sánchez, A., Pedroso, E., and Grandas, A. (2011) Maleimide-
937 Dimethylfuran exo Adducts: Effective Maleimide Protection in the
938 Synthesis of Oligonucleotide Conjugates. *Org. Lett.* 13, 4364–4367.
- (66) Paris, C., Brun, O., Pedroso, E., and Grandas, A. (2015) 940
Exploiting Protected Maleimides to Modify Oligonucleotides,
941 Peptides and Peptide Nucleic Acids. *Molecules* 20, 6389–6408.
- (67) de Araújo, A. D., Palomo, J. M., Cramer, J., Seitz, O.,
943 Alexandrov, K., and Waldmann, H. (2006) Diels–Alder Ligation of
944 Peptides and Proteins. *Chem. - Eur. J.* 12, 6095–6109.
- (68) Marchán, V., Ortega, S., Pulido, D., Pedroso, E., and Grandas,
946 A. (2006) Diels-Alder cycloadditions in water for the straightforward
947 preparation of peptide–oligonucleotide conjugates. *Nucleic Acids Res.*
948 34, e24.
- (69) Steven, V., and Graham, D. (2008) Oligonucleotide
950 conjugation to a cell-penetrating (TAT) peptide by Diels-Alder
951 cycloaddition. *Org. Biomol. Chem.* 6, 3781–3787.
- (70) Willems, L. I., Verdoes, M., Florea, B. I., van der Marel, G. A.,
953 and Overkleeft, H. S. (2010) Two-Step Labeling of Endogenous
954 Enzymatic Activities by Diels–Alder Ligation. *ChemBioChem* 11,
955 1769–1781.

- 957 (71) Hoogewijs, K., Buyst, D., Winne, J. M., Martins, J. C., and
958 Madder, A. (2013) Exploiting furan's versatile reactivity in reversible
959 and irreversible orthogonal peptide labeling. *Chem. Commun.* 49,
960 2927–2929.
- 961 (72) Lizzul-Jurse, A., Bailly, L., Hubert-Roux, M., Afonso, C.,
962 Renard, P.-Y., and Sabot, C. (2016) Readily functionalizable
963 phosphonium-tagged fluorescent coumarins for enhanced detection
964 of conjugates by mass spectrometry. *Org. Biomol. Chem.* 14, 7777–
965 7791.
- 966 (73) Kand, D., Kalle, A. M., and Talukdar, P. (2013)
967 Chromenoquinoline-based thiol probes: a study on the quencher
968 position for controlling fluorescent Off-On characteristics. *Org.*
969 *Biomol. Chem.* 11, 1691–1701.
- 970 (74) Zhang, W., Ma, Z., Du, L., and Li, M. (2014) Design strategy
971 for photoinduced electron transfer-based small-molecule fluorescent
972 probes of biomacromolecules. *Analyst* 139, 2641–2649.
- 973 (75) Chevalier, A., Hardouin, J., Renard, P.-Y., and Romieu, A.
974 (2013) Universal Dark Quencher Based on “Clicked” Spectrally
975 Distinct Azo Dyes. *Org. Lett.* 15, 6082–6085.
- 976 (76) Chevalier, A., Renard, P.-Y., and Romieu, A. (2014) Azo-
977 Sulforhodamine Dyes: A Novel Class of Broad Spectrum Dark
978 Quenchers. *Org. Lett.* 16, 3946–3949.
- 979 (77) Roubinet, B., Chevalier, A., Renard, P.-Y., and Romieu, A.
980 (2015) A Synthetic Route to 3-(Heteroaryl)-7-hydroxycoumarins
981 Designed for Biosensing Applications: 3-(Heteroaryl)-7-hydroxycou-
982 marins. *Eur. J. Org. Chem.* 2015, 166–182.
- 983 (78) Lv, Z., Sun, Z., Song, C., Lu, S., Chen, G., and You, J. (2016)
984 Sensitive and background-free determination of thiols from waste-
985 water samples by MOF-5 extraction coupled with high-performance
986 liquid chromatography with fluorescence detection using a novel
987 fluorescence probe of carbazole-9-ethyl-2-maleimide. *Talanta* 161,
988 228–237.
- 989 (79) West, J. M., Tsuruta, H., and Kantrowitz, E. R. (2004) A
990 Fluorescent Probe-labeled Escherichia coli Aspartate Transcarbamoy-
991 lase That Monitors the Allosteric Conformational State. *J. Biol. Chem.*
992 279, 945–951.
- 993 (80) Maeda, H., Maeda, T., Mizuno, K., Fujimoto, K., Shimizu, H.,
994 and Inouye, M. (2006) Alkynylpyrenes as Improved Pyrene-Based
995 Biomolecular Probes with the Advantages of High Fluorescence
996 Quantum Yields and Long Absorption/Emission Wavelengths. *Chem.*
997 *- Eur. J.* 12, 824–831.
- 998 (81) Chow, C.-F., Lam, M. H. W., and Leung, M. K. P. (2002)
999 Fluorescent sensing of homocysteine by molecular imprinting. *Anal.*
1000 *Chim. Acta* 466, 17–30.
- 1001 (82) Takahashi, H., Nara, Y., and Tuzimura, K. (1976) Application
1002 of N-(9-acridinyl)maleimide as a fluorescent detection reagent of
1003 cysteine and related thiols and disulfide compounds on thin-layer
1004 chromatogram. *Agric. Biol. Chem.* 40, 2493–2494.
- 1005 (83) Nara, Y., and Tuzimura, K. (1978) Synthesis of N-(9-
1006 acridinyl)maleimide, a Fluorometrical Reagent for Thiol Com-
1007 pounds. *Agric. Biol. Chem.* 42, 793–798.
- 1008 (84) Freimuth, L., and Christoffers, J. (2015) Bifunctional
1009 Diaminoterephthalate Scaffolds as Fluorescence Turn-On Probes for
1010 Thiols. *Chem. - Eur. J.* 21, 8214–8221.
- 1011 (85) Wache, N., Schröder, C., Koch, K.-W., and Christoffers, J.
1012 (2012) Diaminoterephthalate Turn-On Fluorescence Probes for
1013 Thiols-Tagging of Recoverin and Tracking of its Conformational
1014 Change. *ChemBioChem* 13, 993–998.
- 1015 (86) Balciunas, A., Fless, G. M., Scanu, A. M., and Copeland, R. A.
1016 (1993) Interactions of a fluorescently labeled peptide with kringle
1017 domains in proteins. *J. Protein Chem.* 12, 39–43.
- 1018 (87) Zhao, B., Musci, G., Sugawara, Y., and Berliner, L. J. (1988)
1019 Spin-label and fluorescence labeling studies of the thioester bonds in
1020 human α_2 -macroglobulin. *Biochemistry* 27, 5304–5308.
- 1021 (88) Zhao, Y., Xue, Y., Li, H., Zhu, R., Ren, Y., Shi, Q., Wang, S., and
1022 Guo, W. (2017) An excited state intramolecular proton transfer dye
1023 based fluorescence turn-on probe for fast detection of thiols and its
1024 applications in bioimaging. *Spectrochim. Acta, Part A* 175, 215–221.
- (89) Liu, T., Huo, F., Yin, C., Li, J., Chao, J., and Zhang, Y. (2016) A
1025 triphenylamine as a fluorophore and maleimide as a bonding group
1026 selective turn-on fluorescent imaging probe for thiols. *Dyes Pigm.* 128,
1027 209–214.
- (90) Chung, C. C., Ohwaki, K., Schneeweis, J. E., Stec, E., Varnerin,
1028 J. P., Goudreau, P. N., Chang, A., Cassaday, J., Yang, L., et al. (2008)
1029 A Fluorescence-Based Thiol Quantification Assay for Ultra-High-
1030 Throughput Screening for Inhibitors of Coenzyme A Production.
1031 *Assay Drug Dev. Technol.* 6, 361–374.
- (91) Guo, L., Yang, D., Xia, L., Qu, F., Dou, Y., Qu, F., Kong, R., and
1032 You, J. (2017) A highly water-soluble, sensitive, coumarin-based
1033 fluorescent probe for detecting thiols, and its application in
1034 bioimaging. *New J. Chem.* 41, 15277–15282.
- (92) Mora, M. F., Stockton, A. M., and Willis, P. A. (2013) Analysis
1035 of thiols by microchip capillary electrophoresis for in situ planetary
1036 investigations: Microfluidics and Miniaturization. *Electrophoresis* 34,
1037 309–316.
- (93) Hirshberg, M., Henrick, K., Lloyd Haire, L., Vasisht, N., Brune,
1038 M., Corrie, J. E. T., and Webb, M. R. (1998) Crystal Structure of
1039 Phosphate Binding Protein Labeled with a Coumarin Fluorophore, a
1040 Probe for Inorganic Phosphate. *Biochemistry* 37, 10381–10385.
- (94) Lund, M. N., and Andersen, M. L. (2011) Detection of Thiol
1041 Groups in Beer and Their Correlation with Oxidative Stability. *J. Am.*
1042 *Soc. Brew. Chem.* 69, 163–169.
- (95) Sippel, T. O. (1981) Microfluorometric analysis of protein thiol
1043 groups with a coumarinylphenylmaleimide. *J. Histochem. Cytochem.*
1044 29, 1377–1381.
- (96) Sippel, T. O. (1981) New fluorochromes for thiols: maleimide
1045 and iodoacetamide derivatives of a 3-phenylcoumarin fluorophore. *J.*
1046 *Histochem. Cytochem.* 29, 314–316.
- (97) Song, H. Y., Ngai, M. H., Song, Z. Y., MacAry, P. A., Hobbey, J.,
1047 and Lear, M. J. (2009) Practical synthesis of maleimides and
1048 coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via
1049 reduction of native disulfides. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3400–3406.
- (98) Ares, J. J., Messier, R. J., and Kornecki, E. (1991) Synthesis of
1050 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles containing trimethoxyphenyl groups:
1051 Potential antagonists of platelet activating factor. *J. Heterocycl. Chem.*
1052 28, 1197–1201.
- (99) Corrie, J. E. T. (1994) Thiol-reactive fluorescent probes for
1053 protein labelling. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1 (0), 2975–2982.
- (100) Gao, T., Yang, C., and Zheng, Y. G. (2013) Comparative
1054 studies of thiol-sensitive fluorogenic probes for HAT assays. *Anal.*
1055 *Bioanal. Chem.* 405, 1361–1371.
- (101) Liu, T., Huo, F., Li, J., Chao, J., Zhang, Y., and Yin, C. (2016)
1056 A fast response and high sensitivity thiol fluorescent probe in living
1057 cells. *Sens. Actuators, B* 232, 619–624.
- (102) Qu, L., Yin, C., Huo, F., Li, J., Chao, J., and Zhang, Y. (2014)
1058 A maleimide-based thiol fluorescent probe and its application for
1059 bioimaging. *Sens. Actuators, B* 195, 246–251.
- (103) Zhang, Y., Huo, F., Yin, C., Yue, Y., Hao, J., Chao, J., and Liu,
1060 D. (2015) An off-on fluorescent probe based on maleimide for
1061 detecting thiols and its application for bioimaging. *Sens. Actuators, B*
1062 207, 59–65.
- (104) Kanaoka, Y., Sekine, T., Machida, M., Soma, Y., Tanizawa, K.,
1063 and Ban, Y. (1964) Studies on Protein-Sulphydryl Reagents. I.
1064 Synthesis of Benzimidazole Derivatives of Maleimide ; Fluorescent
1065 Labeling of Maleimide. *Chem. Pharm. Bull.* 12, 127–134.
- (105) Matsumoto, T., Urano, Y., Shoda, T., Kojima, H., and Nagano,
1066 T. (2007) A Thiol-Reactive Fluorescence Probe Based on Donor-
1067 Excited Photoinduced Electron Transfer: Key Role of Ortho
1068 Substitution. *Org. Lett.* 9, 3375–3377.
- (106) Guo, X.-F., Zhao, P.-X., Wang, H., and Zhang, H.-S. (2011)
1069 Simple and rapid determination of thiol compounds by HPLC and
1070 fluorescence detection with 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(2-malei-
1071 mide) difluoroboradiazas-indacene. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol.*
1072 879, 3932–3936.
- (107) Kand, D., Kalle, A. M., Varma, S. J., and Talukdar, P. (2012) A
1073 chromenoquinoline-based fluorescent off-on thiol probe for bioimaging.
1074 *Chem. Commun.* 48, 2722–2724.

- 1094 (108) Shen, Y., Liu, C., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, C., Jin, J., Liu,
1095 X., Li, H., and Yao, S. (2015) A simple and new fluorescent and
1096 colorimetric probe based on NBD-maleimide for detecting thiols in
1097 living cells. *Anal. Methods* 7, 6419–6425.
- 1098 (109) Huo, F., Kang, J., Yin, C., Zhang, Y., and Chao, J. (2015) A
1099 turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition
1100 reaction and its application for bioimaging. *Sens. Actuators, B* 207,
1101 139–143.
- 1102 (110) Chassaing, C., Gonin, J., Wilcox, C. S., and Wainer, I. W.
1103 (1999) Determination of reduced and oxidized homocysteine and
1104 related thiols in plasma by thiol-specific pre-column derivatization and
1105 capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J.*
1106 *Chromatogr., Biomed. Appl.* 735, 219–227.
- 1107 (111) Majima, E., Goto, S., Hori, H., Shinohara, Y., Hong, Y.-M.,
1108 and Terada, H. (1995) Stabilities of the fluorescent SH-reagent eosin-
1109 5-maleimide and its adducts with sulphydryl compounds. *Biochim.*
1110 *Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1243, 336–342.
- 1111 (112) McMahon, B. K., and Gunnlaugsson, T. (2012) Selective
1112 Detection of the Reduced Form of Glutathione (GSH) over the
1113 Oxidized (GSSG) Form Using a Combination of Glutathione
1114 Reductase and a Tb(III)-Cyclen Maleimide Based Lanthanide
1115 Luminescent ‘Switch On’ Assay. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 10725–10728.
- 1116 (113) Ridnour, L. A., Winters, R. A., Ercal, N., and Spitz, D. R.
1117 (1999) Measurement of glutathione, glutathione disulfide, and other
1118 thiols in mammalian cell and tissue homogenates using high-
1119 performance liquid chromatography separation of N-(1-pyrenyl)-
1120 maleimide derivatives. *Methods Enzymol.* 299, 258–267.
- 1121 (114) Ogony, J., Mare, S., Wu, W., and Ercal, N. (2006) High
1122 performance liquid chromatography analysis of 2-mercaptoethylamine
1123 (cysteamine) in biological samples by derivatization with N-(1-
1124 pyrenyl) maleimide (NPM) using fluorescence detection. *J.*
1125 *Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 843, 57–62.
- 1126 (115) Wu, W., Goldstein, G., Adams, C., Matthews, R. H., and Ercal,
1127 N. (2006) Separation and quantification of N-acetyl-L-cysteine and N-
1128 acetyl-cysteine-amide by HPLC with fluorescence detection. *Biomed.*
1129 *Chromatogr.* 20, 415–422.
- 1130 (116) Kogedal, B., Källberg, M., and Mortensson, J. (1984)
1131 Determination of non-protein-bound N-acetylcysteine in plasma by
1132 high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., Biomed.*
1133 *Appl.* 311, 170–175.
- 1134 (117) Tu, F.-Q., Zhang, L.-Y., Guo, X.-F., Wang, H., and Zhang, H.-
1135 S. (2014) Development of a potential method based on microchip
1136 electrophoresis with fluorescence detection for the sensitive
1137 determination of intracellular thiols in RAW264.7 cells: Microfluidics
1138 and Miniaturization. *Electrophoresis* 35, 1188–1195.
- 1139 (118) Tsuruta, Y., Tomida, H., and KoHashi, K. (1988) N-[4-(2-
1140 Phthalimidyl) phenyl] maleimide as Fluorescence Derivatization
1141 Reagent for Thiols. *Anal. Sci.* 4, 531–532.
- 1142 (119) Nair, J. S., and Rajasekharan, K. N. (2004) Synthesis and
1143 fluorescence properties of 3-benzoxa- and thiazol-2-ylquinoleine-5 or
1144 7-maleimide. *Indian J. Chem. B* 43B, 1944–1955.
- 1145 (120) Guo, X.-F., Wang, H., Guo, Y.-H., and Zhang, H.-S. (2009)
1146 Selective Spectrofluorimetric Determination of Glutathione in
1147 Clinical and Biological Samples Using 1,3,5,7-Tetramethyl-8-Phenyl-
1148 (2-Maleimide)-Difluoroboradiazas-Indacene. *Anal. Chim. Acta* 633,
1149 71–75.
- 1150 (121) Chen, Z., Sun, Q., Yao, Y., Fan, X., Zhang, W., and Qian, J.
1151 (2017) Highly sensitive detection of cysteine over glutathione and
1152 homo-cysteine: New insight into the Michael addition of mercapto
1153 group to maleimide. *Biosens. Bioelectron.* 91, 553–559.
- 1154 (122) Okitsu, K., Misawa, T., Shoda, T., Kurihara, M., and Demizu,
1155 Y. (2017) Development of an ON/OFF switchable fluorescent probe
1156 targeting His tag fused proteins in living cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*
1157 27, 3417–3422.
- 1158 (123) Girouard, S., Houle, M.-H., Grandbois, A., Keillor, J. W., and
1159 Michnick, S. W. (2005) Synthesis and Characterization of
1160 Dimaleimide Fluorogens Designed for Specific Labeling of Proteins.
1161 *J. Am. Chem. Soc.* 127, 559–566.
- (124) Guy, J., Caron, K., Dufresne, S., Michnick, S. W., Skene, and
Keillor, J. W. (2007) Convergent Preparation and Photophysical
Characterization of Dimaleimide Dansyl Fluorogens: Elucidation of
the Maleimide Fluorescence Quenching Mechanism. *J. Am. Chem.*
Soc. 129, 11969–11977.
- (125) Guy, J., Castonguay, R., Campos-Reales Pineda, N. B.,
Jacquier, V., Caron, K., Michnick, S. W., and Keillor, J. W. (2010) De
novo helical peptides as target sequences for a specific, fluorogenic
protein labelling strategy. *Mol. Biosyst.* 6, 976–987.
- (126) Chen, Y., Clouthier, C. M., Tsao, K., Strmiskova, M.,
Lachance, H., and Keillor, J. W. (2014) Coumarin-Based Fluorogenic
Probes for No-Wash Protein Labeling. *Angew. Chem., Int. Ed.* 53,
13785–13788.
- (127) Youziel, J., Akhbar, A. R., Aziz, Q., Smith, M. E. B., Caddick,
S., Tinker, A., and Baker, J. R. (2014) Bromo- and thiomaleimides as a
new class of thiol-mediated fluorescence ‘turn-on’ reagents. *Org.*
Biomol. Chem. 12, 557–560.
- (128) Yudhistira, T., Mulay, S. V., Lee, K. J., Kim, Y., Park, H.-S., and
Churchill, D. G. (2017) Thiomaleimide Functionalization for
Selective Biological Fluorescence Detection of Peroxynitrite as Tested
in HeLa and RAW 264.7 Cells. *Chem. - Asian J.* 12, 1927–1934.
- (129) Dietrich, M., Delaitre, G., Blinco, J. P., Inglis, A. J., Bruns, M.,
and Barner-Kowollik, C. (2012) Photoclickable Surfaces for
Profluorescent Covalent Polymer Coatings. *Adv. Funct. Mater.* 22,
304–312.
- (130) Jouanno, L.-A., Renault, K., Sabot, C., and Renard, P.-Y.
(2016) 5-Alkoxyoxazole - A Versatile Building Block in (Bio)organic
Synthesis: 5-Alkoxyoxazole - A Versatile Building Block in (Bio)-
organic Synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* 2016, 3264–3281.
- (131) Zhang, D., Devarie-Baez, N. O., Li, Q., Lancaster, J. R., and
Xian, M. (2012) Methylsulfonyl Benzothiazole (MSBT): A Selective
Protein Thiol Blocking Reagent. *Org. Lett.* 14, 3396–3399.
- (132) Abbas, A., Xing, B., and Loh, T.-P. (2014) Allenamides as
Orthogonal Handles for Selective Modification of Cysteine in
Peptides and Proteins. *Angew. Chem., Int. Ed.* 53, 7491–7494.
- (133) Koniev, O., Leriche, G., Nothisen, M., Remy, J.-S., Strub, J.-
M., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Baati, R., and Wagner, A.
(2014) Selective Irreversible Chemical Tagging of Cysteine with 3-
Arylpropionitriles. *Bioconjugate Chem.* 25, 202–206.

Partie expérimentale

I General remarks:

TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with UV lamp (254 and 365 nm) and/or staining with a phosphomolybdic acid or KMnO_4 solution. Flash-column chromatography purifications were performed on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 μm) from Merck. All chemicals were used as received from commercial sources without further purification unless otherwise stated. All solvents were dried following standard procedures: CH_2Cl_2 , CH_3CN , triethylamine: distillation over CaH_2 ; DMF, NMP, MeOH, EtOH and Xylene: dried over 3Å MS; THF: distillation over Na/benzophenone. Anhydrous DMF was obtained from Carlo Erba-SdS or Fisher Scientific and stored over 3Å molecular sieves. Peptide synthesis-grade DIEA, NMP and piperidine were purchased from Iris Biotech GmbH. Triethylamine (TEA) was distilled over KOH and stored over KOH. Urokinase (uPA) from human urine (500 U/mg protein, lyophilized form), DT Diaphorase human, Nitroreductase from *E. Coli* from Helix pomatiav (24954 U/g) and alcohol dehydrogenase recombinant from *E. coli* (500 U/mL) provided by Sigma Aldrich. Human AKR1C2 protein (100 U/mg) provided by Sino Biological Inc.. The HPLC gradient grade acetonitrile (CH_3CN) were obtained from VWR. Aq. buffers (phosphate buffered saline (PBS, 100 mM phosphate + 150 mM NaCl, pH 7.4), NaOAc, NaHCO_3 , ...) and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MW.cm). Triethylammonium acetate (TEAA, 2.0 M) and triethylammonium bicarbonate (TEAB, 1.0M) buffers were prepared from distilled triethylamine and glacial acetic acid or CO_2 gas.

1 Instruments and methods:

The synthesis of peptides were carried out on an Applied BioSystems 433A synthesizer using the standard Fmoc/tBu chemistry¹. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded either on a Bruker DPX 300 spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non-deuterated solvent signal². J values are expressed in Hz. Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. Analytical HPLC were performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Semi-preparative HPLC were performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography System (P4000) equipped with a UV-visible 2000 detector. Automated flash purifications on RP-C18 cartridges were performed with a Interchim® puriflash 430 system. HRMS analyses were performed on a LCT Premier XE benchtop orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an electrospray source and in the positive and negative modes (ESI+/-). ESI low resolution mass spectra were obtained either with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus. The photoreactions at 380 nm were performed with a Rayonet® reactor RPR-100 (Southern New England Ultra Violet company) equipped with 8 lamps (8 x 15 W). UV-visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using either a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path: 10 x 10 mm,

¹ G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *35*, 161–214.

² G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.

Partie expérimentale

chamber volume: 3.5 mL) or a quartz micro cell (Hellma, 108.002-QS, light path: 10 mm, volume chamber: 500 μ L). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra/kinetic) were performed with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 \times 4 mm, chamber volume: 1400 μ L, Chamber volume 3.5 mL for all other studies) for quantum yield determination or an ultra-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 105.251-QS, light path: 3 \times 3 mm, chamber volume: 45 μ L) for enzymatic assays, or a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 \times 4 mm, chamber volume: 3.5 mL) for all other studies. Cary Eclipse Microplate reader was used for screening studies (96 wells plate, chamber volume: 200 μ L). Emission spectra were recorded under the same conditions after excitation at the corresponding wavelength (excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit = 5 nm). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2\Phi_F(s)$$

Where A is the absorbance (in the range 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.337 for PBS, 1.333 for water, 1.362 for EtOH, 1.497 for toluene, 1.424 for CH₂Cl₂, 1.344 for MeCN, 1.407 for THF, 1.328 for MeOH, 1.431 for DMF, and 1.478 for DMSO and the following standard were used for QY calculation.

Standard	Standard	QY	Excitation
Anthracene ³	EtOH	0.27	366 nm
Lucifer Yellow ⁴	Water	0.21	430 nm
Fluorescein ³	NaOH 0.1 M	0.95	470 nm
R6G ³	EtOH	0.94	500 nm

2 High- and low-pressure liquid chromatography separations:

2.1. High-pressure liquid chromatography separations for reaction monitoring:

System QC was used for analytical experiments. RP-HPLC (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 5 μ m, 2.1 \times 100 mm) with ACN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid (aq. TFA, 0.1%, pH 2.0) as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min.

2.2. Semi-preparative high-pressure liquid chromatography and low pressure liquid chromatography (with a Interchim® flash purification system) for purification steps:

³ A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, DOI 10.1351/PAC-REP-10-09-31.

⁴ P. A. Peixoto, A. Boulangé, M. Ball, B. Naudin, T. Alle, P. Cosette, P. Karuso, X. Franck, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15248–15256.

Partie expérimentale

System A: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μ m, 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was selected according to the compound absorption maximum.

System B: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μ m, 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 15 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was selected according to the compound absorption maximum.

System C: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μ m, 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (200 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 15 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was selected according to the compound absorption maximum.

System D: Automated-flash chromatography (Biotage[®]SNAP cartridge KP-C18-HS, 120 g) with CH₃CN and aq. TFA, 0.1% as eluents [100% TFA (5 min) then linear gradient from 0% to 100% (100 min) of CH₃CN] at a flow rate of 40.0 mL/min. UV detection was achieved at 254 nm.

II. Unpublished experimental data

1 In vitro enzymatic assays - fluorescence bioassays and Photo-cross-linking experiments

General procedure for in vitro peptide cleavage by Urokinase Plasminogen

A 100 μ M solution of fluorogenic probe was prepared in PBS (45 mL, 0.1 M pH 7.4) and transferred into the ultra-micro quartz cell. uPA solution (10 μ L, 1.2 U, 25 μ g in 100 μ L of buffer: 500 mM Tris·HCl + 1.0 M NaCl + 1% PEG 6000 + 2.0 M mannitol) was added, and the resulting mixture was incubated at 37.5 °C for 30 min. After excitation at the desired wavelength, the fluorescence emission (depending of the fluorophore selected for the application) was monitored over time, with measurements recorded every 1 s.

General procedure for in vitro cleavage by Pig Liver Esterase (PLE)

1.25 mL of a 10 μ M solution of propyrazolone **90** and 2.5 μ M aof probe **66** in PB buffer (100 mM, pH 7.4) was prepared and transferred into the semi-micro quartz fluorescence cell. 10 μ L (10 U) of PLE solution in deionized water was added and the resulting mixture was incubated at 37.5 °C. After excitation at desired wavelength (depending of the fluorophore selected for the application), the fluorescence emission at the desired wavelength was monitored over time with measurements recorded every 1 s.

General procedure for in vitro cleavage by Nitroreductase from E. Coli

A 10.0 μ M solution of propyrazolone **92** and probe **66** containing 500 μ M of NADH (adding 5 μ L of 140 mM solution of NADH in water) was prepared in 1.25 mL of PB and transferred into the semi-micro quartz fluorescence cell. The resulting mixture was incubated at 37.5 °C. After excitation at desired wavelength (depending of the fluorophore selected for the application), the fluorescence emission at the desired wavelength was monitored over time with measurements recorded every 1 s. The fluorescence emission monitoring was achieved during 60 sec, then 10 μ L of NTR solution (1 μ g) corresponding to a final concentration of 10 μ g/mL, was added and the recording of fluorescence emission was restarted.

General procedure for keto-reductases in vitro orthogonality evaluation

Partie expérimentale

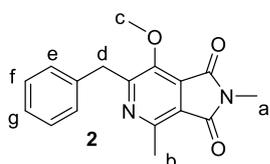
A 10.0 μM solution of 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones **183** containing 500 μM of NADH (adding 5 μL of 140 mM solution of NADH in water) was prepared in 1.25 mL of PBS and transferred into the semi-micro quartz fluorescence cell. The resulting mixture was incubated at 37.5 °C. After excitation at desired wavelength (depending of the fluorophore selected for the application), the fluorescence emission at the desired wavelength was monitored over time with measurements recorded every 1 s. The fluorescence emission monitoring was achieved during 60 sec, then 10 μL of enzyme solution (1 U, alcohol dehydrogenase recombinant from *E. coli* or human AKR1C2) corresponding to a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, was added and the recording of fluorescence emission was restarted.

General procedure for Photo-cross-linking experiments

To a solution of BSA (30 μM , in 1 mL PBS buffer 0.1 M, pH 7.4) was 2 μL of solution of 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones **155** or **183** (0.025 M in DMSO, 0.5 equiv.). The mixture was irradiated at 380 nm (Rayonet® 16 x 15 W) during 6 hours. The reactions were followed by fluorescence with fluorimeter ($\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$).

To a solution of BSA (30 μM , in 1 mL PBS buffer 0.1 M, pH 7.4) was 2 μL of solution of 3-benzoylquinoxalin-2(1*H*)-ones **155** or **183** (0.25 M in DMSO, 5 equiv.). The mixture was irradiated at 380 nm (Rayonet® 16 x 15 W) during 6 hours. The reactions were followed by fluorescence with fluorimeter ($\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$).

2 Unpublished synthesized compounds



To a solution of 6-benzyl-7-methoxy-2,4-dimethyl-1*H*-pyrrolo[3,4-*c*]pyridine-1,3(2*H*)-dione **1** (30 mg, 0.106 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (2 mL), was added methyl iodide (7.3 μL , 0.12 mmol, 1.1 equiv) and K_2CO_3 (16.6 mg, 0.12 mmol, 1.1 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at r. t. for 5 h. The resulting solution was diluted with EtOAc and washed

with water, dried over MgSO_4 , and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 90:10, v/v). The product was recovered as yellow powder (26 mg, 0.088 mmol, 83%).

Mp : 89 °C

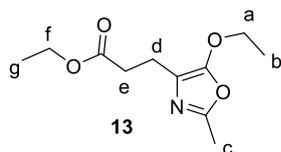
IR (neat): 3033, 2920, 2860, 1703, 1456, 1431, 1375, 1259, 1226, 1125, 1103, 969, 878, 852.

^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.33 – 7.05 (m, 5H, e, f and g), 4.24 (s, 2H, d), 3.99 (s, 3H, c), 3.11 (s, 3H, a), 2.80 (s, 3H, b).

^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 168.22, 165.75, 162.28, 149.69, 148.53, 138.43, 129.15, 129.15, 128.56, 128.56, 126.61, 126.20, 122.07, 62.91, 40.29, 24.23, 20.61.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ m/z 296.1161 found m/z 297.1246 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

Partie expérimentale



The ethyl 3-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)propanoate **13** was prepared using diethyl 2-acetamidopentanedioate **12** (586 mg, 2.39 mmol), CaO (670 mg, 11.95 mmol, 5 equiv.), Celite® (120 mg, 20% by weight relatively to the starting aminoester) and P₂O₅ (1.36 g, 9.6 mmol, 4 equiv.) in dry CHCl₃ (10 mL). The resulting mixture was heated during 3 h at 75 °C and then was hydrolyzed by a solution of sat. aq. NaHCO₃. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/CH₂Cl₂ 5:95, v/v, R_f = 0.3), to give the product as a yellow oil (323 mg, 1.42 mmol, 90%).

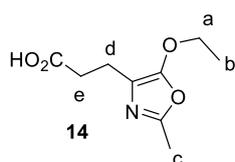
Mp = oil

IR (neat): 2981, 1733, 1678, 1588, 1443, 1377, 1256.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, a); 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, f); 2.68-2.63 (m, 2H); 2.59-2.53 (m, 2H); 2.27 (s, 3H, c); 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, b); 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, g).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 184.5, 172.3, 159.4, 155.0, 63.2, 60.8, 29.4, 29.1, 24.2, 14.3, 14.0.

HRMS (ESI+): Calc. for C₁₁H₁₈NO₄ *m/z* 228.1236 [M+H]⁺; found *m/z* 228.1233.



To a solution of methyl 3-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)propanoate **13** (182 mg, 0.80 mmol) dissolved in a mixture of THF/water (5:1, 2 mL:0.4 mL) under inert atmosphere was added lithium hydroxide (77 mg, 3.2 mmol, 4 equiv.). The resulting mixture was heated at 70°C during 3h. The reaction was monitored by TLC for consumption of the starting material. The solution was then allowed to cool at room temperature and acetic acid was added (0.37 mL, 6.4 mmol, 8 equiv.). The reaction mixture was stirred for one more hour under inert atmosphere at room temperature. The solution was concentrated under reduced pressure. AcOEt (10 mL) was added to the crude mixture and this solution was filtered over Celite® and finally concentrated under reduced pressure. The crude product was co-evaporated with some toluene to remove the excess of acetic acid and was used without further purification. The desired product was obtained as a pale yellow solid (143 mg, 0.72 mmol, 90%).

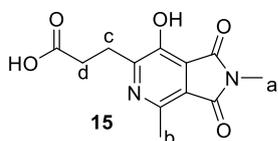
Mp = 66-68°C.

IR (neat): 2927, 1721, 1684, 1571, 1417, 1377, 1287, 1266, 1234, 1181, 1173, 1082, 1014.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.14 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, a), 2.65-2.59 (m, 2H), 2.47-2.41 (m, 2H), 2.29 (s, 3H, c), 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, b).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 180.2, 155.1, 154.5, 117.0, 71.8, 36.8, 22.2, 15.3, 13.8.

MS (ESI-): Calc. for C₁₁H₁₈NO₄ *m/z* 198.08 [M-H]⁻; found *m/z* 198.13.



To a solution of 3-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)propanoic acid **14** (50.0 mg, 0.251 mmol, 1 equiv.) in NMP (1.72 mL) was successively added the *N*-methyl-maleimide (70.0 mg, 0.627 mmol, 2.5 equiv.), and TFA (64 μL, 0.8

Partie expérimentale

mmol, 3 equiv.). The reaction was at room temperature for 2 h. After completion, the crude product was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). The product-containing fractions were lyophilized to give the product (56.8 mg, 0.216 mmol, 86%) as a yellow amorphous powder.

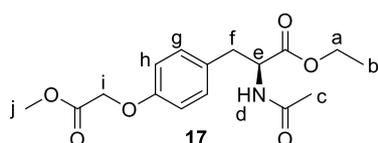
Mp: 173 °C.

IR (neat cm⁻¹) 3427, 2920, 2847, 2533, 1767, 1660, 1424, 1304, 1253, 1239, 1215, 1127, 975, 934, 898.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 3.17 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.07 (s, 3H, a), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.67 (s, 3H, b).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 176.68, 169.39, 168.50, 159.01, 146.57, 146.44, 122.34, 122.20, 32.06, 28.34, 23.88, 16.60.

HRMS (ESI) exact mass calcd for C₁₂H₁₁N₂O₅ m/z 263.0668 found m/z 263.0656 [M - H]⁻



To a solution of commercial ethyl acetyl-L-tyrosinate **16** (1.454 g, 6.2 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (7.2 mL), was added K₂CO₃ (1.5 g, 12.4 mmol, 2 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min after addition of methyl

iodoacetate (1.17 mL, 12.4 mmol, 2 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solution was diluted with EtOAc (30 mL) and washed with water (5 × 50 mL), dried over MgSO₄, and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 50: 50, v/v). The product was recovered as white amorphous powder (1.095 g, 3.78 mmol, 61%).

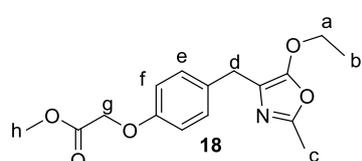
Mp: 56 °C

IR (neat): 3312, 1736, 1635, 1514, 1374, 1294, 1225, 1198, 1138, 1077, 1006, 862.

¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, d), 4.81 (dt, *J* = 7.8, 5.7 Hz, 1H, e), 4.60 (s, 2H), 4.16 (tt, *J* = 7.2, 3.7 Hz, 2H, a), 3.80 (s, 3H, j), 3.06 (dd, *J* = 5.7, 1.8 Hz, 2H), 1.98 (s, 3H, c), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, b).

¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 171.68, 169.73, 169.27, 156.78, 130.32, 129.23, 114.54, 65.19, 61.29, 53.24, 52.09, 36.90, 22.86, 14.00.

HRMS (ESI) exact mass calcd for C₁₆H₂₂NO₆ m/z 324.1447 found m/z 324.1459 [M + H]⁺



To a solution of ethyl (S)-2-acetamido-3-(4-(2-methoxy-2-oxoethoxy)phenyl)propanoate **17** (500 g, 1.54 mmol, 1 equiv.) in dry toluene (5 mL), was added POCl₃ (187 μL, 2.01 mmol, 1.3 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at 80 °C for 4 h

Partie expérimentale

30. After completion, the solution was added dropwise in a saturated solution of NaHCO_3 (50 mL), extracted three times with AcOEt (25 mL), dried over MgSO_4 , and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 50: 50, v/v), to afford the corresponding oxazole as a pale yellow oil (454.2 mg, 1.49 mmol, 97%).

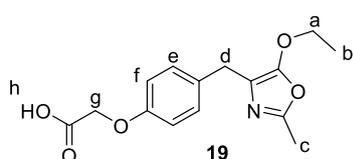
Mp: oil

IR (neat): 2993, 2955, 1760, 1669, 1612, 1586, 1510, 1438, 1375, 1348, 1269, 1204, 1176, 1085, 1022, 953, 909.

^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.87 – 6.78 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.59 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H), 4.07 (qd, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 2H, a), 3.79 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, h), 3.63 (s, 2H), 2.29 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, c), 1.31 (td, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 3H, b).

^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 169.61, 156.38, 153.98, 152.55, 132.97, 129.71, 115.96, 114.74, 70.47, 65.59, 52.28, 30.16, 15.11, 14.40.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ m/z 306.1341 found m/z 306.1341 $[\text{M} + \text{H}]^+$



To a solution of methyl 2-(4-((5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)methyl)phenoxy)acetate **18** (200 mg, 0.644 mmol, 1 equiv.) in THF (6 mL), was added deionized water (0.91 mL) and LiOH (31.4 mg, 1.31 mmol, 2 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at 70 °C for 3 h. After completion, the reaction mixture was cooled

to room temperature and glacial AcOH was added (150 μL , 2.62 mmol, 4 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solution was diluted in deionized water (20 mL) and extracted with AcOEt (3 \times 20 mL), dried over MgSO_4 , and the organic layer concentrated under reduced. The crude product was co-evaporated several times with toluene (5 \times 8mL) to obtain the product as colorless oil (136.7 mg, 0.46 mmol, 72%).

Mp: oil

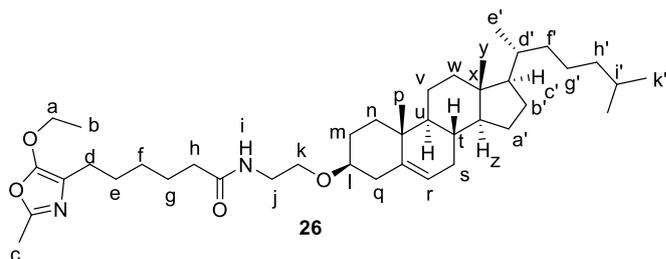
IR (neat): 2927, 2507, 1739, 1673, 1612, 1583, 1510, 1440, 1375, 1250, 1207, 1177, 1112, 1078, 1013, 976, 909.

^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 11.43 (s, 1H, h), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.85 – 6.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.09 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, a), 3.65 (s, 2H), 2.33 (s, 3H, c), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, b).

^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 171.94, 156.59, 153.94, 153.64, 132.15, 129.69, 115.42, 114.69, 70.76, 65.47, 29.32, 15.06, 13.85.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{NO}_5$ m/z 290.1028 found m/z 290.1033 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Partie expérimentale



To a solution of amino ethyl cholesterol **25**⁶ (123 mg, 2.86 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (6 mL), was added 5-ethoxyoxazole **10** (155 mg, 4.58 mmol, 1.6 equiv) and triethylamine (80 μ L, 5.72 mmol, 2 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at 40 °C to completion (TLC : DCM/EtOAc 30:70, v/v). The solution was quenched

with a saturated solution of NH_4Cl , and extracted with DCM ($\times 3$). The combined phase was dried over MgSO_4 , and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc 80:20; v/v DCM/EtOAc 70:30, v/v; DCM/EtOAc 50:50, v/v; to DCM/EtOAc 30:70, v/v) to furnish the oxazole conjugate cholesterol as a colorless oil (40.5 mg, 1.60 mmol, 56%).

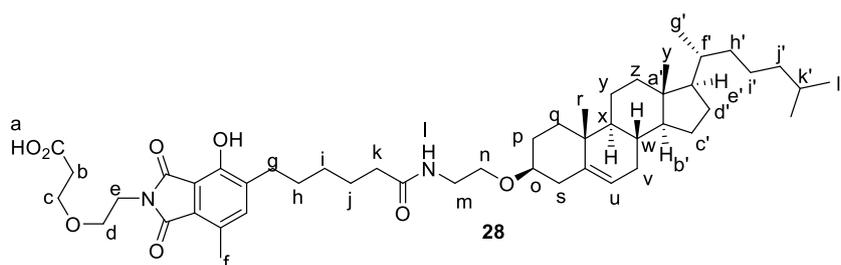
Mp: oil

IR (neat cm^{-1}) 3302, 2933, 2866, 1667, 1546, 1465, 1378, 1270, 1106, 1022, 910, 801, 731, 645

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.88 (s, 1H, i), 5.33 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, r), 4.08 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, a), 3.52 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.46 – 3.32 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.23 – 3.04 (m, 1H, l), 2.38 – 2.25 (m, 5H, c et d), 2.17 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H, h), 2.06 – 0.76 (m, 48H), 0.67 (s, 3H, y).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.20, 153.61, 152.47, 140.72, 121.98, 116.83, 79.45, 70.51, 66.75, 56.88, 56.28, 50.28, 42.45, 39.90, 39.70, 39.64, 39.22, 37.28, 36.97, 36.81, 36.31, 35.91, 32.05, 32.01, 28.97, 28.53, 28.42, 28.36, 28.14, 25.58, 24.50, 24.41, 23.95, 22.94, 22.69, 21.19, 19.50, 18.84, 15.16, 14.42, 11.98.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_3$ m/z 652.5179 found m/z 653.5245 [M + H]⁺



To a solution of the cholesterol 5-ethoxyoxazole **26** (6 mg, 0.092 mmol, 1 equiv.) in NMP (63 μ L) was added the carboxylic acid-based maleimide **27**⁶ (4.9 mg, 0.23 mmol, 2.5 equiv.) and

TFA (2.4 μ L, 0.03 mmol, 3 equiv.). The reaction was stirred for 3 h at room temperature. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO_3 , and extracted with DCM. The combined organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (EtOAc/DCM 80:20, v/v; to EtOAc 100%; to EtOAc/MeOH 80/20, v/v), to give the product as a pale yellow solid (2.2 mg, 2.7 μ mol, 30%).

⁵ J. Biswas, S. K. Mishra, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, 4600-4613.

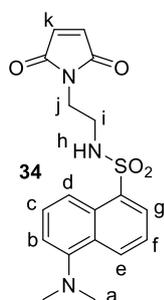
⁶ M. Berg, S. Nozinovic, M. Engeser, A. Lützen, *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 2015, 5966-5978.

⁶ A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, 15, 1349-1359.

Partie expérimentale

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.04 (s, 1H, l), 5.30 (s, 1H, u), 2.69 (s, 1H, o), 2.15 (d, $J = 12.6$ Hz, 3H), 1.63 – 0.74 (m, 60H), 0.67 (s, 3H, y).

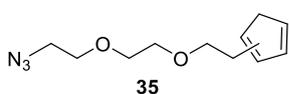
HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_8\text{Na}$ m/z 842.5295 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; found m/z 842.5295



A solution of the TFA salt of 1-(2-amino-ethyl)-pyrrole-2,5-dione **33** (113 mg, 0.81 mmol, 2.2 equiv.) and dansyl chloride (100 mg, 0.37 mmol, 1.0 equiv.) were dissolved in DMF (6 mL). Then, DIEA (142 μL , 0.82 mmol, 2.2 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. After completion, the reaction mixture was poured into water (60 mL) and the organic layer was extracted with DCM (3 \times 20 mL). Combined organic layer was dried over MgSO_4 and solvent were removed by vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc 90:10, v/v). The product was recovered as yellow oil (97 mg, 0.26 mmol, 70%).

^1H NMR analysis was in agreement with that reported in the literature.⁷

^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.24 – 8.15 (m, 2H), 7.53 (ddd, $J = 10.1, 8.6, 7.5$ Hz, 2H, c et f), 7.17 (dd, $J = 7.6, 0.6$ Hz, 1H), 6.34 (s, 2H, k), 5.07 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.53 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.16 (dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, 2H), 2.88 (s, 6H, a).



A solution of freshly distilled cyclopentadiene (380 μL , 4.56 mmol, 3 equiv.) was dissolved in dry THF (5 mL) and cooled to 0°C. Sodium hydride (60%, w/w in mineral oil, 182 mg, 4.56 mmol, 3 equiv.) was added in one portion into the reactional mixture, which became dark red. After 5 min, the homogenous mixture was cooled to -78 °C. Afterwards, a solution of 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (500 mg, 1.52 mmol, 1 equiv.) in dry THF (5 mL) was introduced dropwise to the mixture. The reaction was stirred for 1 h at -78°C, then the mixture was allowed to warm to 0 °C for 2 h. After completion, the mixture was filtered on a celite[®] plug and the flask was washed four times with EtOAc and DCM. The filtrate was concentrated under vacuum to give a brown solid. The crude product was directly purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, v/v) to afford 1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cyclopenta-1,3-diene as a light yellow oil (227 mg, 1.02 mmol, 67%).

Mp: oil

IR (neat): 2924, 2865, 2099, 1745, 1709, 1442, 1346, 1284, 1110, 928, 811.

Two inseparable isomers were observed by ^1H NMR in a ratio 1:1 and are reported below:

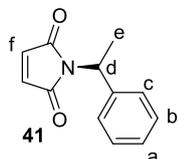
^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6.44 (ddq, $J = 12.0, 3.1, 1.5$ Hz, 3H), 6.27 (ddd, $J = 5.3, 2.7, 1.4$ Hz, 1H), 6.24 – 6.19 (m, 1H), 6.11 – 6.05 (m, 1H), 3.71 – 3.59 (m, 16H), 3.38 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 2.94 (dtd, $J = 4.2, 2.9, 1.5$ Hz, 4H), 2.94 (dtd, $J = 4.2, 2.9, 1.5$ Hz, 4H), 2.75 – 2.63 (m, 4H), 1.66 (s, 1H), 1.34 – 1.18 (m, 1H).

⁷ Araújo, A. D. de; Palomo, J. M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6095–6109.

Partie expérimentale

^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 146.0, 143.6, 134.7, 133.8, 132.4, 131.1, 127.7, 127.4, 77.5, 77.1, 76.7, 71.3, 70.8, 70.7, 70.3, 70.2, 70.1, 50.7, 43.8, 41.4, 31.0, 30.3.

HRMS (ESI) Calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 241.1665 ; found : 241.1664.

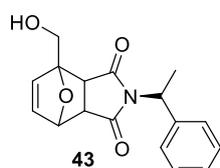


A solution of (*R*)-1-phenylethanol (500 mg, 4.09 mmol, 1.0 equiv.) in dry THF (15 mL, 0.41 M) was prepared under argon atmosphere and cooled to 0 °C. PPh_3 (1.180 mg, 4.5 mmol, 1.1 equiv.) was added to the mixture, followed by DIAD (0.88 mL, 4.5 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred for 15 min at 0 °C and 1*H*-pyrrole-2,5-dione (597 mg, 6.14 mmol, 1.5 equiv.) was added to the mixture, which was stirred for 30 min at 0 °C, and overnight at room temperature. After completion, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc 90:10, v/v) to provide the product as a yellow oil (278 mg, 1.39 mmol, 34%).

^1H NMR analysis was in agreement with previous literature.⁹

^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.37 (m, 2H), 7.34 – 7.21 (m, 3H), 6.61 (s, 2H, f), 5.34 (q, J = 7.4 Hz, 1H, d), 1.81 (d, J = 7.4 Hz, 3H, e).

HPLC R_t = 23.9 min.



To a solution of furan-2-ylmethanol (24.5 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) in THF/ H_2O (2:1, v/v, 1 mL) was added a solution of (*R*)-1-(1-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (50 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) in THF/ H_2O (2:1, v/v, 1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. After completion, the reactional mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (2 × 15 mL). Combined organic layer was dried over MgSO_4 , and solvents were removed under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 70:30 and finally 50:50, v/v). The product was recovered as colorless oil (60 mg, 0.20 mmol, 80%).

Three stereoisomers were observed by ^1H NMR in a ratio 0.7/1/1.

Mp: oil

IR (neat): 3449, 2925, 2857, 1691, 1378, 1356, 1219, 1188, 1025, 983, 969, 730, 697.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.27 (m, 13.2H), 6.60 (dd, J = 5.7, 1.5 Hz, 0.7H), 6.55 – 6.50 (m, 0.7H), 6.28 (dd, J = 5.8, 1.7 Hz, 1H), 6.20 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 6.12 (dd, J = 5.8, 1.7 Hz, 1H), 6.02 (d, J = 5.8 Hz, 0.9H), 5.39 (q, J = 7.3 Hz, 0.9H), 5.30 – 5.15 (m, 4.8H), 4.29 – 4.06 (m, 5.4H), 4.03 – 3.83 (m, 1.4H), 3.58 (dd, J = 7.8, 5.4 Hz, 1.9H), 3.32 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 2H), 2.95 (dd, J = 6.6, 1.0 Hz, 0.8H), 2.92 – 2.89 (m, 0.8H), 2.76 (dt, J = 28.2, 7 Hz, 1H), 2.12 – 2.02 (m, 2H), 1.80 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 1.70 (d, J = 7.6 Hz, 5.7H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 175.9, 175.8, 175.7, 175.7, 175.1, 175.0, 174.6, 170.6, 167.7, 142.4, 140.2, 139.0, 138.9, 138.9, 138.8, 138.4, 138.3, 136.9, 136.8, 135.3, 135.2, 134.6, 134.5, 133.9, 132.4, 130.8,

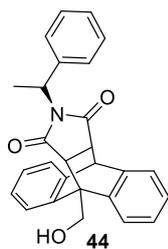
⁹ Galvis, C. E. P.; Kouznetsov, V. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *11*, 407–411.

Partie expérimentale

128.4, 128.4, 128.31, 128.1, 128.1, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 126.9, 110.3, 107.6, 92.2, 92.2, 91.5, 91.4, 81.0, 80.7, 79.6, 79.6, 68.1, 67.9, 61.3, 61.3, 60.7, 60.5, 57.3, 50.3, 50.1, 50.1, 49.6, 49.6, 47.7, 47.7, 47.5, 47.47, 45.6, 45.5, 38.6, 30.3, 29.6, 28.8, 25.5, 23.7, 22.9, 17.6, 16.4, 15.9, 15.9, 14.0, 10.9.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{17}H_{18}NO_4$ $[M+H]^+$: 300.1236 ; found : 300.1240.

HPLC R_t = 21.2 min, 21.7 min, 24.0 min.



To a solution of anthracen-9-ylmethanol (52 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL) was added a solution of (*R*)-1-(1-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (50 mg, 0.25mmol, 1.0 equiv) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 5 days. After completion, the reactional mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (2 × 15 mL). Combined organic layer was dried over MgSO₄, and solvents were removed under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 50:50, v/v) to provide the corresponding product as a light yellow oil (56 mg, 0.135 mmol, 54%).

The diastereoisomeric ratio of 0.77:1 was determined by ¹H NMR.

Mp: oil

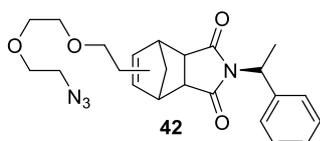
IR (neat): 3448, 3065, 3031, 2969, 2941, 1688, 1457, 1359, 1221, 1195, 907, 728, 696.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (dd, *J* = 5.2, 3.6 Hz, 1.7H), 7.40 – 7.30 (m, 2.7H), 7.27 – 7.21 (m, 2.8H), 7.21 – 7.09 (m, 13.2H), 6.99 – 6.91 (m, 2H), 6.90 – 6.82 (m, 1.7H), 5.13 (t, *J* = 12.8 Hz, 1.3H), 5.07 – 4.84 (m, 4.3H), 4.76 (d, *J* = 3.3 Hz, 0.7H), 4.73 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 0.8H), 3.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.23 – 3.16 (m, 2.1H), 3.12 (bs, 1.6H), 1.31 (d, *J* = 7.3 Hz, 2.3H), 1.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 176.7, 176.6, 176.5, 176.4, 142.2, 142.2, 142.2, 139.3, 139.3, 139.0, 138.5, 138.5, 128.2, 127.3, 127.2, 126.9, 126.8, 126.8, 126.7, 126.5, 126.4, 125.2, 123.9, 123.9, 123.2, 123.2, 122.3, 60.2, 60.1, 49.6, 49.5, 49.3, 49.3, 47.4, 47.4, 45.6, 45.5, 45.5, 15.84, 15.7.

HRMS (ESI+) Calculated for $C_{27}H_{24}NO_4$ $[M+H]^+$: 410.1756 ; found : 410.1757.

HPLC R_t = 25.8 min, 29.3 min.



To a solution of 1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cyclopenta-1,3-diene and 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)cyclopenta-1,3-diene (39 mg, 0.17 mmol, 1.0 equiv.) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL) was added a solution of (*R*)-1-(1-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (34 mg, 0.25mmol, 1.0 equiv) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 5 d. After completion, the reactional mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (2 × 15 mL). Combined organic layer was dried over MgSO₄, and solvents were removed under

Partie expérimentale

reduced pressured. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20 and 70:30, v/v) to provide the cycloadduct as white foam (65 mg, 0.225 mmol, 90%).

Five stereoisomers were observed by ^1H NMR with the following ratio 1.00:1.05:1.00:0.84:0.95.

Mp: oil

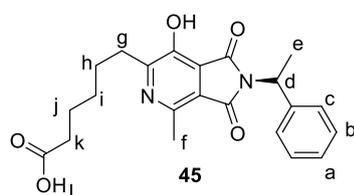
IR (neat): 2941, 2968, 2100, 1694, 1453, 1354, 1188, 1113, 913, 728, 698.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.43 – 7.34 (m, 10H), 7.33 – 7.26 (m, 9H), 7.25 – 7.18 (m, 6H), 5.98 (dd, J = 5.6, 2.9 Hz, 1H), 5.89 – 5.81 (m, 2H), 5.70 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.60 – 5.55 (m, 1.7H), 5.50 (s, 1H), 5.23 (dd, J = 14.5, 7.6 Hz, 4.4H), 3.69 – 3.56 (m, 29.5H), 3.56 – 3.47 (m, 7.4H), 3.41 – 3.33 (m, 11.4H), 3.31 – 3.16 (m, 18.9H), 3.01 (dd, J = 7.3, 6.1 Hz, 2.2H), 2.42 – 2.26 (m, 2.5H), 2.26 – 2.10 (m, 4.3H), 1.97 – 1.83 (m, 3.8H), 1.72 – 1.64 (m, 20.5H), 1.49 – 1.42 (m, 5.2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 177.8, 177.7, 177.4, 177.4, 177.2, 177.2, 177.1, 177.1, 146.8, 146.7, 139.9, 139.6, 139.5, 137.8, 137.7, 134.1, 134.0, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.6, 127.6, 127.5, 127.5, 126.5, 126.5, 70.6, 70.6, 70.0, 69.9, 69.9, 69.9, 69.0, 68.9, 68.7, 57.0, 56.9, 55.5, 55.5, 52.2, 50.6, 50.1, 49.6, 49.6, 49.5, 48.3, 47.9, 47.8, 46.9, 46.8, 46.6, 46.6, 45.5, 45.3, 45.3, 45.0, 45.0, 31.1, 31.1, 30.8, 30.4, 16.8, 16.3, 16.2, 16.0.

HRMS (ESI+) Calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 425.2189 ; found : 425.2180.

HPLC R_t = 28.4 min, 29.2 min.



To a solution of 6-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)hexanoic acid **9** (60 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv.) in THF/ H_2O (2:1, v/v, 1 mL) was added a solution of (*R*)-1-(1-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (50 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) in THF/ H_2O (2:1, v/v, 1 mL) and TFA (19 μL , 0.25 mmol, 1.0 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. After completion, the reactional mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (3 \times 15 mL). Combined organic layer was dried over MgSO_4 , and solvents were removed under vacuum. The crude product was purified by RP-HPLC (system A). The product was isolated as a sticky yellow oil (61 mg, 0.12 mmol, 48%).

Mp: oil

IR (neat): 3375, 2941, 2865, 1699, 1393, 1335, 1197, 1146, 1061, 759, 698.

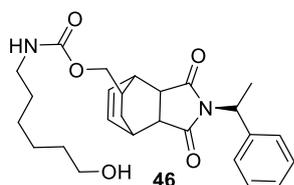
^1H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 7.47 – 7.23 (m, 5H, a, b and c), 5.49 (q, J = 7.4 Hz, 1H, d), 2.89 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.66 (s, 3H, f), 2.27 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.85 (d, J = 7.3 Hz, 3H, e), 1.72 (dd, J = 15.1, 7.7 Hz, 2H), 1.66 – 1.54 (m, 2H), 1.47 – 1.34 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 176.2, 168.8, 160.4, 146.8, 146.5, 141.7, 129.6, 128.7, 128.1, 122.8, 122.1, 118.6, 50.5, 34.5, 32.7, 29.7, 28.7, 25.6, 19.5, 17.9.

HRMS (ESI-) Calculated for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 395.1607 ; found : 395.1617.

Partie expérimentale

HPLC R_t = 26.2 min.



To a solution of cyclohexa-2,4-dien-1-ylmethyl (6-hydroxyhexyl)carbamate (19 mg, 0.093 mmol, 1.0 equiv.) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL) was added a solution of (*R*)-1-(1-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione (50 mg, 0.25 mmol, 1.0 equiv) in THF/H₂O (2:1, v/v, 1 mL). The mixture was stirred at room temperature for 72 h. After completion, the reaction mixture was diluted with water (10 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). Combined organic layer was dried over MgSO₄, and solvents were removed under vacuum. The crude product was purified twice by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20 and 50:50, v/v) and flash-column chromatography (silica gel, DCM/EtOAc as gradient from 100:0 to 90:10, 80:20 and 70:30, v/v). The product was recovered as white foams (22 mg, 0.13 mmol, 52%).

Two stereoisomers were observed by ¹H NMR analysis in a 1:1 ratio.

Mp: oil

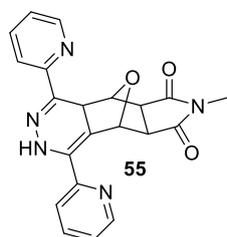
IR (neat): 3358, 2931, 2860, 1687, 1528, 1453, 1361, 1234, 1190, 1056, 1024, 698.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.18 (m, 5H), 6.20 – 5.82 (m, 2H), 5.36 – 5.22 (m, 1H), 4.81 – 4.54 (m, 1H), 3.81 (dd, *J* = 10.8, 5.8 Hz, 1H), 3.62 (td, *J* = 6.5, 1.4 Hz, 2H), 3.59 – 3.47 (m, 1H), 3.25 – 3.03 (m, 4H), 2.86 – 2.67 (m, 2H), 2.18 – 1.96 (m, 1H), 1.94 – 1.74 (m, 1H), 1.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.61 – 1.44 (m, 4H), 1.44 – 1.27 (m, 5H), 1.27 – 1.17 (m, 1H), 0.98 – 0.70 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 178.4, 178.4, 178.21, 156.4, 139.4, 133.0, 132.8, 130.1, 129.9, 128.1, 127.5, 127.4, 66.9, 62.6, 49.9, 43.8, 43.8, 43.4, 43.3, 40.8, 35.9, 33.5, 32.5, 32.0, 29.9, 27.8, 27.8, 26.3, 25.3, 16.4, 16.4.

HRMS (ESI+) Calculated for C₂₆H₃₅N₂O₅ [M+H]⁺: 455.2546; found: 455.2538.

HPLC R_t = 27.1 min.



To a solution of dipyridinyle tetrazine **52**¹⁰ (10 mg, 0.042 mmol, 1.0 equiv.) in DCM (0.5 mL) was added oxabicyclic **51**¹¹ (9.1 mg, 0.051 mmol, 1.2 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 6 h. After completion, the solvent was removed under vacuum. The crude product was purified by flash-column chromatography (silica gel, cyclohexane/EtOAc as gradient from 70:30 to 0:100, v/v). The product was recovered as yellow powder (14.7 mg, 0.038 mmol, 90%).

Two stereoisomers were observed by ¹H NMR analysis in a 1:0.8 ratio.

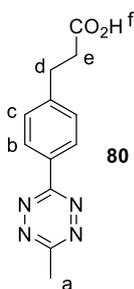
¹⁰ R. M. Versteegen, R. Rossin, W. ten Hoeve, H. M. Janssen, M. S. Robillard, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 14112–14116.

¹¹ S. Çetinkaya, P. H. K. Buyun, *Synthetic Metals* **2013**, *180*, 59–63.

Partie expérimentale

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.32 (s, 1H), 8.80 – 8.71 (m, 1H), 8.71 – 8.63 (m, 2H), 8.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.89 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.85 – 7.76 (m, 2H), 7.69 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.44 – 7.39 (m, 1H), 7.38 – 7.31 (m, 1H), 7.31 – 7.18 (m, 2H), 6.01 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 5.13 (s, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.44 (t, J = 3.4 Hz, 2H), 3.34 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.00 (s, 3H), 2.93 (s, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 176.8, 176.5, 176.3, 157.1, 154.2, 153.5, 149.5, 149.4, 149.3, 148.7, 137.5, 137.5, 136.8, 136.6, 133.6, 125.5, 123.9, 123.4, 122.8, 122.7, 122.6, 108.6, 86.3, 80.3, 79.2, 50.1, 49.9, 49.5, 42.5, 39.2, 29.8, 25.4. MS (ESI+) Calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 387.13 ; found : 388.13.



To a 25 mL sealed round bottom flask equipped with a stir bar, 175.2 mg (1 mmol) of commercial 3-(4-cyanophenyl)propanoic acid were solubilized in 1.63 mL of dry ACN. 7.36 mL (50 mmol) of hydrazine monohydrate and 546 mg (0.5 mmol) of $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ were added. The vessel was degazed with argon, sealed and the mixture was stirred in an oil bath at 40°C for 20 hours. The consumption of 3-(4-cyanophenyl)propanoic acid was monitored by HPLC (system QC). The reaction solution was cooled to room temperature and the seal was removed. Sodium nitrite (1.38 mg, 20 mmol) in 20 mL of water was slowly added to the solution and followed by slow addition of 1M HCl during which the solution turned bright red in color and gas evolved. Addition of 1M HCl continued until gas evolution ceased and the pH value is 3. (**Caution!** This step generates a large amount of toxic nitrogen oxide gasses and should be performed in a well-ventilated fume hood). The mixture was extracted with EtOAc and the organic phase dried over magnesium sulfate. The EtOAc was removed using rotary evaporation and the residue purified using silica column chromatography (MeOH/DCM from 0:100 to 2:98, v/v) to give 32.8 mg product as pink solid, the yield is 13%.

^1H NMR analysis was in agreement with that reported in the literature¹².

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (d, J = 8.5 Hz, 2H, d), 7.49 (d, J = 8.6 Hz, 2H, c), 3.10 – 2.99 (m, 5H, a and d or e), 2.70 (t, J = 7.6 Hz, 2H, d or e).

H-SGRSANAK(Dde)-NH₂
81

Step 1: solid-phase synthesis (SPS) of the uPA peptidyl substrate. SPS of peptide H-Ser-Gly-Arg-Ser-Ala-Asn-Ala-Lys(Dde)-NH₂ **81** with L-amino acids was performed using standard Fmoc/tBu chemistry and Rink Amide MBHA resin (Novabiochem, 100–200 mesh, 0.50 or 0.59 mmol/g loading) on a scale of 0.25 mmol. Coupling reactions were performed with commercial Fmoc protected L-amino acids from Iris Biotech or Novabiochem (4 equiv) and N,N,N',N' -tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU, 4 equiv), HOBT (4 equiv), and DIEA (12 equiv) in peptide-grade DMF.

Step 2: cleavage of the uPA peptidyl substrate from resin. A precooled TFA solution (~6 mL for 350 mg of resin) containing TIPS (2.5% v/v) and deionized water (2.5% v/v) was added to the resin. After being stirred at rt for 3 h, the resin was filtered and washed with TFA. The filtrate was evaporated to dryness, and cold Et₂O was added to the oily residue. The resulting white precipitate was isolated by centrifugation, lyophilized, and purified by semipreparative RP-HPLC (system B, 3 injections). The

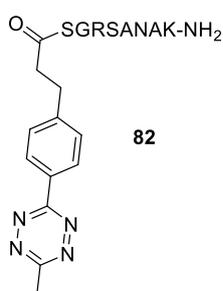
¹² A. Maggi, E. Ruivo, J. Fissers, C. Vangestel, S. Chatterjee, J. Joossens, F. Sobott, S. Staelens, S. Stroobants, P. Van Der Veken, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7544–7551.

Partie expérimentale

product-containing fractions were lyophilized to give a TFA salt of the uPA peptidyl substrate **81** as a white amorphous powder (127 mg, 53% yield).

HRMS (ESI+): Calc. for $C_{40}H_{69}N_{14}O_{13}$ m/z 953.5190[M+H]⁺; found m/z 953.5192.

HPLC (system A): t_R = 19.3 min (96.3% purity)

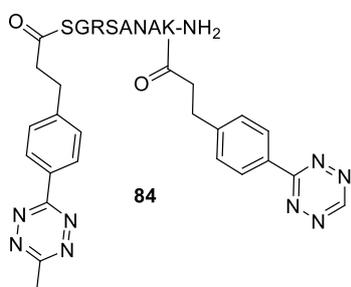


To a solution of peptide substrate of urokinase **81** (40 mg, 0.042 mmol, 1 equiv.) in NMP (560 μ L) were successively added 3-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)propanoic acid **80** (11.2 mg, 0.05 mmol, 1.2 equiv.), HBTU (19.1 mg, 0.05 mmol, 1.2 equiv.) and DIEA (37 μ L, 0.21 mmol, 5 equiv.). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The reaction completion was checked by RP-HPLC (System QC). Upon reaction completion, Et₂O was added; the resulting precipitate was centrifuged, then dissolved in DMF (3 mL). Hydroxylamine hydrochloride (25 mg, 0.36 mmol, 5 equiv) and imidazole (24.5 mg, 0.36 mmol,

5 equiv.) were added, and the reaction mixture was stirred 3 h at room temperature. The reaction progress was monitored by RP-HPLC (System QC). After reaction completion, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System C). The product-containing fractions were lyophilized to give the modified peptide (13 mg, 0.013 mmol, 31% overall yield for the two steps) as a pink amorphous powder. .

HPLC (system QC): t_R = 18.553 min (98.2% purity).

HRMS (ESI+): calcd. for $C_{42}H_{67}N_{18}O_{12}$ m/z 1015.5186 [M]⁺; found m/z 1015.5197.

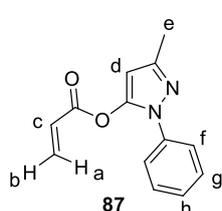


To a solution of tetrazine modified peptide substrate of urokinase **82** (8 mg, 7.88 μ mol, 1 equiv.) in NMP (105 μ L) were added 3-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)propanoic acid **83** (2.2 mg, 0.015 mmol, 1.2 equiv.), HBTU (3.6 mg, 0.015 mmol, 1.2 equiv.) and DIEA (6.9 μ L, 0.064 mmol, 5 equiv.), The mixture was stirred 2 h at room temperature. The reaction completion was checked by RP-HPLC (System QC). After reaction completion, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (System

C). The product-containing fractions were lyophilized to give the modified peptide (2.6 mg, 2.13 μ mol, 27%) as a pink amorphous powder.

HPLC (system QC): t_R = 22.367 min (91 % purity).

HRMS (ESI+): calcd. for $C_{53}H_{75}N_{22}O_{13}$ m/z 1227.5884 [M]⁺; found m/z 1227.5900.



To a solution of the commercial 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (1.74 g, 10 mmol, 1 equiv.) in CHCl₃ (30 mL) were added, at 0 °C, acryloyl chloride (0.98 mL, 1.2 mmol, 1.2 equiv.), triethylamine (1.67 mL, 12 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred for 1 h at reflux. After the reaction was complete, the crude product was diluted with CHCl₃ (30 mL) and washed with

Partie expérimentale

saturated solution of NaHCO_3 (30 mL). The aqueous phase was extracted twice with 30 mL of CHCl_3 . The combined organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (DCM 100%), to give the product as a yellow oil (0.73 mmol, 1.67 g, 73%).

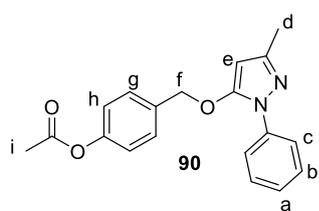
Mp = oil

IR (neat cm^{-1}) 3060, 2920, 1757, 1716, 1596, 1558, 1504, 1403, 1387, 1367, 1221, 1143, 1116, 1070, 1046, 1023, 1006, 979.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.58 – 7.51 (m, 2H), 7.49 – 7.37 (m, 2H), 7.31 (ddd, $J = 7.3, 3.9, 1.3$ Hz, 1H), 6.57 (dd, $J = 17.2, 1.1$ Hz, 1H), 6.25 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.05 (dd, $J = 10.5, 1.1$ Hz, 1H), 2.34 (s, 3H, e).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD [D4]) δ 162.50, 150.46, 146.09, 138.90, 135.38, 130.28, 128.84, 127.34, 124.63, 96.93, 14.18.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ m/z 229.0977 found m/z [M + H]⁺ 229.0978



To a solution of the commercial 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (200 mg, 1.15 mmol, 1 equiv.) in DCM (2 mL) were added, at 0 °C, 4-(hydroxymethyl)phenylacetate (260 mg, 1.6 mmol, 1.4 equiv.), triphenyl phosphine (430 mg, 1.6 mmol, 1.4 equiv.) and DIAD (330 mg, 1.5 mmol, 1.3 equiv.). The reaction was stirred 50 min at 0 °C followed by agitation at room temperature overnight. After the reaction

was completed, the crude product was diluted with DCM (10 mL) and washed with water (5 mL). The aqueous phase was extracted twice with 10 mL of DCM. The combined organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 10:90 and AcOEt/Cyclohexane 20:80, v/v), to give the product as a white solid (0.24 mmol, 77.2 mg, 21%).

Mp = 78 °C

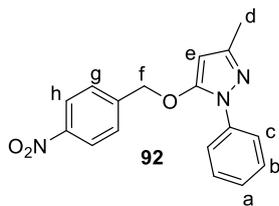
IR (neat cm^{-1}) 3373, 2973, 2513, 2247, 2073, 1753, 1567, 1507, 1365, 1192, 1121, 1105, 1044, 1011, 972, 912.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.73 – 7.65 (m, 2H), 7.44 – 7.34 (m, 4H), 7.23 (ddd, $J = 7.4, 4.0, 1.1$ Hz, 1H, a), 7.15 – 7.06 (m, 2H), 5.53 (s, 1H, e), 5.10 (s, 2H, f), 2.30 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD [D4]) δ 171.02, 156.03, 150.49, 139.49, 134.97, 129.99, 129.95, 127.65, 123.73, 122.96, 88.39, 74.35, 20.87, 14.21.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$ m/z 323.1396 found m/z [M + H]⁺ 323.1399

Partie expérimentale



To a solution of the commercial 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (200 mg, 1.15 mmol, 1 equiv.) in DCM (2 mL) were added, at 0 °C, 4-nitrobenzyl alcohol (239 mg, 1.6 mmol, 1.4 equiv.), triphenyl phosphine (430 mg, 1.6 mmol, 1.4 equiv.) and DIAD (330 mg, 1.5 mmol, 1.3 equiv.). The reaction was stirred 50 min at 0 °C, then overnight at room temperature. After the reaction was completed, the crude product was diluted with DCM

(10 mL) and washed with water (5 mL). The aqueous phase was extracted twice with 10 mL of DCM. The combined organic phase was washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 10:90 and AcOEt/Cyclohexane 20:80, v/v), to give the product as a pale yellow solid (0.23 mmol, 71.5 mg, 20%).

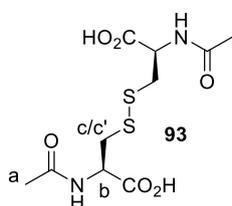
Mp = 107 °C

IR (neat cm^{-1}) 3073, 2923, 2347, 1588, 1559, 1511, 1395, 1342, 1139, 1044, 991, 878, 857, 833.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.33 – 8.18 (m, 2H), 7.77 – 7.64 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.46 – 7.34 (m, 2H), 7.26 (tt, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H, a), 5.51 (s, 1H, e), 5.22 (s, 2H, f), 2.26 (s, 3H, d).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD [D_4]) δ 155.69, 150.57, 149.22, 144.50, 139.41, 130.05, 129.21, 127.87, 124.72, 123.87, 88.46, 73.57, 14.21.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3$ m/z 310.1192 found m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 310.1194



To a solution of commercial N-acetyl cysteine (NAC) (26 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) in MeOD (4 mL) were added NaHCO_3 (40.3 mg, 0.48 mmol, 3 equiv.) and 4-bromo-5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one¹³ (20.2 mg, 0.08 mmol, 0.5 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 5 h and followed by ^1H NMR. The crude material was concentrated under reduced pressure and purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH from 60:40 to 0:100, v/v). The product was concentrated, solubilized in ACN and filtered. The product was concentrated to obtain the desired product (15.9 mg, 0.098 mmol, 61%) as a white powder.

^1H NMR analysis was in agreement with that reported in the literature¹⁴.

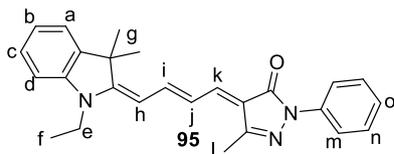
^1H NMR (300 MHz, D_2O) δ 4.47 (dd, $J = 8.9, 4.1$ Hz, 2H, b), 3.23 (dd, $J = 14.0, 4.1$ Hz, 2H, c), 2.93 (dd, $J = 14.0, 8.9$ Hz, 2H, c'), 2.02 (s, 6H, e).

MS (ESI $^+$): calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ m/z 323.0 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$; found m/z 322.9.

¹³ A. Akbarza deh, R. Soleymani, M.Taher, M. Karimi-Cheshmehali, *Oriental Journal of Chemistry* **2012**, *28*, 153-164.

¹⁴ V. Rathore, A. Upadhyay, S. Kumar, *Org. Lett.*, **2018**, *20*, pp 6274–6278

Partie expérimentale



To a solution of 5(1E,2E)-4-((E)-1-ethyl-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)-N-phenylbut-2-en-1-imine **94**¹⁵ (50 mg, 0.156 mmol, 1 equiv.) (or Cy 5.0 **96**¹⁶ (64 mg, 0.156 mmol, 1 equiv.)) in EtOH (5 mL) were added 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (41.3 mg, 0.234 mmol, 1.5 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 10 min. The crude material was concentrated under reduced pressure and purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH from 100:0 to 95:5, v/v) to obtain the desired product (19.3 mg, 0.05 mmol, 31%) as a dark purple powder.

Mp = 201 °C

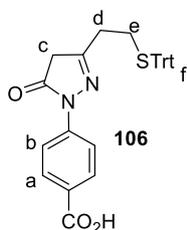
IR (neat): 2920, 2533, 1767, 1660, 1494, 1456, 1424, 1259, 1240, 1158, 1126, 1076, 1018, 995.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.03 (dt, *J* = 8.3, 4.2 Hz, 2H), 7.78 (dd, *J* = 22.9, 10.5 Hz, 1H), 7.68 – 7.51 (m, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 2H), 7.28 (dd, *J* = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 7.23 – 7.16 (m, 1H), 7.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.80 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, e), 2.27 (s, 3H, i), 1.64 (s, 6H, g), 1.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, f).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.65, 164.41, 149.63, 145.86, 142.90, 140.04, 139.46, 128.70, 128.32, 123.87, 122.45, 122.01, 120.17, 118.82, 118.69, 117.42, 108.12, 99.1147.52, 37.85, 28.46, 13.02, 11.69.

HRMS (ESI+): calcd. for C₂₆H₂₈N₃O *m/z* 398.2227 [M+H]⁺; found *m/z* 398.2219.

UV-vis (in PBS buffer 0.1 M at 25 °C): λ_{max} = 573 nm, λ(573 nm) = 122 500 M⁻¹ cm⁻¹



To a solution of ethyl 3-oxo-5-(tritylthio)pentanoate **103**¹⁷ (200 mg, 0.476 mmol, 1 equiv.) in absolute EtOH (4 mL) was added 4-hydrazinylbenzoic acid (80 mg, 0.523 mmol, 1.1 equiv.) at room temperature. The mixture was stirred at reflux for 2 h. The crude material was concentrated, co-evaporated with EtOH under reduced pressure to obtain the desired product (241 mg, 0.476 mmol, quantitative yield) as a yellow amorphous powder.

Mp = 120 °C

IR (neat): 3678, 2988, 2902, 1603, 1394, 1251, 1173, 1077, 1066, 1057, 904, 858, 767.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, a), 7.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, b), 7.48 – 7.17 (m, 15H, f), 3.24 (s, 2H, c), 2.58 – 2.36 (m, 4H, d and e).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.48, 170.84, 158.81, 144.55, 142.50, 131.41, 129.65, 128.16, 127.00, 125.35, 117.82, 67.28, 30.44, 28.51.

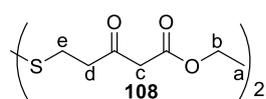
¹⁵ S. J. Mason, J. L. Hake, J. Nairne, W. J. Cummins, S. Balasubramanian, *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 2939–2949.

¹⁶ D. S. Pisoni, L. Todeschini, A. C. A. Borges, C. L. Petzhold, F. S. Rodembusch, L. F. Campo, *The Journal of Organic Chemistry* **2014**, *79*, 5511–5520.

¹⁷ R. Kudirka, R. M. Barfield, J. McFarland, A. E. Albers, G. W. de Hart, P. M. Drake, P. G. Holder, S. Banas, L. C. Jones, A. W. Garofalo, et al., *Chemistry & Biology* **2015**, *22*, 293–298.

Partie expérimentale

HRMS (ESI+): calcd. for $C_{31}H_{25}N_2O_3S$ $[M-H]^-$ 505.1586; found 505.1576.



To a solution of commercial 3,3'-disulfanediyldipropionic acid **107** (500 mg, 2.38 mmol, 1 equiv.) in dry DCM (10 mL) were added DMAP (639 mg, 5.23 mmol, 2.2 equiv.), meldrum's acid (754 mg, 5.23 mmol, 2.2 equiv.) and DCC (1.08 g, 5.23 mmol, 2.2 equiv.) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C for 30 min and overnight at room temperature. After the reaction was completed, the crude product was diluted with DCM (10 mL) and washed twice with a solution of HCl 1 M. The combined organic phase was washed with brine, dried over $MgSO_4$, and evaporated under vacuum. The crude material was diluted with absolute EtOH (20 mL) and stirred at reflux for 6 h. After completion (control by NMR), the crude material was concentrated and the residue purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/Cyclo from 50:50 to 70:30, v/v) to obtain the desired product. (164 mg, 0.476 mmol, 20%) was obtained as colorless oil.

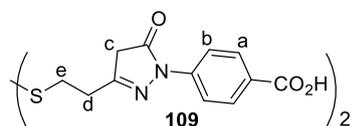
Mp = oil

IR (neat): 3424, 2982, 1735, 1713, 1617, 1408, 1368, 1347, 1312, 1253, 1154, 1129, 1096, 1078, 1033, 940, 842, 814.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, b), 3.41 (s, 4H, c), 2.96–2.87 (m, 4H), 2.87–2.76 (m, 4H), 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, a).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 200.76, 166.80, 61.35, 49.25, 42.18, 31.11, 14.02.

HRMS (ESI+): calcd. for $C_{14}H_{23}O_6S_5$ m/z 351.0931 $[M+H]^+$; found m/z 351.0926.



To a solution of diethyl 5,5'-disulfanediyldis(3-oxopentanoate) **108** (190 mg, 0.542 mmol, 1 equiv.) in absolute EtOH (5 mL) was added 4-hydrazinylbenzoic acid (164 mg, 1.08 mmol, 2 equiv.) The mixture was stirred at reflux for 2 h. After completion, the reaction was evaporated under vacuum and the residue precipitated with DCM to obtain the desired product. (284 mg, 0.542 mmol, quantitative yield) as a brown amorphous powder.

Mp = 229 °C

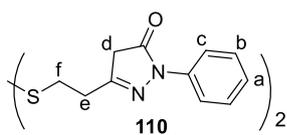
IR (neat): 2902, 2560, 1682, 1626, 1600, 1566, 1511, 1395, 1289, 1178, 851, 766.

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 3.37 (s, 4H, c), 3.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H), 2.86 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 171.16, 167.50, 151.60, 142.31, 126.68, 119.27, 112.58, 36.82, 32.90, 28.48.

HRMS (ESI+): calcd. for $C_{24}H_{21}N_4O_6S_5$ m/z 325.0903 $[M-H]^-$; found m/z 325.0901.

Partie expérimentale



To a solution of diethyl 5,5'-disulfanediyldis(3-oxopentanoate) **108** (160 mg, 0.456 mmol, 1 equiv.) in absolute EtOH (5 mL) was added phenylhydrazine (90 μ L, 0.913 mmol, 2 equiv.) The mixture was stirred at reflux for 2 h. After completion, the reaction was evaporated under vacuum to obtain the desired product (13.9 mg, 0.237 mmol, 52%) as a yellow amorphous powder.

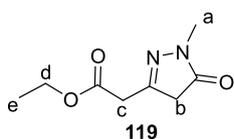
Mp = 148 °C

IR (neat): 3676, 2988, 2902, 1594, 1557, 1454, 1394, 1250, 1066, 904, 829, 753, 729, 690.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.83 (d, J = 7.9 Hz, 4H, c), 7.37 (t, J = 7.9 Hz, 4H, b), 7.17 (t, J = 7.9 Hz, 2H, a), 3.39 (s, 4H, d), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.88 (t, J = 7.0 Hz, 4H).

^{13}C NMR. (75 MHz, CDCl_3) δ 170.33, 157.49, 137.98, 128.95, 125.30, 118.86, 42.19, 34.41, 30.90.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 439.1262; found 439.1254.



To a solution of commercial diethyl 3-oxopentanedioate **118** (1.54 mL, 8.33 mmol, 1 equiv.) in EtOH (25 mL) was added N-methylhydrazine (540 μ L, 10.2 mmol, 1.2 equiv.) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 40 min. The crude material was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt, 50:50, v/v) to obtain the desired product (909.5 mg, 4.95 mmol, 58%) as a white amorphous powder.

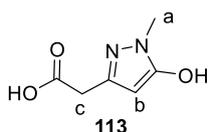
Mp = 110 °C

IR (neat): 2980, 2933, 2387, 1729, 1538, 1474, 1422, 1394, 1369, 1326, 1271, 1213, 1262, 127, 925, 837.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.19 (q, J = 7.1 Hz, 2H, d), 3.45 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.29 (s, 3H, a), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, e).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.53, 168.40, 152.15, 61.50, 40.37, 36.75, 31.06, 14.00.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$ m/z 185.0926 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found m/z 185.0925.



To a solution of ethyl 2-(1-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)acetate **119** (200 mg, 1.086 mmol, 1 equiv.) in water (9.33 mL) was added a solution of LiOH 2.3 M (933 μ L). The mixture was stirred overnight at room temperature. The crude material was concentrated, co-evaporated with EtOH under reduced pressure and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (MeOH 100%) to obtain the desired product (167 mg, 1.086 mmol, quantitative yield) as a white amorphous powder.

Partie expérimentale

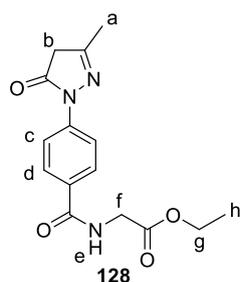
Mp = 239 °C

IR (neat): 3363, 2947, 2613, 1593, 1502, 1465, 1436, 1380, 1308, 1168, 1000, 944, 860, 772.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 5.22 (s, 1H, b), 3.39 (s, 3H, a), 3.24 (s, 2H, c).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 172.9, 154.91, 141.85, 86.52, 36.18, 32.49.

HRMS (ESI+): calcd. for C₈H₉N₂O₃ m/z 157.0613 [M+H]⁺; found m/z 157.0606.



To a solution of 4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoic acid **127**¹⁸ (400 mg, 1.83 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (10 mL) were added ethyl glycinate (562.9 mg, 4.033 mmol, 2.2 equiv.), HBTU (1.529 g, 4.033 mmol, 2.2 equiv.) and DIEA (639 μL, 7.32 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. After completion the mixture was diluted with AcOEt and washed three times with a saturated solution of NH₄Cl and one time with brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column

chromatography on silica gel (DCM/MeOH from 100:0 to 97:3, v/v) to obtain the desired product (378.3 mg, 1.244 mmol, 68%) as a white amorphous powder.

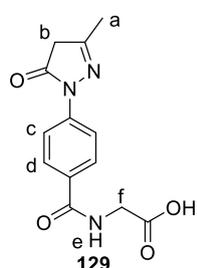
Mp = 169 °C

IR (neat): 3053, 2967, 2927, 1736, 1656, 1615, 1549, 1509, 1401, 1366, 1356, 1310, 1269, 1207, 1165, 10667, 851.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.05 – 7.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H, e), 4.35 – 4.13 (m, 4H, g and b or f), 3.45 (d, *J* = 0.5 Hz, 2H), 2.20 (s, 3H, a), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, h).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 170.88, 170.26, 166.89, 156.99, 141.04, 129.72, 128.12, 118.08, 61.76, 43.28, 42.02, 17.17, 14.28.

HRMS (ESI+): calcd. for C₁₅H₁₈N₃O₄ m/z 304.1297 [M]⁺; found m/z 304.1291.



A solution of ethyl 4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoyl glycinate **128** (100 mg, 0.33 mmol, 1 equiv.) in NaOH 1 M (3.33 mL) was stirred for 1 h at room temperature. After completion the mixture was acidified to pH 1 with a solution of HCl 5 M (1.5 mL). The aqueous layer was concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH 50:50, v/v) to obtain the desired product. (91 mg, 0.33 mmol, quantitative yield) was obtained as white

amorphous powder.

Mp = up to 400 °C

¹⁸ R. Bianchini, M. Bonanni, M. Corsi, A. S. Infantino, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8636–8644.

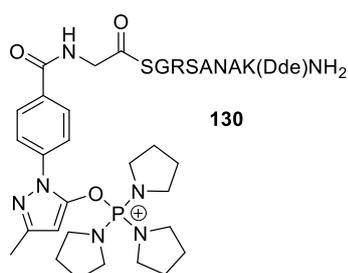
Partie expérimentale

IR (neat): 1727, 1636, 1403, 1320, 1193, 1007, 847, 767.

^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.10 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.39 (d, J = 0.5 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H, a).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 169.41, 167.41, 152.33, 146.89, 132.06, 129.43, 129.23, 121.19, 40.09, 38.88, 18.53.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$ m/z 274.0828 [M-H]⁻; found m/z 274.0826.

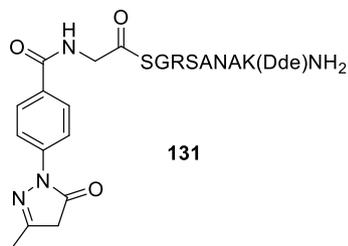


130

To a solution of peptide subtract of urokinase **81** (21 mg, 0.022 mmol, 1 equiv.) in NMP (294 μL) were added (4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoyl)glycine **129** (6.7 mg, 0.024 mmol, 1.1 equiv.), PyBOP (10.6 mg, 0.024 mmol, 1.1 equiv.) and DIEA (19 μL , 0.11 mmol, 5 equiv.). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After checking by RP-HPLC (systeme QC), the reaction was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system C). The product-containing fractions were lyophilized to obtain the product (4.4 mg, 0.0031 mmol, 14%) as a white amorphous powder.

HPLC (system QC): t_R = 20. 65 min (94% purity).

MS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{65}\text{H}_{102}\text{N}_{20}\text{O}_{16}\text{P}^+$ [M]⁺ 1449.8; found 1449.6.



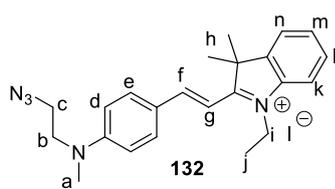
131

To a solution of peptide subtract of urokinase **81** (21 mg, 0.022 mmol, 1 equiv.) in NMP (294 μL) were added (4-(3-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)benzoyl)glycine **129** (6.7 mg, 0.024 mmol, 1.1 equiv.), HBTU (9.2 mg, 0.024 mmol, 1.1 equiv.) and DIEA (19 μL , 0.11 mmol, 5 equiv.). The mixture was stirred for 2 h at room temperature. After checking by RP-HPLC (systeme QC), the reaction was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system C). The product-containing fractions were lyophilized to obtain the product (6.92 mg, 0.0059 mmol, 27%) as a white amorphous powder.

HPLC (system QC): t_R = 20. 42 min (97% purity).

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{53}\text{H}_{80}\text{N}_{17}\text{O}_{16}$ [M+H]⁺ 1210.5969; found 1210.5980.

Partie expérimentale



To a solution of 4-((2-azidoethyl)(methyl)amino)benzaldehyde¹⁹ (144 mg, 0.685 mmol, 1 equiv.) in absolute EtOH (8 mL) was added 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium iodide (225 mg, 0.714 mmol, 1.05 equiv.) The mixture was stirred overnight at reflux. After completion, the reaction was concentrated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH from 100:0 to 90:10, v/v) to obtain the desired product (217.1 mg, 0.432 mmol, 63%) as a dark purple amorphous powder.

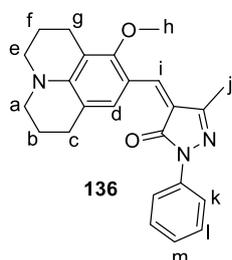
Mp = 88 °C

IR (neat): 2979, 2919, 2092, 1567, 1518, 1505, 1463, 1388, 1367, 1317, 1275, 1167, 1111, 1086, 1044, 1019, 945, 716.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.14 – 7.98 (m, 3H), 7.48 – 7.31 (m, 4H), 7.22 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.63 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, i), 3.65 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, c), 3.51 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, b), 3.11 (s, 3H, a), 1.71 (s, 6H, h), 1.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, j).

¹³C NMR. (75 MHz, CDCl₃) δ 178.60, 154.98, 154.02, 142.25, 140.32, 135.09, 129.13, 127.93, 122.68, 122.51, 112.89, 112.62, 104.64, 51.41, 51.06, 49.03, 42.13, 39.44, 27.42, 13.53.

HRMS (ESI+): calcd. for C₂₃H₂₈N₅ [M]⁺ 374.2345; found 374.2346.



To a solution of 8-methoxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinoline-9-carbaldehyde²⁰ (20 mg, 0.086 mmol, 1 equiv.) in EtOH (200 μL) was added 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (15 mg, 0.086 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred at 160 °C for 5 min under microwaves irradiation. The crude material was concentrated under reduced pressure and purified by preparative TLC (thick = 1 mm) (Cyclohexane/AcOEt 70:30, v/v) to obtain the desired product (35 mg, 0.086 mmol, quantitative yield) as a red amorphous powder.

Mp = 151 °C

IR (neat): 3047, 2927, 2853, 1933, 1733, 1546, 1519, 1494, 1457, 1304, 1276, 1259, 120, 1128, 995.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 9.29 (s, 1H, i), 7.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, k), 7.73 (s, 1H, d), 7.43 – 7.33 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, l), 7.18 – 7.09 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H, m), 3.78 (s, 3H, h), 3.40 – 3.28 (m, 4H, a and e), 2.79 (dt, *J* = 16.4, 6.3 Hz, 4H, c, and g), 2.33 (s, 3H, j), 2.02 – 1.89 (m, 4H, b and f).

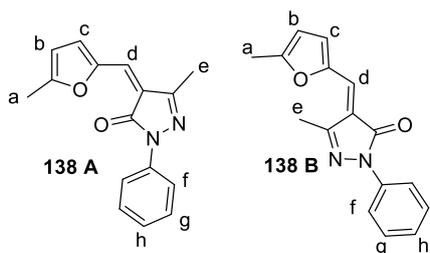
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 163.21, 159.95, 151.74, 149.95, 140.91, 139.34, 133.15, 128.76, 124.29, 119.61, 119.09, 117.65, 114.45, 112.60.

HRMS (ESI+): calcd. for C₂₄H₂₆N₃O₂ m/z 388.2025 [M+H]⁺; found m/z 388.2030.

¹⁹ Y. He, L. Chen, F. Liu, H. Zhang, F. Huo, Z. Chen, J. Liu, Z. Zhen, X. Liu, S. Bo, *Dyes and Pigments* **2017**, *139*, 756–763.

²⁰ K. Maiti, A. K. Mahapatra, A. Gangopadhyay, R. Maji, S. Mondal, S. S. Ali, S. Das, R. Sarkar, P. Datta, D. Mandal, *ACS Omega* **2017**, *2*, 1583–1593.

Partie expérimentale



To a solution of commercial 5-methylfuran-2-carbaldehyde (110.11 mg, 1 mmol, 1 equiv.) in EtOH (2 mL) was added 5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3H-pyrazol-3-one **68** (174.2 mg, 1 mmol, 1 eq.). The mixture was stirred at 160 °C for 5 min under microwaves irradiation. The crude material was concentrated under reduced pressure and purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt from 95:5 to

90:10, v/v) to obtain the desired products A and B (119.1 mg, 0.45 mmol, 45 % for A and 69.6 mg, 0.26 mmol, 26% for B) as a red amorphous powder.

Mp = 157 °C (A) and 162 °C (B)

IR (neat): A: 2920, 1682, 1614, 1595, 1496, 1366, 1319, 1238, 1216, 1142, 999, 923, 821.

B: 3107, 2920, 1682, 1614, 1594, 1564, 1545, 1500, 1366, 1342, 1299, 1258, 1155, 1115, 1033, 1005, 791, 756.

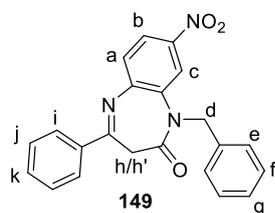
¹H NMR A (300 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 8.04 – 7.68 (m, 2H), 7.45 – 7.36 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.20 – 7.12 (m, 1H), 6.50 – 6.22 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.30 (s, 3H).

B (300 MHz, CDCl₃) δ 8.02 – 7.93 (m, 2H), 7.44 – 7.36 (m, 3H), 7.17 (dt, *J* = 7.4, 3.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 6.31 (dd, *J* = 3.5, 0.8 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H), 2.48 (s, 3H).

¹³C NMR A (75 MHz, CDCl₃) δ 162.23, 160.43, 149.85, 149.69, 138.72, 128.88, 128.74, 127.38, 124.48, 120.27, 118.82, 112.20, 14.32, 12.92.

B (75 MHz, CDCl₃) δ 165.27, 160.69, 149.01, 148.12, 138.59, 128.78, 127.43, 126.56, 124.45, 120.15, 118.53, 111.23, 17.92, 14.40.

HRMS (ESI⁺): calcd. for C₁₆H₁₅N₂O₂ m/z 267.1134 [M+H]⁺; found m/z 267.1142



To a mixture of 7- and 8-nitro-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one **146** (1 g, 3.56 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (35 mL) at 0 °C was added NaH (95% in mineral oil, 94 mg, 4.27 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of benzyl bromide (1.7 mL, 14 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was maintained overnight at room temperature, before removing the solvent under reduced pressure.

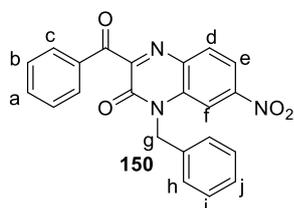
The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 90:10 to 80:20, v/v) to obtain the desired product (640 mg, 1.71 mmol, 48% yield) as a white solid.

Mp : 188 °C

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.38 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, c), 8.17 (dd, *J* = 8.1, 1.5 Hz, 2H), 8.07 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1H, b), 7.65 – 7.55 (m, 4H, a and Ar), 7.27 – 7.13 (m, 3H), 7.04 – 6.97 (m, 2H), 5.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, h'), 5.15 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, h), 4.35 (d, *J* = 12.2 Hz, 2H, d).

Partie expérimentale

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.11, 163.62, 146.75, 144.44, 136.87, 136.03, 133.59, 132.14, 128.95, 128.55, 128.18, 127.85, 127.17, 126.43, 120.01, 118.81, 49.48.



To a solution of 1-benzyl-8-nitro-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one **149** (630 mg, 1.7 mmol, 1 equiv.) in DMSO (5.1 mL) in a flask equipped with a rubber septum (with a needle inserted for preventing overpressure), was added N-bromosuccinimide (121 mg, 0.68 mmol, 0.4 eq.) at room temperature. The mixture was then heated to 110 °C, and stirred for 6 h. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (40 mL), a solution of saturated aq. NaHCO_3 (20 mL), a solution of saturated aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM 100%) to obtain the desired product (316.6 mg, 0.82 mmol, 48%) as a yellow amorphous powder.

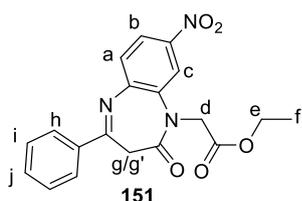
Mp = 201 °C

IR (neat): 3100, 2907, 1689, 1657, 1595, 1524, 1449, 1344, 1149, 901.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.31 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.25 – 8.16 (m, 2H), 8.11 (dd, J = 9.6, 2.4 Hz, 3H), 7.85 – 7.70 (m, 1H), 7.61 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.46 – 7.25 (m, 4H), 5.62 (s, 2H, g).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.38, 158.16, 152.95, 148.36, 135.59, 135.02, 134.95, 133.97, 133.77, 131.62, 129.95, 129.08, 128.87, 127.68, 12.94, 118.30, 110.89, 45.48.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5$ m/z 402.1090 $[\text{M}-\text{H}+\text{H}_2\text{O}]^-$; found m/z 402.1085.



To a solution of 7-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one and 8-nitro-4-phenyl-1,5-benzodiazepin-2-one **146** mixture (1 g, 3.56 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (35 mL) at 0 °C, was added NaH (95% in mineral oil, 0.094 g, 3.92 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of ethyl bromoacetate (1.57 mL, 14 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was maintained overnight at room temperature, before removing the solvent under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc from 95:5 90:10 to 85:15, v/v) to obtain the ethyl 2-(8-nitro-2-oxo-4-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-1-yl)acetate (794.2 mg, 2.17 mmol, 61% yield) as yellow solid.

Mp = 146 °C.

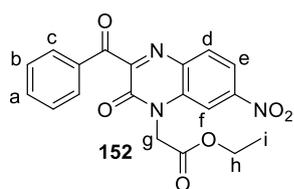
IR (neat): 3113, 2980, 2913, 1743, 1731, 1693, 1669, 1603, 1568, 1519, 1449, 1429, 1343, 1292, 1241, 1212, 1155, 1017, 875.

Partie expérimentale

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8.30 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.21–8.07 (m, 3H), 7.68–7.52 (m, 4H), 4.82–4.55 (m, 2H, d), 4.30 (d, J = 12.6 Hz, 1H, g'), 4.09 (qd, J = 7.1, 3.4 Hz, 2H, e), 3.26 (d, J = 12.6 Hz, 1H, g), 1.11 (t, J = 7.1 Hz, 3H, f).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): δ = 168.52, 165.41, 162.99, 146.24, 144.53, 136.04, 133.88, 132.09, 128.87, 128.10, 127.75, 120.24, 118.84, 60.96, 49.76, 13.83.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5$ m/z 366.1090 [M-H] $^-$; found m/z 366.1099.



To a solution of ethyl 2-(8-nitro-2-oxo-4-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[b][1,4]diazepin-1-yl)acetate **151** (754.2 mg 2.05 mmol, 1 equiv.) in DMSO (6 mL) in a flask equipped with a rubber septum (with a needle inserted for preventing overpressure), was added N-bromosuccinimide (146 mg, 0.82 mmol, 0.4 eq.) at room temperature. The mixture was then heated to 110 °C, and stirred for 6 h. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (40 mL), a solution of saturated aq. NaHCO_3 (20 mL), a solution of saturated aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (from DCM 100% to DCM/AcOEt 80:20, v/v) to obtain the desired product (398 mg, 1 mmol, 51%) as a yellow amorphous powder.

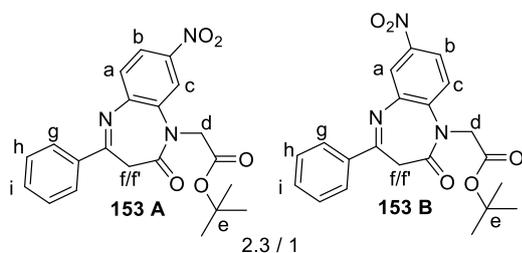
Mp = 129 °C.

IR (neat): 2973, 2453, 1735, 1688, 1568, 1514, 1448, 1345, 1233, 1153, 878.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 8.55 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.21 (dt, J = 16.5, 5.5 Hz, 2H), 8.04–7.95 (m, 2H), 7.84–7.70 (m, 1H), 7.59 (dd, J = 10.6, 4.8 Hz, 2H), 5.31 (s, 2H, g), 4.22 (q, J = 7.1 Hz, 2H, h), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H, i).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 190.99, 167.03, 157.62, 152.44, 148.86, 135.12, 135.02, 133.81, 133.80, 131.75, 129.76, 129.14, 118.63, 110.86, 61.67, 44.28, 13.95.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6$ m/z 380.0883 [M-H] $^-$; found m/z 380.0878.



To a solution of 7- and 8-nitro-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one mixture **146** (1 g, 3.56 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (35 mL) at 0 °C was added NaH (95% in mineral oil, 94 mg, 4.27 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of *tert*-butyl bromo acetate (2.1 mL, 14 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was maintained

overnight at room temperature, before removing the solvent under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 95:5 to

Partie expérimentale

80:20, v/v) to obtain the regioisomer A (737.4 mg, 1.85 mmol, 52%) and the regioisomer B (317.7 mg, 0.82 mmol, 23%) as a white solid.

mp = 138 °C (A) et 160 °C (B)

IR (neat cm⁻¹) Regio A : 2980, 2933, 1746, 1694, 1608, 1569, 1512, 1448, 1340, 1290, 1237, 1220, 1149, 1129, 874, 846, 829.

Regio B : 2974, 2886, 1694, 1513, 1425, 1448, 1375, 1341, 1236, 1150, 1087, 1046, 879.

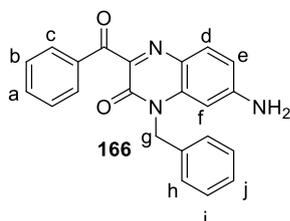
¹H NMR Regio A : (300 MHz, DMSO) δ 8.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.15 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 3H), 7.72 – 7.45 (m, 4H), 4.70 – 4.48 (m, 2H, d), 4.30 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, f'), 3.22 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H, f), 1.31 (s, 9H, e).

Regio B : (300 MHz, DMSO) δ 8.29 – 8.01 (m, 4H), 7.79 – 7.41 (m, 4H), 4.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, d), 4.39 – 4.20 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, f'), 3.21 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, f), 1.29 (s, 9H, e).

¹³C NMR Regio A : (75 MHz, DMSO) δ 167.43, 165.28, 162.87, 146.18, 144.47, 136.04, 13.94, 132.08, 128.85, 128.04, 127.78, 120.08, 118.53, 81.50, 50.37, 27.43.

Regio B : (75 MHz, DMSO) δ 167.17, 165.08, 162.33, 143.96, 141.30, 138.99, 136.12, 131.89, 128.83, 127.92, 123.78, 122.08, 120.56, 81.50, 50.42, 27.48.

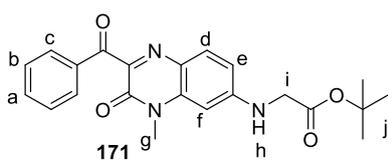
HRMS (ESI) exact mass calcd for C₂₁H₂₀N₃O₅ m/z 394.1403 m/z [M - H]⁻ 394.1409



To a solution of 3-benzoyl-1-benzyl-7-nitroquinoxalin-2(1H)-one **150** (10 mg, 0.026 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (0.3 mL), was added anhydrous MeOH (0.3 mL) and Pd(OH)₂ (1 mg, 0.007 mmol, 0.3 equiv.) under H₂ atmosphere. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. After completion the mixture was filtered under celite®, and wash with DCM and MeOH to obtain the desired product. (6 mg, 0.016 mmol 65%) was obtained as brown amorphous powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 – 7.84 (m, 2H), 7.77 – 7.63 (m, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.50 (dd, *J* = 8.7, 3.4 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 10.0, 4.3 Hz, 2H), 7.29 (dd, *J* = 6.8, 3.0 Hz, 3H), 6.70 – 6.58 (m, 1H), 6.49 – 6.38 (m, 2H), 5.36 (s, 2H, g).

HRMS (ESI) exact mass calcd for C₂₂H₁₈N₃O m/z 356.1 m/z [M+H]⁺ 355.9



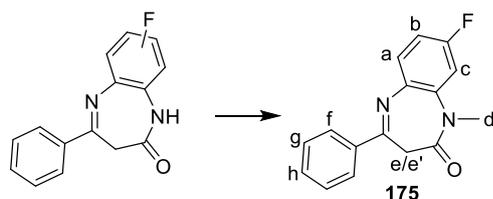
To a solution of 7-amino-3-benzoyl-1-methylquinoxalin-2(1H)-one **170** (10 mg, 0.036 mmol, 1 equiv.) in anhydrous ACN (1 mL), were added tert-butyl 2-bromoacetate (5.8 μL, 0.036 mmol, 1 equiv.), NaI (5.4 mg, 0.036 mmol, 1 equiv.) and DIEA (12.5 μL, 0.039 mmol, 1.1 equiv.). The mixture was stirred at reflux for 24 h. After completion the mixture was diluted with DCM (5 mL) and wash three times with a saturated solution of NaHCO₃. The mixture was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The

Partie expérimentale

crude material was purified by preparative TLC 1 mm (cyclohexane/EtOAc 50:50, v/v) to obtain the desired product. (2.1 mg, 0.005 mmol 15%) was obtained as yellow amorphous powder.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.00 – 7.93 (m, 2H), 7.68 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.53 (m, 1H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 6.66 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.25 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 1.5 Hz, 2H, i), 2.09 (s, 3H, g), 1.52 (s, 9H, j).

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4$ m/z 394.2 m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 393.9



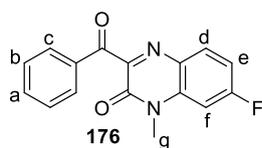
To a solution of 4-fluorobenzene-1,2-diamine (1 g, 7.92 mmol, 1 equiv.) in xylene (20 mL) was added 1-phenylhexane-1,3-dione (1.64 mL, 9.5 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred 12 h at 140 °C. The mixture was let a 0 °C until a formation of precipitate. The precipitation was filtered and washed with Et_2O , to obtain

426.2 mg of 7- and 8-fluoro-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one mixture as white amorphous powder. The crude product was directly engaged in the followed step without further purification.

To a solution of 7- and 8-fluoro-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one mixture (200 mg, 0.787 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (16 mL) at 0 °C was added NaH (95% in mineral oil, 21 mg, 0.866 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of methyl iodide (195 μL , 3.2 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was maintained overnight at room temperature, before removing the solvent under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 90:10 to 80:20, v/v) to obtain the desired product (133 mg, 0.496 mmol, 63%) as a white solid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.99 – 7.79 (m, 2H), 7.38 – 7.14 (m, 3H), 7.04 (dd, J = 9.1, 5.4 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 9.1, 2.9 Hz, 1H), 6.76 (ddd, J = 9.1, 7.4, 2.9 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 12.1 Hz, 1H, e'), 3.13 (s, 3H, d), 2.75 (d, J = 12.1 Hz, 1H, e).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 166.06, 161.78, 160.90, 157.64, 142.84 (d, J = 10.8 Hz), 137.05, 131.67, 131.64, 131.42, 128.76, 127.81, 123.17 (d, J = 9.3 Hz), 113.55 (d, J = 23.2 Hz), 112.94 (d, J = 23.1 Hz), 39.76, 35.34.

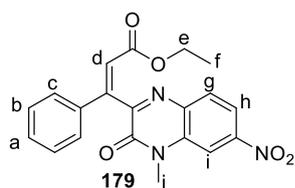


To a solution of 8-fluoro-1-methyl-4-phenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[b][1,4]diazepin-2-one **175** (130 mg, 0.485 mmol, 1 equiv.) in DMSO (1.5 mL) in a flask equipped with a rubber septum (with a needle inserted for preventing overpressure), was added N-bromosuccinimide (34.3 mg, 0.19 mmol, 0.4 eq.) at room temperature. Unless stated, the mixture was then heated to 110 °C, and stirred for 6 h. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (40 mL), a solution of saturated aq. NaHCO_3 (20 mL), a solution of saturated aq. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under

Partie expérimentale

reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM 100%) to obtain the desired product (45.1 mg, 0.16 mmol, 33%) as a yellow amorphous powder.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (dd, $J = 5.2, 3.3$ Hz, 2H), 7.65 – 7.56 (m, 2H), 7.46 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 2H), 3.73 (s, 3H, g).



To a solution of triethyl phosphonoacetate (128 μL , 0.65 mmol, 2 equiv.) in anhydrous THF (2.0 mL), was added NaH 60 % (26 mg, 0.65 mmol, 2 equiv.) under Argon atmosphere at 0 $^\circ\text{C}$. The mixture was stirred for 30 minutes at 0 $^\circ\text{C}$, and a solution of 3-benzoyl-1-methyl-7-nitroquinoxalin-2(1H)-one **148** (100 mg, 0.32 mmol, 1 equiv.) in 500 μL of dry THF was added. The mixture was stirred for 3 h at room temperature. After completion the mixture was quenched with water and washed twice with DCM. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclo/AcOEt 70:30, v/v) to obtain the desired product (81.4 mg, 0.21 mmol, 66%) obtained as a yellow amorphous powder.

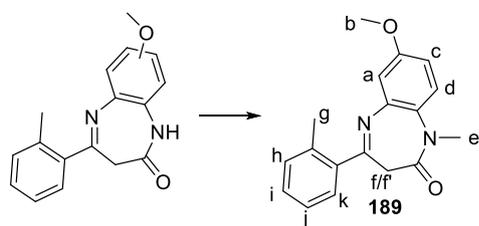
Mp = 212 $^\circ\text{C}$

IR (neat): 3080, 2980, 1703, 1661, 1616, 1590, 1529, 1462, 1348, 1322, 1287, 1179, 1110, 871, 845.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.39 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.18 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.70 – 7.52 (m, 2H), 7.52 – 7.30 (m, 3H), 6.79 (s, 1H, d), 3.99 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, e), 3.74 (s, 3H, i), 1.07 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, f).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.15, 162.05, 153.28, 150.70, 147.71, 135.57, 135.51, 133.93, 130.62, 130.33, 128.89, 127.40, 119.20, 117.87, 110.64, 60.32, 29.40, 13.83.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5$ m/z 380.1246 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found m/z 38.1246.



To a solution of 4-methoxybenzene-1,2-diamine (1 g, 7.24 mmol, 1 equiv.) in xylene (20 mL) was added ethyl 3-oxo-3-(o-tolyl)propanoate (1.79 mL, 8.7 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred 6 h at 140 $^\circ\text{C}$. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (40 mL) and washed with a solution of saturated aq. NaHCO_3 (2 \times 30 mL). The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc from 80:20, v/v). After concentration under reduced pressure, the product precipitated with Et_2O to obtain the mixture of regioisomers (255.4 mg, 0.94 mmol, 13%) as a white solid. The mixture of regioisomers was directly engaged in the followed.

Partie expérimentale

To a solution of 7- and 8-methoxy-4-(*o*-tolyl)-1,3-dihydro-2H-benzo[*b*][1,4]diazepin-2-one mixture (200 mg, 0.713 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (15 mL) at 0 °C was added NaH (95% in mineral oil, 20 mg, 0.784 mmol, 1.2 equiv.). The mixture was stirred for 10 to 15 min before the addition of methyl iodide (176 μ L, 2.85 mmol, 4 equiv.). The reaction mixture was maintained overnight at room temperature, before removing the solvent under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (cyclohexane/EtOAc 50:50, v/v) to obtain the desired product (192.5 mg, 0.656 mmol, 92%) as a white solid

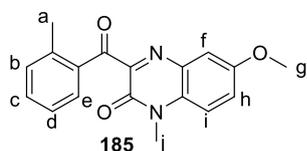
Mp : 153 °C

IR (neat cm⁻¹) 2920, 2833, 1666, 1610, 1569, 1495, 1443, 1423, 1307, 1272, 1160, 1144, 1103, 1028, 1014, 831, 814.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.64 – 7.53 (m, 1H), 7.41 – 7.14 (m, 4H), 6.97 – 6.71 (m, 2H), 3.84 (m, 4H, b et f'), 3.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 3H, e), 3.24 – 3.03 (m, 1H, f), 2.52 (s, 3H, g).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 166.35, 166.21, 164.05, 161.93, 157.77, 156.53, 142.26, 138.97, 138.81, 136.39, 135.67, 135.44, 131.29, 131.26, 129.58, 129.35, 128.58, 128.29, 128.16, 128.13, 125.99, 125.94, 122.77, 114.08, 111.54, 109.69, 106.43, 55.61, 55.55, 43.61, 43.38, 35.31, 35.23, 20.95, 20.86.

HRMS (ESI) exact mass calcd for C₁₈H₁₉N₂O₂ m/z 295.1447 found m/z 295.1436 [M+H]⁺



To a solution of 7-methoxy-1-methyl-4-(*o*-tolyl)-1,3-dihydro-2H-benzo[*b*][1,4]diazepin-2-one **189** (195 mg, 0.66 mmol, 1 equiv.) in DMSO (2.2 mL) in a flask equipped with a rubber septum (with a needle inserted for preventing overpressure), was added N-bromosuccinimide (47.2 mg, 0.265 mmol, 0.4 eq.) at room temperature. The mixture was then heated to 110 °C, and stirred for 6 h. Thereafter, to the solution cooled to room temperature were successively added dichloromethane (25 mL), a solution of saturated aq. NaHCO₃ (20 mL), a solution of saturated aq. Na₂S₂O₃ (20 mL) and brine (20 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (Cyclohexane/AcOEt from 90:10 to 80:20, v/v) to obtain the desired product (29.8 mg, 0.099 mmol, 15%) as a yellow amorphous powder.

Mp = 169 °C

IR (neat): 2920, 2840, 2187, 1677, 1640, 1500, 1487, 1267, 1166, 1026, 923.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.45 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.35 – 7.19 (m, 4H), 3.87 (s, 3H, g), 3.73 (s, 3H, j), 2.69 (s, 3H, a).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 194.23, 156.41, 156.23, 153.13, 140.80, 134.47, 133.18, 132.97, 132.34, 132.02, 128.30, 125.73, 121.52, 114.94, 112.05, 55.93, 29.21, 21.79.

HRMS (ESI⁺): calcd. for C₁₈H₁₇N₂O₃ m/z 309.1239 [M+H]⁺; found m/z 309.1240.

III. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles.

- 1. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles
1: Fluorogenic behaviour of the hetero-Diels–Alder ligation of 5-alkoxyoxazoles with maleimides and applications**

Supporting information

Fluorogenic behaviour of the hetero-Diels–Alder ligation of 5-alkoxyoxazoles with maleimides and applications

Kévin Renault, Laurie-Anne Jouanno, Antoine Lizzul-Jurse^a Pierre-Yves Renard, Cyrille Sabot^{a,}*

Table of contents

I. General information, instruments and methods	289
II. Experimental procedures	292
II.1. Preparation of maleimide and 5-ethoxyoxazole precursors of azaphthalimide 7 and 8	292
II.2. Synthesis of azaphthalimides 2-3, 6-8.....	293
III. RP-HPLC analyses	296
IV. Kinetic studies of the Kondrat'eva ligation in organic and aqueous media	298
IV.1. In organic media	298
IV.2. In aqueous media	298
V. Fluorescence spectroscopy	300
V.1. Acidity constant (pKa) determination of compound 1	300
V.2. Energy-transfer efficiency of compound 16	301
V.3. Photophysical properties of compound 1 and 8	301
VI. References	303

I. General information, instruments and methods

General Information. Flash column chromatography purifications were performed silica gel (40-63 μm). Thin-layer chromatography (TLC) were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp (at 254/365 nm) and/or staining with KMnO_4 solution. Unless otherwise noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. Phosphate buffer saline PBS (pH 7.4, 0.1 M), carbonate buffer (pH 10.89, 0.1 M) and aq. mobile phases for HPLC were prepared with water purified by means of a MilliQ system (purified to 18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$).

Instrument and Methods. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent peak for calibration. J values are expressed in Hz. High resolution mass spectra (HRMS) were obtained using an orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer equipped with an electrospray source in positive and negative modes. Low resolution mass spectra (LRMS) were obtained with a mass spectrometer equipped an ESI source. UV-visible absorption spectra were obtained using a rectangular quartz cell (standard cell, Open Top, 10 \times 10 mm, chamber volume 3.5 mL). Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed using a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 \times 4 mm, Chamber volume 1.4 mL for quantum yields determination, Chamber volume 3.5 mL for all other studies). *In vitro* Fluorescence assays and *in vitro* enzymatic assays were performed using an ultra-micro quartz cell (Hellma, 105.251-QS, 20 \times 3 mm, Chamber volume 45 μL). The absorption spectra of azaphtalimide derivatives were recorded (430-

Partie expérimentale

800 nm) in basic conditions or polar and protic solvent at 25 °C. The absorption spectra of azaphthalimide derivatives were recorded (370-800 nm) in acidic condition or in apolar and aprotic solvent at 25 °C. Excitation/emission spectra were recorded under the same conditions after emission/excitation at the corresponding wavelength (366/430 nm, excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit: 5 nm). Fluorescence quantum yields were measured at 25 °C by a relative method using lucifer yellow ($\Phi_F = 21\%$ in water, 430 nm) as a standard and fluoresceine ($\Phi_F = 92.5\%$ in NaOH 0.1 M, 488 nm¹). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi F (X) = (A_s/A_x) (F_x/F_s) (n_x/n_s)^2 \Phi F (S)$$

where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1 a.u.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.337 for PBS, 1.333 for water 1.362 for EtOH, 1.497 for toluene, 1.424 for DCM, 1.344 for ACN, 1.407 for THF, 1.328 for MeOH, 1.431 for DMF and 1.478 for DMSO.

Carbonate buffer pH 10.89 0.1 M: 500 mL of solution of NaHCO₃ 0.1 M and 500 mL of solution of Na₂CO₃.10H₂O 0.1 M were prepared. To 450 mL of Na₂CO₃.10H₂O 0.1 M solution, was added 50 mL of NaHCO₃ 0.1 M solution to give after, pH value adjusted with pHmeter, the carbonate buffer pH 10.89 0.1 M.

HPLC systems used for purity control or purification

System QC was used for analytical experiments (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 x 100 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min. Several chromatographic systems were used for the purification steps (by semi-preparative HPLC): System A: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 10.0 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min), followed by linear gradient from 0% to 30% (30 min) of ACN, followed by isocratic mixture 30% of ACN (15 min) and followed by linear gradient from 30% to 100% (55 min) of ACN] at a flow rate of 7 mL/min. UV-

Partie expérimentale

vis wavelength used for the detection was performed at 465 nm. System B: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (45 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 570 and 430 nm.

System C: RP-HPLC (Thermo Hypersil GOLD C18 column, 5 μm , 10.0 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (200 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 4 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 575 and 390 nm.

System D: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (20 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 330 and 235 nm.

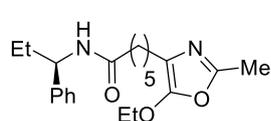
System E: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (100 min) of ACN and followed 100% (20 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 365 and 310 nm.

System F: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (200 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 355 and 235 nm.

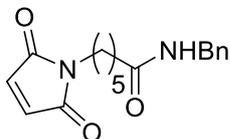
System G: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (5 min), followed by linear gradient from 0% to 20% (20 min) of ACN, followed by linear gradient from 20% to 60% (80 min) and followed by linear gradient from 60% to 100% (35 min)] at a flow rate of 20 mL/min. UV-vis wavelength used for the detection was performed at 340 and 240 nm.

II. Experimental procedures

II.1. Preparation of maleimide and 5-ethoxyoxazole precursors of azaphthalimide 7 and 8



2-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)-N-(1-phenylpropyl)acetamide. To a solution of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)hexanoate² (50 mg, 0.15 mmol, 1 equiv.) in freshly distilled THF (0.8 mL), under argon atmosphere, was added α -ethylbenzylamine (24 μ L, 0.17 mmol, 1.1 equiv), and DIEA (31 μ L, 0.18 mmol, 1.2 equiv). The resulting reaction mixture was stirred overnight at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO₃, extracted with AcOEt (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 50:50, v/v, rf = 0.2), to give the product as a colorless oil (0.095 mmol, 34 mg, 63%). IR (neat cm⁻¹) 3291, 2969, 2936, 2864, 1641, 1538, 1271; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H), 5.63 (d, 1H), 4.88 (q, J = 15.3, 7.2 Hz, 1H), 4.08 (q, J = 15.3, 7.2 Hz, 2H), 2.36 – 2.26 (m, 5H), 2.23 – 2.12 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.88 – 1.75 (m, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.33 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 0.88 (t, J = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 153.6, 152.4, 142.4, 128.7, 128.7, 127.4, 126.7, 126.7, 116.8, 70.5, 54.8, 36.9, 29.2, 28.9, 28.4, 25.6, 24.5, 15.1, 14.4, 10.9. HRMS (ESI) [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₃₂N₂O₃ m/z 359.2335 found m/z 359.233.



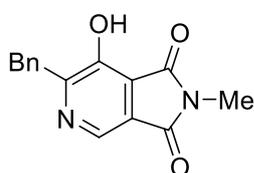
N-benzyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide. To a solution of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanoate (50 mg, 0.16 mmol, 1 equiv.) in freshly distilled THF (1 mL), under argon atmosphere, was added benzylamine (23 μ L, 0.21 mmol, 1.3 equiv). The resulting reaction mixture was stirred overnight at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO₃, extract with AcOEt (3 \times 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 50:50, v/v, rf = 0.2), to give the product as a

Partie expérimentale

colorless oil (0.061 mmol, 18 mg, 38%). IR (neat cm^{-1}) 3302, 2935, 1705, 1629, 1412, 828, 695; mp 115 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.31 (m, 5H), 6.67 (s, 2H), 5.68 (s, 1H), 4.44 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.51 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.21 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.66 (m, 4H), 1.33 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.6, 170.9, 170.9, 138.5, 134.2, 134.2, 128.8, 128.8, 127.9, 127.9, 127.6, 43.7, 37.7, 36.5, 28.3, 26.4, 25.2.

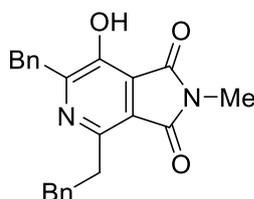
II.2. Synthesis of azaphthalimides 2-3, 6-8

Azaphthalimides **4** and **5** were prepared according to a reported procedure.²



Compound 2. To a solution of the 4-benzyl-5-ethoxyoxazole³ (250.0 mg, 1.23 mmol) in a mixture of THF/Water (170/100, 6.5 mL/3.8 mL) was added the N-methylmaleimide (273 mg, 2.46 mmol, 2 equiv.) and TFA (380 μL ,

6.45 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 5 h at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO_3 , extracted with AcOEt (3×30 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (DCM 100% to AcOEt/DCM 50:50, v/v), followed by trituration in diethylether (3×1 mL), to give the product as a pale yellow solid (0.58 mmol, 155 mg, 47%). IR (neat cm^{-1}) 3098, 2934, 2459, 1699, 1435, 1379, 1217, 1049, 1013, 864, 753, 740, 729 ; mp 174 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.59 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.27 (m, 5H), 4.30 (s, 2H), 3.14 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.0, 167.1, 158.1, 146.9, 137.6, 135.6, 129.3, 128.7 126.8, 124.1, 120.5, 38.9, 24.1.

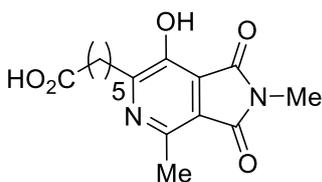


Compound 3. To a solution of 4-benzyl-5-ethoxy-2-phenethyloxazole³ (100.0 mg, 0.46 mmol) in a mixture of THF/Water (170/100, 2.4 mL/1.4 mL) was added the N-methylmaleimide (102 mg, 0.92 mmol, 2 equiv.) and TFA

(140 μL , 23.7 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 5 h at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO_3 , extracted with AcOEt (3×20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally

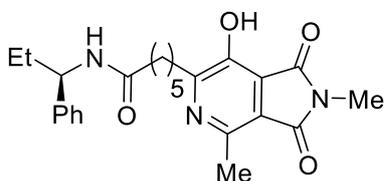
Partie expérimentale

purified by chromatography on silica gel (DCM 100% to AcOEt/DCM 50:50, v/v), followed by trituration in diethylether (3 × 1 mL), to give the product as a pale yellow solid (0.26 mmol, 98 mg, 57%). IR (neat cm⁻¹) 3431, 3028, 2935, 2862, 1773, 1699, 1436, 1408, 1251, 1226, 1023, 999, 759, 747, 701; mp 168 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (m, 5H), 4.28 (s, 2H), 3.44 (dd, *J* = 8.9, 6.9 Hz, 2H), 3.17 – 2.85 (m, 5H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.1, 167.8, 157.2, 150.6, 145.4, 141.2, 137.8, 129.3, 128.7, 128.5, 128.4, 126.7, 126.0, 120.7, 120.1, 38.9, 35.2, 35.2, 23.9.



Compound 6. To a solution of the carboxylic acid 5-ethoxyoxazole (50 mg, 2.07 mmol, 1 equiv.) in NMP (1.42 mL) was added the N-methylmaleimide (58 mg, 5.18 mmol, 2.5 equiv.) and TFA (53 μL, 9.00 mmol, 4.5 equiv.). The reaction was stirred overnight at rt. After

the reaction was completed, the mixture was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system D). The product-containing fractions were lyophilized to give 48.5 mg (76% yield) of the product as a yellow oil. IR (neat cm⁻¹) 2930, 1702, 1434, 1380, 1198, 1008, 901, 758, 529, 407. ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 3.08 (s, 3H), 2.99 – 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.79 – 1.54 (m, 4H), 1.49 – 1.36 (m, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 177.5, 169.3, 168.6, 161.4, 146.8, 146.4, 122.5, 122.3, 34.7, 33.2, 29.8, 29.00, 25.9, 23.9, 19.6. HRMS (ESI) exact mass calcd for C₁₅H₁₇N₂O₅ m/z 305.1137 found m/z 305.1134 [M - H]⁻. HPLC (system QC): tR = 19.557 min (98% purity).

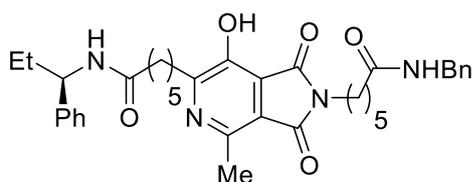


Compound 7. To a solution of the 2-(5-ethoxy-2-methyloxazol-4-yl)-N-(1-phenylpropyl)acetamide (100.0 mg, 0.28 mmol) in a mixture of THF/Water (170/100, 1.5 mL/0.9 mL) was added the N-methylmaleimide (62 mg, 0.56 mmol, 2 equiv.)

and TFA (90 μL, 1.53 mmol, 5 equiv.). The reaction was left during 5 h at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO₃, extracted with AcOEt (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO₄, and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 70:30, v/v), to give

Partie expérimentale

the product as a pale yellow solid (0.19 mmol, 80 mg, 67%). IR (neat cm^{-1}) 3318, 2948, 2869, 1704, 1645, 1515, 1422, 1378, 1246, 1151, 1007, 907, 865, 753, 700, 677; mp 158 °C. ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7.32 (m, 5H), 5.60 (d, 2H), 4.88 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.14 (s, 3H), 2.96 – 2.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.80 (m, 2H), 1.69 (m, 4H), 1.42 (m, 2H), 0.88 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H). ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 172.3, 169.3, 168.2, 159.4, 147.2, 145.4, 142.3, 128.7, 127.4, 126.7, 120.1, 119.7, 54.9, 36.8, 32.4, 29.2, 27.9, 25.6, 23.9, 20.2, 10.9.



Compound 8. To a solution of the 2-(5-ethoxy-2-

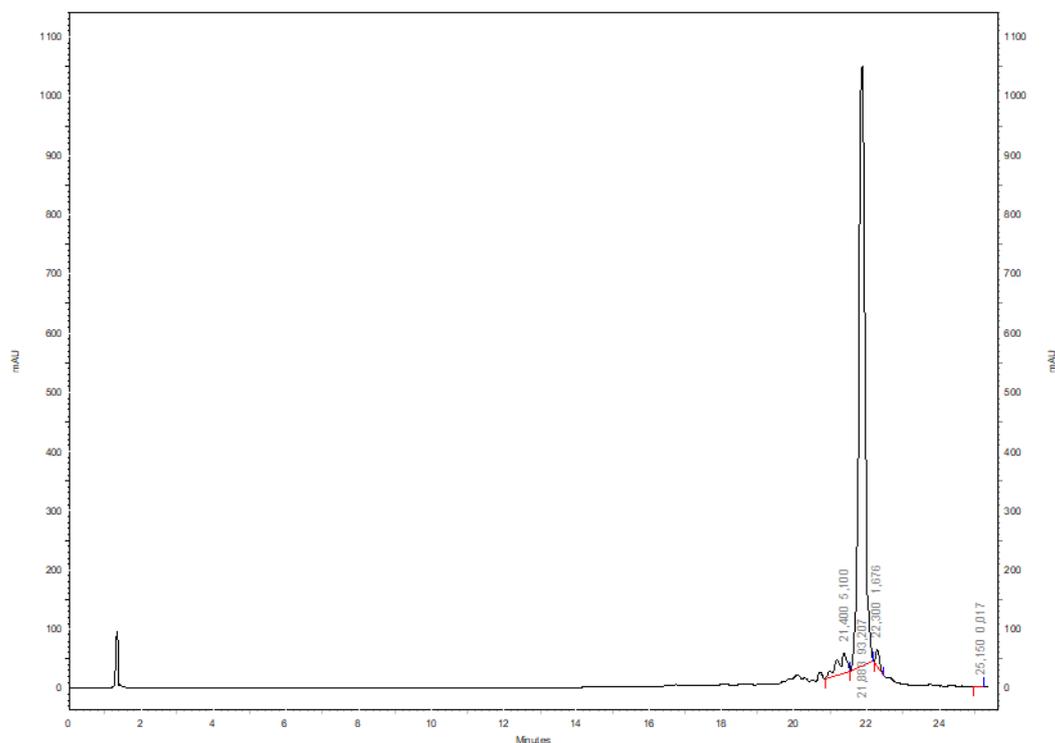
methyloxazol-4-yl)-N-(1-phenylpropyl)acetamide (110.0 mg, 0.31 mmol) in a mixture of THF/Water (170/100,

1.64 mL/0.97 mL) was added the N-benzyl-6-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)hexanamide (186 mg, 0.62 mmol, 2 equiv.) and TFA (100 μL , 1.70 mmol, 5.5 equiv.). The reaction was left during 7 h at rt. The solution was quenched with a saturated solution of NaHCO_3 , extract with AcOEt (3×25 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO_4 , and evaporated under vacuum. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (AcOEt/Cyclohexane 50:50, AcOEt 100% and AcOEt/MeOH 90:10, v/v), followed by trituration in a mixture (AcOEt/MeOH 50:50, 4mL), and recrystallization in MeOH (2 mL), to give the product as a pale yellow solid (0.12 mmol, 73 mg, 38%). IR (neat cm^{-1}) 3290, 2938, 2866, 1752, 1704, 1643, 1516, 1399, 1251, 1152, 1052, 979, 908, 696; mp 164 °C. ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.36 – 7.13 (m, 10H), 4.66 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.48 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.78 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.14 (m, 4H), 1.70 – 1.38 (m, 10H), 1.34 – 1.11 (m, 6H), 0.82 (dt, $J = 12.3, 6.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 172.0, 171.6, 168.0, 166.6, 160.3, 144.0, 139.7, 128.2, 128.2, 128.1, 127.1, 126.6, 126.5, 126.4, 120.4, 120.1, 54.9, 53.9, 42.0, 37.2, 35.4, 35.1, 32.2, 29.3, 28.6, 27.7, 27.3, 25.9, 25.3, 24.9, 19.6, 11.0.

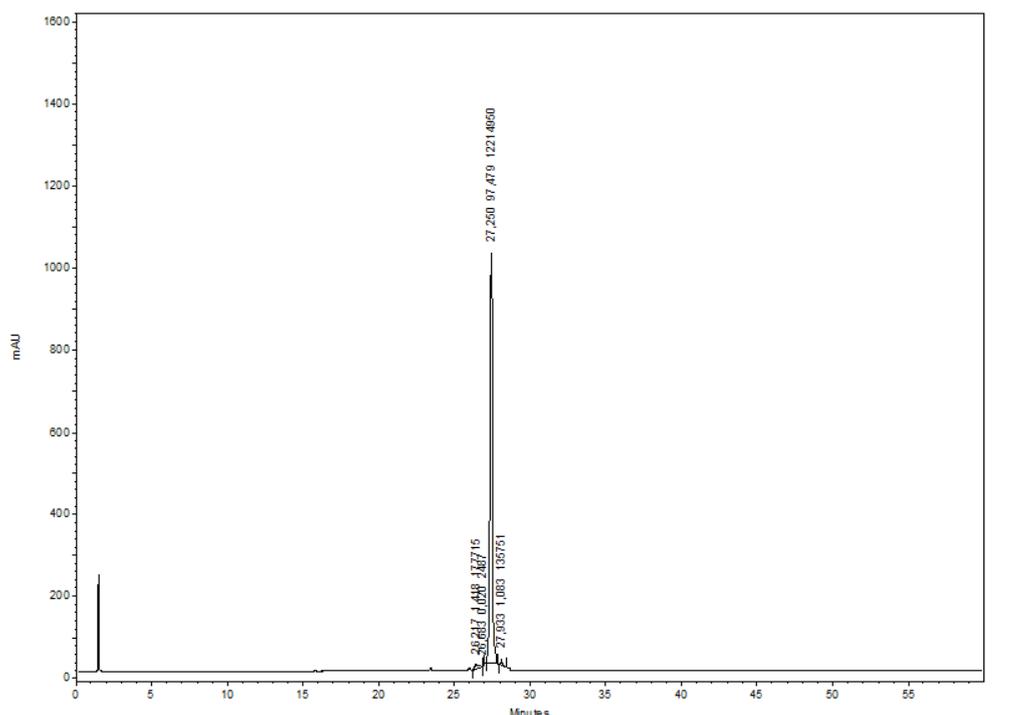
Partie expérimentale

III. RP-HPLC analyses

RP-HPLC elution profile (system QC) of compound **13** (Max Plot mode)

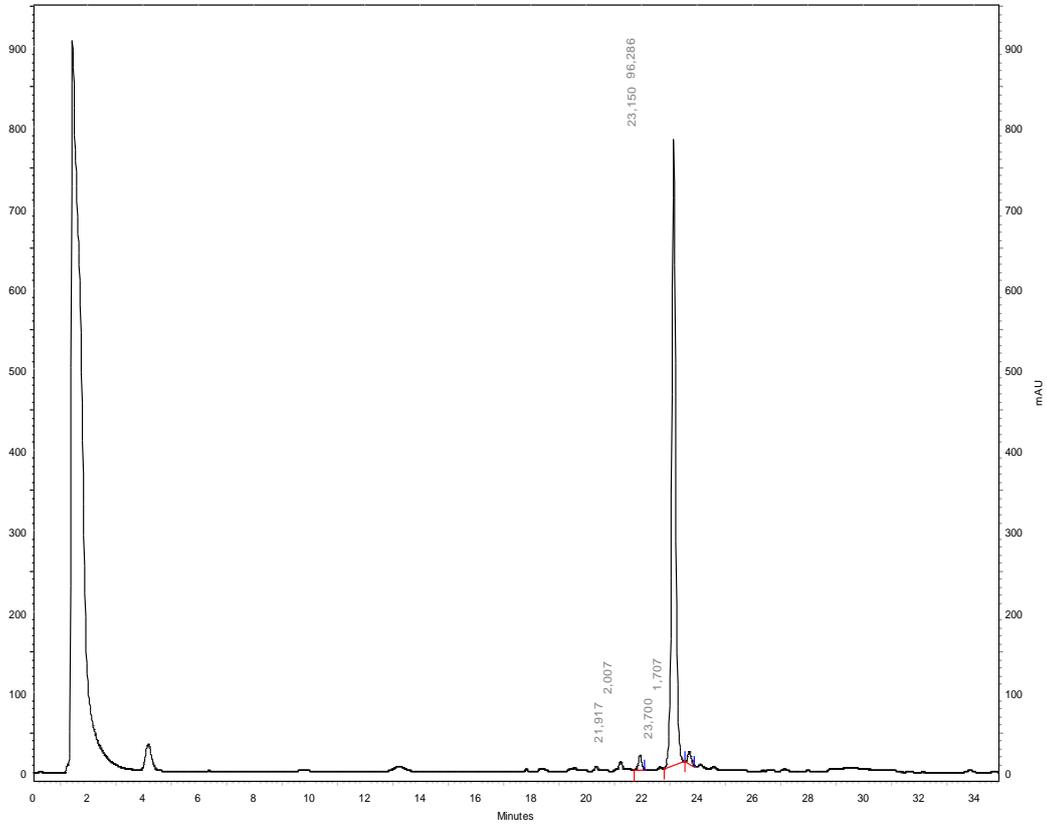


RP-HPLC elution profile (system QC) of compound **16** (Max Plot mode)

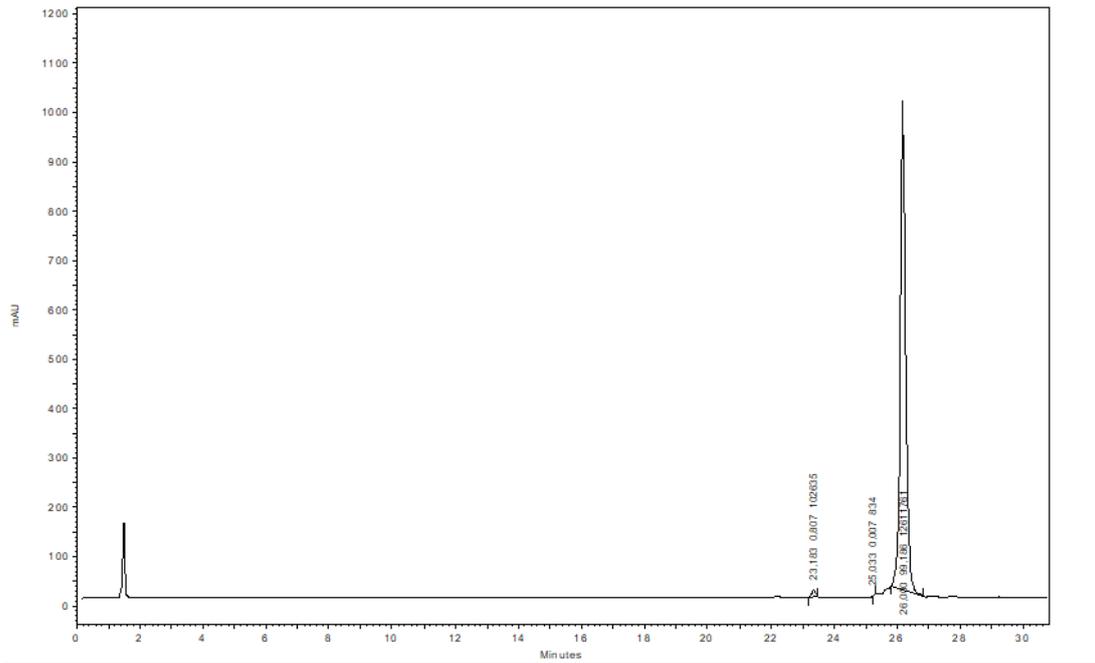


Partie expérimentale

RP-HPLC elution profile (system QC) of compound **19** (Max Plot mode)



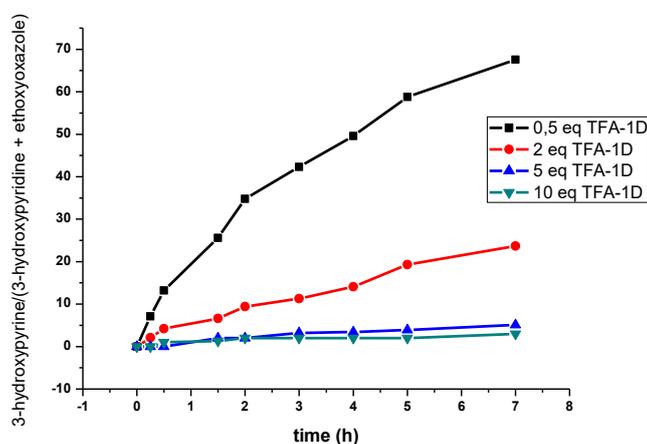
RP-HPLC elution profile (system QC) of compound **24** (Max Plot mode)



IV. Kinetic studies of the Kondrat'eva ligation in organic and aqueous media

V. 1. In organic media

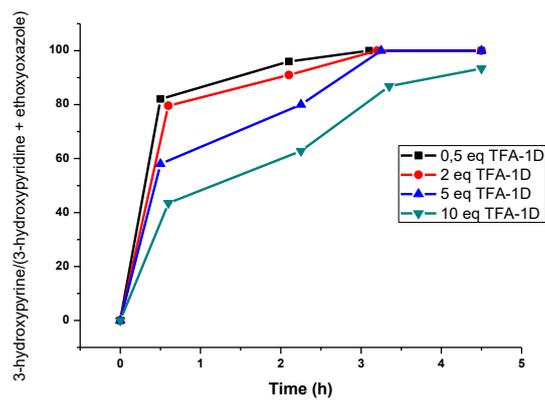
To a solution of 4-benzyl-5-ethoxy-2-methyloxazole **1** (16 mg, 0.08 mmol, 1 equiv) in CDCl₃ (0.50 mL) in a NMR tube, were added successively *N*-methylmaleimide **2a** (20.3 mg, 0.20 mmol, 2.5 equiv) and TFA (0.5; 2; 5 or 10 equiv). The ratio 5-alkoxyoxazole **1**:3-hydroxypyridine **4a** was determined at different time by ¹H NMR analysis based on the comparative integration between the methylic protons of **1** and **4a**. No traces of the intermediate bicyclic adduct was observed under these conditions.



V. 2. In aqueous media

To a solution of 4-benzyl-5-ethoxy-2-methyloxazole **1** (16 mg, 0.08 mmol, 1 equiv) in the corresponding deuterated binary aqueous medium (deuterated DMSO/D₂O, 2:1, v/v, 0.50 mL) in a NMR tube, were added TFA (0.5; 2; 5 or 10 equiv), and *N*-methylmaleimide **2a** (20.3 mg, 0.198 mmol, 2.5 equiv). The ratio 5-alkoxyoxazole **1**:3-hydroxypyridine **4a** was determined by ¹H NMR analysis based on the comparative integration between the methyl protons of **1** and **4a**. No traces of the intermediate bicyclic adduct was observed under these condition.

Partie expérimentale



V. Fluorescence spectroscopy

V.1. Acidity constant (pKa) determination of compound 1

To a solution of compound **1** 10 μM in carbonate buffer 0.1 M pH 10.89, in Hellma, 104F-QS, 10 \times 4 mm, chamber cell volume 3.5 mL, was successively added TFA. The absorbance values at 420 nm were measured for each pH values. The derivate graphic was traced to determine the pKa value.

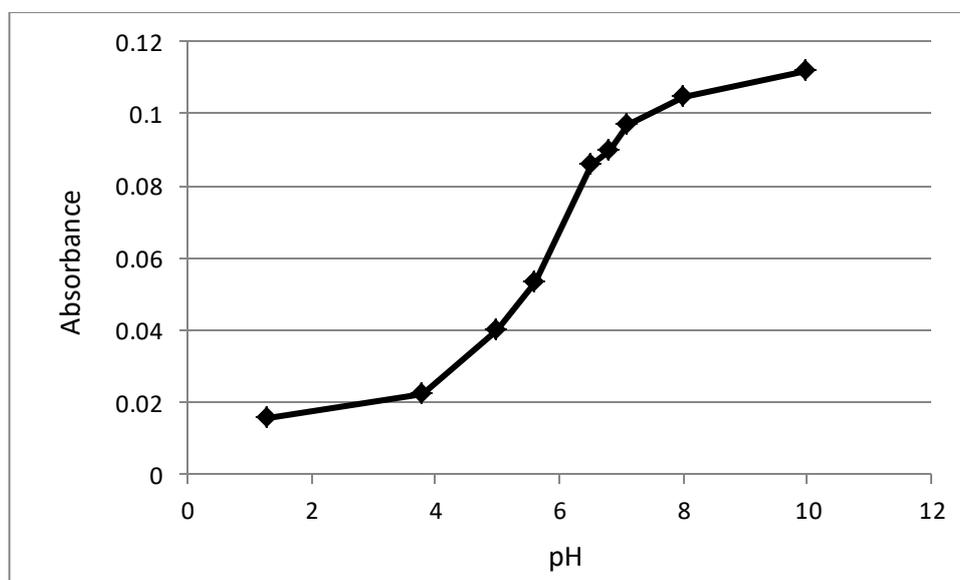


Figure S1: Absorbance value at 420 nm in function of pH

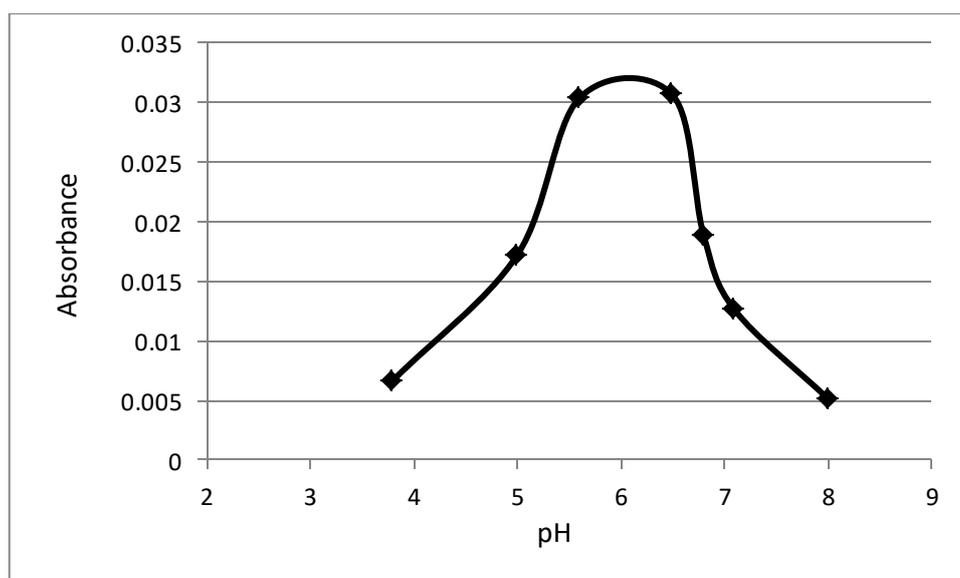


Figure S2: derivate of absorbance value at 420 nm in function of pH

Partie expérimentale

V.2. Energy-transfer efficiency of compound 16

The energy-transfer efficiency of **16** was calculated based on the equation: $E = \{100 \times [1 - (\text{fluorescence intensity of the donor in the FRET cassette})/(\text{fluorescence intensity of the free donor})]\%$, to be 78%. Since the azaphthlimide moiety exhibits a residual absorption at 315 nm (*i.e.*, excitation wavelength used to record the azaphthalimide **6** intensity of the donor), a correction factor ($\times 1.072$) taking into account this contribution to the overall absorption of **6** was applied to the fluorescence intensity of the donor in the FRET cassette, to avoid an overestimation of the E parameter. Finally, a value of 77% was obtained.

V.3. Photophysical properties of compound 1 and 8

a) Photophysical properties of compound 1 in different solvents at 25 °C

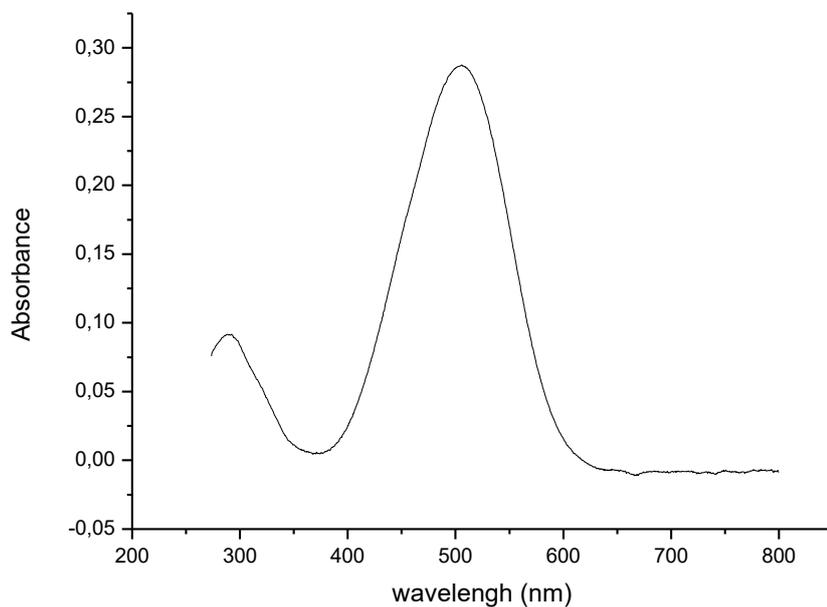
Solvent	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max em}}$ (nm)	Quantum yield
H ₂ O	419	523	7%
MeOH	420	516	10%
EtOH	424	524	15%
DMSO	455	510	7%
DMF	455	512	5%
ACN	345	413	<1%
THF	433	493	33%
DCM	348	425	<1%
Toluene	350	423	1%

b) Photophysical properties of compound 8 at different pH values at 25 °C

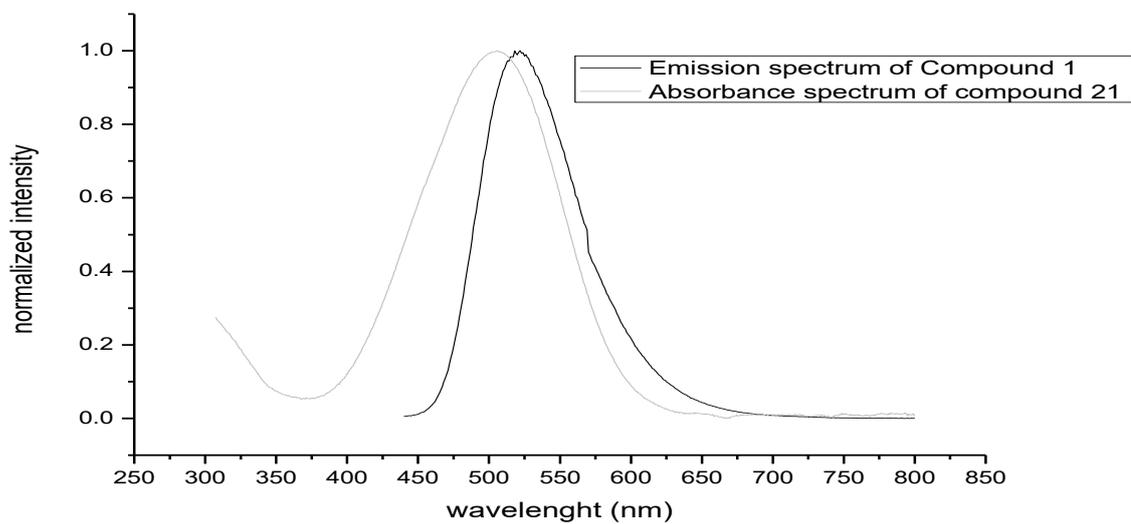
PH	$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max em}}$ (nm)	Quantum Yield
5.6	419	520	6%
6.7 (H ₂ O)	418	523	10%
6.7 (PBS)	419	520	16%
7.0 (PBS)	419	520	17%
7.2 (PBS)	419	520	18%
7.4 (PBS)	420	520	18%

Partie expérimentale

d) Absorbance spectrum of compound 21 in DMSO, recorded at 25 °C



e) Superimposition of absorption and emission ($\lambda_{ex} = 430$ nm) spectrum of compound 21 (in DMSO) and compound 1 (in PBS pH 7.4), respectively recorded at 25 °C.



VI. References

¹. A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, *83*, 2213–2228.

². L.-A., Jouanno, A. Chevalier, N. Sekkat, N. Perzo, H. Castel, A. Romieu, N. Lange, C. Sabot, P.-Y. Renard, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10353–10366. ³. A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.*, **2011**, *83*, 2213–2228.

³. C. Sabot, E. Oueis, X. Brune, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 768–77

2. **Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles**
2 : Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules

Electronic Supplementary Information

Investigation of tetrazine reactivity towards C-nucleophiles: pyrazolone-based modification of biomolecules

Kévin Renault,^a Clément Guillou,^b Pierre-Yves Renard,^a Cyrille Sabot^{**a}

^aNormandie Univ, COBRA, UMR 6014 & FR 3038; Univ Rouen; INSA Rouen; CNRS, 1 rue Tesnière 76821 Mont-Saint-Aignan, Cedex (France).

E-mail : cyrille.sabot@univ-rouen.fr

^bPISSARO Proteomics Platform, IRIB, Normandie University, 76000 Rouen (France).

Table of contents

1) Screening of potential carbanions/enolizable species in PBS 7.4 by fluorescence spectroscopy	306
2) Characterization of compounds	307
2.1) RP-HPLC elution profiles for compounds 1, 7-9	307
2.2) HRMS (ESI-TOF) for compound 9	309
2.3) Spectroscopic data for fluorescein, compound 9 and Lyso-Fluo	310
3) SDS-PAGE analysis of native lysozyme and fluorescein-modified lysozyme Lyso-Fluo..	312
4) RP-HPLC monitoring of pyrazolone-tetrazine chemical ligation.....	313
5) Tests of stability	314
5.1) Study of stability of intermediate 4 in the presence of BSA.....	314
5.2) Study of stability of by-product 6 in the presence of BSA.....	315
5.3) Study of stability of product 5 in the presence of BSA	316

Partie expérimentale

1) Screening of potential carbanions/enolizable species in PBS 7.4 by fluorescence spectroscopy

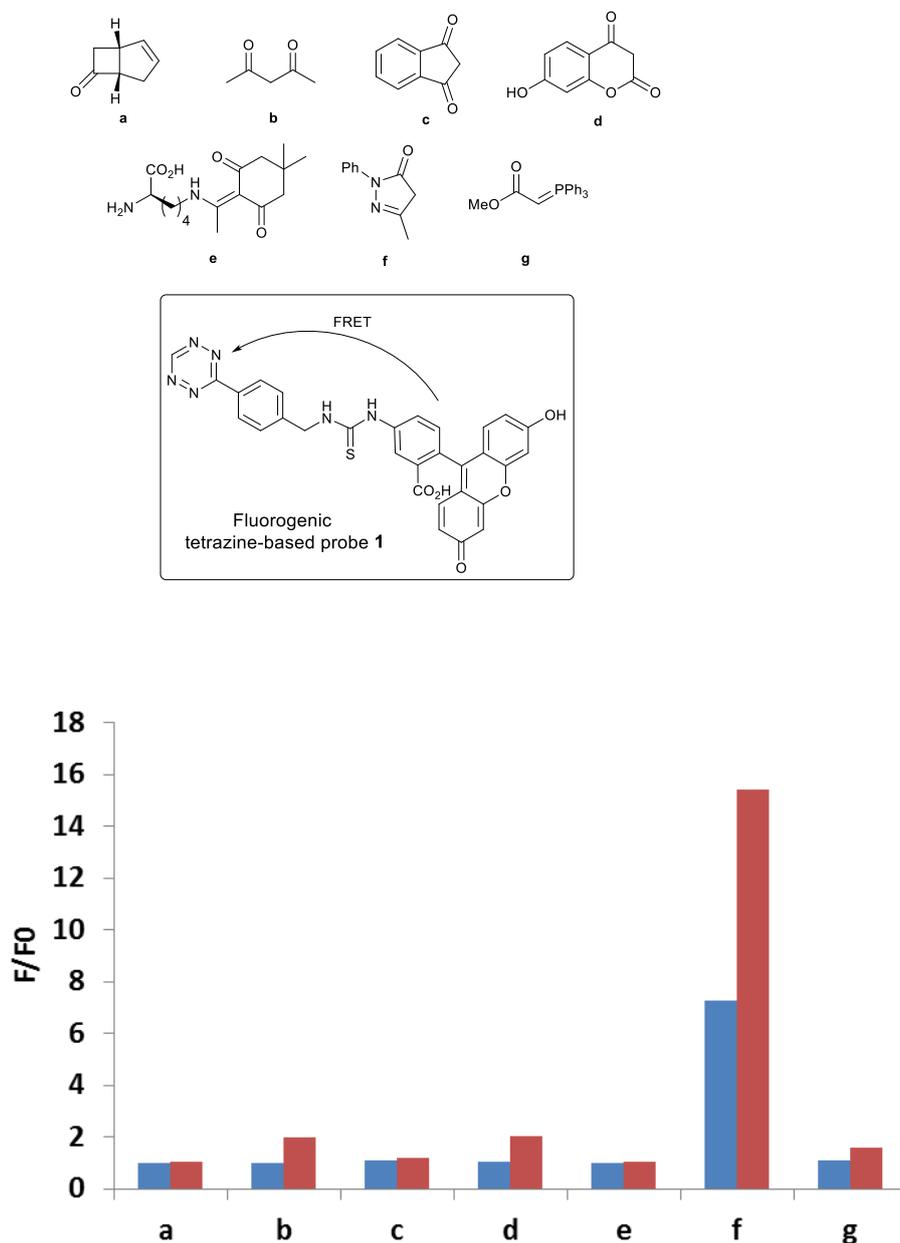
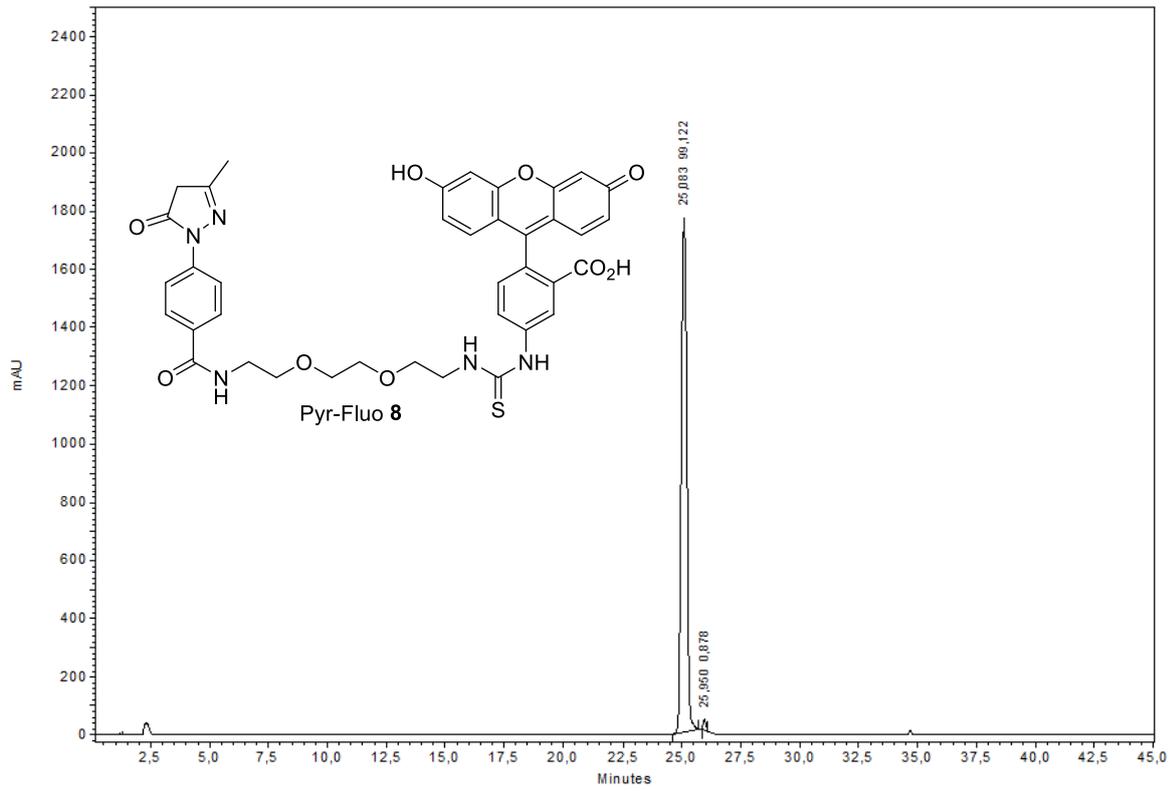


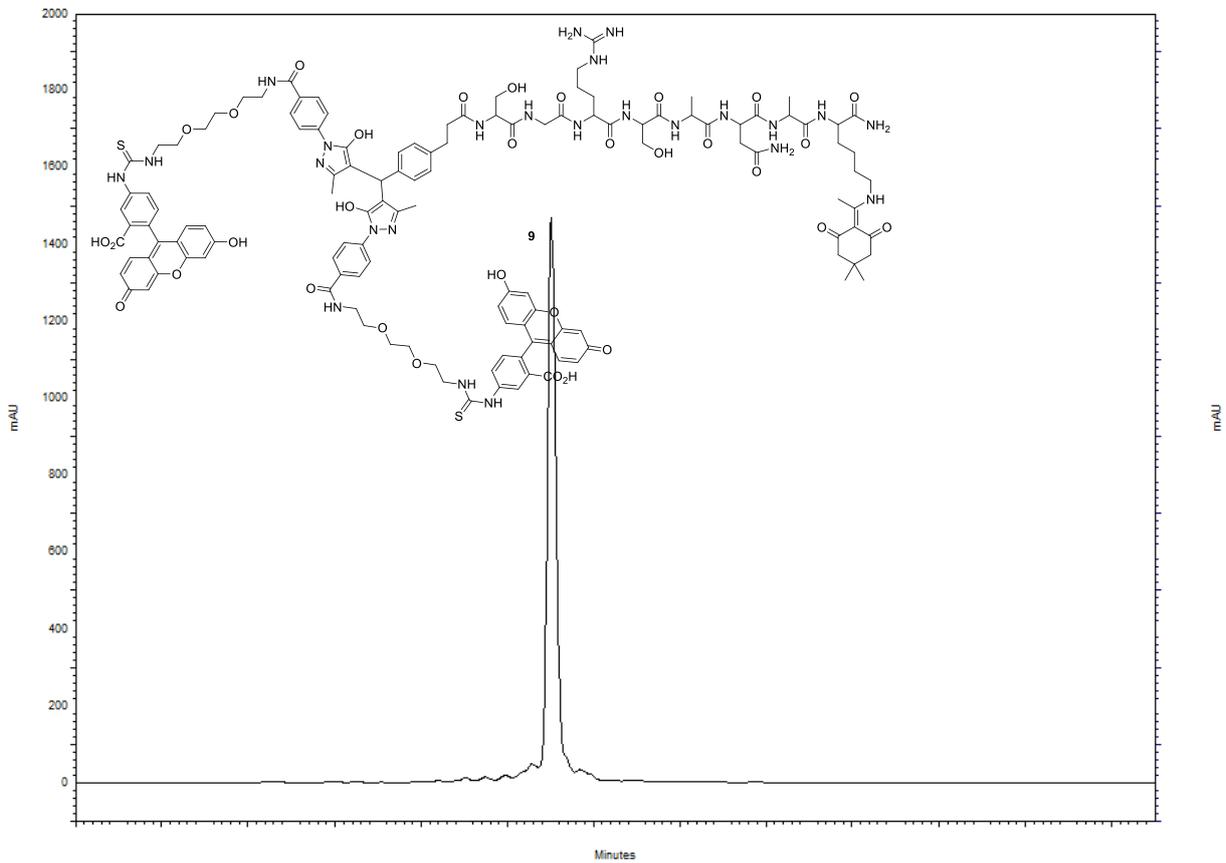
Figure S1: Screening study: fluorescence responses of tetrazine-based probe 1 (2.5 mM) at 2 (blue) and 60 min (red) after the addition of carbanions/enolizable species (10 mM, 4 equiv.) in PBS 7.4 at 25 °C at λ_{ex} 470 nm and λ_{em} 520 nm.

Partie expérimentale

RP-HPLC elution profile of Pyr-Fluo 8 (recorded in "Max Plot" mode)



RP-HPLC elution profile of modified peptide 9 (recorded at 330 nm)



2.2) HRMS (ESI-TOF) for compound 9

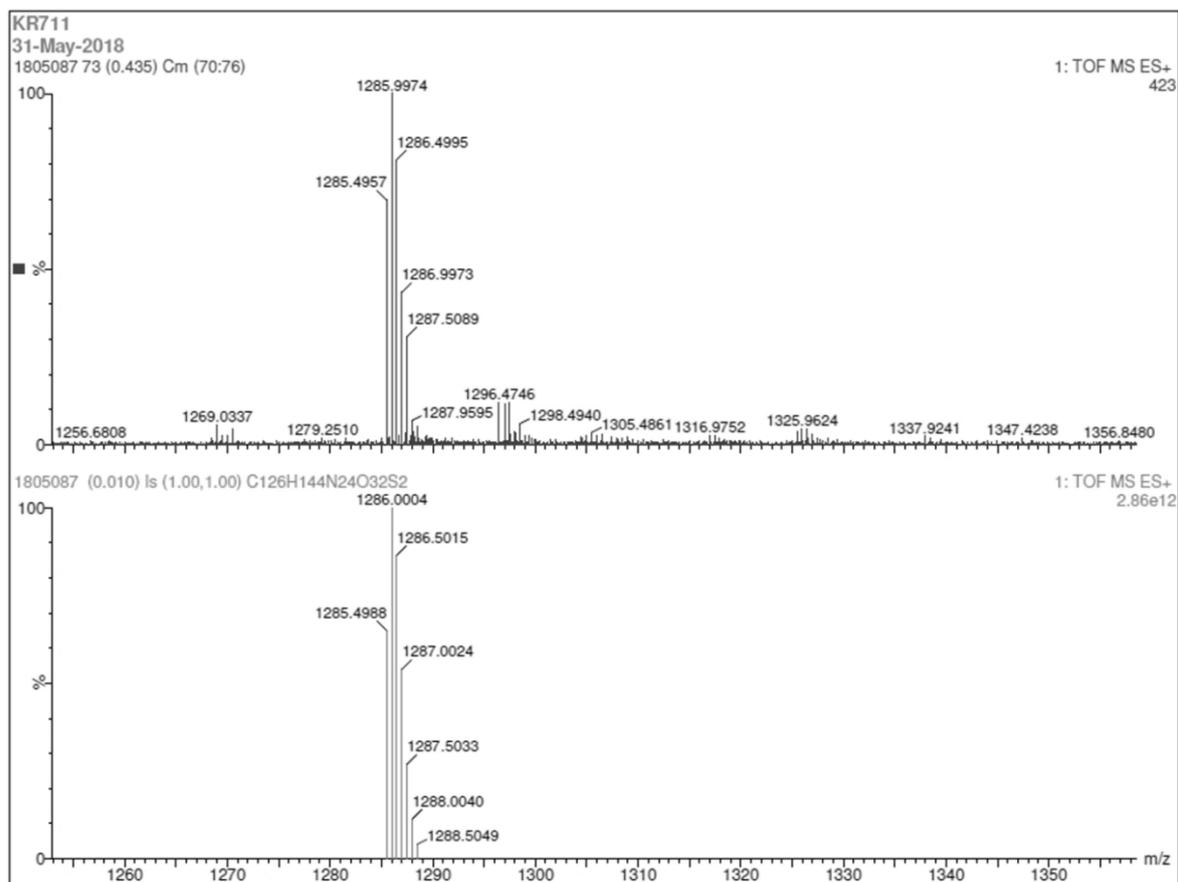
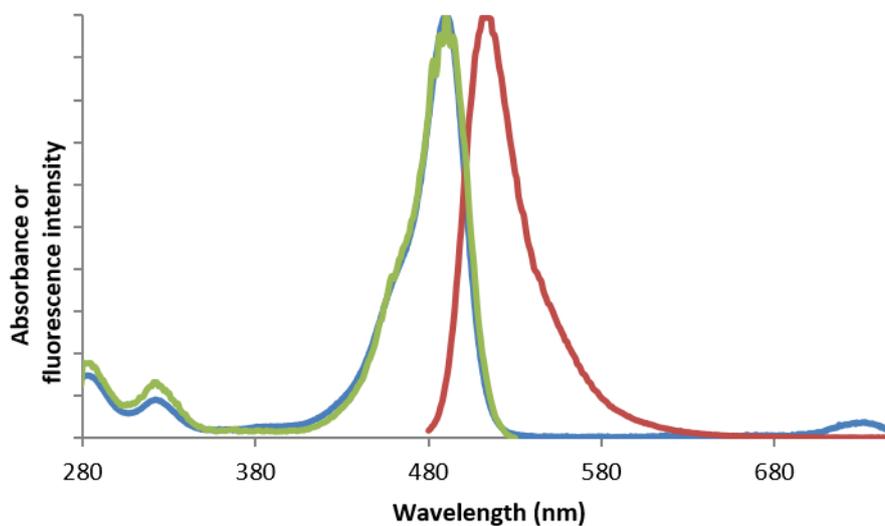
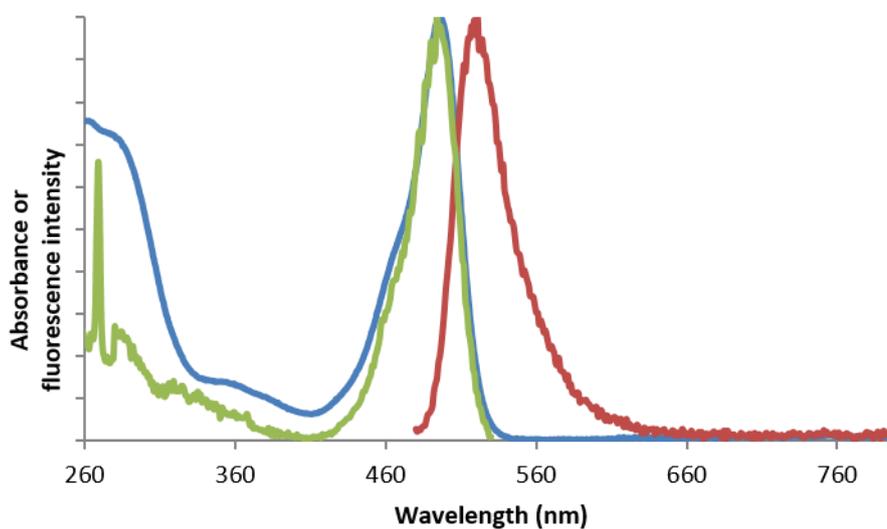


Figure S2: HRMS (ESI-TOF) exact mass calcd for $C_{126}H_{146}N_{24}O_{32}S_2$ m/z 1285.4988 (in blue); found m/z 1285.4957 (in red) $[M+2H]^{2+}$

2.3) Spectroscopic data for fluorescein, compound 9 and Lyso-Fluo

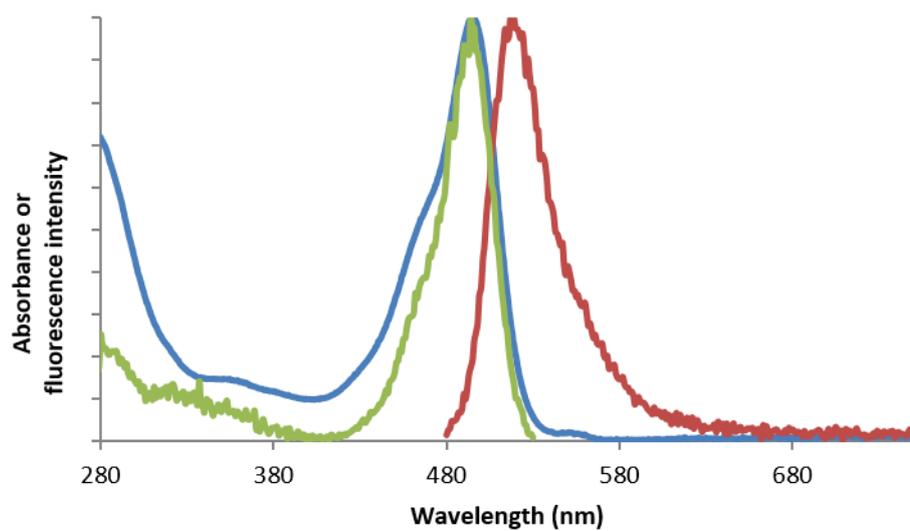


Normalized absorption (in blue), emission (in red, λ_{ex} 470 nm) and excitation (in green, λ_{em} 540 nm) spectra of fluorescein in PBS (0.1 M, pH 7.4) at 25 °C.



Normalized absorption (in blue), emission (in red, λ_{ex} 470 nm) and excitation (in green, λ_{em} 540 nm) spectra of peptide 9 in PBS (0.1 M, pH 7.4) at 25 °C.

Partie expérimentale



Normalized absorption (in blue), emission (in red, λ_{ex} 470 nm) and excitation (in green, λ_{em} 540 nm) spectra of Lyso-Fluo in PBS (0.1 M, pH 7.4) at 25 °C.

3) SDS-PAGE analysis of native lysozyme and fluorescein-modified lysozyme Lyso-Fluo

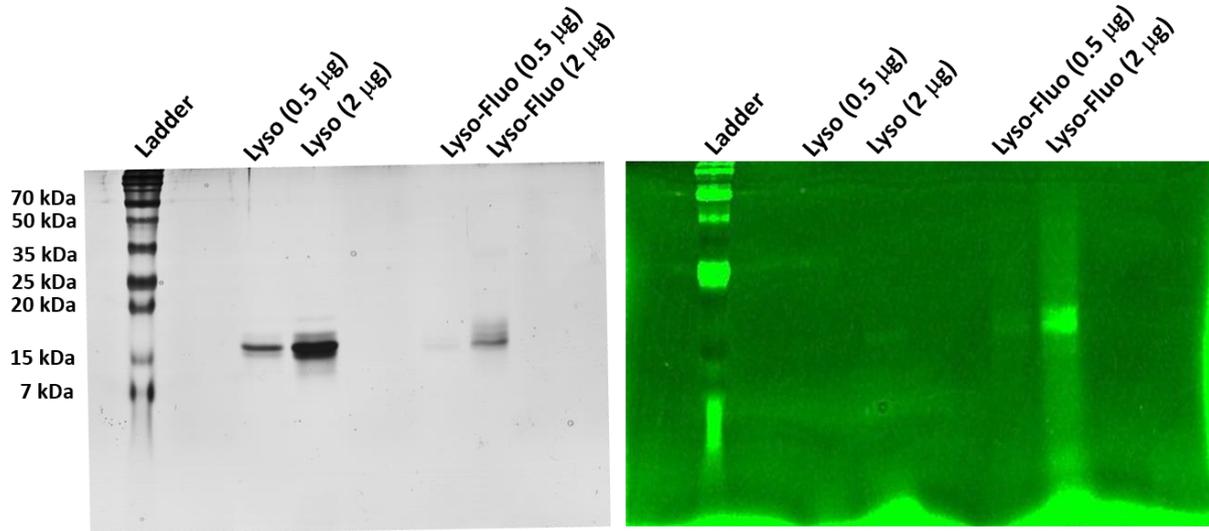
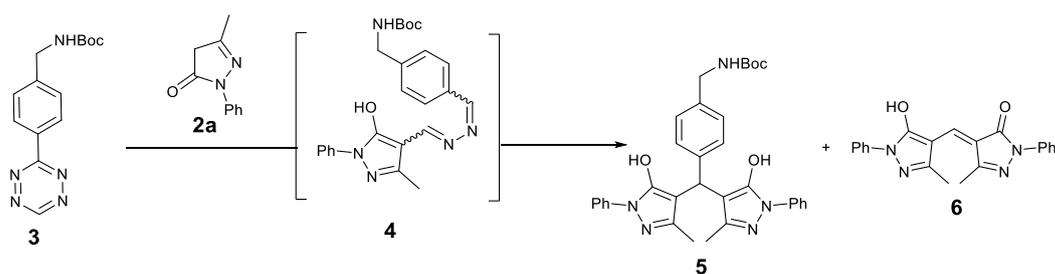
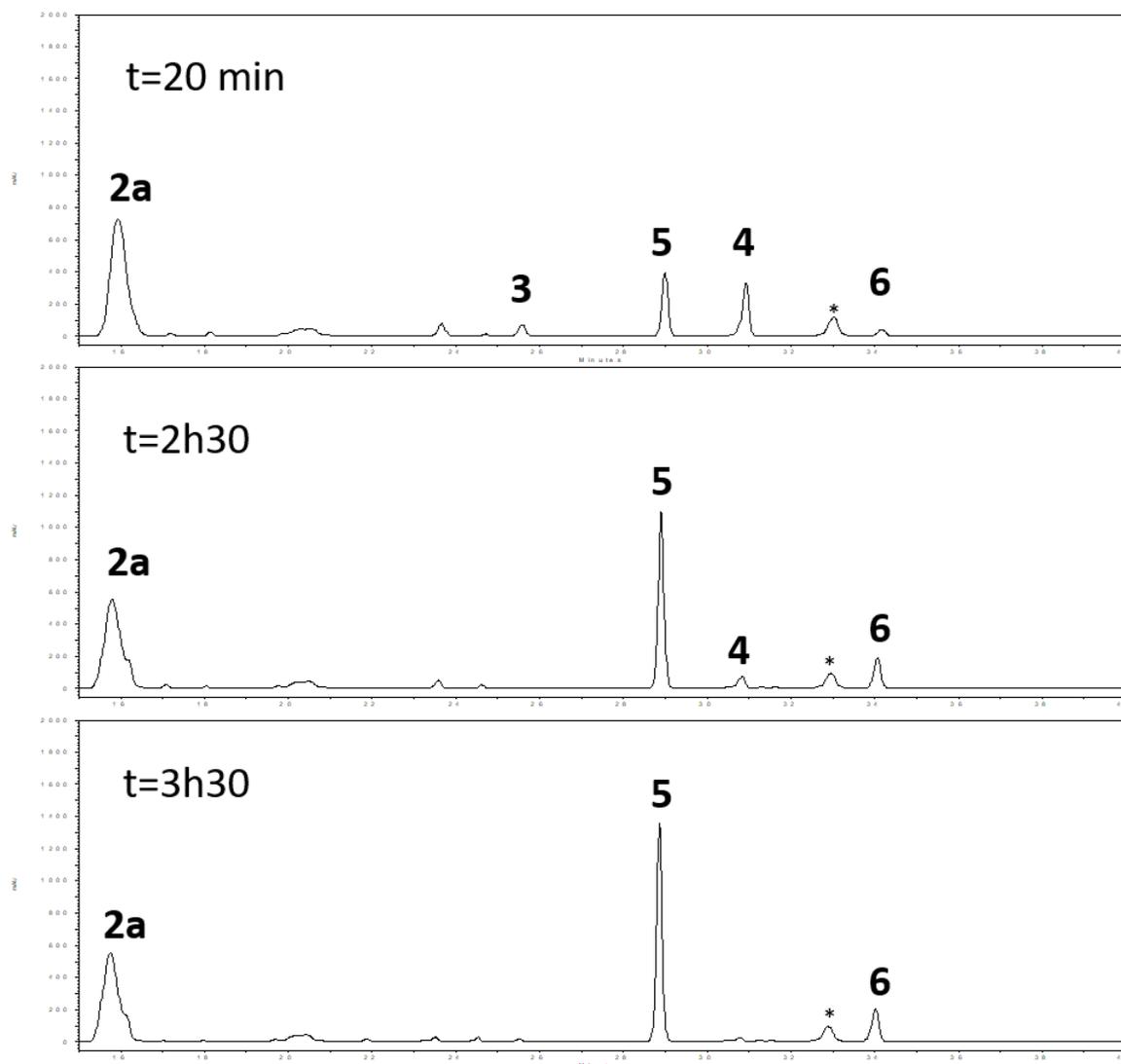


Figure S3: SDS-PAGE analysis of native h-Lyso and fluorescein-modified h-Lyso (left: silver nitrate staining; right: fluorescence detection).

4) RP-HPLC monitoring of pyrazolone-tetrazine chemical ligation



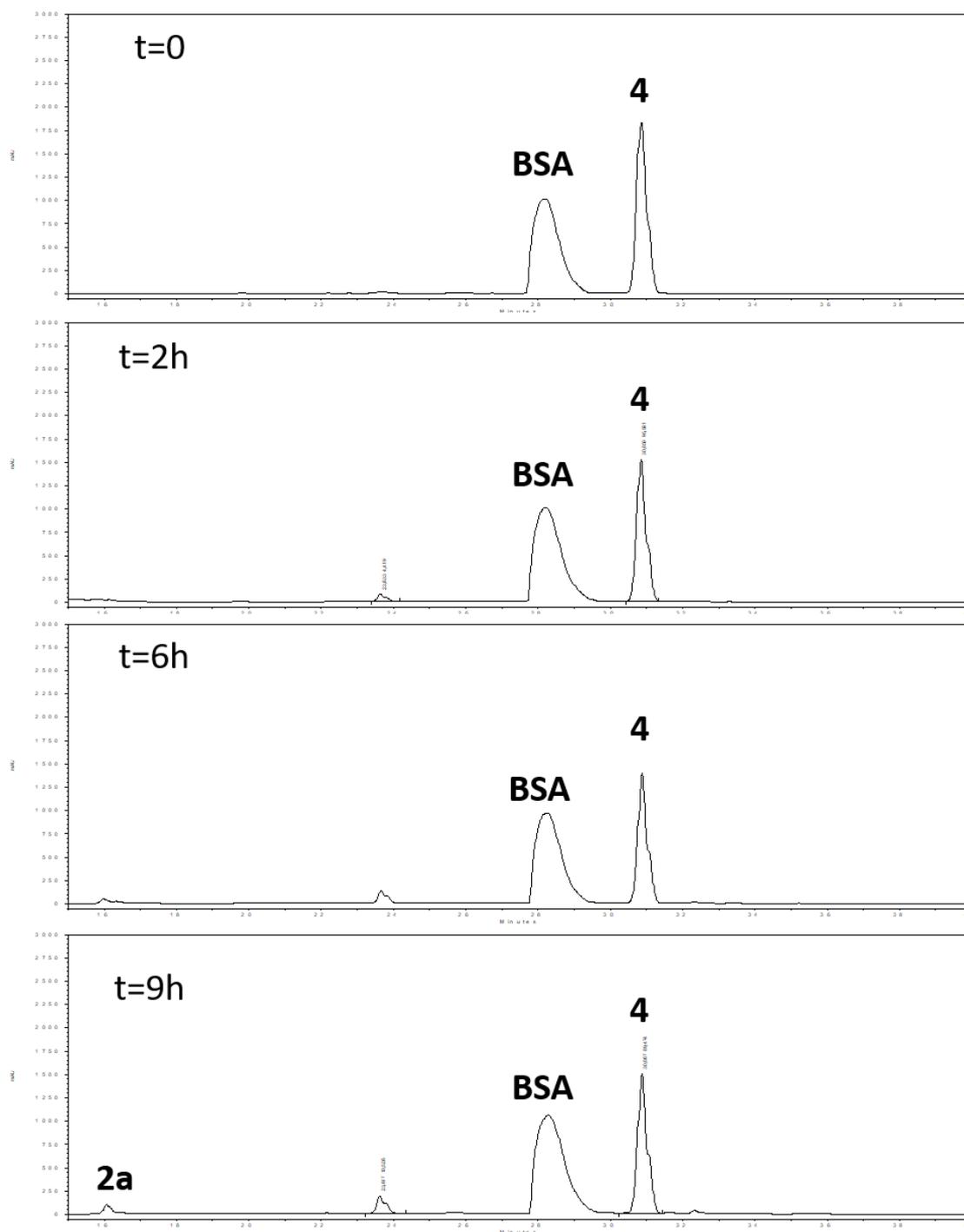
To a solution of tetrazine **3** (25.6 mg, 0.09 mmol, 1 equiv.) in a 1.7 mL solution of ACN/PBS pH 7.4 (1:0.7, v/v) was added N-phenylpyrazolone **2a** (77.6 mg, 0.45 mmol, 5 equiv.). The reaction was stirred for 3 h 30 at room temperature. A sample of the reaction mixture was collected for HPLC analysis at t=20 min, 2 h 30 and 3 h 30 (System QC, recorded in "Max Plot" mode, * contamination from TFA).



5) Tests of stability

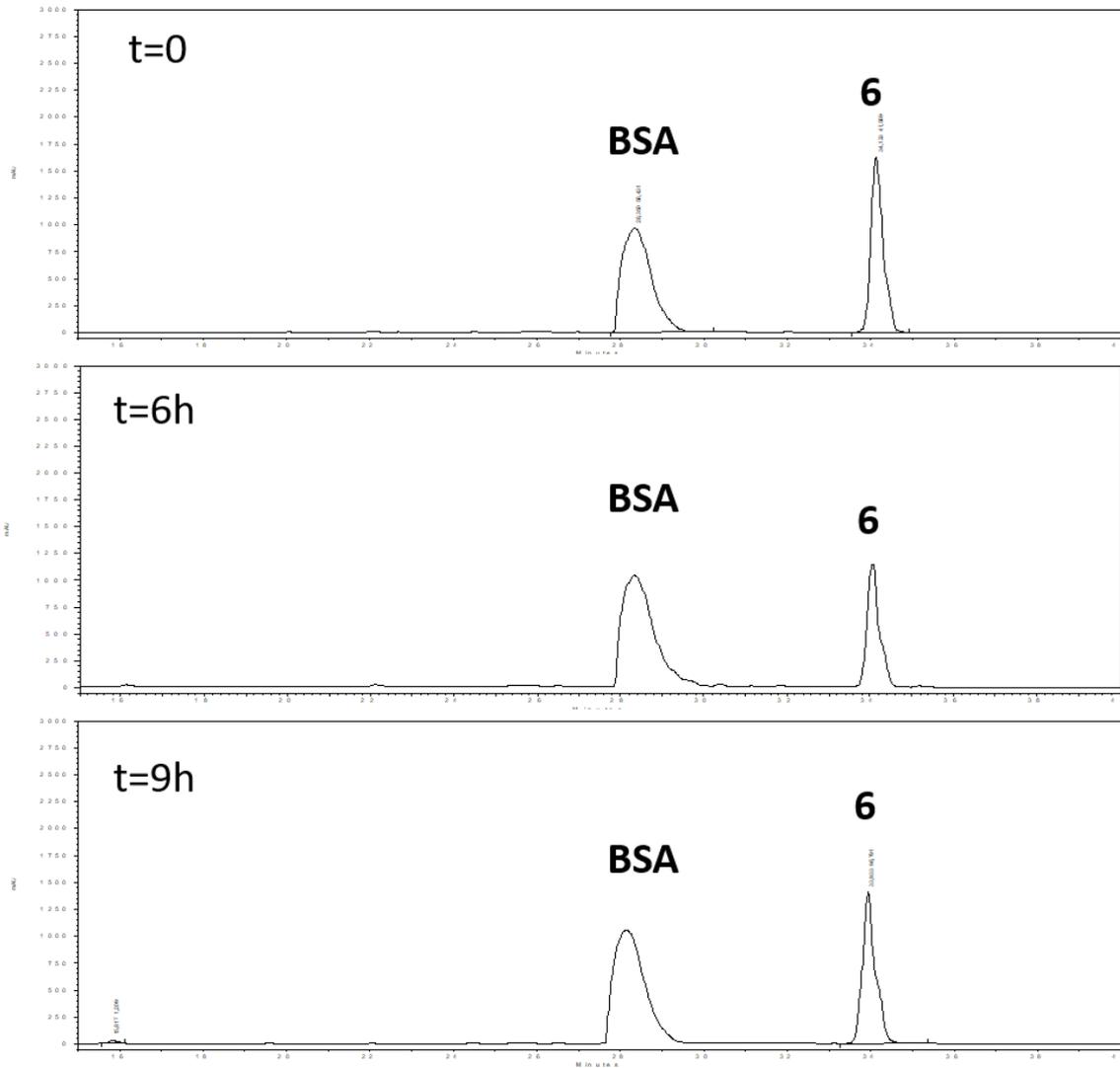
5.1) Study of stability of intermediate 4 in the presence of BSA

To a solution of bovine serum albumin (3.0 mg, 0.045 μmol) in PBS (0.1 M, pH 7.4, 900 μL) placed in an Eppendorf tube was added 100 μL of a stock solution of 4 (0.6 mg, 1.38 μmol , 500 μL acetonitrile). The resulting mixture was incubated at 37 °C. A sample of the reaction mixture was collected for HPLC analysis at t=0, 2, 6 and 9h (System QC, recorded in "Max Plot" mode).



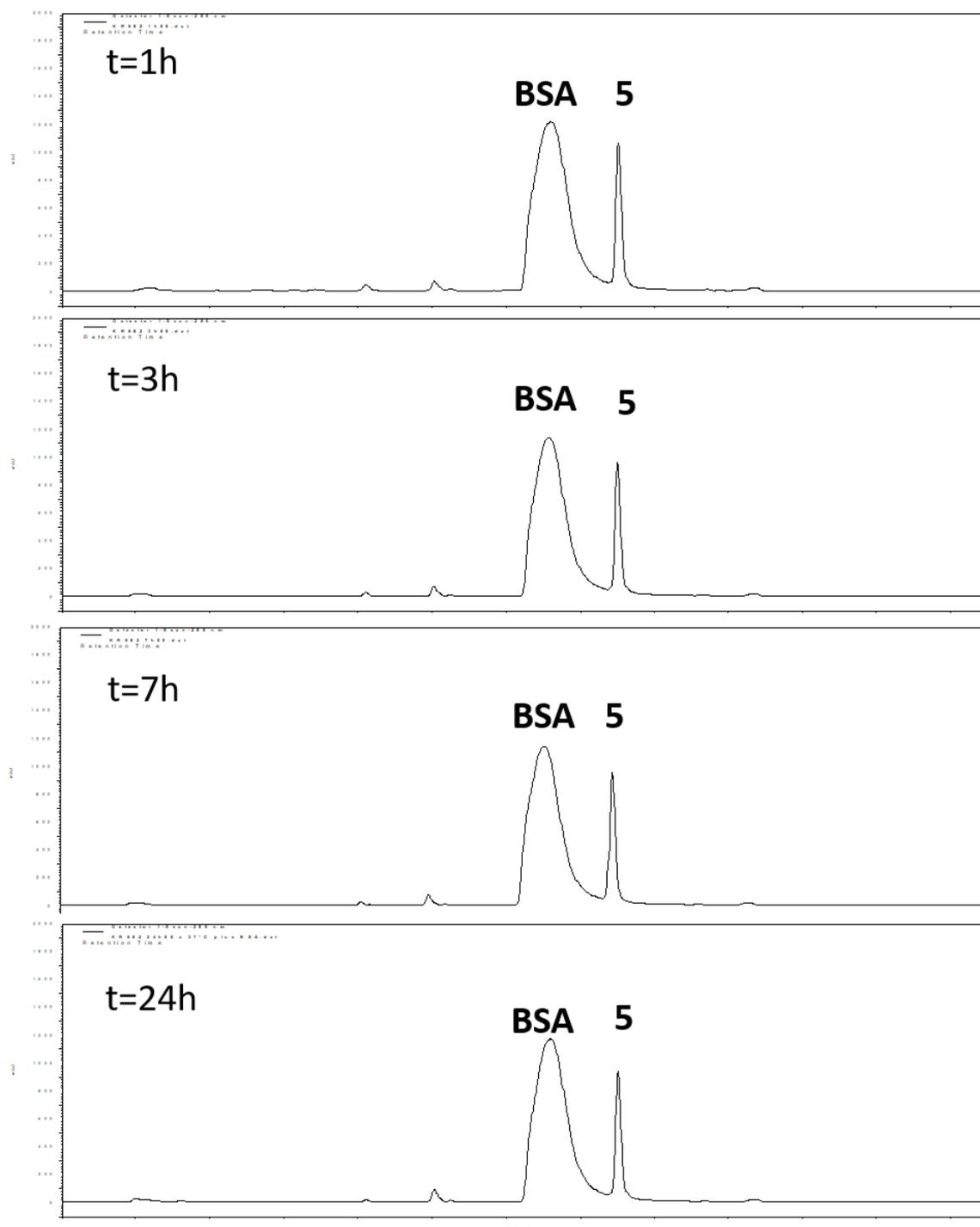
5.2) Study of stability of by-product 6 in the presence of BSA

To a solution of bovine serum albumin (3.0 mg, 0.045 μmol) in PBS (0.1 M, pH 7.4, 900 μL) placed in an Eppendorf tube was added 100 μL of a stock solution of 6 (0.5 mg, 1.36 μmol , 500 μL acetonitrile). The resulting mixture was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. A sample of the reaction mixture was collected for HPLC analysis at t=0, 6 and 9h (System QC, recorded in "Max Plot" mode).



5.3) Study of stability of product 5 in the presence of BSA

To a solution of bovine serum albumin (14.5 mg, 0.220 mmol) in PBS (0.1 M, pH 7.4, 900 μ L) placed in an Eppendorf tube was added 100 μ L of a stock solution of 5 (0.625 mg, 2.2 μ mol, 500 μ L acetonitrile). The resulting mixture was incubated at 37 °C. A sample of the reaction mixture was collected for HPLC analysis at t=1, 3, 24h (System QC, recorded at 280 nm).



Partie expérimentale

3. **Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles 3: Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols**

SUPPORTING INFORMATION

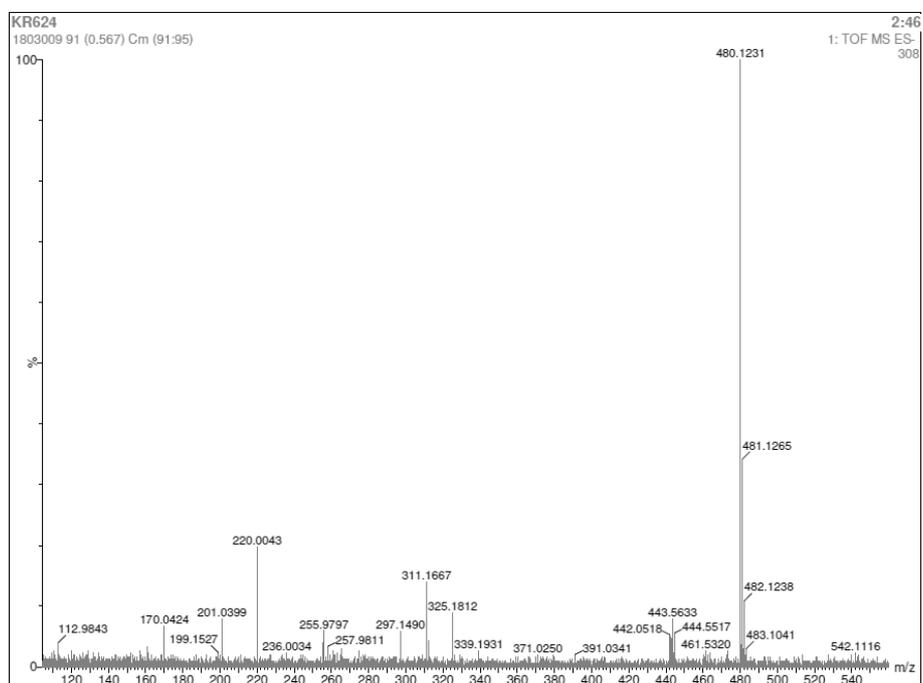
Title : Fast-Responsive and Water-Soluble Pyrazolone-based Fluorogenic Probe for the Detection of Biothiols

Authors: Kévin Renault, Pierre-Yves Renard, and Cyrille Sabot*

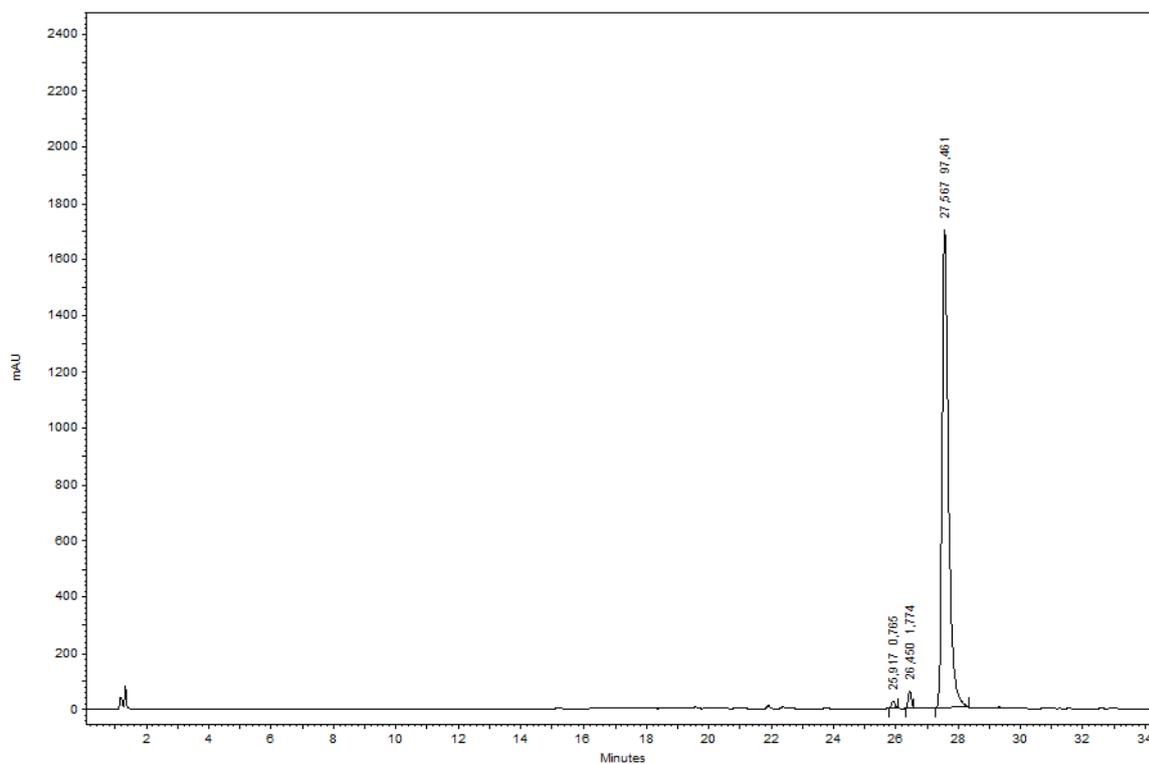
I. Mass spectrum and RP-HPLC chromatogram of compound 1.....	320
I.1. HRMS spectrum of compound 1	320
I.2. RP-HPLC chromatogram of compound 1.....	320
II. Absorbance and fluorescence spectroscopic data of the probe 1.....	321
II.1. UV/Vis absorption spectra of the probe 1 upon addition of increasing quantities of biothiols 321	
II.2. Fluorescence response of the probe 1 upon addition of increasing quantities of biothiols....	323
II.3. Fluorescence response of the probe 1 towards biologically relevant nucleophiles.....	325
II.4. Photophysical properties of probe 1 in presence of biothiols in PBS pH 7.40 at 25 °C.	331
II.5. Study of pH-dependence fluorescence change of probe 1 in the presence of biothiols.....	332
III. Detection limit of probe 1	335
IV. Fluorescence mechanism of probe 1	340
IV.1. NMR study of the reaction of probe 1 with NAC	340
IV.2. Fluorescence and RP-HPLC study of the reversibility of the thiol-Michael adduct.....	340

I Mass spectrum and RP-HPLC chromatogram of compound 1

I.1. HRMS spectrum of compound 1

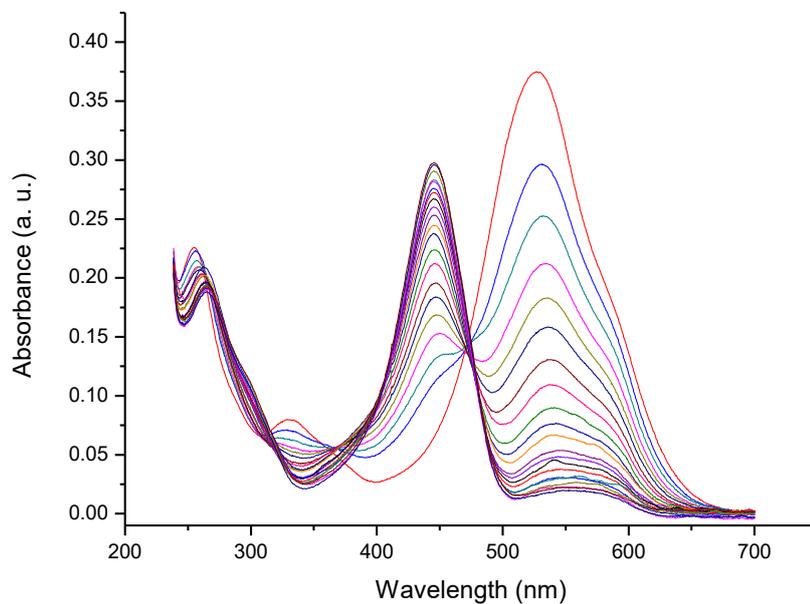


I.2. RP-HPLC chromatogram of compound 1

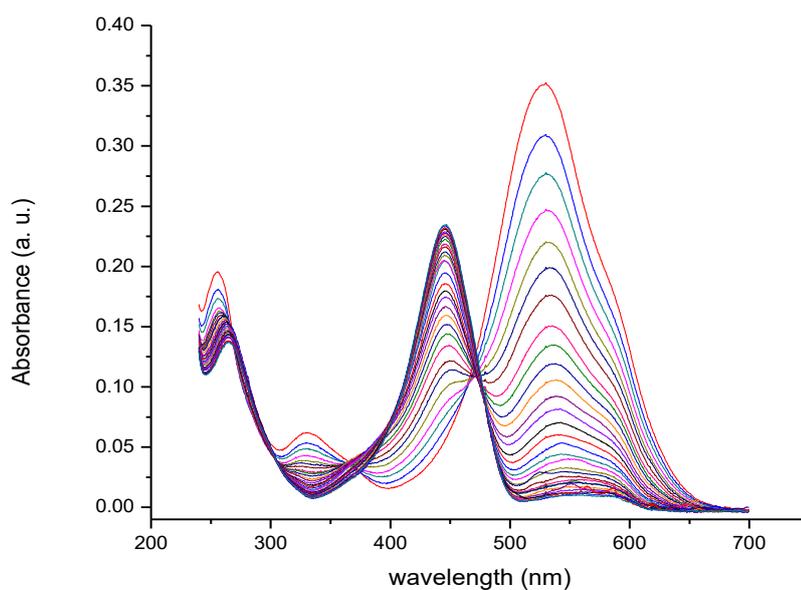


II. Absorbance and fluorescence spectroscopic data of the probe 1

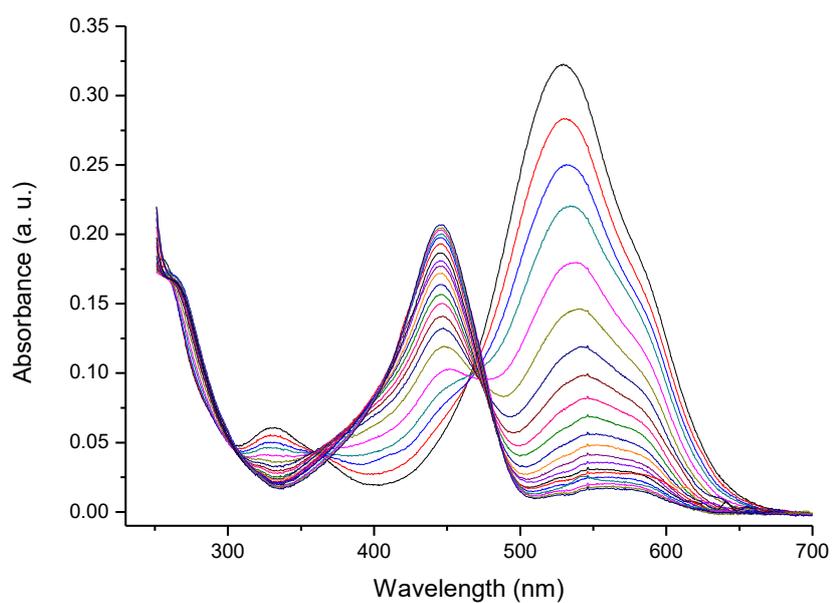
II.1. UV/Vis absorption spectra of the probe 1 upon addition of increasing quantities of biothiols



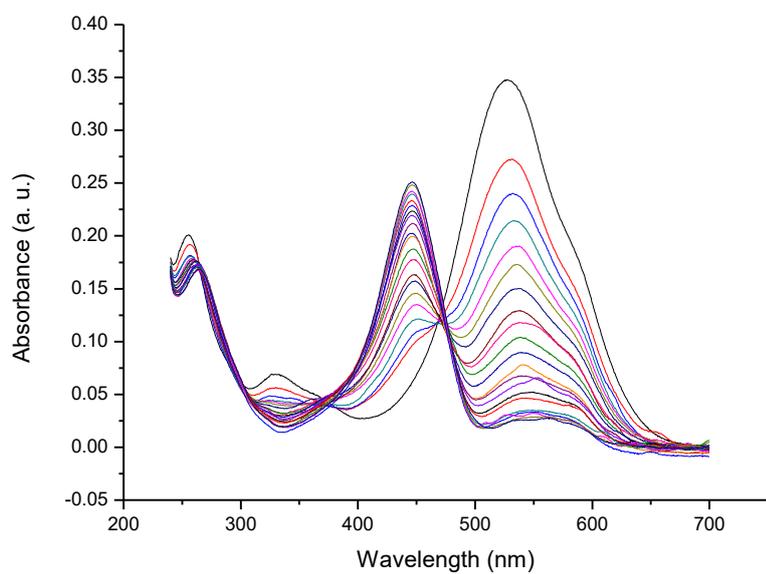
Probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of GSH (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$.



Probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of NAC (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$.

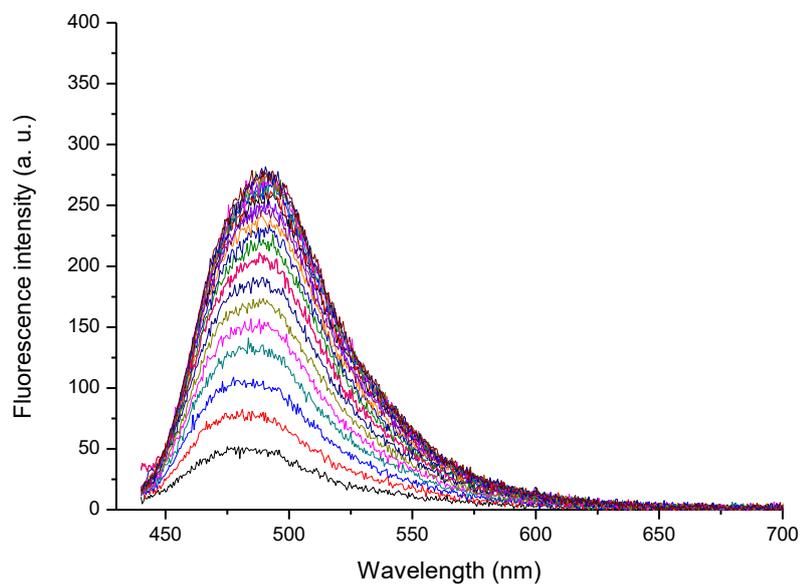


Probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of Hcy (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$.

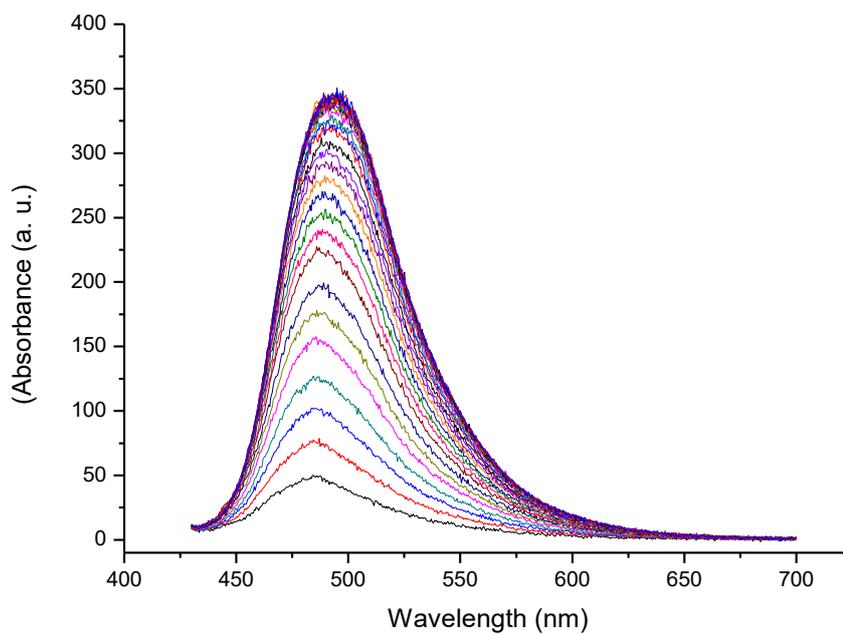


Probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of Cys (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$.

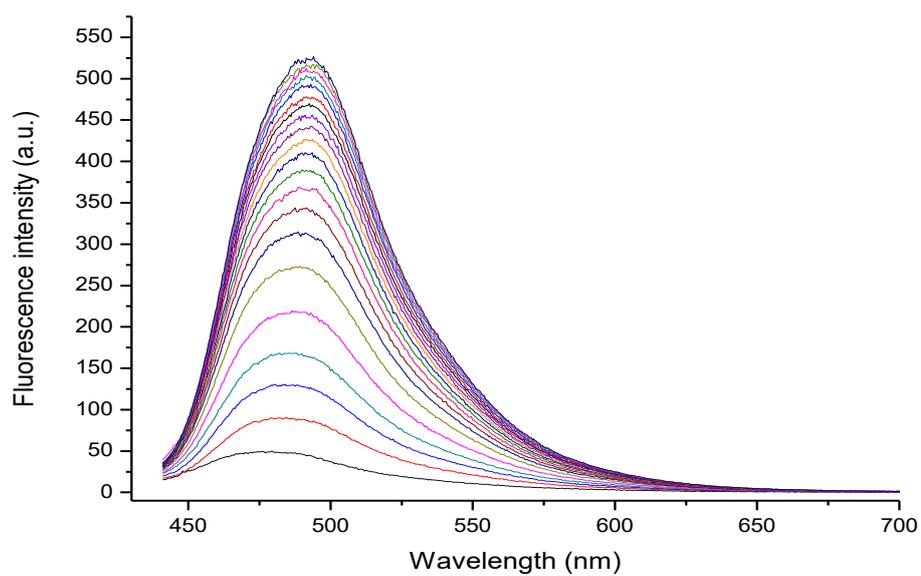
II.2. Fluorescence response of the probe 1 upon addition of increasing quantities of biothiols



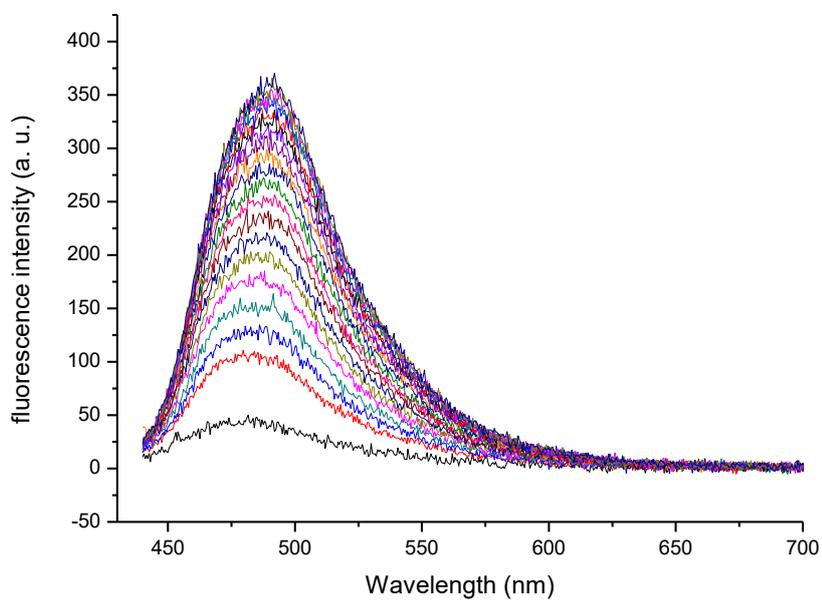
Fluorescence response of the probe 1 (10 μM) upon addition of increasing quantities of GSH (0.1 equiv. from 0 to 3 eq), in PBS 7.40 at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



Fluorescence response of the probe 1 (10 μM) upon addition of increasing quantities of NAC (0.1 equiv. from 0 to 3 eq), in PBS 7.40 at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.

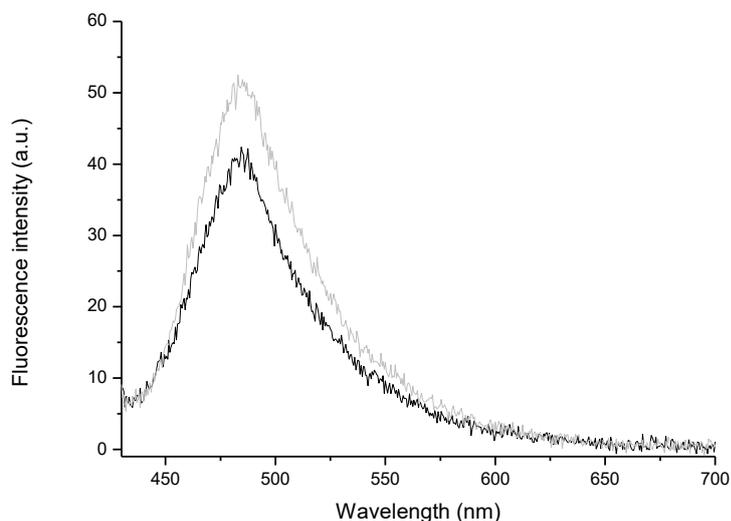


Fluorescence response of the probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of Hcy (0.1 equiv. from 0 to 3 eq), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$, at λ_{ex} 410 nm.

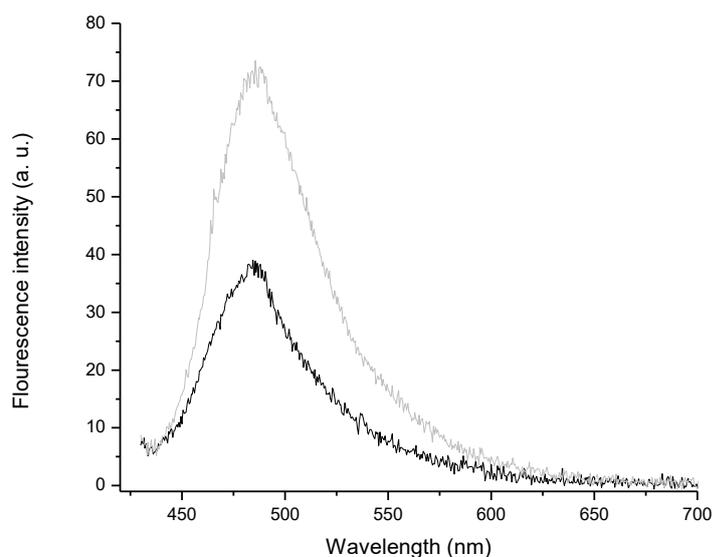


Fluorescence response of the probe **1** (10 μM) upon addition of increasing quantities of Cys (0.1 equiv. from 0 to 3 equiv.), in PBS 7.40 at 25 $^{\circ}\text{C}$, at λ_{ex} 410 nm.

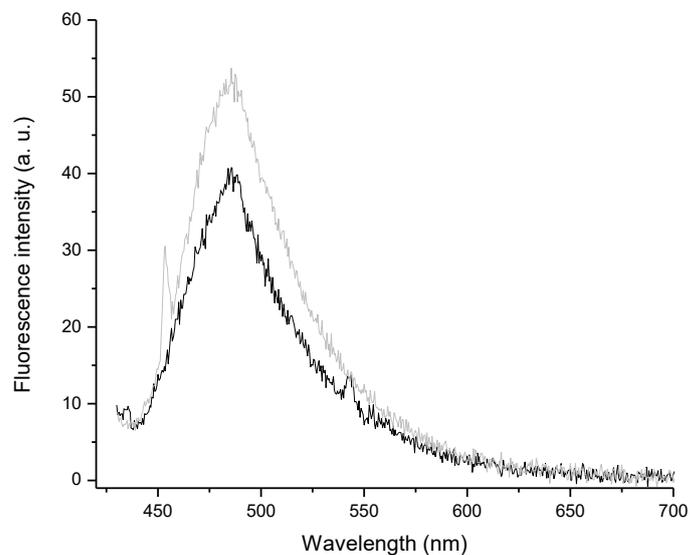
II.3. Fluorescence response of the probe 1 towards biologically relevant nucleophiles



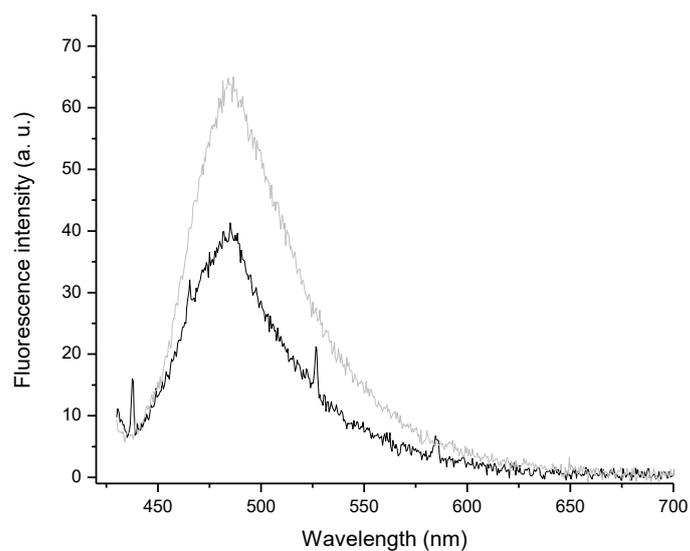
Fluorescence responses of the probe **1** (10 μ M) at t=0 (in black) and t=1 min (in grey) recorded in PBS pH 7.4, at 25 $^{\circ}$ C, at λ_{ex} 410 nm.



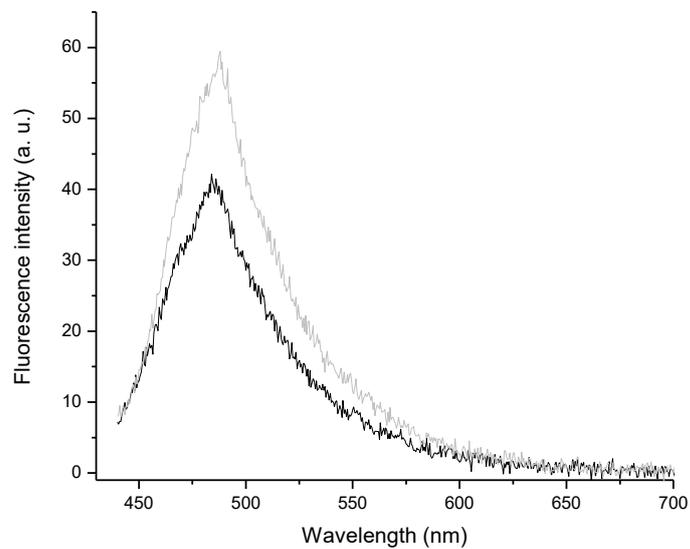
Fluorescence responses of probe **1** (10 μ M) one minute after the addition of Met (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 $^{\circ}$ C, at λ_{ex} 410 nm.



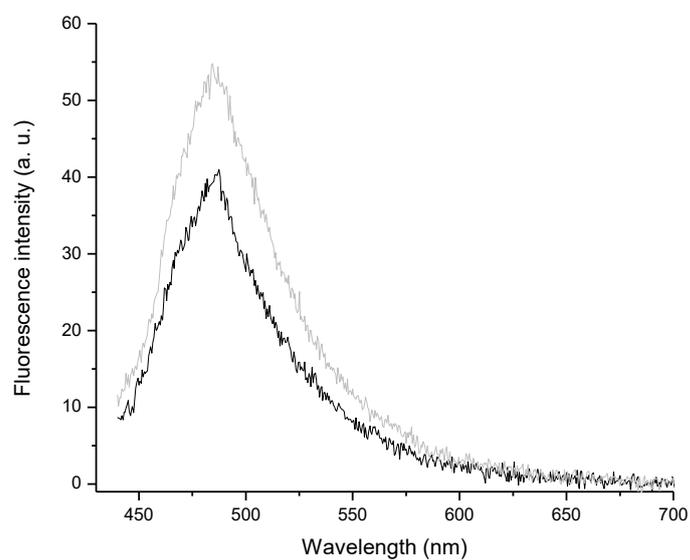
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Lys (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 $^{\circ}\text{C}$, at λ_{ex} 410 nm.



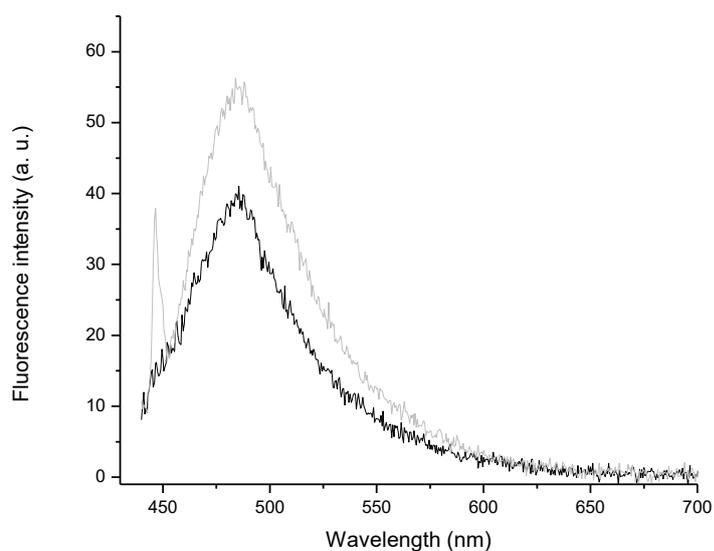
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Gly (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 $^{\circ}\text{C}$, at λ_{ex} 410 nm.



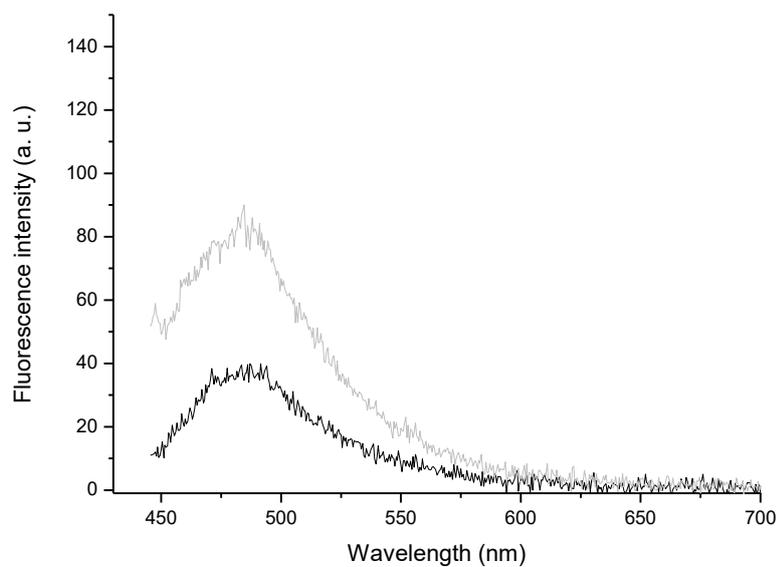
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of His (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



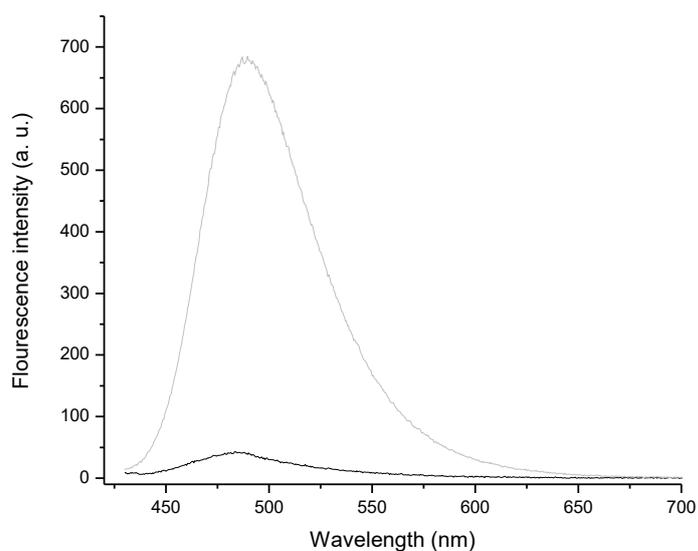
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Ser (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



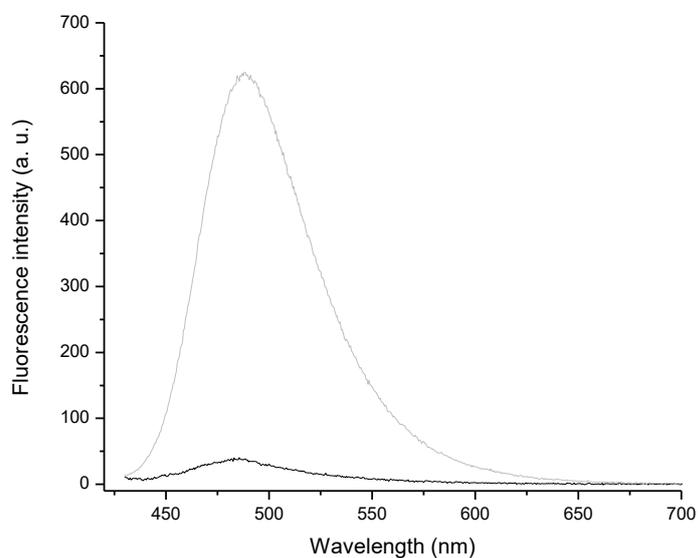
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Tyr (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



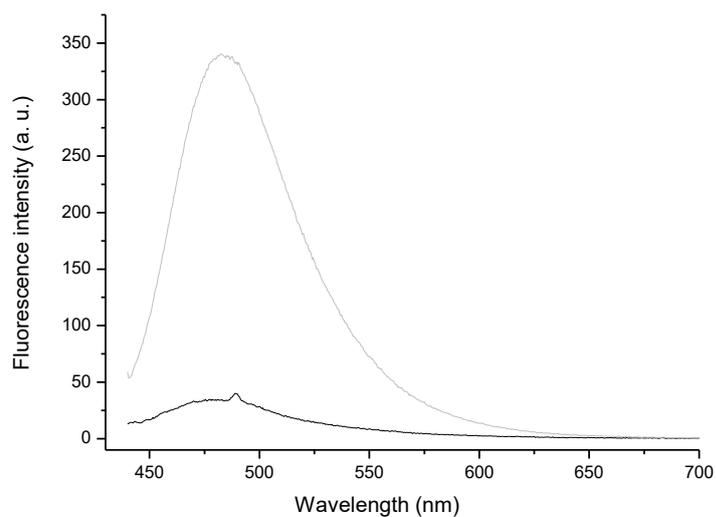
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of human lysozyme (10 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



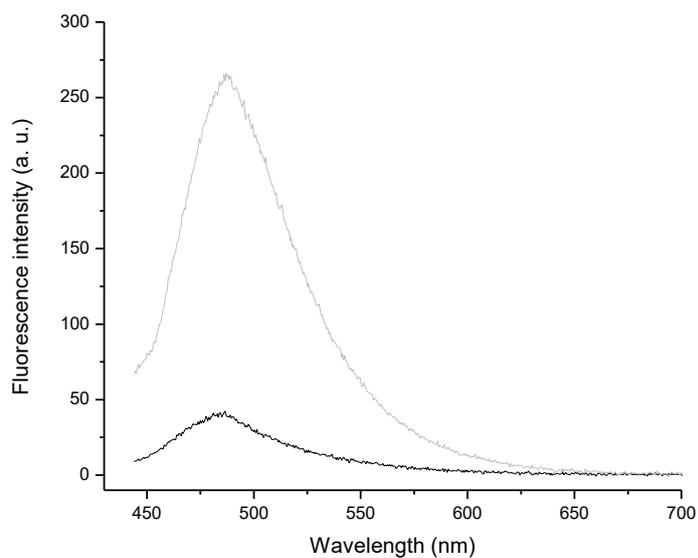
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of GSH (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of NAC (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Hcy (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.



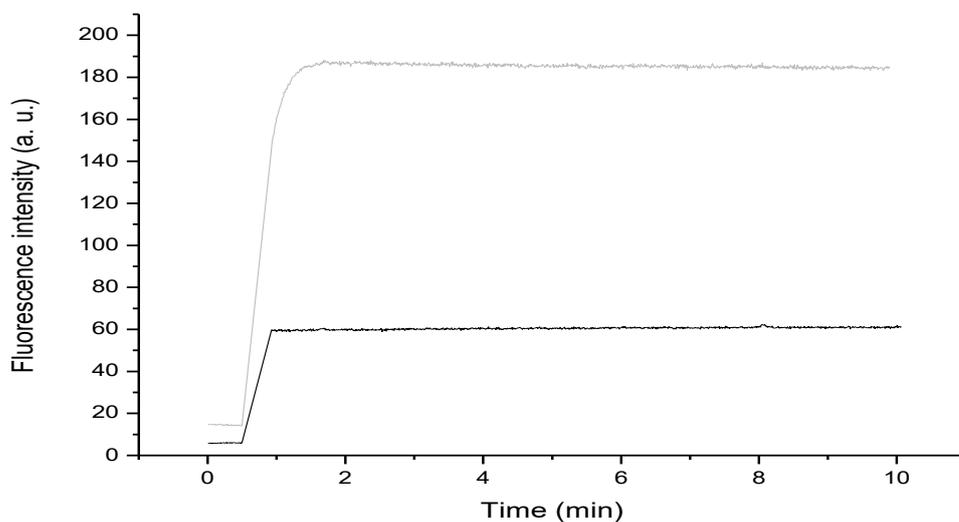
Fluorescence responses of probe **1** (10 μM) one minute after the addition of Cys (50 equiv.) recorded in PBS pH 7.4, at 25 °C, at λ_{ex} 410 nm.

II.4. Photophysical properties of probe 1 in presence of biothiols in PBS pH 7.40 at 25 °C.

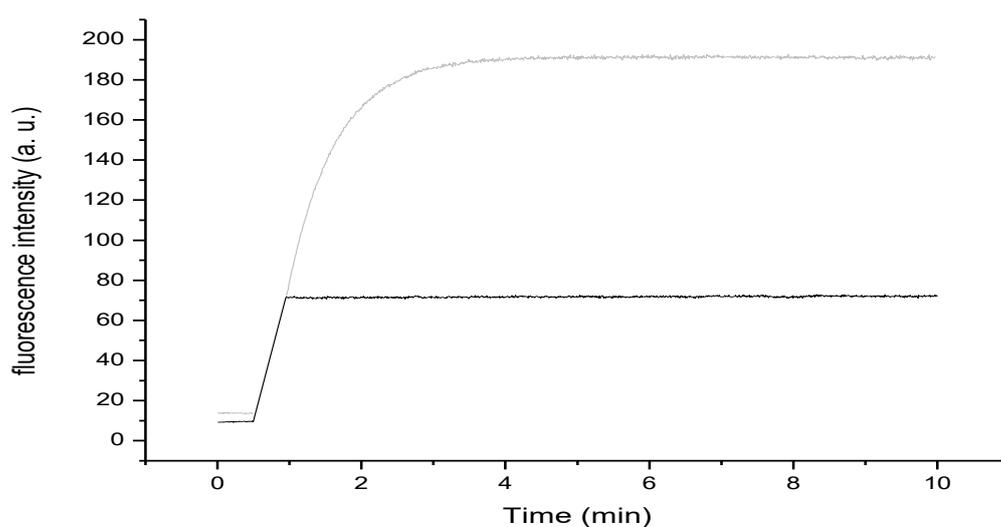
Compound	λ_{abs} (nm) ^[b]	λ_{em} (nm) ^[b]	ϵ ^[c]	Q.E. ^[d]	Detection limit (nM) at pH 7.40	Detection limit (nM) at pH 5.01
1	528	480	-	-	-	-
1 + GSH	446	490	16.42	93.9 %	38	159
1 + NAC	446	488	15.83	93.7 %	33	43
1 + Hcy	446	485	8.40	88.01 %	19	147
1 + Cys	446	487	6.53	84.7 %	36	198

[a] All measurements were performed at 25 °C in PBS buffer 7.4 with 50 equiv. of analytes. [b] Maxima of the main absorption (λ_{abs}) and emission (λ_{em}) bands. [c] Fluorescence exaltation. [d] Quenching efficiency.

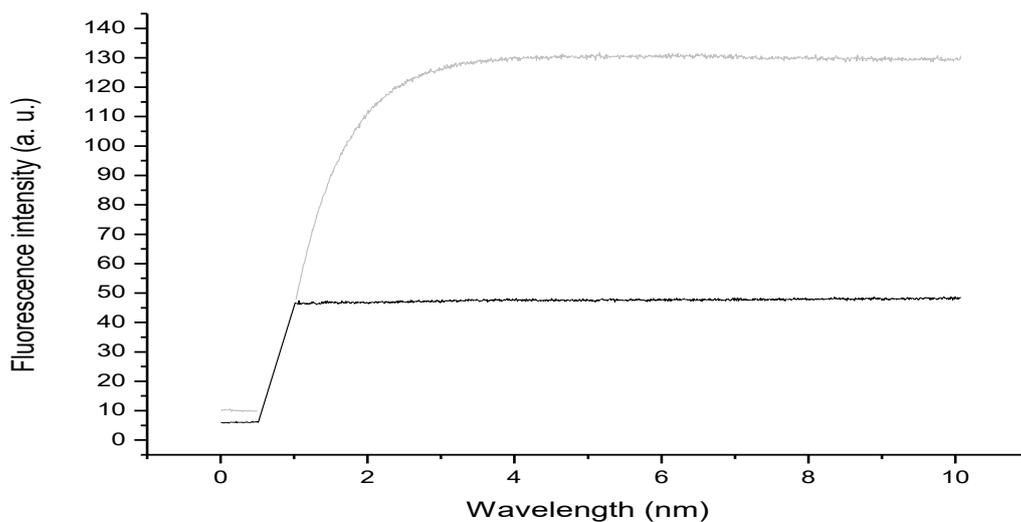
II.5. Study of pH-dependence fluorescence change of probe 1 in the presence of biothiols



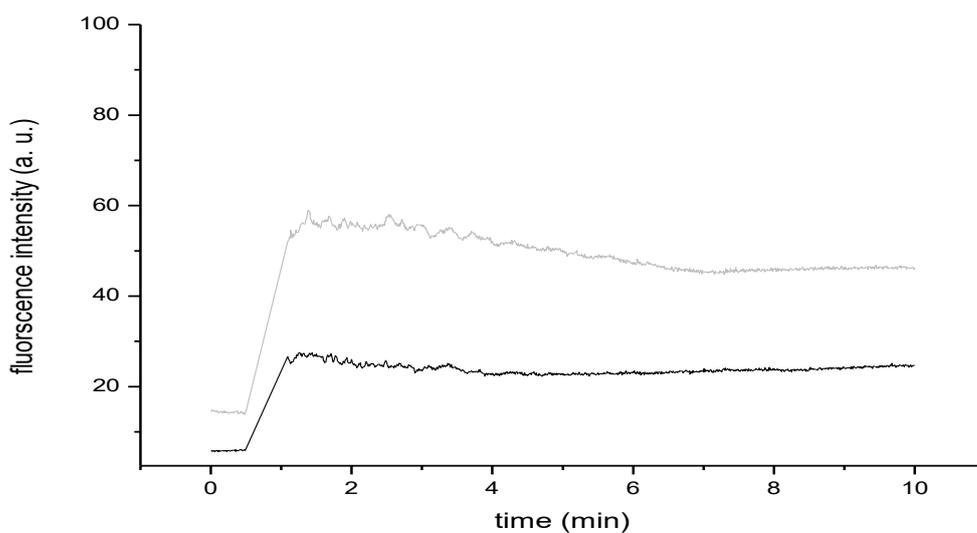
Time course of fluorescence change of probe 1 (10 μ M) upon the addition of GSH (50 equiv.) at pH 7.40 (in black) and pH 5.01 (in red), at 25 $^{\circ}$ C at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm.



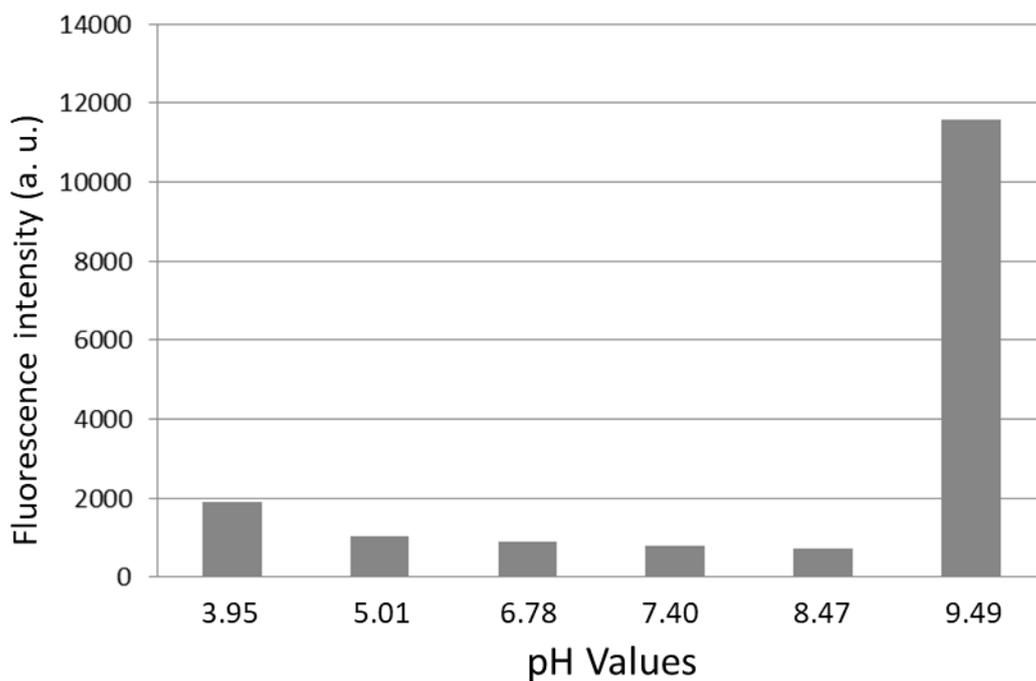
Time course of fluorescence change of probe 1 (10 μ M) upon the addition of NAC (50 equiv.) at pH 7.40 (in black) and pH 5.01 (in red), at 25 $^{\circ}$ C at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm.



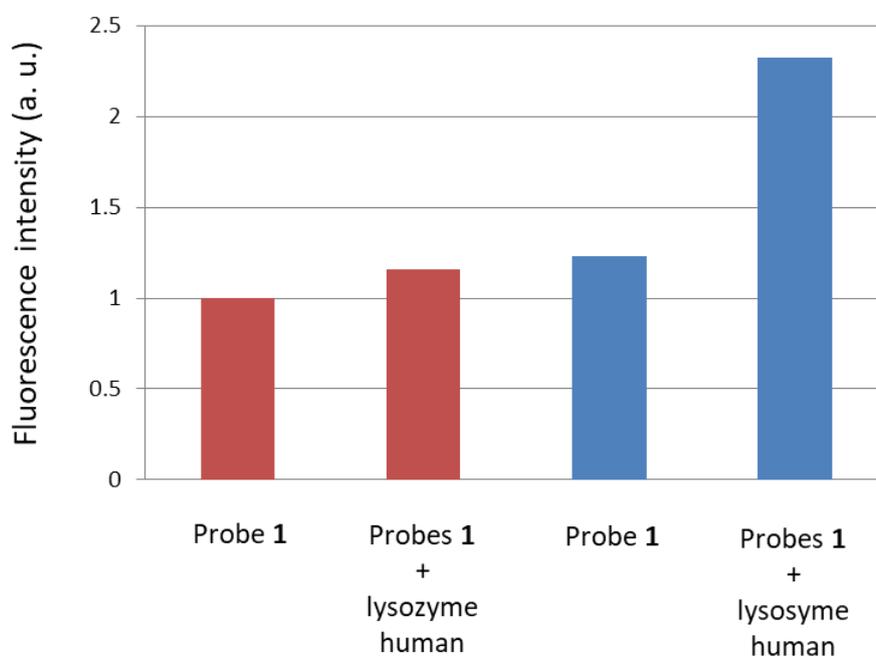
Time course of fluorescence change of probe **1** (10 μ M) upon the addition of Hcy (50 equiv.) at pH 7.40 (in black) and pH 5.01 (in red), at 25 $^{\circ}$ C at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm.



Time course of fluorescence change of probe **1** (10 μ M) upon the addition of Cys (50 equiv.) at pH 7.40 (in black) and pH 5.01 (in red), at 25 $^{\circ}$ C at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm.



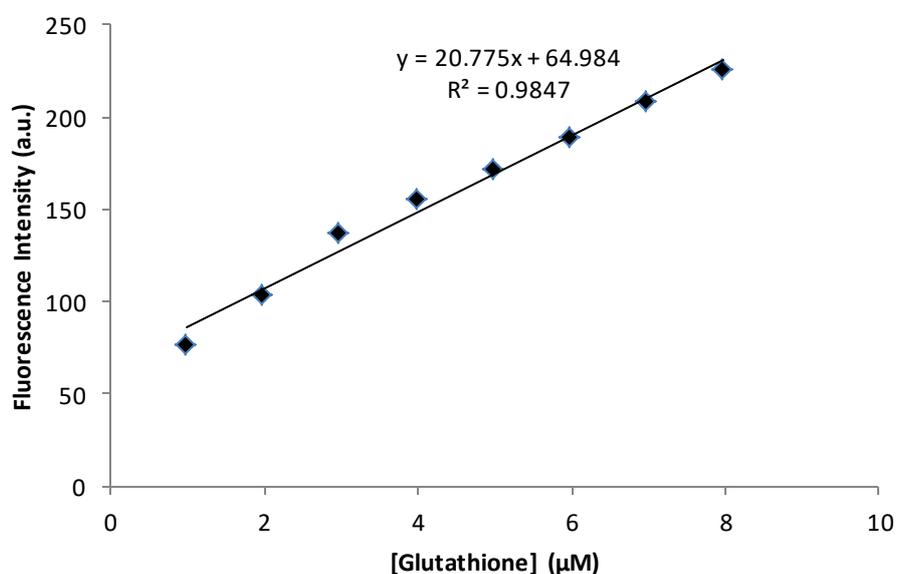
Study of pH-dependent fluorescence intensity area changes of probe **1** (10 μM) at 25 $^{\circ}\text{C}$ at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm after incubation ($t=1$ min).



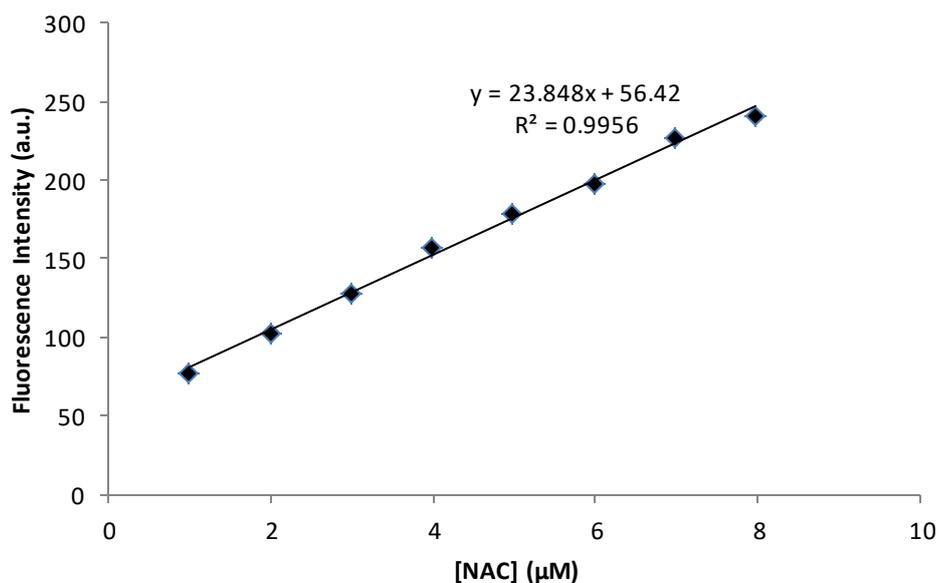
Study of pH-dependent fluorescence response intensity area change of probe **1** (10 μM) in the presence of human lysozyme (100 μM , 10 eq) at pH 5.01 (in red) and 7.40 (in blue) at 25 $^{\circ}\text{C}$ at λ_{ex} 410 nm and at λ_{em} 485 nm after incubation ($t=1$ min).

III. Detection limit of probe 1

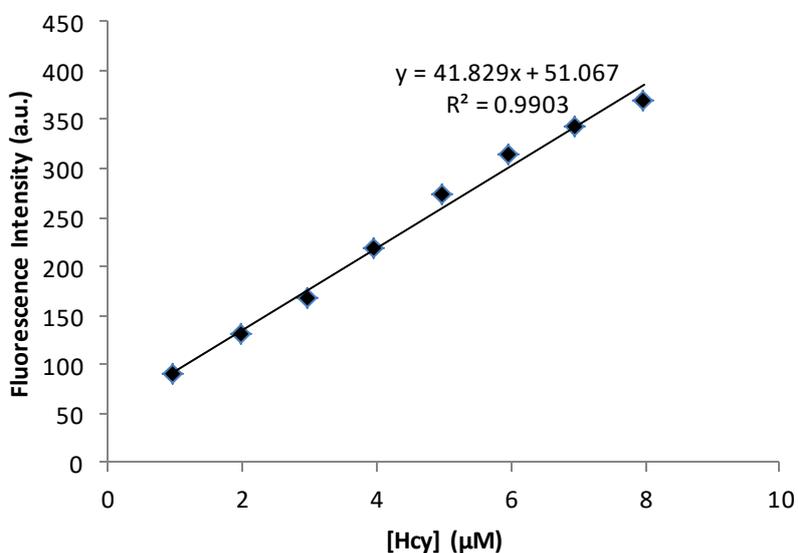
The detection limit of probe **1** towards analytes was calculated on the basis of the linear relationship between the emission intensity at 485 nm and the concentration of analytes. The detection limit was calculated with the following equation: detection limit = $3\sigma/k$, with σ the standard deviation of blank measurement, k the slope between the fluorescence intensity (F) at 485 nm versus the concentration of analytes.



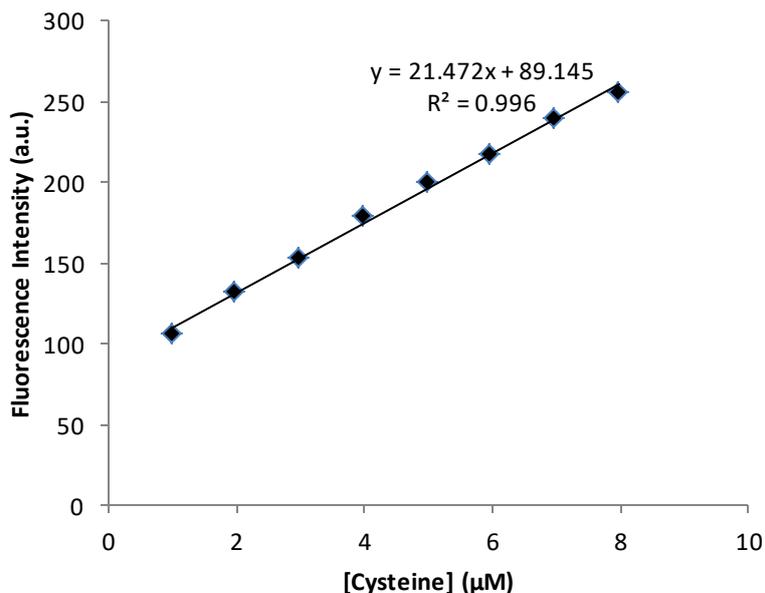
Fluorescence intensity changes of probe **1** (10 µM) in PBS (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for GSH [1-8 µM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.* $t = 1$ min). σ was found to be 0.261 and $k = 20.775$, therefore a detection limit of 38 nM was found.



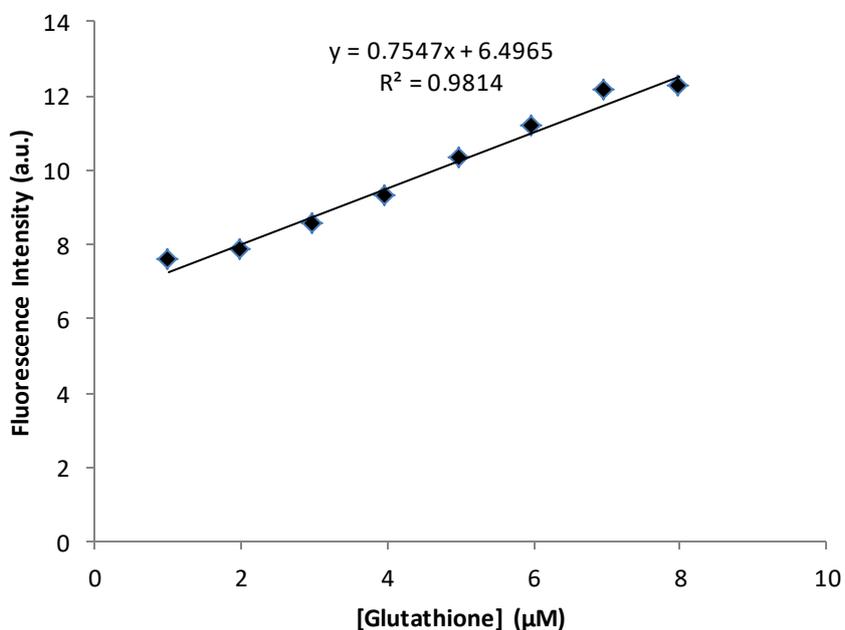
Fluorescence intensity changes of probe **1** (10 μM) in PBS (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for NAC [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.t* = 1 min). σ was found to be 0.261 and $k = 23.848$, therefore a detection limit of 33 nM was found.



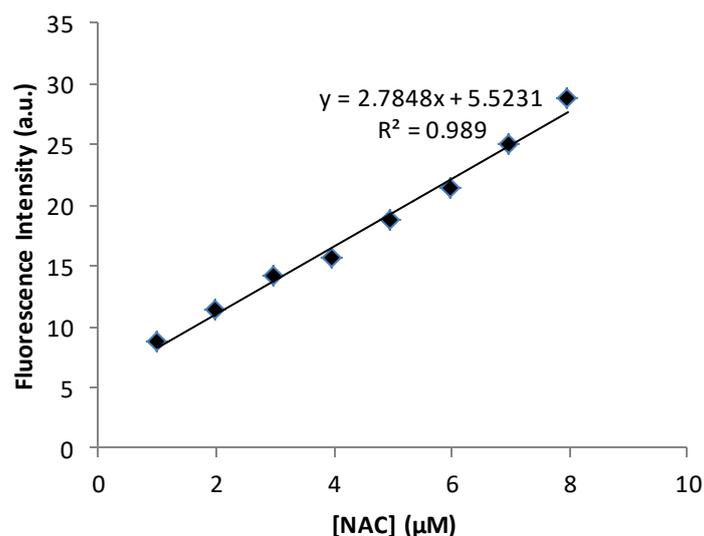
Fluorescence intensity changes of probe **1** (10 μM) in PBS (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for Hcy [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.t* = 1 min). σ was found to be 0.261 and $k = 41.829$, therefore a detection limit of 19 nM was found.



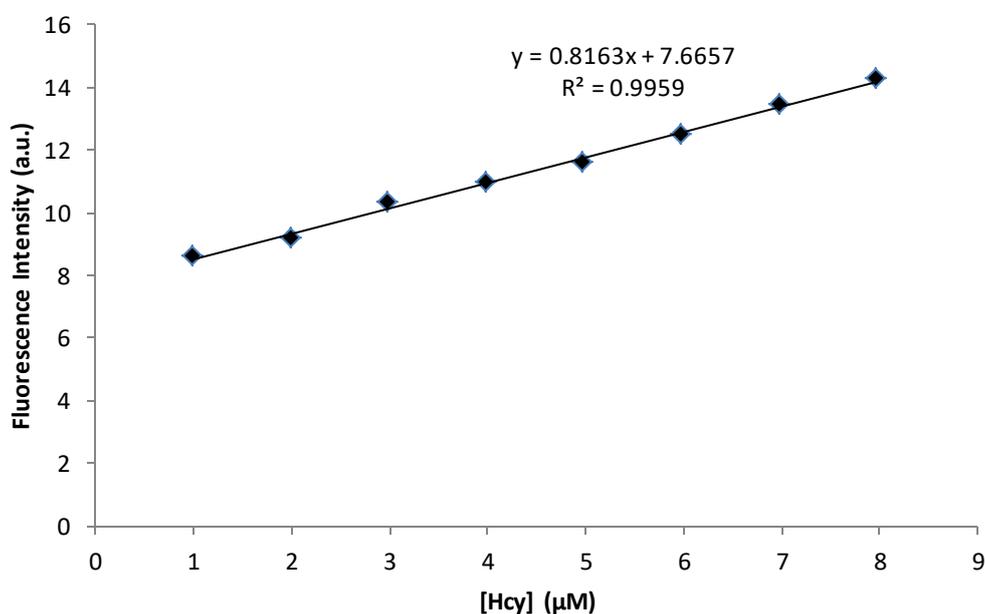
Fluorescence intensity changes of probe **1** (10 μM) in PBS (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for Cys [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.t* = 1 min). σ was found to be 0.261 and $k = 21.472$, therefore a detection limit of 36 nM was found.



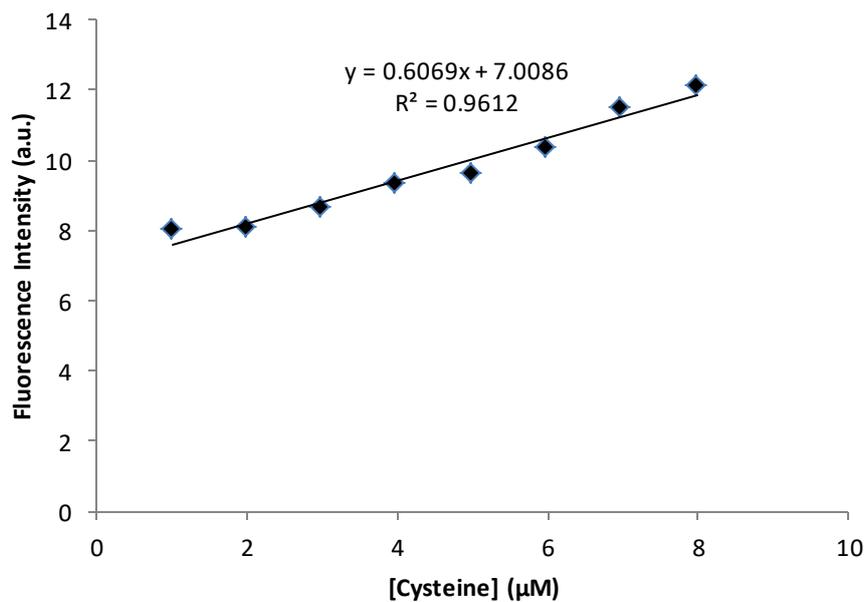
Fluorescence intensity changes of probe **1** (10 μM) in acetate buffer (0.1 M, pH = 5.01) at 25 °C for GSH [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.t* = 2 min). σ was found to be 0.040037 and $k = 0.7547$, therefore a detection limit of 159 nM was found.



Fluorescence intensity changes of probe (10 μM) in acetate buffer (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for NAC [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.* $t = 2$ min). σ was found to be 0.40037 and $k = 2.7848$, therefore a detection limit of 43.1 nM was found.



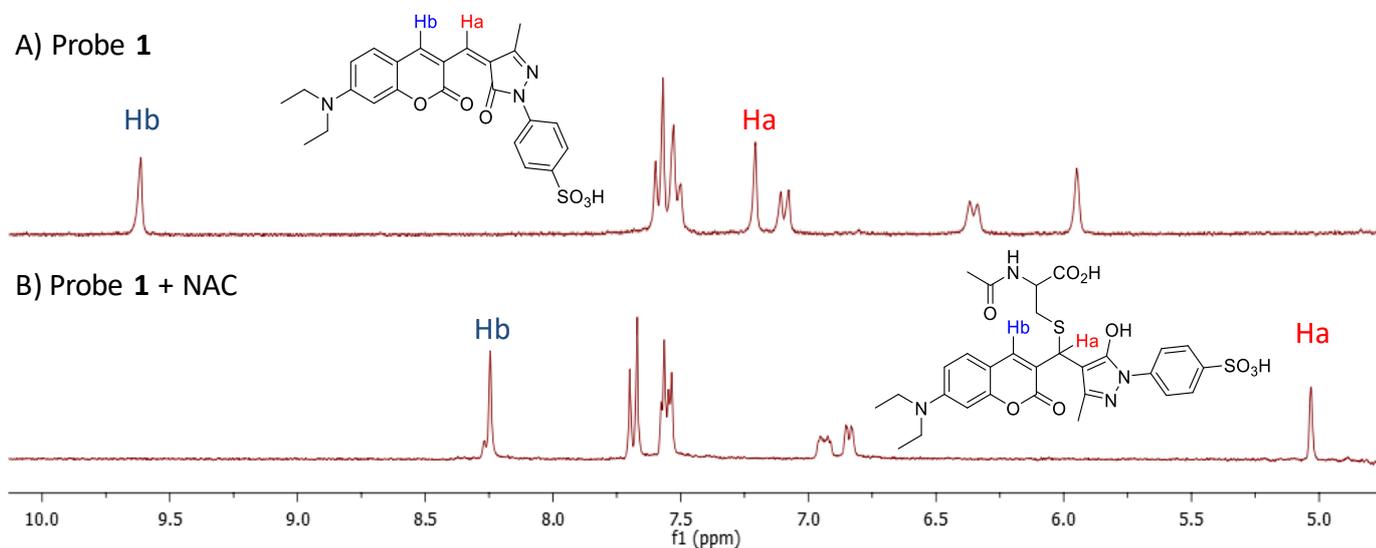
Fluorescence intensity changes of probe (10 μM) in acetate buffer (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for Hcy [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.* $t = 2$ min). σ was found to be 0.40037 and $k = 0.8163$, therefore a detection limit of 147 nM was found.



Fluorescence intensity changes of probe (10 μM) in acetate buffer (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for Cys [1-8 μM], λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.* $t = 2$ min). σ was found to be 0.40037 and $k = 0.70086$, therefore a detection limit of 198 nM was found.

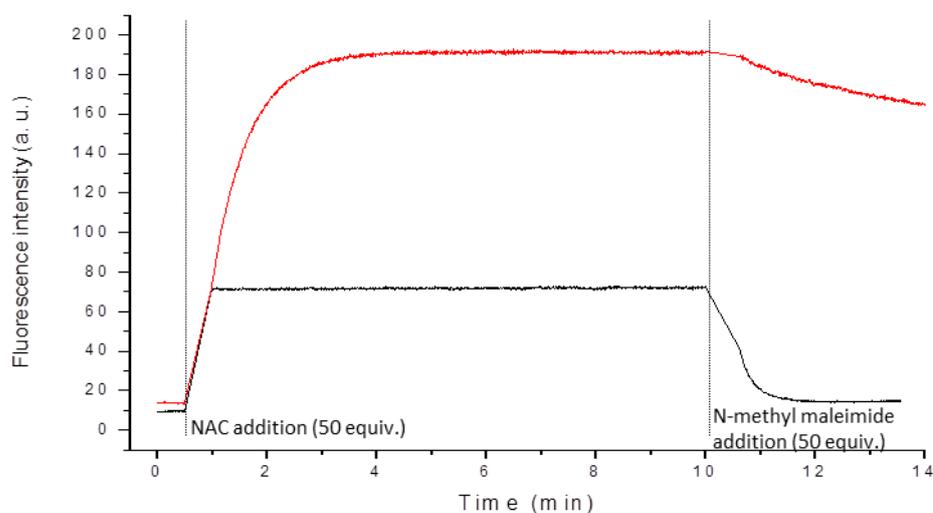
IV. Fluorescence mechanism of probe 1

IV.1. NMR study of the reaction of probe 1 with NAC

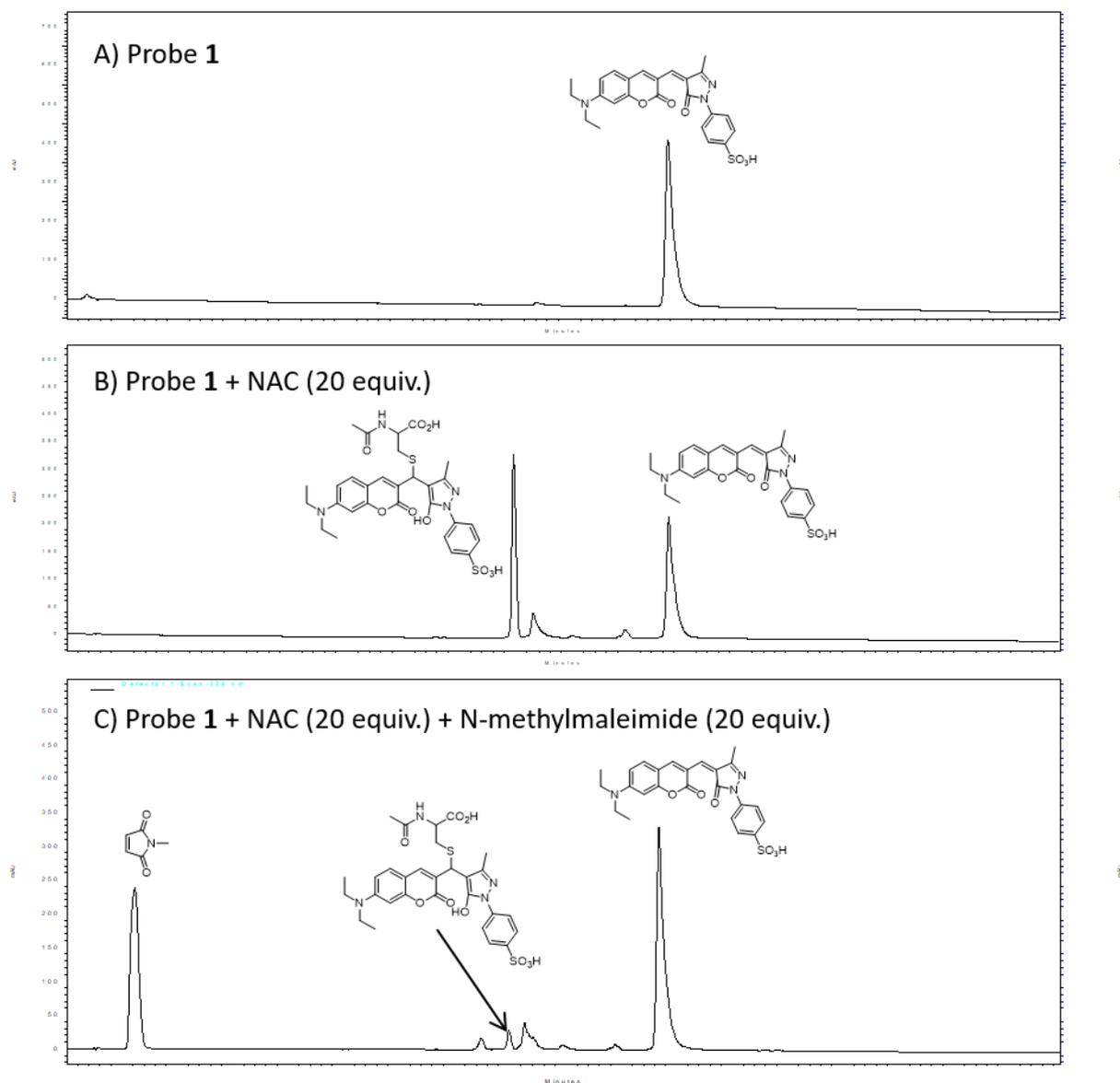


^1H NMR spectra of: A) the probe 1 dissolved in a mixture of DMSO- d_6 / D_2O (0.5 mL, 1:1, v/v); B) the probe 1 dissolved in a mixture of DMSO- d_6 / D_2O (0.5 mL, 1:1, v/v of A) followed by the addition of NAC (4 mg, 5 equiv.).

IV.2. Fluorescence and RP-HPLC study of the reversibility of the thiol-Michael adduct



Time course of fluorescence change of probe **1** (10 μ M) at pH 7.40 (in black) and pH 5.01 (in red), upon the addition of NAC (50 equiv.), then N-methylmaleimide (50 eq.) at 25 $^{\circ}$ C, λ_{ex} 410 nm, λ_{em} 485 nm.



RP-HPLC chromatograms of probe **1** (A), followed by the successive addition of NAC (20 equiv., B), and N-methylmaleimide (20 equiv., C) (System QC, recorded at 325 nm)

- 4. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles**
4 : Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones

Electronic Supplementary Information

Metal-free oxidative ring contraction of benzodiazepinones: an entry to quinoxalinones

Hasan Mtiraoui,^{a,†} Kevin Renault,^{b,†} Morgane Sanselme,^c Moncef Msaddek,^{a,*} Pierre-Yves Renard,^b Cyrille
Sabot^{*,b}

^a Université Monastir, Laboratory of Heterocyclic Chemistry Natural Products and Reactivity/CHPNR,
Department of Chemistry, Faculty of Science of Monastir, 5000 Monastir (Tunisia)

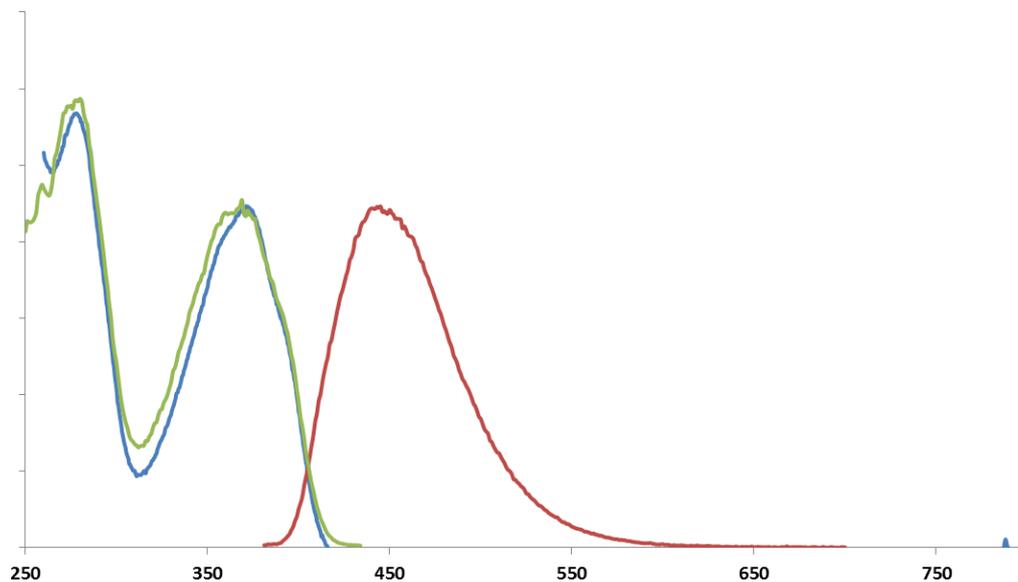
^b Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76100 Rouen (France)

^c Normandie Univ, France; UNIROUEN, Laboratoire SMS EA3233, 1 rue Tesnière, France, F-76821 Mont Saint
Aignan (France)

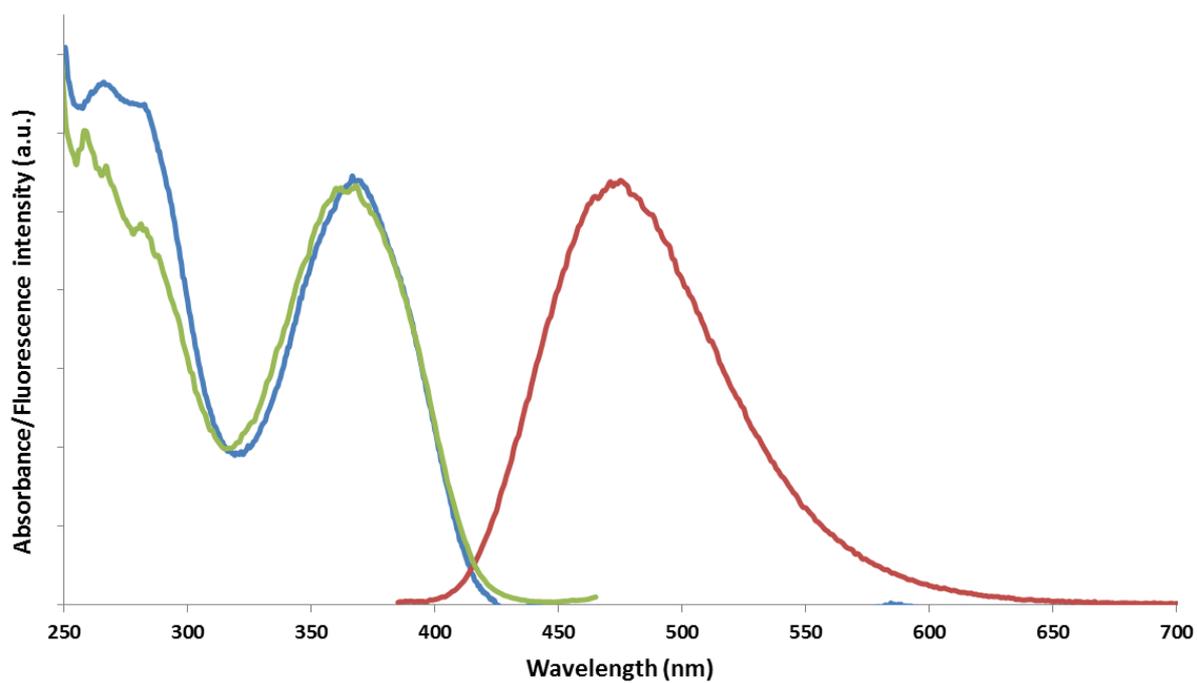
Table of contents

I. Spectroscopic data for compounds 5 and 8.....	344
II. Crystallographic data for compound 2a	346

I. Spectroscopic data for compounds 5 and 8

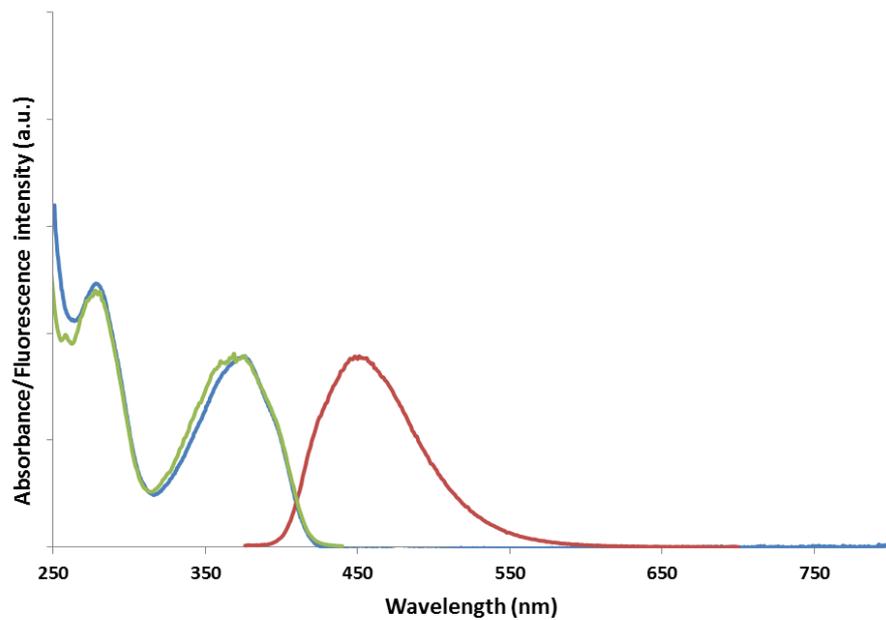


Normalized absorption (blue), emission (red), and excitation spectra (green) of quinoxalinone 5 in THF, at 25 °C.



Normalized absorption (blue), emission (red), and excitation spectra (green) of quinoxalinone 5 in PBS 7.4, at 25 °C.

Partie expérimentale



Normalized absorption (blue), emission (red), and excitation spectra (green) of cholesterol conjugate **8** in THF, at 25 °C.

II. Crystallographic data for compound 2a

The crystal structure of 2a [C₁₅H₁₀N₂O₂] has been determined from single crystal X-Ray diffraction. The chosen crystal was stuck on a glass fibre and mounted on the full three-circle goniometer of a diffractometer with a CCD area detector. Three sets of exposures (a total of 1800 frames) were recorded, corresponding to three ω scans (steps of 0.3°), for three different values of ϕ . The details of data collection are given in annexe.

The cell parameters and the orientation matrix of the crystal were preliminary determined by using SMART Software²¹. Data integration and global cell refinement were performed with SAINT Software²². Intensities were corrected for Lorentz, polarisation, decay and absorption effects (SAINT and SADABS Softwares) and reduced to FO2. The program package WinGX3²³ was used for space group determination, structure solution and refinement.

DATA REFINEMENT

The non-standard space group P2₁/n (n°14) was determined from systematic extinctions and relative Fo² of equivalent reflections. The structure was solved by direct methods²⁴. Anisotropic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. Every Hydrogen atoms were located from subsequent difference Fourier syntheses and placed with geometrical constraints (SHELXL²⁵). The final cycle of full-matrix least-square refinement on F² was based on 2407 observed reflections and 172 variable parameters and converged with unweighted and weighted agreement factors of:

R1 = 0.0417, wR2 = 0.1096 for 2186 reflections with $I > 2\sigma I$ and R1 = 0.0457, wR2 = 0.1131 for all data.

²¹ SMART for WNT/2000 V5.622 (2001), Smart software reference manual, Bruker Advanced X Ray Solutions, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

²² SAINT+ V6.02 (1999), Saint software reference manual, Bruker Advanced X Ray Solutions, Inc., Madison, Wisconsin, USA.

²³ WinGX: Version 1.70.01: An integrated system of Windows Programs for the solution, refinement and analysis of Single Crystal X-Ray Diffraction Data, By Louis J. Farrugia, Dept. of chemistry, University of Glasgow. L. J. Farrugia (1999) J. Appl. Cryst. 32, 837-838.

²⁴ Include in WinGX suite : SIR 92: A. Altomare, G. Cascarano, & A. Gualardi (1993) J. Appl. Cryst. 26, 343-350; SHELXS-97: Sheldrick, G. M., (1990) Acta Cryst, A46, 467.

²⁵ Include in WinGX suite: SHELXL-97 – a program for crystal structure refinement, G. M. Sheldrick, University of Goettingen, Germany, 1997, release 97-2.

Partie expérimentale

ANNEXE: CRYSTALLOGRAPHIC DATA

Table 1a: Atomic coordinates (x104) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor

	x	y	z	U(eq)
C(1)	10816(1)	1728(2)	7013(1)	33(1)
C(2)	11538(1)	170(3)	7454(1)	42(1)
C(3)	12031(1)	608(3)	8348(1)	48(1)
C(4)	11820(1)	2591(3)	8812(1)	50(1)
C(5)	11096(1)	4099(3)	8391(1)	46(1)
C(6)	10571(1)	3676(2)	7484(1)	35(1)
C(7)	9355(1)	4720(2)	6238(1)	35(1)
C(8)	9616(1)	2871(2)	5653(1)	34(1)
C(9)	8497(1)	6269(2)	5814(1)	37(1)
C(10)	7570(1)	5693(2)	6011(1)	35(1)
C(11)	7439(1)	3664(3)	6491(1)	45(1)
C(12)	6557(1)	3218(3)	6658(1)	57(1)
C(13)	5815(1)	4777(4)	6357(1)	63(1)
C(14)	5935(1)	6787(4)	5872(1)	66(1)
C(15)	6808(1)	7242(3)	5701(1)	49(1)
N(1)	9800(1)	5129(2)	7082(1)	39(1)
N(2)	10319(1)	1401(2)	6108(1)	37(1)
O(1)	8585(1)	7934(2)	5336(1)	64(1)
O(2)	9209(1)	2674(2)	4831(1)	42(1)

Table 1b: Hydrogen coordinates (x104) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$).

U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized Uij tensor

	x	y	z	U(eq)
H(2)	11686	-1156	7147	50
H(3)	12511	-435	8646	57
H(4)	12172	2894	9411	60
H(5)	10951	5410	8708	55
H(11)	7943	2604	6700	54
H(12)	6470	1853	6977	68
H(13)	5228	4480	6479	75
H(14)	5426	7833	5660	79
H(15)	6887	8600	5374	59
H(2A)	10465	197	5818	44

Partie expérimentale

Table 2: Bond lengths (Å)

C(1)-N(2)	1.3812(16)
C(1)-C(2)	1.3916(19)
C(1)-C(6)	1.3977(19)
C(2)-C(3)	1.373(2)
C(2)-H(2)	0.93
C(3)-C(4)	1.390(2)
C(3)-H(3)	0.93
C(4)-C(5)	1.367(2)
C(4)-H(4)	0.93
C(5)-C(6)	1.4023(18)
C(5)-H(5)	0.93
C(6)-N(1)	1.3870(17)
C(7)-N(1)	1.2892(16)
C(7)-C(8)	1.4730(18)
C(7)-C(9)	1.5130(18)
C(8)-O(2)	1.2319(15)
C(8)-N(2)	1.3496(17)
C(9)-O(1)	1.2072(17)
C(9)-C(10)	1.4822(18)
C(10)-C(15)	1.3860(19)
C(10)-C(11)	1.3876(19)
C(11)-C(12)	1.386(2)
C(11)-H(11)	0.93
C(12)-C(13)	1.367(3)
C(12)-H(12)	0.93
C(13)-C(14)	1.379(3)
C(13)-H(13)	0.93
C(14)-C(15)	1.376(2)
C(14)-H(14)	0.93
C(15)-H(15)	0.93
N(2)-H(2A)	0.86

Partie expérimentale

Table 3: Angles (°)

N(2)-C(1)-C(2)	121.53(12)	O(1)-C(9)-C(7)	119.69(12)
N(2)-C(1)-C(6)	118.07(12)	C(10)-C(9)-C(7)	118.34(11)
C(2)-C(1)-C(6)	120.40(12)	C(15)-C(10)-C(11)	119.12(13)
C(3)-C(2)-C(1)	119.36(13)	C(15)-C(10)-C(9)	118.49(12)
C(3)-C(2)-H(2)	120.3	C(11)-C(10)-C(9)	122.39(12)
C(1)-C(2)-H(2)	120.3	C(12)-C(11)-C(10)	119.95(14)
C(2)-C(3)-C(4)	120.81(14)	C(12)-C(11)-H(11)	120
C(2)-C(3)-H(3)	119.6	C(10)-C(11)-H(11)	120
C(4)-C(3)-H(3)	119.6	C(13)-C(12)-C(11)	120.26(16)
C(5)-C(4)-C(3)	120.19(13)	C(13)-C(12)-H(12)	119.9
C(5)-C(4)-H(4)	119.9	C(11)-C(12)-H(12)	119.9
C(3)-C(4)-H(4)	119.9	C(12)-C(13)-C(14)	120.25(15)
C(4)-C(5)-C(6)	120.25(14)	C(12)-C(13)-H(13)	119.9
C(4)-C(5)-H(5)	119.9	C(14)-C(13)-H(13)	119.9
C(6)-C(5)-H(5)	119.9	C(15)-C(14)-C(13)	119.89(16)
N(1)-C(6)-C(1)	121.22(11)	C(15)-C(14)-H(14)	120.1
N(1)-C(6)-C(5)	119.82(12)	C(13)-C(14)-H(14)	120.1
C(1)-C(6)-C(5)	118.91(12)	C(14)-C(15)-C(10)	120.53(15)
N(1)-C(7)-C(8)	125.20(12)	C(14)-C(15)-H(15)	119.7
N(1)-C(7)-C(9)	117.39(12)	C(10)-C(15)-H(15)	119.7
C(8)-C(7)-C(9)	117.41(11)	C(7)-N(1)-C(6)	117.78(11)
O(2)-C(8)-N(2)	123.79(12)	C(8)-N(2)-C(1)	123.46(11)
O(2)-C(8)-C(7)	122.46(12)	C(8)-N(2)-H(2A)	118.3
N(2)-C(8)-C(7)	113.74(11)	C(1)-N(2)-H(2A)	118.3
O(1)-C(9)-C(10)	121.96(12)		

Table 4: Anisotropic displacement parameters ($\text{Å}^2 \times 10^3$) The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2 \pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
C(1)	31(1)	37(1)	33(1)	-2(1)	8(1)	-2(1)
C(2)	39(1)	42(1)	44(1)	-2(1)	9(1)	5(1)
C(3)	40(1)	53(1)	45(1)	6(1)	3(1)	7(1)
C(4)	48(1)	61(1)	35(1)	-3(1)	0(1)	0(1)
C(5)	50(1)	49(1)	36(1)	-8(1)	8(1)	2(1)
C(6)	34(1)	38(1)	34(1)	-2(1)	9(1)	0(1)
C(7)	33(1)	35(1)	36(1)	0(1)	10(1)	0(1)
C(8)	31(1)	34(1)	35(1)	-2(1)	7(1)	-3(1)
C(9)	39(1)	35(1)	37(1)	1(1)	10(1)	2(1)
C(10)	35(1)	36(1)	32(1)	-2(1)	7(1)	0(1)
C(11)	44(1)	43(1)	47(1)	7(1)	9(1)	1(1)
C(12)	56(1)	59(1)	58(1)	11(1)	20(1)	-12(1)
C(13)	42(1)	76(1)	75(1)	-1(1)	24(1)	-7(1)
C(14)	41(1)	69(1)	90(1)	13(1)	21(1)	13(1)
C(15)	43(1)	47(1)	58(1)	12(1)	14(1)	6(1)
N(1)	40(1)	42(1)	37(1)	-5(1)	10(1)	5(1)
N(2)	38(1)	36(1)	34(1)	-7(1)	7(1)	4(1)
O(1)	49(1)	61(1)	88(1)	34(1)	27(1)	9(1)
O(2)	45(1)	42(1)	34(1)	-5(1)	1(1)	2(1)

Partie expérimentale

Table 5: Torsion angles (°)

N(2)-C(1)-C(2)-C(3)	178.16(13)
C(6)-C(1)-C(2)-C(3)	-2.2(2)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-0.4(2)
C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	2.0(2)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-1.0(2)
N(2)-C(1)-C(6)-N(1)	5.28(19)
C(2)-C(1)-C(6)-N(1)	-174.38(12)
N(2)-C(1)-C(6)-C(5)	-177.20(12)
C(2)-C(1)-C(6)-C(5)	3.1(2)
C(4)-C(5)-C(6)-N(1)	176.02(14)
C(4)-C(5)-C(6)-C(1)	-1.5(2)
N(1)-C(7)-C(8)-O(2)	-174.35(13)
C(9)-C(7)-C(8)-O(2)	5.41(19)
N(1)-C(7)-C(8)-N(2)	7.11(19)
C(9)-C(7)-C(8)-N(2)	-173.13(11)
N(1)-C(7)-C(9)-O(1)	99.06(17)
C(8)-C(7)-C(9)-O(1)	-80.72(17)
N(1)-C(7)-C(9)-C(10)	-80.36(16)
C(8)-C(7)-C(9)-C(10)	99.86(14)
O(1)-C(9)-C(10)-C(15)	-5.8(2)
C(7)-C(9)-C(10)-C(15)	173.64(13)
O(1)-C(9)-C(10)-C(11)	174.07(15)
C(7)-C(9)-C(10)-C(11)	-6.53(19)
C(15)-C(10)-C(11)-C(12)	-0.4(2)
C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	179.77(14)
C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	-0.3(3)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	1.0(3)
C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-0.8(3)
C(13)-C(14)-C(15)-C(10)	0.1(3)
C(11)-C(10)-C(15)-C(14)	0.5(2)
C(9)-C(10)-C(15)-C(14)	-179.65(15)
C(8)-C(7)-N(1)-C(6)	-2.0(2)
C(9)-C(7)-N(1)-C(6)	178.28(11)
C(1)-C(6)-N(1)-C(7)	-4.44(19)
C(5)-C(6)-N(1)-C(7)	178.06(13)
O(2)-C(8)-N(2)-C(1)	175.40(12)
C(7)-C(8)-N(2)-C(1)	-6.08(18)
C(2)-C(1)-N(2)-C(8)	-179.85(13)
C(6)-C(1)-N(2)-C(8)	0.49(19)

Partie expérimentale

Table 6: Calculated reflections from PowderCell*

h	k	l	2 θ /°	d/Å	I/rel.	F(hkl)
-1	0	1	7.54	11.71	96.77	48.66
1	0	1	9.84	8.98	100.00	64.63
2	0	0	12.67	6.98	11.41	28.19
-2	0	2	15.12	5.86	2.33	15.26
0	1	1	16.93	5.23	61.42	62.12
-1	1	1	17.52	5.06	26.96	42.64
-1	0	3	17.70	5.01	23.08	56.39
-3	0	1	18.43	4.81	41.48	78.80
1	1	1	18.63	4.76	47.72	60.45
0	1	2	19.96	4.44	6.07	23.14
-1	1	2	19.97	4.44	72.17	79.84
-2	1	1	20.22	4.39	11.59	32.41
2	1	0	20.29	4.37	29.58	51.97
1	0	3	20.85	4.26	86.15	129.03
3	0	1	21.48	4.13	5.50	33.61
1	1	2	21.91	4.05	24.67	51.40
-2	1	2	21.93	4.05	79.70	92.44
-3	0	3	22.76	3.90	66.15	123.83
-1	1	3	23.80	3.74	7.55	31.01
0	1	3	24.23	3.67	21.43	53.19
0	0	4	24.42	3.64	14.95	63.39
3	1	0	24.84	3.58	12.86	42.30
-2	1	3	25.07	3.55	5.76	28.59
-3	1	2	25.41	3.50	72.53	102.89
4	0	0	25.49	3.49	2.80	28.71
1	1	3	26.26	3.39	23.12	60.16
-3	1	3	27.82	3.20	12.68	47.35
0	1	4	29.22	3.05	26.88	72.63
-2	1	4	29.23	3.05	12.67	49.90
-4	1	1	29.38	3.04	4.44	29.69
3	0	3	29.81	2.99	2.37	31.18
-4	1	2	29.92	2.98	39.17	89.93

Source: Cu-K $_{\alpha 1}$ ($\lambda = 1.540598 \text{ \AA}$)

Condition on reflections: $l \geq 2$

Range (2 θ): From 3° to 30°

*PowderCell for Windows (version 2.4) by Kraus W. & Nolze G., Federal institute for materials Research and testing, Rudower Chausse 5, 12489 Berlin Germany.

- 5. Experimental sections extracted from “Supplementary Materials / Supporting Information” files of published articles**
5: Photophysical properties of quinoxalin-2(1*H*)-ones: application to the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection hydrogen sulfide

Electronic Supplementary Information

Photophysical properties of quinoxalin-2(1*H*)-ones: application to the preparation of an azide-based fluorogenic probe for the detection hydrogen sulfide

Kévin Renault, Pierre-Yves Renard, and Cyrille Sabot*

Normandie Univ, CNRS, UNIROUEN, INSA Rouen, COBRA (UMR 6014), 76000 Rouen, (France).

I. Absorbance, excitation and emission spectra of 7-aminoquinoxalinone 10 in different solvents.....	354
II. pH dependence of the emission of 7-aminoquinoxalinone 10.....	360
III. <i>In vitro</i> fluorescence assays.....	361
IV. HPLC monitoring of the reduction of 11 by hydrogen sulfide	362
V. Detection limit of probe 11	363

I. Absorbance, excitation and emission spectra of 7-aminoquinoxalinone **10** in different solvents

Compound **10** in cyclohexane

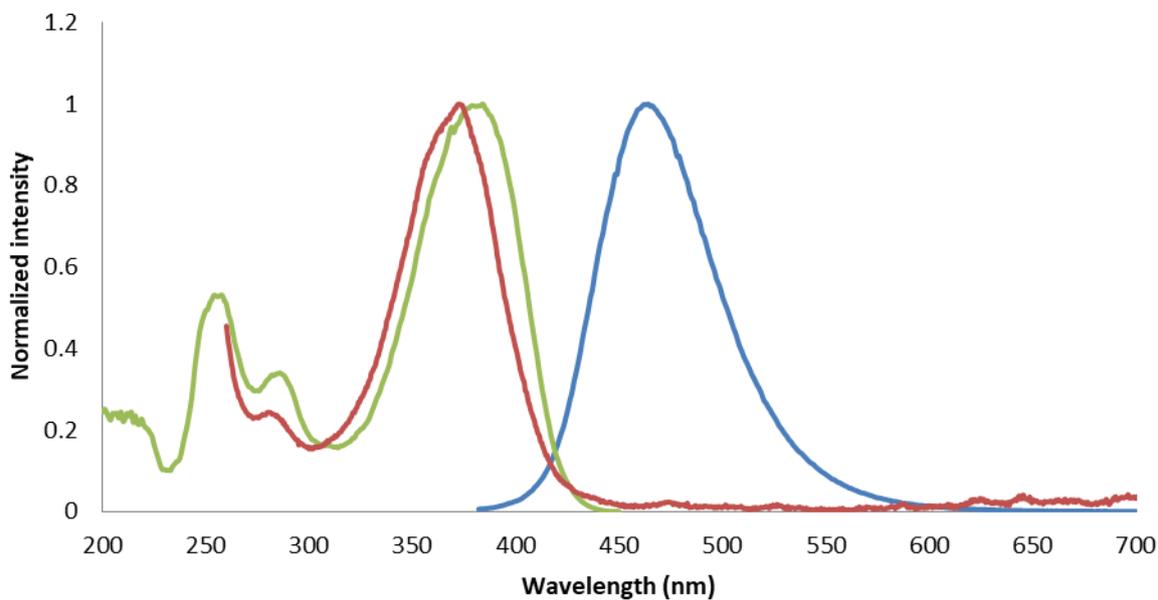
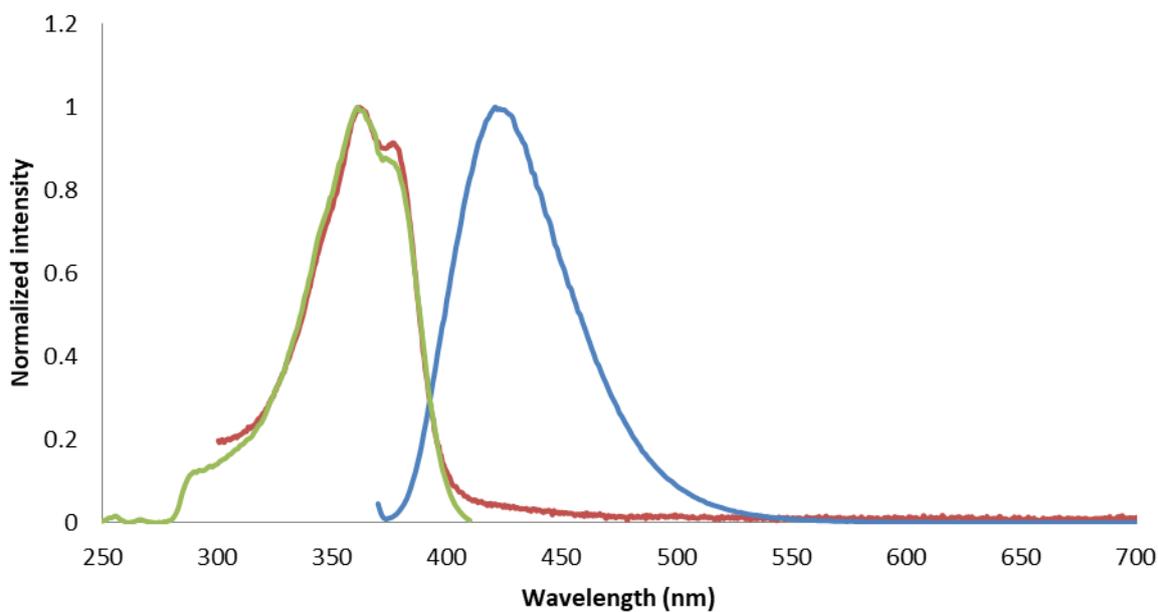


Figure S1 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 464$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in cyclohexane.

Compound **10** in toluene



Partie expérimentale

Figure S2 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 421$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in toluene.

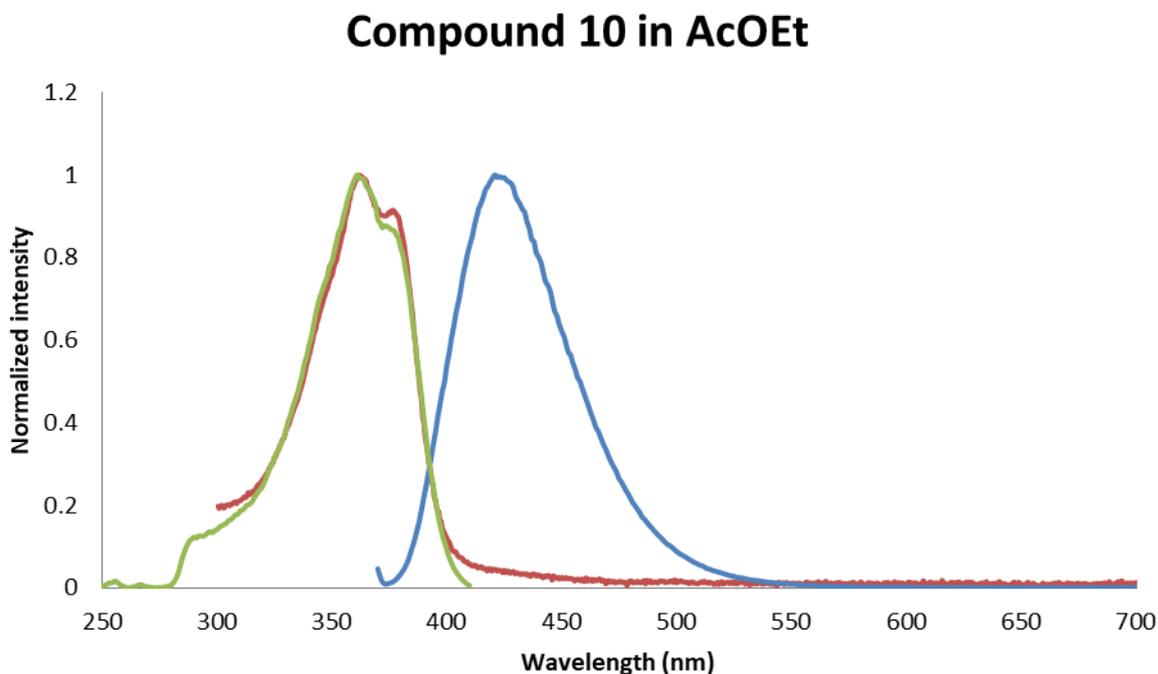


Figure S3 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 434$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in AcOEt.

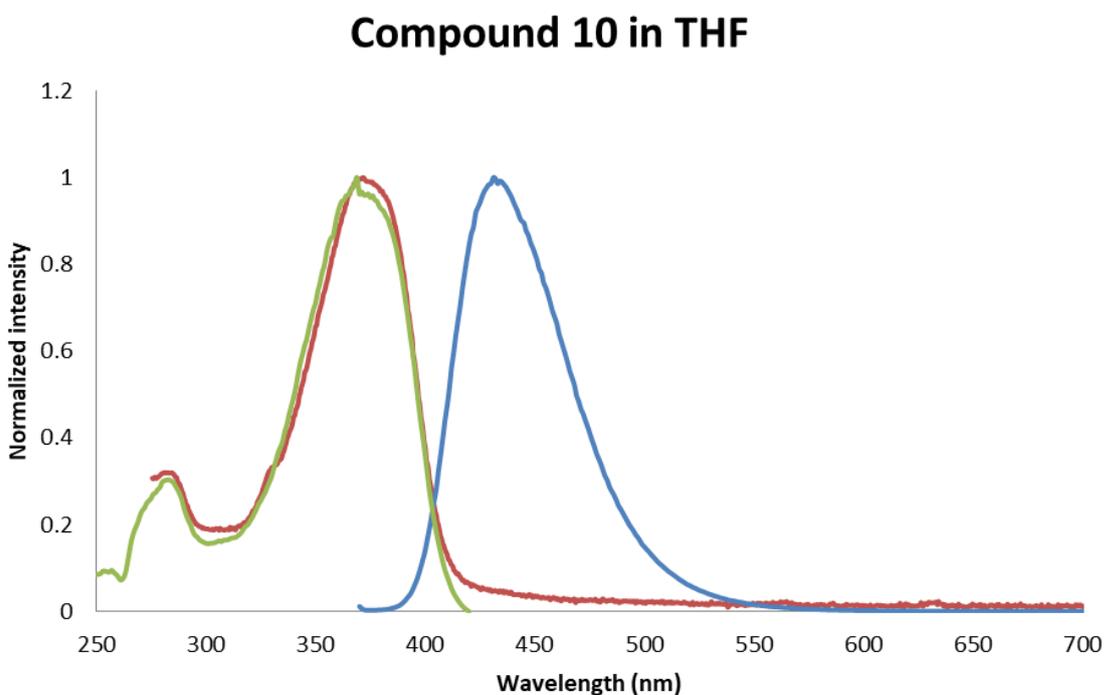


Figure S4 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 431$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in THF.

Compound 10 in DCM

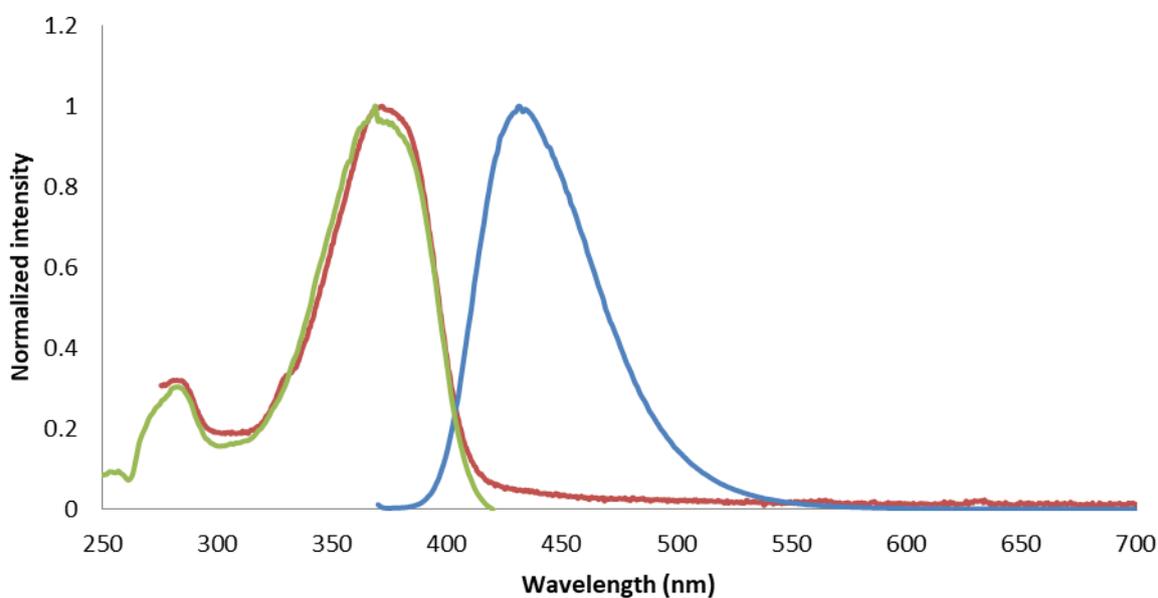


Figure S5 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 429$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in DCM.

Compound 10 in MeCN

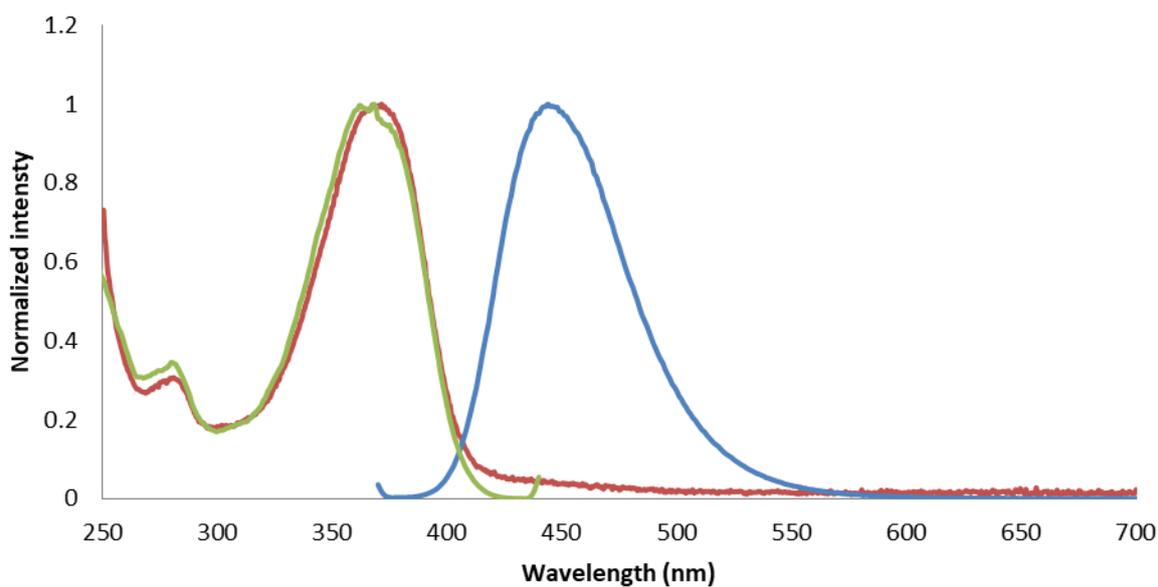


Figure S6 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 444$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in MeCN.

Compound 10 in DMSO

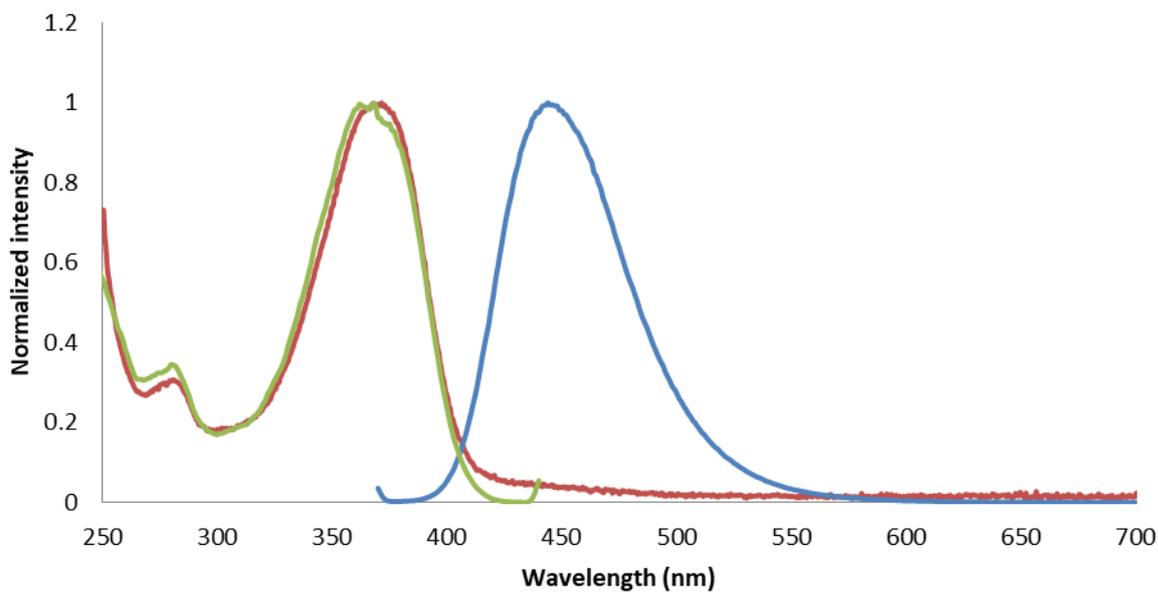


Figure S7 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 459$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in DMSO.

Compound 10 in EtOH

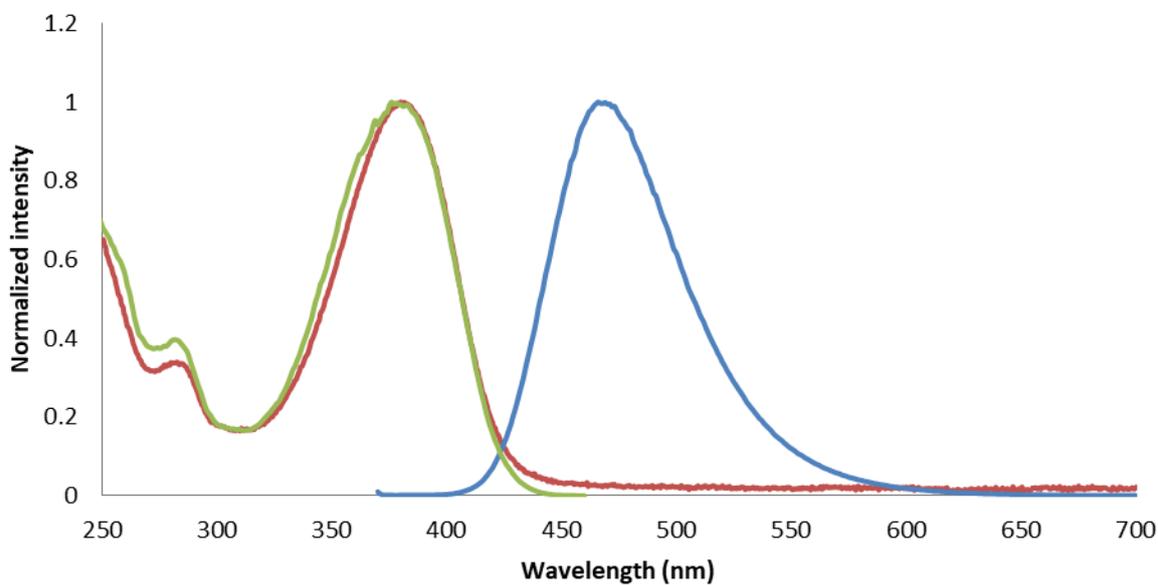


Figure S8 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 467$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in EtOH.

Compound 10 in MeOH

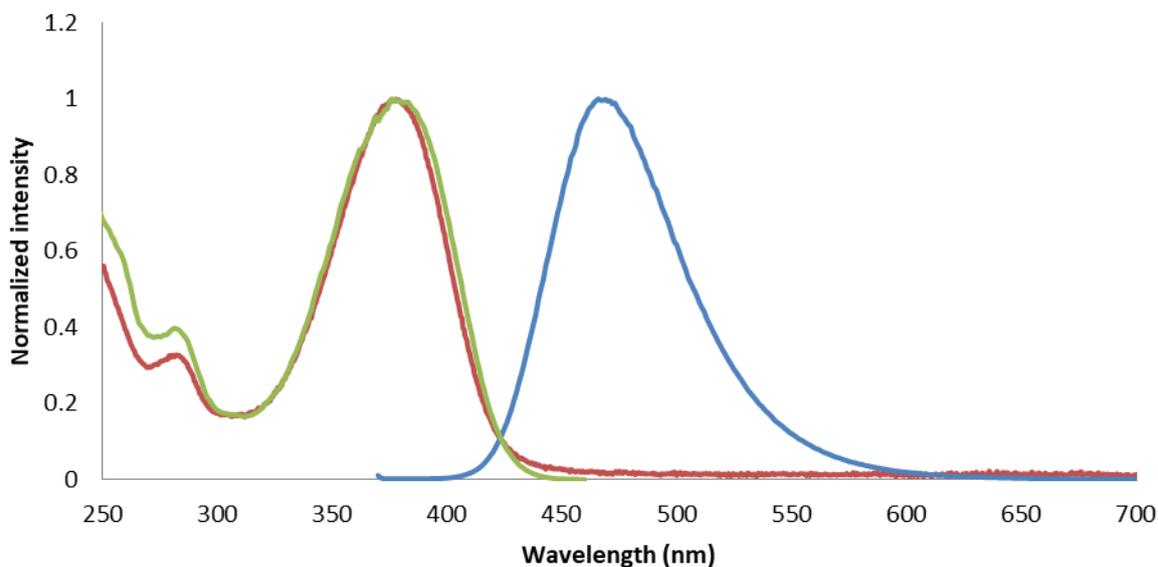


Figure S9 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 474$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in MeOH.

Compound 10 in Water

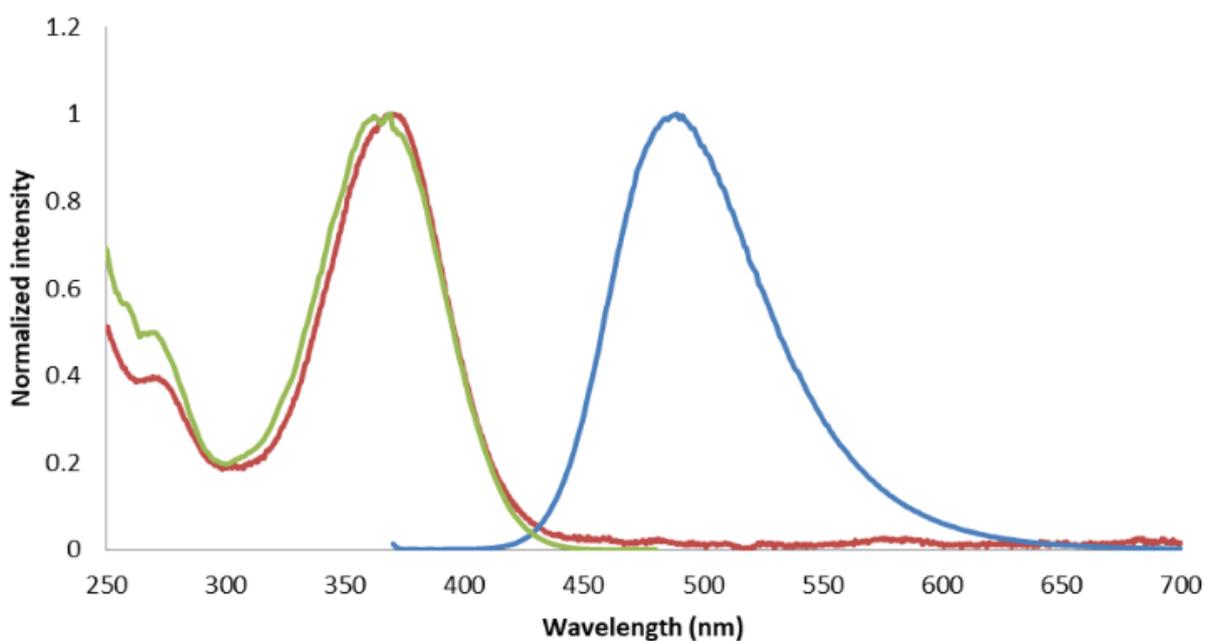


Figure S10 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 489$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in Water.

Compound 10 in PBS 7.4

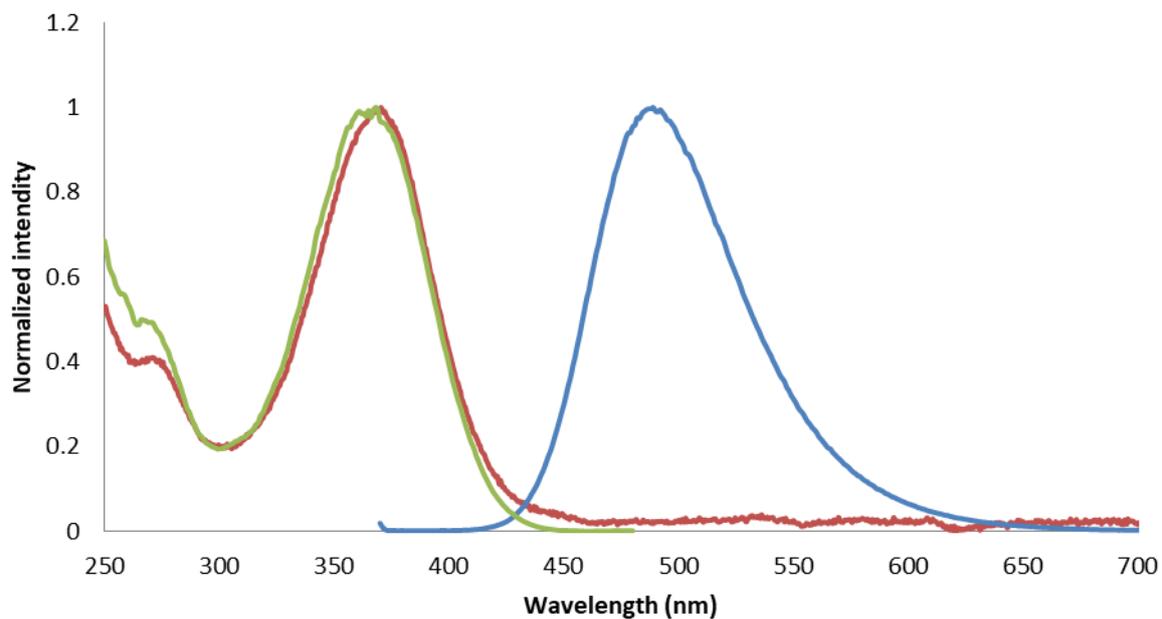


Figure S11 Normalized absorption (red trace), emission (blue trace, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm) and excitation (green trace, $\lambda_{\text{em}} = 489$ nm) spectra for compound **10** at 25 °C in PBS buffer.

II. pH dependence of the emission of 7-aminoquinoxalinone **10**

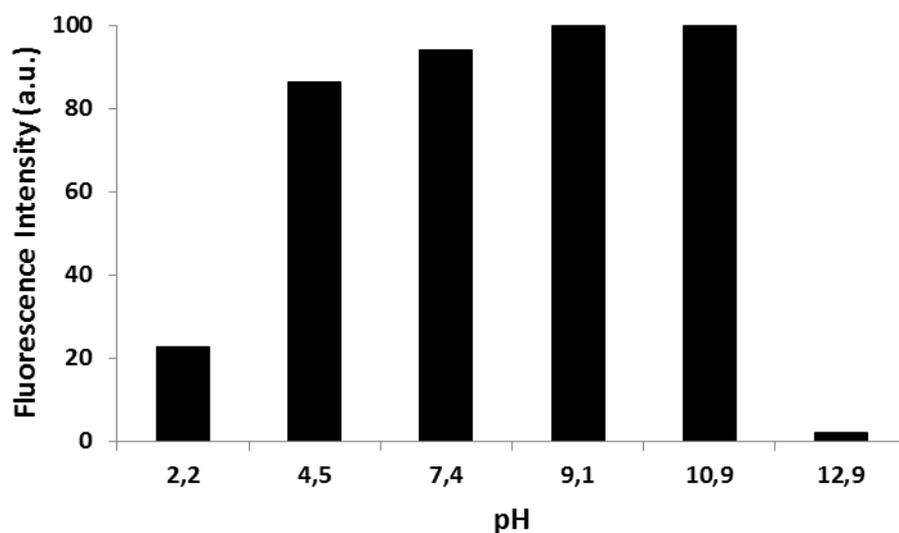


Figure S12 Fluorescence responses of 7-aminoquinoxalinone **10** in aq. HCl (10 mM, pH 2.2), sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), in PBS (0.1 M, pH 7.4), in sodium borate buffer (0.1 M, 9.1), in sodium carbonate buffer (0.1 M, pH 10.9), or in aq. NaOH (2.0 M, pH = 12.9) at 25 °, $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 489$ nm.

III. *In vitro* fluorescence assays

A 10 μ M solution of the corresponding fluorogenic probe (compound **11** or 4-methyl-7-azidocoumarin) was prepared in 3 mL of PBS Buffer (0.1 M pH 7.4) and transferred into the quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 x 4 mm, Chamber volume 3.5 mL). A 0.3 M solution of bio-analytes (5 μ L, 50 equiv.) was added and the resulting mixture was incubated at 25 °C for 60 min or 240 min. After excitation at 370 nm (for compound **11**) or 330 nm (for the 4-methyl-7-azidocoumarin), the fluorescence emission at 489 nm (for compound **11**) or 450 nm (4-methyl-7-azidocoumarin) was simultaneously monitored over time with measurements recorded every 0.5 s. Emission spectra of the probe was recorded before and after cleavage in order to determine the quenching efficiency (QE), which was calculated on the basis of the following equation: $QE = 100 \times [1 - (\text{fluorescence emission intensity of the probe}) / (\text{fluorescence emission intensity of the probe after complete reaction with NaHS})]$

For probe **11**: $QE = 100 \times [1 - (1114.4) / (80925)] = 98.6\%$

For 4-methyl-7-azido-coumarin: $QE = 100 \times [1 - (261) / (58828)] = 99.6\%$

IV. HPLC monitoring of the reduction of **11** by hydrogen sulfide

A 0.1 mg/mL solution of probe **11** in DMSO/ACN/H₂O (1 mL, 1:1:8) containing NaHS (50 equiv.) was monitoring by RP-HPLC at t = 5 min and t = 1 h.

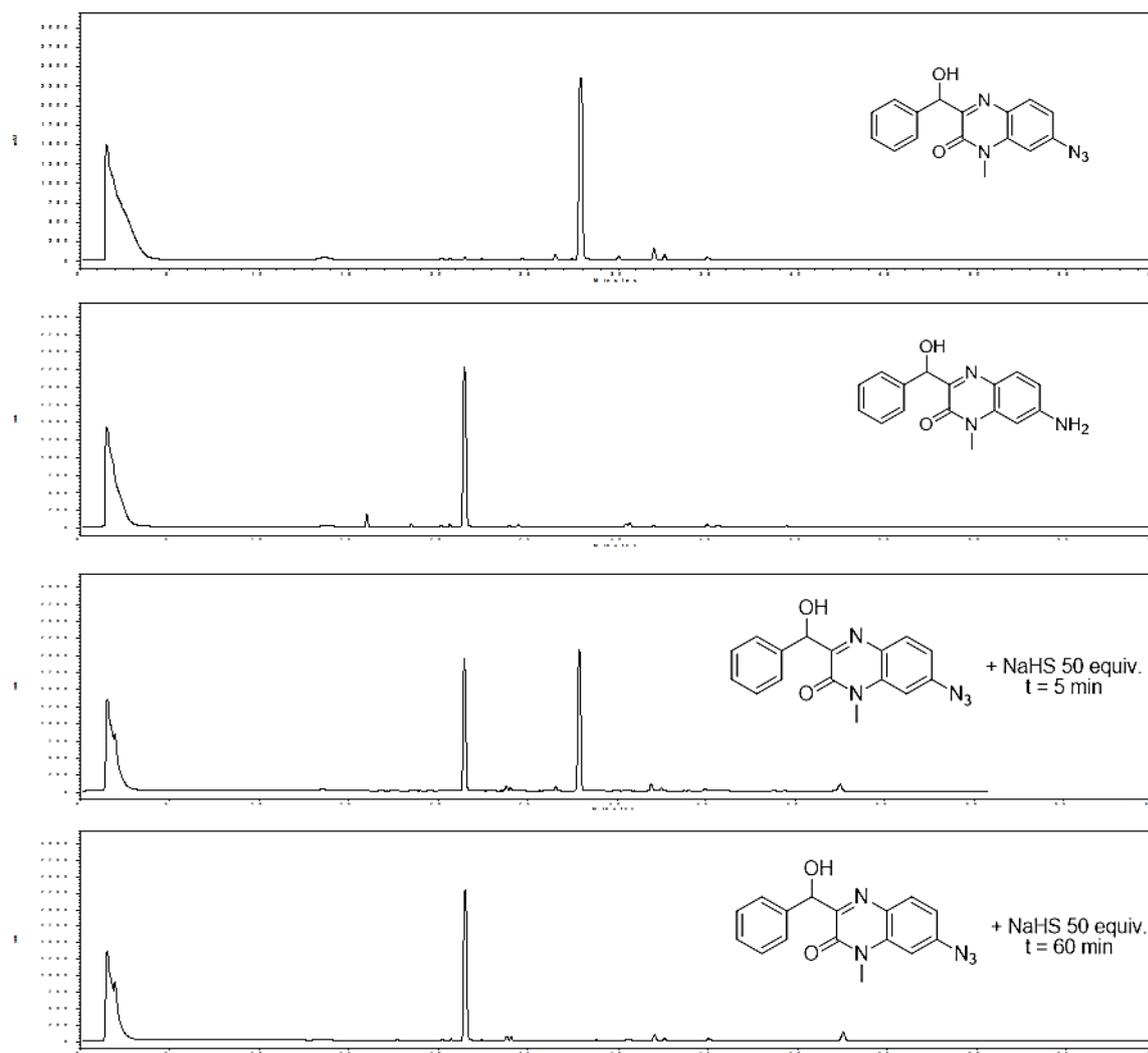


Figure S13 RP-HPLC elution profiles (analytical system) of the reduction of probe **11** by NaHS (50 equiv.) (detection in "MaxPlot" mode).

V. Detection limit of probe 11

The detection limit of probe **11** towards NaHS analyte was calculated on the basis of the linear relationship between the emission intensity at 489 nm and the concentration of NaHS. The detection limit was calculated with the following equation: detection limit = $3\sigma/k$, with σ the standard deviation of blank measurement, k the slope between the fluorescence intensity (F) at 489 nm versus the concentration of NaHS. σ was found to be 1.023 and $k = 2.4249$, therefore a detection limit of 1.30 μM was found.

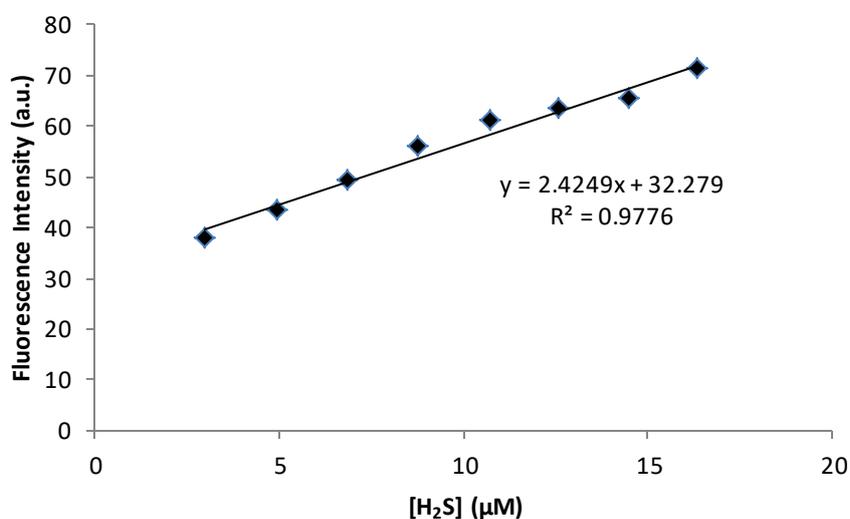
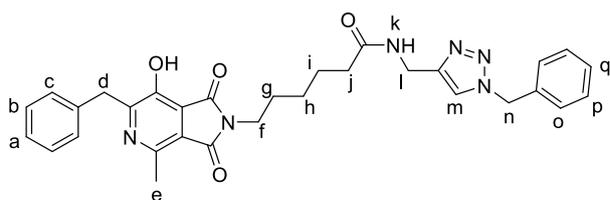


Figure S14 Fluorescence intensity changes of probe **11** (20 μM) in PBS (0.1 M, pH = 7.4) at 25 °C for NaHS [3-17 μM], $\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 489 \text{ nm}$ (fluorescence intensity values were measured when the intensity reached a plateau *i.e.* $t = 5\text{-}15 \text{ min}$).

IV. Annexes

Note : les molécules décrites dans cette partie ne sont pas présentées dans le manuscrit et ne font donc pas l'objet de numérotation. Cependant, ces molécules ayant été synthétisées dans le cadre de cette thèse, et ne faisant pas l'objet de publication dans la littérature (ou dont les conditions réactionnelles ont été modifiées), il a été choisi de les décrire dans cette partie du document, ces molécules présentant un intérêt synthétique.



The *N*-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6-(6-benzyl-7-hydroxy-4-methyl-1,3-dioxo-1*H* pyrrolo[3,4-*c*]pyridine-2(3*H*)-yl)hexanamide. To a solution of the 4-benzyl-5-ethoxy-2-methyloxazole (15.0 mg, 0.069 mmol) in a mixture of ACN/acetate buffer (1M, pH = 5.0,

396 μ L:1500 μ L) were successively added the *N*-((pro-2-yn-1-yl)hexanamide)-6-maleimide (22.35 mg, 0.090 mmol, 1.3 equiv.), CuSO₄·5H₂O (3.50 mg, 0.014 mmol, 0.2 equiv), sodium ascorbate (27.34 mg, 0.138 mmol, 2 equiv.) and the benzyl azide (13.85mg, 0.104 mmol, 1.5 equiv.). The reaction was left overnight at 37 °C. The solution was then diluted with AcOEt (30 mL) and washed with a solution containing 10 % of EDTA (5 mL), the layers were separated, dried over MgSO₄ and the organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was finally purified by chromatography on silica gel (100 % CH₂Cl₂ then CH₂Cl₂/MeOH 98:2, v/v), to give the product as a pale yellow solid (30 mg, 0.054 mmol, 79%).

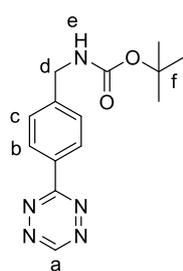
Mp: 90-92 °C.

IR (neat cm⁻¹) 2936, 1763, 1703, 1646, 1538, 1434, 1402, 1219, 1125, 1051.

¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7.87 (s, 1H, m), 7.42-7.33 (m, 7H), 7.29-7.19 (m, 3H), 6.27 (s, 1H, k), 5.49 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.59 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H, e), 2.18-2.15 (m, 2H), 1.65-1.60 (m, 2H), 1.31-1.25 (m, 4H).

¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 177.1, 176.9, 172.9, 169.0, 168.0, 157.5, 147.4, 145.3, 137.9, 134.4, 129.2, 129.2, 128.9, 128.5, 128.2, 126.6, 120.7, 120.1, 54.5, 39.0, 37.6, 36.2, 28.2

MS (ESI) exact mass calcd for C₃₁H₃₃N₆O₄ m/z 553.26 found m/z 553.20 [M+H]⁺



To a 25 mL sealed round bottom flask equipped with a stir bar, *tert*-butyl (4-cyanobenzyl)carbamate²⁶ (232 mg, 1 mmol, 1 equiv.) were solubilized in dry DMF (2.4 mL). The mixture was degassed with argon and formamidine acetate (3.240 g 30 mmol, 30 equiv.), anhydrous hydrazine (4.8 mL, 50 mmol, 50 equiv.) and Zn(OTf)₂ (546 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) were added. The vessel was sealed and the mixture was stirred in an oil bath at 40 °C for 36 h. The consumption of *tert*-butyl

²⁶ Z. Luo, A. J. Rosenberg, H. Liu, J. Han, Z. Tu, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, 150, 796–808.

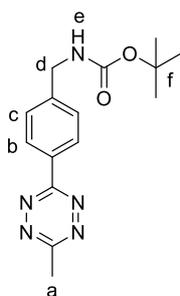
Partie expérimentale

(4-cyanobenzyl)carbamate was monitored by HPLC (system QC). The reaction solution was cooled to room temperature and the cap was removed. Sodium nitrite (1.38 mg, 20 mmol, 20 equiv.) in 20 mL of water was slowly added to the solution and followed by slow addition of 1M HCl during which the solution turned bright red in color and gas evolved. Addition of 1M HCl continued until gas evolution ceased and the pH value is 3. (Caution! This step generates a large amount of toxic nitrogen oxide gasses and should be performed in a well-ventilated fume hood). The mixture was extracted with EtOAc and the organic phase dried over magnesium sulfate. The EtOAc was removed using rotary evaporation and the residue purified using silica column chromatography (Hexane:EtOAc, 7:1, v/v) to give the product (142.7 mg, 0.5 mmol, 50%) as pink solid.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ , 10.21 (s, 1H, a), 8.60 (d, $J = 10$ Hz, 2H, b), 7.53 (d, $J = 10$ Hz, 2H, c), 4.45 (2H, d, $J = 5$ Hz, d), 1.49 (s, 9H, f)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 39.07, 51.82, 118.84, 119.19, 120.76, 132.11, 141.12, 142.56, 149.360

HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z calcd. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}]^+$ + 310.1276, found 310.1274.



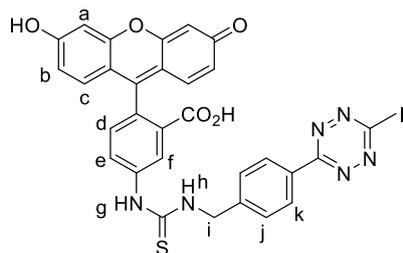
To a 25 mL sealed round bottom flask equipped with a stir bar, *tert*-butyl (4-cyanobenzyl)carbamate²⁶ (232 mg, 1 mmol, 1 equiv.) was dissolved in dry DMF (2.4 mL). The mixture was degassed with argon and ACN (1.23 mL, 30 mmol, 30 equiv.), anhydrous hydrazine (4.8 mL, 50 mmol, 50 equiv.), and of $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ (546 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) were added. The vessel was sealed and the mixture was stirred in an oil bath at 40 °C for 36 h. The consumption of *tert*-butyl (4-cyanobenzyl)carbamate was monitored by HPLC (system QC). The reaction solution was cooled to room temperature and the cap was removed. Sodium nitrite (1.38 mg, 20 mmol, 20 equiv.) in 20 mL of water was slowly added to the solution and followed by slow addition of 1M HCl during which the solution turned bright red in color and gas evolved. Addition of 1M HCl continued until gas evolution ceased and the pH value is 3. (Caution! This step generates a large amount of toxic nitrogen oxide gasses and should be performed in a well-ventilated fume hood). The mixture was extracted with EtOAc and the organic phase dried over magnesium sulfate. The EtOAc was removed using rotary evaporation and the residue purified using silica column chromatography (Hexane:EtOAc, 4:1, v/v) to give the product (108.5 mg, 0.36 mmol, 36%) as pink solid.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (d, $J = 5$ Hz, 2H, b), 7.50 (d, $J = 10$ Hz, 2H, c), 4.43 (d, $J = 5$ Hz, 2H, d), 3.09 (s, 3H, a), 1.48 (s, 9H, f),

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 32.25, 38.06, 50.80, 79.14, 117.74, 117.84, 119.89, 130.54, 140.12, 146.42, 149.08

HRMS $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z calcd. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}]^+$ + 324.1429, 324.1431.

Partie expérimentale



To a solution of the tetrazine **74** (27 mg, 0.141 mmol, 1 equiv.) in mixture of dry THF/MeOH (1 mL / 1 mL) were added FITC (40 mg, 0.128 mmol, 1 equiv.) and DIEA (72 μ L, 0.412 mmol, 4 equiv.). The reaction was stirred 2 h at room temperature. After the reaction was completed, the crude product was evaporated under vacuum and the residue was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). The product-

containing fractions were lyophilized to give (20.2 mg, 0.044, 31%) of the product as an orange amorphous powder.

Mp = 198 °C (degradation)

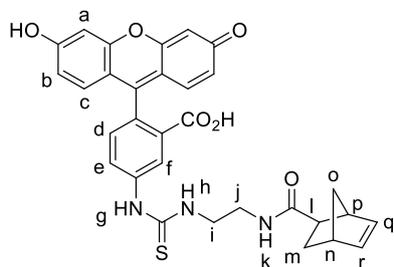
IR (neat cm⁻¹) 2987, 2907, 2347, 1680, 1533, 1407, 1267, 1047.

¹H NMR (300 MHz, MeOD [D₄]) δ 8.51 (d, J = 8.3 Hz, 2H, k), 8.30 (s, 1H), 7.90 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.3 Hz, 2H, j), 7.24 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.74 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H, i), 3.13 – 2.95 (s, 3H, l).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ 182.19, 178.86, 177.86, 177.70, 172.17, 169.30, 167.30, 163.81, 160.30, 154.90, 141.40, 130.98, 130.21, 128.80, 128.03, 127.56, 114.64, 112.28, 102.04, 19.65.

HRMS (ESI) exact mass calcd for C₃₁H₂₁N₆O₅S m/z 589.1294 found m/z 589.1302 [M+H]⁺

HPLC (system QC): t_R = 28.117min (99 % purity).



To a solution of FITC (40 mg, 0.108 mmol, 1 equiv.) in a dry mixture of THF/MeOH (2 mL, 1:1, v/v) were added (1R,4R)-N-(2-aminoethyl)bicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2-carboxamide²⁷ (20.4 mg, 0.113 mmol, 1.1 eq.) and DIEA (72 μ L, 0.412 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. After the reaction was completed (monitoring by RP-HPLC system QC), the crude product was evaporated under vacuum and the residue

was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system B). The product-containing fractions were lyophilized to give the product (39.4 mg, 0.069 mmol, 64%) as an orange amorphous powder.

Mp = 167 °C

IR (neat): 3667, 2958, 2540, 1661, 1595, 1542, 1520, 1456, 1384, 1306, 1260, 1184, 1131, 1077, 997, 850.

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.28 (d, J = 1.7 Hz, 1H, f), 7.87 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H, e), 7.26 (d, J = 8.2 Hz, 1H, d), 7.10 (d, J = 8.9 Hz, 2H, a), 6.96 (d, J = 2.3 Hz, 2H, c), 6.82 (dd, J = 8.9, 2.3 Hz, 2H, b), 6.15 (dd, J = 5.7, 2.9 Hz, 1H, q or r), 5.91 (dd, J = 5.7, 2.9 Hz, 1H, q or r), 3.74 (t, J = 6.0, 2H), 3.41 (t, J = 6.0,

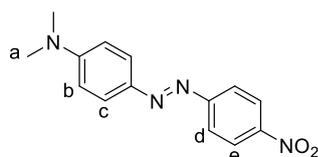
²⁷ C. Meyer, S. Liebscher, F. Bordusa, *Bioconjugate Chemistry* **2016**, *27*, 47–53.

Partie expérimentale

2H), 3.17 (s, 1H), 2.93 (dt, $J = 9.1, 3.9$ Hz, 1H), 2.86 (s, 1H), 1.86 (ddd, $J = 12.9, 9.3, 3.7$ Hz, 1H), 1.46–1.21 (m, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 183.21, 177.83, 169.56, 166.18, 160.85, 156.99, 142.65, 138.66, 133.08, 132.06, 130.60, 128.29, 123.38, 119.08, 116.84, 115.27, 114.41, 103.44, 50.76, 47.55, 45.48, 43.96, 39.96, 30.00.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ m/z 568.1542 [M-H] $^-$; found m/z 568.1540.



To a solution of commercial para-nitroaniline (100 mg, 0.72 mmol, 1 equiv.) in freshly distilled CH_3CN (1 mL), cooled at 0°C was added NOBF_4 (92.5 mg, 0.79 mmol, 1.1 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at 0°C for 15 min. Thereafter, a solution of *N,N*-diethylaniline (104.2 mg, 0.86 mmol, 1.2 equiv) in freshly distilled CH_3CN (0.5 mL) was added dropwise and the resulting mixture was stirred 30 min at room temperature. Aq. 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) was then added slowly until a precipitate was appeared. The orange solid was recovered by filtration and washed with a (1:1, v/v) mixture of H_2O -ACN and cold Et_2O to give the diazo compound as a red amorphous solid (111 mg, 0.41 mmol, 57%).

Mp = 228°C

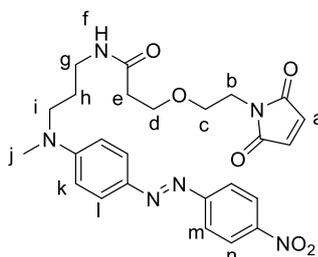
IR (neat): $\nu = 1600, 1510, 1366, 1332, 1307, 1135, 1103, 858, 824, 688, 531$ cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.32$ (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, e), 7.92 (m, 4H, c and d), 6.76 (d, $3J = 8.9$ Hz, 2H, b), 3.13 (s, 6H, a) ppm

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 157.0, 153.5, 147.5, 143.9, 126.2, 124.8, 122.7, 111.6, 40.4$ ppm

LRMS (ESI+): calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2$ [M + H] $^+$ 271.12 found: 271.33

UV-vis (in ACN at 25°C): $\lambda_{\text{max}} = 478$ nm, $\lambda(478 \text{ nm}) = 41\,000$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$



To a solution of (*E*)-*N*1-methyl-*N*1-(4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)propane-1,3-diamine (34 mg, 0.107 mmol, 1 equiv.) in dry THF (1 mL), were added 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl) ethoxy)propanoate²⁸ (50 mg, 0.161 mmol, 1.5 equiv), and triethylamine (30 μL , 0.215 mmol, 2 equiv). The resulting reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was then diluted in DCM and washed three times with a saturated solution of NaHCO_3 and three times with a saturated solution of NH_4Cl . The organic phase was dried over magnesium sulfate. The DCM was removed using rotary evaporation and the residue purified using silica column chromatography (Acetone 100%) to give product (14 mg, 0.028 mmol, 26%) as a red amorphous powder

²⁸ A. Warnecke, I. Fichtner, D. Garmann, U. Jaehde, F. Kratz, *Bioconjugate Chemistry* **2004**, *15*, 1349–1359.

Partie expérimentale

Mp = 114 °C

IR (neat): 3280, 3087, 2927, 2873, 1704, 1600, 1584, 1556, 1510, 1417, 1373, 1326, 1307, 1259, 1132, 1096, 966, 857, 822.

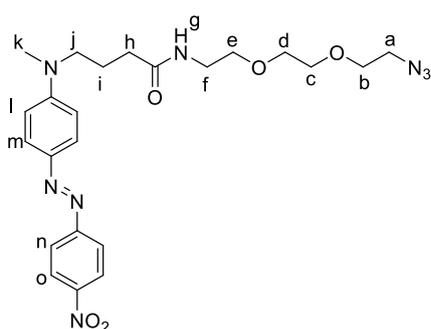
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (d, J = 9.1 Hz, 2H, n), 7.90 (dd, J = 9.1, 7.7 Hz, 4H, l and m), 6.76 (d, J = 9.1 Hz, 2H, k), 6.64 (s, 2H, a), 6.41 (s, 1H, f), 3.73 (t, J = 5.2 Hz, 2H, j), 3.67 (t, J = 5.6 Hz, 2H, i), 3.60 (t, J = 5.2 Hz, 2H, h), 3.56 – 3.49 (t, J = 5.6 Hz, 2H, g), 3.33 (q, J = 5.6 Hz, 2H, e), 3.11 (s, 3H, d), 2.42 (t, J = 5.6 Hz, 2H, c), 1.91 (q, J = 5.6 Hz, 2H, b).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171.69, 170.81, 156.94, 152.49, 147.52, 143.80, 134.32, 126.31, 124.83, 122.74, 111.56, 68.61, 67.20, 50.38, 38.90, 37.70, 37.49, 37.31, 27.45.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_6$ m/z 509.2160 found m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 509.2149

^{13}C NMR (75 MHz, MeOD [D_4]) δ 168.77, 150.43, 146.06, 138.84, 130.37, 128.91, 124.75, 97.00, 34.50, 33.16, 14.17.

HRMS (ESI) exact mass calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ m/z 523.1474 found m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ 523.1484



To a solution of (E)-4-(methyl(4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)amino)butanoic acid²⁹ (164 mg, 0.478 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (5 mL) were successively added 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethan-1-amine (100 mg, 0.574 mmol, 1.2 eq.), HBTU (218 mg, 0.574 mmol, 1.2 equiv.) and DIEA (333 μL , 1.912 mmol, 4 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 4 h. After completion the mixture was diluted with AcOEt and washed three times with water. The aqueous layer was extracted with DCM. The organic layer was dried

over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/AcOEt from 100:0 to 70:30, v/v) to obtain the desired product. (250.3 mg, 0.478 mmol, quantitative yield) as a dark red amorphous powder.

Mp = 54 °C

IR (neat): 2913, 2107, 1733, 1598, 1585, 1510, 1364, 1325, 1306, 1182, 1131, 1101, 1079, 1038, 952, 930, 858, 822.

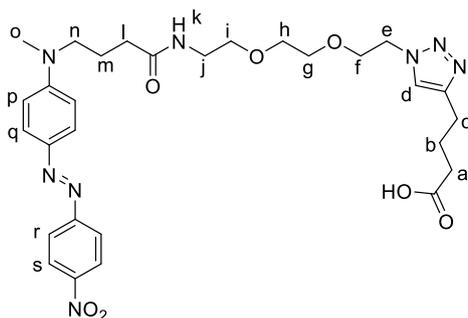
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.39 – 8.23 (m, 2H, o), 7.99 – 7.76 (m, 4H, m and n), 6.86 – 6.72 (m, 2H, l), 4.29 – 4.20 (m, 2H), 3.77 – 3.62 (m, 8H), 3.55 – 3.45 (m, 2H), 3.39 – 3.30 (m, 2H), 3.09 (s, 3H, k), 2.42 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 1.98 (dt, J = 14.5, 7.1 Hz, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172.93, 156.85, 152.48, 147.37, 143.76, 126.24, 124.70, 122.64, 111.47, 70.73, 70.62, 70.13, 69.22, 63.73, 51.68, 50.70, 38.68, 31.16, 22.27.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ m/z 499.2001 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found m/z 499.2007.

²⁹ K. Renault, L.-A. Jouanno, A. Lizzul-Jurse, P.-Y. Renard, C. Sabot, *Chemistry - A European Journal* **2016**, *22*, 18522–18531.

Partie expérimentale



To a solution of (E)-N-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(methyl(4-((4-nitrophenyl)diazenyl)phenyl)amino)butanamide (100 mg, 0.20 mmol, 1 equiv.) in dry DMF (2 mL) were added hex-5-ynoic acid (26.6 μ L, 0.240 mmol, 1.2 eq.), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg, 0.02 mmol, 0.1 equiv.) and sodium ascorbate (7.9 mg, 0.04 mmol, 0.2 equiv.). The mixture was stirred at room temperature for 1 h. After completion the mixture was diluted with DCM and washed three times with water. The organic layer was dried over MgSO_4 and concentrated under reduced

pressure. The crude material was purified by flash column chromatography on silica gel (DCM/MeOH from 100:0 to 90:10, v/v) to obtain the desired product. (119.7 mg, 0.196 mmol, 98%) as a dark red amorphous powder.

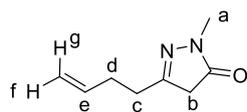
Mp = 77 $^{\circ}\text{C}$

IR (neat): 3660, 3133, 2913, 1723, 1693, 1602, 1510, 1386, 1335, 1257, 1167, 1141, 1097, 1066, 985, 965, 858, 826.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.37 – 8.25 (d, J = 9.3 Hz, 2H, s), 7.91 (dt, J = 9.2, 4.2 Hz, 4H, q and r), 7.48 (s, 1, d), 6.77 (d, J = 9.3 Hz, 2H, p), 4.48 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 4.28 – 4.17 (m, 2H), 3.83 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.64 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 3.59 (s, 4H), 3.56 – 3.41 (m, 4H), 3.09 (s, 3H), 2.79 (s, 2H), 2.41 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.98 (m, 4H), 1.24 (dd, J = 9.0, 5.0 Hz, 2H).

Hz, MeOD) ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 173.02, 156.86, 152.51, 147.41, 143.77, 126.26, 124.74, 122.67, 111.52, 70.53, 70.45, 69.57, 69.14, 63.61, 51.66, 50.28, 38.69, 31.17, 24.71, 22.27.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_7$ m/z 611.2645 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found m/z 611.2641



To a solution of ethyl 3-oxohept-6-enoate (150 mg, 0.88 mmol, 1 equiv.) in EtOH (3 mL) was added N-methylhydrazine (56 μ L, 1.06 mmol, 1.2 eq.) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 30 min.

The crude material was concentrated under reduced pressure to obtain the desired product (137.8 mg, 0.88 mmol, quantitative yield) as a yellowish oil.

Mp = oil

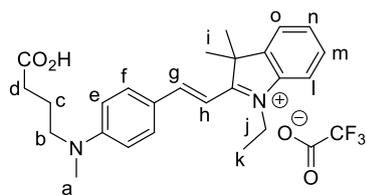
IR (neat): 3077, 2924, 2847, 1700, 1584, 1432, 1400, 1294, 1103, 995, 911.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5.81 (ddt, J = 16.7, 10.2, 6.6 Hz, 1H, e), 5.06 (ddt, J = 10.2, 6.6, 1.5 Hz, 2H, f et g), 3.27 (s, 3H, a), 3.16 (s, 2H, b), 2.50 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.40 – 2.27 (t, J = 7.2 Hz, 2H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 172.34, 158.76, 136.60, 116.28, 40.37, 30.69, 30.50, 22.79.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}$ m/z 153.1028 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found m/z 153.1022.

Partie expérimentale



Under nitrogen atmosphere, POCl_3 (2.8 mL, 27.7 mmol, 2.5 eq.) was carefully added to anhydrous DMF (5.6 mL, 72 mmol, 6.5 equiv.) and the mixture was stirred at 0 °C for 30 min to lead to an orange solution mixture. Then commercial 4-(methyl(phenyl)amino)butanoic acid (2.135 g, 11.06 mmol, 1 eq.) dissolved in anhydrous DMF (6 mL) was added and the reaction mixture was stirred for 4 h

at room temperature. After completion, 80 mL of iced water was added and the mixture was stirred 12 h. The aqueous phase was extracted with DCM (4 × 30 mL) and the combined organic phase was washed with brine, dry over MgSO_4 and was evaporated under vacuum. The crude product was directly engaged in next step without further purifications.

To a solution of 4-((4-formylphenyl)(methyl)amino)butanoic acid (1.2617 g, 5.71 mmol, 1 equiv.) in absolute EtOH (55 mL) was added 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium iodide (1.803 g, 5.71 mmol, 1 equiv.) The mixture was stirred overnight at reflux. After completion, the reaction was concentrated under vacuum and purified by Interchim® (Systeme D). The product-containing fractions were lyophilized to obtain the desired product (2.88 g, 2.74 mmol, 48%) as a dark purple amorphous powder.

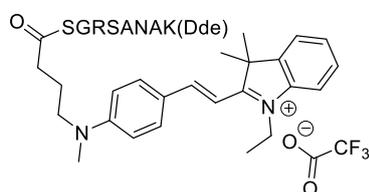
Mp = 94 °C

IR (neat): 2933, 1807, 168, 1572, 1527, 1465, 1394, 1369, 1289, 1181, 1169, 1129, 1111, 1089, 1042, 822.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.54 – 7.32 (m, 4H), 7.06 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.43 (q, J = 6.7 Hz, 2H, j), 3.64 – 3.42 (t, J = 6.5 Hz, 2H, b), 3.12 (s, 3H, a), 2.43 (t, J = 6.5 Hz, 2H, d), 1.93 (q, J = 6.5 Hz, 2H, c), 1.75 (s, 6H, i), 1.52 (t, J = 6.7 Hz, 3H, k).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 178.22, 155.26, 155.11, 142.30, 140.85, 129.43, 127.87, 122.67, 122.48, 113.05, 112.64, 103.36, 51.95, 51.07, 41.03, 38.73, 31.19, 27.70, 22.49, 13.11.

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$ m/z 391.2386 $[\text{M}]^+$; found m/z 391.2384.



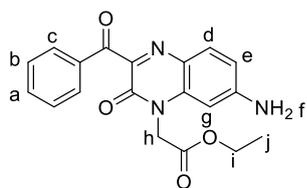
To a solution of peptide substrate of urokinase (20 mg, 0.021 mmol, 1 equiv.) in NMP (280 μL) were successively added (E)-2-(4-((3-carboxypropyl)(methyl)amino)styryl)-1-ethyl-3,3 dimethyl-3H-indol-1-ium (12 mg, 0.023 mmol, 1.1 equiv.), PyBOP (12 mg, 0.023 mmol, 1.1 equiv.) and DIEA (18 μL , 0.105 mmol, 5 equiv.). The mixture was

stirred for 2 h at room temperature. After checking by RP-HPLC (systeme QC), the reaction was diluted with aq 0.1% TFA and purified by semi-preparative RP-HPLC (system C). The product-containing fractions were lyophilized to obtain the product (21.36 mg, 0.0149 mmol, 71%) of the product as a dark purple amorphous powder.

HPLC (system QC): t_R = 25.650 min (96.56% purity).

HRMS (ESI+): calcd. for $\text{C}_{65}\text{H}_{97}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$ m/z 1325.7370 $[\text{M}]^+$; found m/z 1325.7379.

Partie expérimentale



To a solution of ethyl 2-(3-benzoyl-7-nitro-2-oxoquinoxalin-1(2H)-yl)acetate (488 mg, 1.28 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (9.8 mL), was added anhydrous MeOH (9.8 mL) and Pd/C (136 mg, 0.128 mmol, 0.1 equiv.) under H₂ atmosphere. The mixture was stirred for 2 h at 0 °C. After completion the mixture was filtered under celite®, and washed with DCM and MeOH to obtain the desired product (431.7 mg, 1.23 mmol 96%) was obtained as brown amorphous powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 7.93 – 7.82 (m, 2H, c), 7.74 – 7.64 (m, 1H, a), 7.60 – 7.42 (m, 3H, g et b), 6.71 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H, e), 6.52 (s, 2H, f), 6.40 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, d), 4.97 (s, 2H, h), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, i), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, j).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*D*₆): δ = 191.88, 167.24, 153.74, 153.13, 144.22, 135.94, 135.66, 133.86, 132.03, 129.52, 128.76, 123.91, 112.64, 94.89, 61.48, 43.12, 13.99.

Depuis quelques décennies, l'étude de systèmes biologiques complexes est un domaine en plein essor. Ainsi, des outils de ligation des biomolécules avec des *reporters* chimiques ont été mis en place afin d'avoir une compréhension toujours fine du vivant. Les ligations sont des réactions chimiques biocompatibles permettant de lier deux entités synthétiques ou biologiques entre elles. On regroupe généralement ces ligations en deux catégories, les réactions de bioconjugaison, qui font intervenir des fonctions chimiques naturellement présentes dans les biomolécules, et les réactions bio-orthogonales qui n'interfèrent pas avec les fonctions chimiques présentes dans ces milieux, mais nécessitent en amont une modification des partenaires de réaction. Cependant, il convient de faire la distinction avec une troisième catégorie, les réactions de conjugaison chimiosélectives, qui mettent en œuvre des fonctions non naturellement présentes sur les biomolécules. En ce sens, elles se rapprochent donc des réactions bio-orthogonales, mais les fonctions ou conditions mises en jeu ne sont pas suffisamment bio-orthogonales ou les réactions ne sont pas suffisamment rapides pour pouvoir être réalisées dans les systèmes biologiques. Ces ligations sont toutefois très utilisées pour de la construction biomoléculaire allant de la petite molécule (par exemple oligopeptide modifié) à la biomacromolécule (type protéine modifiée) et se distinguent par une facilité de mise en œuvre et purification des conjugués, ce qui n'est pas toujours réalisable avec l'arsenal des réactions bio-orthogonales qui conduisent à la formation de multiple isomères.

Ainsi, mes travaux de thèse se sont orientés vers la découverte et/ou l'étude de ligations chimiosélectives ainsi qu'à leur utilisation dans la préparation de sondes fluorescentes voire fluorogéniques. L'étude de la ligation Kondrat'eva préalablement développée au sein du laboratoire, a permis de mettre en évidence son caractère fluorogénique, et a été exploitée pour le marquage fluorescent de molécules *via* une étape unique de ligation fluorogénique. Puis, le développement d'une ligation utilisant le système tétrazine/pyrazolone a été développée afin de pallier le manque de sélectivité des réactions basées sur le motif tétrazine proposées jusqu'alors, qui conduisent à aux bioconjugués sous la forme d'un mélange de produits. Cette approche a été illustrée par le marquage fluorescent d'une protéine humaine. Enfin, le développement d'une nouvelle voie d'accès aux quinoxalinones a permis leur étude photophysique et la mise en évidence de propriétés fluorogéniques utilisées notamment pour la synthèse d'une biosonde.

Mots clés : bioconjugaison, ligation chimiosélective, Diels-Alder, fluorescence, quinoxalinones.

In recent decades, the study of complex biological systems has been a growing field. Thus, biomolecules ligation tools with chemical reporters were set up in order to have a better and fine understanding of the living. Ligations are biocompatible chemical reactions that link two synthetic or biological entities one another. These ligations are generally gathered into two categories, bioconjugation reactions, using chemical functions naturally present in the biomolecules, and bio-orthogonal reactions which does not interfere with these function, but require a prior engineering of the biological partner. However, it is necessary to distinguish a third category, the chemoselective conjugation reactions, which implement functions not naturally present on biomolecules. In this sense, they are therefore closer to bio-orthogonal reactions, but the functions or conditions involved are not sufficiently bio-orthogonal or the reactions are not fast enough to be carried out in any biological systems. These ligations are, however, widely used for biomolecular constructions ranging from the small molecule (for example modified oligopeptides) to the biomacromolecule (protein modification) and are distinguished by their ease of implementation and purification of the conjugates, which is not always feasible with the arsenal of bio-orthogonal reactions that leads to the formation of multiple isomers.

Thus, my PhD work focused on the discovery and/ or the study of chemoselective ligations as well as their use in the preparation of fluorescent or fluorogenic probes. The study of the Kondrat'eva ligation previously developed within the laboratory, highlighted its fluorogenic behaviour, and was exploited for the fluorescent labelling of molecules through a single fluorescence-ligation step. Then, the development of a ligation using the tetrazine / pyrazolone system was developed in order to overcome the lack of selectivity of the reactions based on the tetrazine scaffold which often lead to the formation of bioconjugates as a mixture of isomers. This approach has been illustrated by the fluorescent labelling of a human protein. Finally, the development of a new access route to quinoxalinones allowed to study their photophysical properties and to highlight their fluorogenic properties which were leveraged in particular for the synthesis of a bioprobe.

Keywords: bioconjugation, chemoselective ligation, Diels-Alder, fluorescence, quinoxalinones.